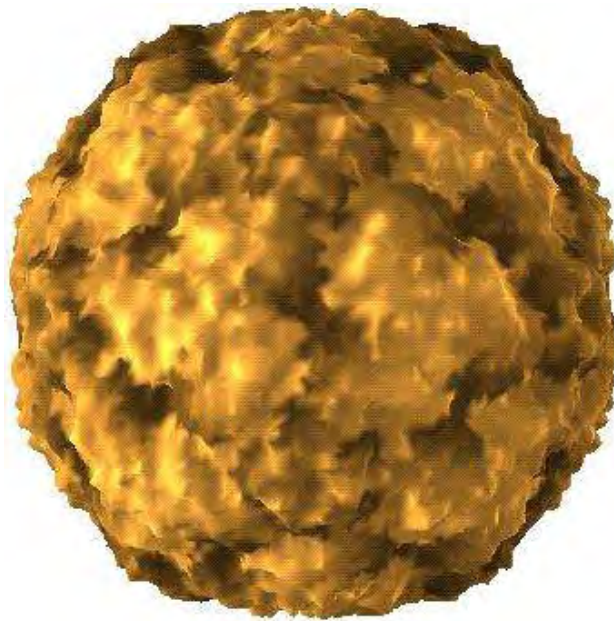


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΙΣ 5'-NTR ΚΑΙ VP1
ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΠΟΛΙΟΪΩΝ**



ΓΟΡΓΟΓΙΕΤΑΣ ΒΥΡΩΝ

Επιβλέπων καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία
με έμφαση στη Βιοτεχνολογία**

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ Καθηγητής, Γενετική Ζωικών Πληθυσμών

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ Λέκτορας, Βιοτεχνολογία Μικροβίων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας *Picornaviridae*. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και αντιγράφονται με την ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Οι πολιοϊοί διακρίνονται σε τρεις οροτύπους (PV1, PV2, PV3) και είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Από το 1960 χρησιμοποιούνται δύο εμβόλια για την εξάλειψη της ασθένειας, αρχικά το IPV (inactivated polio vaccine) και κατόπιν το πιο αποτελεσματικό OPV (oral polio vaccine). Ωστόσο, το OPV εμφάνισε το μειονέκτημα της εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: vaccine-associated paralytic poliomyelitis) μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμού στο γένωμα των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών Sabin. Πολλές μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά τον εντοπισμό μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμού στο γένωμα στελεχών Sabin που απομονώθηκαν από περιπτώσεις VAPP ή από υγιή εμβολιασμένα άτομα προκειμένου να συσχετισθούν με την αύξηση της νευρομολυσματικότητας.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 9 κλινικά δείγματα Sabin που προέρχονταν από ασθενείς που είχαν εμβολιαστεί με το OPV. Συγκεκριμένα τα δείγματα μελετήθηκαν για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στις 5'-NTR και VP1 περιοχές του ιικού γενώματος όπου βρίσκονται οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin στελεχών. Προκειμένου να μελετήσουμε αυτές τις δύο γενωμικές περιοχές ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία: εκχύλιση του ιικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA και μετατροπή σε cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της κάθε περιοχής και αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των αλληλουχιών των δειγμάτων με ειδικά προγράμματα βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και και τυχόν αμινοξικών αλλαγών. Τέλος, μετά τον εντοπισμό των αμινοξικών αλλαγών, επιτεύχθηκε απεικόνιση των θέσεων των αμινοξικών αλλαγών της VP1 περιοχής, με τη χρήση κατατεθειμένων τρισδιάστατων δομών προτύπων στελεχών ώστε να εντοπιστεί η θέση τους στο ικό καψίδιο και να μπορεί να προβλεφθεί η επίδρασή τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών.

Στην VP1 περιοχή το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων ήταν συνώνυμες το οποίο συμφωνεί με το γενικό πρότυπο των μεταλλάξεων των πολιοϊών. Η πλειοψηφία των αμινοξικών αλλαγών εντοπίζεται στο εξωτερικό του καψιδίου. Γενικά οι αμινοξικές αλλαγές επηρεάζουν είτε την αλληλεπίδραση ιού-αντισωμάτων είτε τα αρχικά στάδια του κύκλου

ζωής των πολιοϊών (αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα, απελευθέρωση του ιικού RNA στο κύτταρο ξενιστή).

Σχεδόν όλα τα στελέχη εμφανίζουν ποσοστό απόκλισης της VP1 αλληλουχίας τους από την αντίστοιχη αλληλουχία των πρότυπων εμβολιακών στελεχών μικρότερη του 1% και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως Sabin-like.

Στην 5'-NTR περιοχή οι μεταλλάξεις εντοπίζονται τόσο σε μονόκλωνες όσο και σε δίκλωνες περιοχές του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου απαραίτητου για την μετάφραση των πολιοϊών. Οι μεταλλάξεις βρίσκονται σε θέσεις που αποτελούν τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin στελεχών είτε σε άλλες θέσεις με μικρότερη επίδραση στον φαινότυπο, αλλά όλες δρουν τροποποιώντας την αναδίπλωση του RNA και επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ του RNA και παραγόντων του ξενιστή απαραίτητων για την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος. Για παράδειγμα η μετάλλαξη C583G στα στελέχη Sabin τύπου 1 επηρεάζει την αλληλεπίδραση του κυτταρικού πεπτιδίου p52 με την περιοχή VI του IRES γενετικού στοιχείου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1) ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΠΟΛΙΟΙΩΝ
 - A) ταξινόμηση
 - B) δομή ιικών σωματιδίων
 - Γ) οργάνωση ιικού γενώματος
- 2) ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΠΟΛΙΟΙΩΝ
 - A) υποδοχέας cd-155 και είσοδος ιού στο κύτταρο
 - B) μετάφραση ιικού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία
 - Γ) αντιγραφή ιικού RNA
 - Δ) καψίδωση και απελευθέρωση νέων ιών
- 3) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΠΟΛΙΟΙΩΝ
 - A) μεταλλάξεις
 - B) ανασυνδιασμοί
- 4) ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
- 5) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
- 6) ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΙΩΝ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 1) ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
- 2) ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΩΝ
- 3) ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA
- 4) ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)
- 5) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)
- 6) ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR
- 7) ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR
- 8) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 1) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR
- 2) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ
- 3) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ RASMO
- 4) ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ 5'-UTR ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1) ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΠΟΛΙΟΙΩΝ

A) Ταξινόμηση

Οι πολιοιοί αποτελούν μέλη της οικογένειας Picornaviridae και πιο συγκεκριμένα ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών (Enterovirus).

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

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας *Picornaviridae*.

Στο πιο πρόσφατο σύστημα ταξινόμησης των εντεροϊών (το οποίο λαμβάνει υπόψη τόσο μοριακές όσο και βιολογικές ιδιότητες των ιών), οι εντεροιοί ταξινομούνται σε 5 είδη.

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

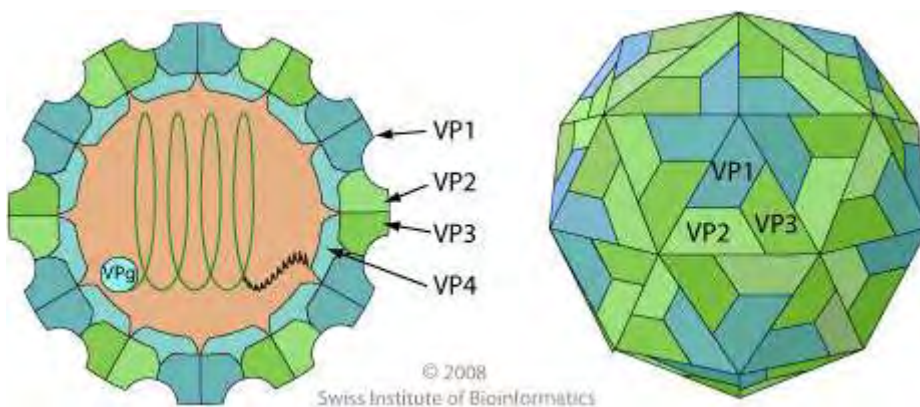
Πίνακας 2: Ταξινόμηση των εντεροϊών με βάση βιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά τους

B) Δομή ιικών σωματιδίων

Το ιικό σωματίδιο αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA μόριο θετικής πολικότητας, το οποίο περιβάλλεται από μη ελυτροφόρο πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Το καψίδιο αποτελείται από 60 αντίγραφα κάθε μιας από τις 4 δομικές πρωτεΐνες VP1,VP2,VP3,VP4. Αυτές οι πρωτεΐνες προκύπτουν ως προϊόν της πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης P1. Η P1 (πρόδρομη πολυπρωτεΐνη) κατά την πρωτεόλυση, τεμαχίζεται στα πολυπεπτίδια VP0,VP1,VP3, τα οποία συναθροίζονται δημιουργώντας το πενταμερές (VP0,VP1,VP3)₅. Τα πενταμερή κατόπιν συναρμολογούνται ώστε να σχηματιστεί το προκαψίδιο [(VP0,VP1,VP3)₅]₁₂. Στο στάδιο της καψιδίωσης, (στο οποίο το RNA πακετάρεται εντός των ιικών σωματιδίων), πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης, στην οποία η πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP4 και VP2. Το ώριμο πλέον καψίδιο σταθεροποιείται εμφανίζοντας ανθεκτικότητα σε πρωτεολυτικά ένζυμα, ισχυρά απορρυπαντικά και χαμηλό pH. (1)

Το ώριμο καψίδιο επίσης χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη 3 αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5x) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3x) και διμερής (2x) αντίστοιχα άξονες συμμετρίας. Ειδικότερα ο πενταμερής άξονας συμμετρίας περιβάλλεται από πέντε μόρια της VP1, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 είναι η μικρότερη δομική πρωτεΐνη σε σχέση με τις υπόλοιπες (VP1,VP2,VP3) και βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου.(2)



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των VP1,VP2,VP3 όπως και οι περισσότερες Θηλιές τους, εκτίθενται στο εξωτερικό του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Γνωρίζουμε 4 αντιγονικές θέσεις :

- N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1
- N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-226 της VP1 και 164-172, 270 της VP2
- N-AgIIIa αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60 και 71-73 της VP3
- N-AgIIIb αποτελείται από τα αμινοξέα 76-79 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.(1)

Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 .

Η αύλακα (canyon), είναι μια βαθιά επιφανειακή κοιλότητα, η οποία περιβάλλεται από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας (δηλαδή από 5 VP1 πρωτεΐνες). Αυτή η αύλακα αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα του κυττάρου.(2)

Γ) Οργάνωση ιικού γενώματος

Το γένωμα των πολιοιών είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA, θετικής πολικότητας και μεγέθους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3' άκρο του και συνδέεται με μια μικρή πρωτεΐνη VPg στο 5' άκρο του .(3)

Η χρήση του RNA ως μέσω αποθήκευσης της γενετικής πληροφορίας προσδίδει στους πολιοιούς διάφορα μειονεκτήματα έναντι της χρήσης DNA :

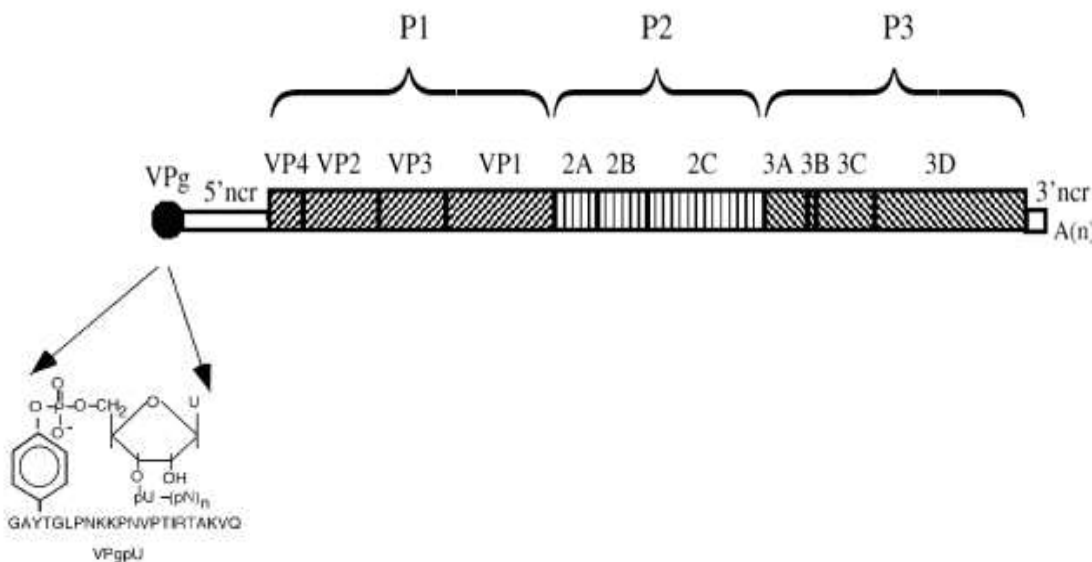
A) το RNA είναι χημικά ασταθέστερο από το DNA

B) κατά την είσοδο του στο κύτταρο , το RNA είναι πιο ευαίσθητο προς τροποποίηση ή αποικοδόμηση από διάφορα κυτταρικά ένζυμα.

Γ) οι RNA ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν κυτταρικές λειτουργίες επιδιόρθωσης , ώστε να διορθώσουν τα λάθη που συμβαίνουν τυχαία κατά την αντιγραφή του γενώματος.

Γι' αυτό το λόγο οι RNA ιοί πρέπει να επιβιώνουν σε υψηλούς ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης.

Για να αντισταθμιστεί αυτό το μειονέκτημα όλοι οι RNA ιοί , όπως και οι πολιοιοί ,περιόρισαν το μέγεθος των γενωμάτων τους (στις περισσότερες περιπτώσεις είναι <15.000nt).Έτσι το μικρό γενωμικό μέγεθος και ο υψηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης δίνουν το πλεονέκτημα της γρήγορης αντιγραφής και προσαρμογής σε ένα νέο περιβάλλον. Παρ' όλα αυτά όμως ,το μικρό μέγεθος του γενώματος προσδίδει το μειονέκτημα στους ιούς , ότι πρέπει να υπάρχουν κάτω από συνθήκες υπερβολικής γενετικής αυστηρότητας.(1)



Εικόνα 2: Οργάνωση του ιικού γενώματος. Επίσης φαίνεται η VPg ιική πρωτεΐνη (δομή και αλληλουχία στην αριστερή πλευρά) η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του ιικού RNA

Το γένωμα των πολιοιών οργανώνεται ως εξής : ένα μεγάλο ανοικτό πλαίσιο ORF, το οποίο έχει εκατέρωθεν δυο μη κωδικές περιοχές UTR (5' άκρο και 3' άκρο). Η ολοκληρωμένη νουκλεοτιδική αλληλούχιση του γενώματος των 3 οροτύπων των πολιοιών έδειξε έναν υψηλό βαθμό ομολογίας , παρ' όλο που συγκεκριμένες περιοχές (όπως αλληλουχίες στην 5' UTR περιοχή και αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του καψιδίου) είναι λιγότερο όμοιες.(3)

Η 5' UTR είναι μια περιοχή μεγέθους 742nt και πλούσιας σε δευτεροταγείς δομές. Τα 100 πρώτα nt σχηματίζουν την δομή cloverleaf ,η οποία αποτελεί ένα

απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας cis-δραστικό γενετικό στοιχείο. Τη δομή αυτή ακολουθεί ένα δεύτερο cis-δραστικό γενετικό στοιχείο, το IRES (internal ribosomal entry site), μεγέθους 400nt ,απαραίτητου για την έναρξη της μετάφρασης. Η αλληλουχία της 5' UTR περιοχής εμφανίζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των 3 οροτύπων των πολιοιών ,γεγονός το οποίο είναι σημαντικό για τη διατήρηση της δευτεροταγούς δομής και την συμμετοχή της σε σημαντικές διαδικασίες του ιού (εξαίρεση αποτελεί η αλληλουχία 154nt, που βρίσκεται μεταξύ της IRES δομής και του ORF, η οποία είναι λιγότερο διατηρημένη).(3)

Το mRNA των πολιοιών κωδικοποιεί ένα μεγάλο πολυπεπτίδιο (μονοκιστρονικό).Το πολυπεπτίδιο αυτό αποτελείται από πολλές λειτουργικές περιοχές ,οι οποίες ξεχωρίζουν μεταξύ τους κατά τη διαδικασία της πρωτεόλυσης,οδηγώντας στη παραγωγή των διαφόρων ιικών πρωτεϊνών.(3)

Ιικές πρωτεΐνες	Ρόλος-λειτουργία
VP1,2,3,4	Πρωτεΐνες καψιδίου
2A,3C,3CD	Πρωτεάσες
3D	RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση
2C	Ελικάση
2B,2BC,3AB,3A	Μετάφραση RNA

Πίνακας 3 Λειτουργία ιικών πρωτεϊνών

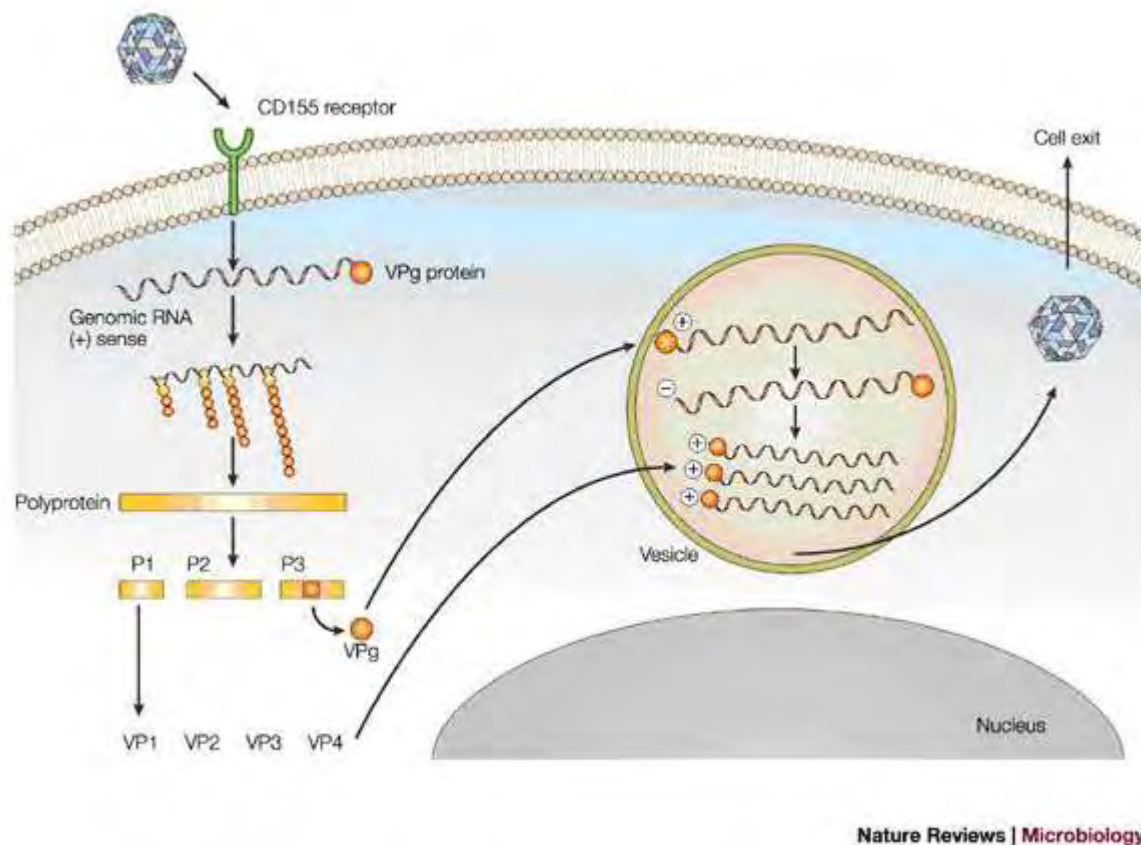
Η κωδικοποίηση ενός πολυπεπτιδίου από ένα μόριο mRNA παρέχει στους ιούς το πλεονέκτημα της περαιτέρω συμπίεσης του γενώματός τους , καθώς δεν απαιτούνται γενετικά στοιχεία για τη ρύθμιση της μεταγραφής υπογενωμικών mRNA. Επίσης ,λόγω του φαινομένου wobble του γενετικού κώδικα , η λανθασμένη ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην τρίτη θέση των κωδικονίων, τα οποία αποτελούν το ORF (85% του ιικού γενώματος) δεν είναι τόσο καταστροφική όσο οι μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές περιοχές. Από την άλλη ,η κωδικοποίηση ενός μόνο πολυπεπτιδίου έχει το μειονέκτημα ότι απαιτούνται πολύ εξειδικευμένες πρωτεάσες για την παραγωγή των τελικών ιικών πρωτεϊνών. (3)

Η 3' UTR περιοχή αποτελείται από 65nt και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου αρνητικής πολικότητας.(3)

ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΠΟΛΙΟΙΩΝ

Μετά την είσοδο του ιικού RNA στο κύτταρο αρχίζει η μετάφρασή του. Η πρωτεϊνοσύνθεση κορυφώνεται σε διάστημα 2-3 ωρών μετά τη μόλυνση. Στο ίδιο διάστημα εμφανίζονται κυστίδια στο κύτταρο, τα οποία επάγονται από συγκεκριμένες ιικές πρωτεΐνες. Η μέγιστη RNA σύνθεση καθυστερεί περίπου 1 ώρα σε σύγκριση με την πρωτεϊνοσύνθεση. Ένας μολυσματικός κύκλος διαρκεί (κάτω από ιδανικές συνθήκες σε κατάλληλα κύτταρα ξενιστές όπως ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα) 6-7 ώρες παράγοντας μέχρι και 1.000.000 νέα ιικά σωματίδια ανά κύτταρο. Συνοπτικά ο κύκλος ζωής των πολιοιών μπορεί να αποδοθεί στα ακόλουθα στάδια (1):

- 1) Ο ιός προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα cd-155 (μέσω της δομής canyon)
- 2) Η είσοδος του ιικού RNA στον ξενιστή πιθανώς συμβαίνει μέσω ενδοκύττωσης
- 3) Το ιικό RNA μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται μέσω πρωτεόλυσης στις λειτουργικές ιικές πρωτεΐνες. Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από το γενετικό στοιχείο IRES
- 4) Η παραγωγή της ιικής πρωτεΐνης 2BC οδηγεί στην εμφάνιση μεμβρανωδών κυστιδίων στα οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του RNA
- 5) Η αντιγραφή του RNA ακολουθεί το μονοπάτι RNA(+)-RNA(-)-RNA(+). Η έναρξη της RNA σύνθεσης απαιτεί την VPg ιική πρωτεΐνη ως primer
- 6) Τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA(+) μπορούν:
 - να χρησιμοποιηθούν στην πρωτεϊνοσύνθεση
 - να χρησιμοποιηθούν για αντιγραφή (προς παραγωγή νέων μορίων RNA)
 - να χρησιμοποιηθούν σε καψίδωση (παραγωγή νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων)
- 7) Τέλος, ακολουθεί η συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματιδίων



Εικόνα: 3 Κύκλος ζωής των πολιοϊών

A) Υποδοχέας cd-155 και είσοδος ιού στο κύτταρο

Η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα είναι, όπως προαναφέραμε, το πρωταρχικό γεγονός του κύκλου της ζωής των πολιοϊών. Στους ανθρώπους ο υποδοχέας πολιοϊών hPVR, έχει ταυτοποιηθεί ως μέλος της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και πρόκειται για μια γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 80KDa η οποία αποτελείται από τρεις εξωκυτταρικές περιοχές (V-C2-C2), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά.(4)

Ο hPVR, μέσω εναλλακτικού ματίσματος ,εκφράζεται σε τέσσερις ισομορφές : 2 ενσωματωμένες στη μεμβράνη (hPVRα και hPVRδ) και 2 εκκρινόμενες (hPVRβ και hPVRγ).(4)

Ο hPVR έχει διπλό ρόλο κατά τη μόλυνση των πολιοϊών : ευθύνεται τόσο για την πρόσδεση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια όσο και για την αποσταθεροποίηση του ιικού σωματιδίου μέσω μεταβολών στη διαμόρφωση του καψιδίου. Αυτές οι μεταβολές περιλαμβάνουν απώλεια της εσωτερικής πρωτεΐνης VP4 κι εξώθηση του εσωτερικού N-τελικού άκρου της VP1.

Αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών είναι ότι τα ιικά σωματίδια έχουν μικρότερο συντελεστή καθίζησης, είναι ευαίσθητα σε πρωτεάσες και πιο υδρόφοβα από τα ανέπαφα ιικά σωματίδια. Έτσι θεωρείται πιθανό πως η ικανότητα των καψιδίων να υφίστανται αυτές τις δομικές μεταβολές από τον υποδοχέα ρυθμίζεται από ένα υδρόφοβο λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης (rocket factor), το οποίο προσδένεται στη βάση της αύλακας (canyon) και συγκεκριμένα στον πυρήνα της VP1. Τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο είτε απευθείας μέσω της πλασματικής μεμβράνης μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα είτε με ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα.(1)

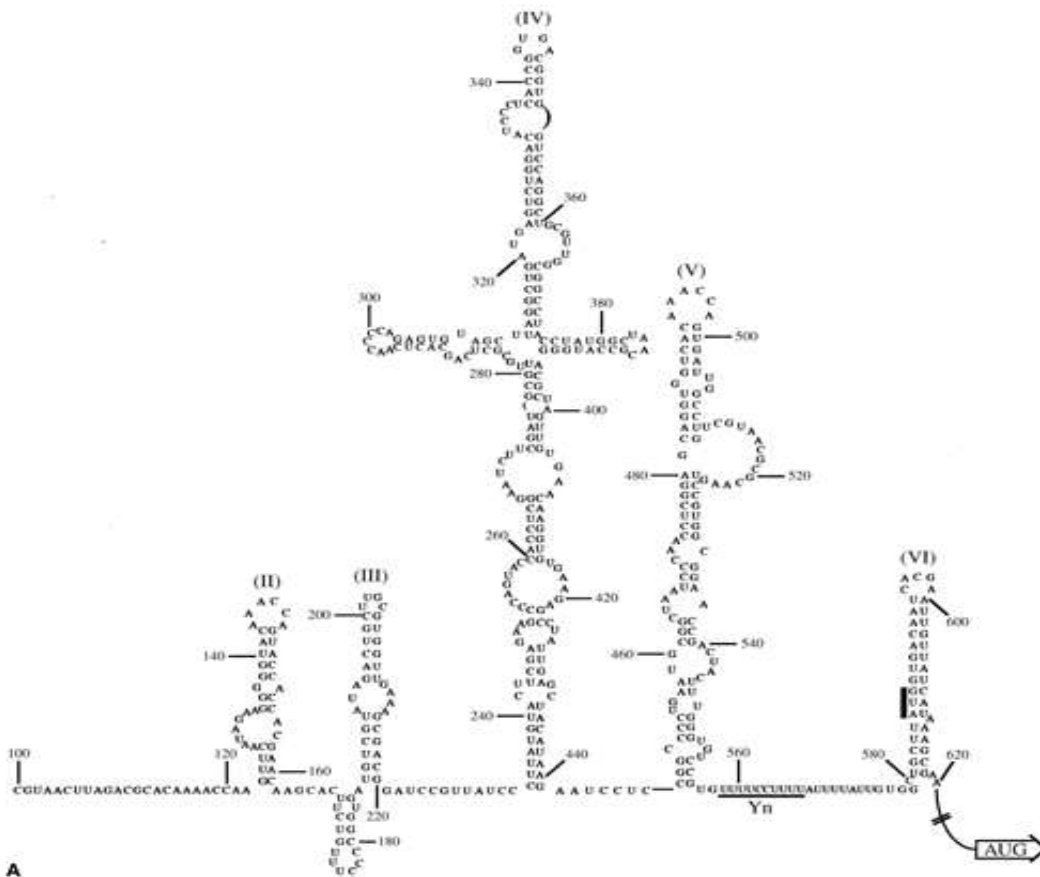
Τέλος, πιθανολογείται ότι το N-τελικό άκρο της VP1 και το N-τελικό άκρο της VP4 σχηματίζουν ένα κανάλι διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επιτρέποντας έτσι την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα.(1)

B) Μετάφραση ιικού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία

Μετά την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα μια κυτταρική πρωτεάση απομακρύνει την VPg από το 5' άκρο του ιικού γενώματος και πραγματοποιείται η μετάφραση από τα ριβοσώματα του κυττάρου.(3)

Η έναρξη της μετάφρασης του ιικού RNA απαιτεί την πρόσδεση της 40s ριβοσωμικής υπομονάδας στην αλληλουχία IRES (η οποία βρίσκεται ανοδικά του κωδικονίου έναρξης AUG).(3)

Τόσο ένα σιωπηλό κωδικόνιο AUG και μια περιοχή ολιγοπυριμιδίνης που βρίσκεται ανοδικά αυτού είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική λειτουργία του IRES. Επίσης τα στοιχεία IRES υπάρχουν σε όλους τους ριζορραφικούς και χωρίζονται βάση της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής τους σε 3 κατηγορίες : τύπου 1, τύπου 2 και τύπου 3.(3)



Εικόνα 4 : Δομή του γενετικού στοιχείου IRES του πολιοϊού τύπου 1. Φαίνονται το συντηρημένο μοτίβο Y_n-X_m-AUG και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της πολυπρωτεΐνης

Κατά την έναρξη της μετάφρασης στους πολιοϊούς η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα κατευθύνεται σε μια περιοχή του IRES που περιέχει το σιωπηλό κωδικόνιο AUG. Για τη μετάφραση είναι απαραίτητοι σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs), με εξαίρεση τον παράγοντα eIF4e, ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα (cap). (5)

Στην cap-εξαρτώμενη μετάφραση των ευκαρυωτικών mRNA οι πρωτεΐνες eIF4G, eIF4E, eIF4A συναρμολογούν το eIF4F σύμπλοκο, το οποίο αλληλεπιδρά με τη 40s ριβοσωμική υπομονάδα (μέσω του eIF), ώστε να σχηματιστεί το 43s σύμπλοκο, το οποίο περιέχει επίσης τους παράγοντες eIF5, eIF2, GTP και Met-tRNA. (5)

Κατόπιν το 43s σύμπλοκο προσδένει το mRNA στο 5' cap άκρο του έτσι ώστε να σχηματιστεί το 48s σύμπλοκο, το οποίο μετακινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του mRNA ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης. Εκτός

από τους παράγοντες eIF στο IRES προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες ενισχύουν τη μετάφραση. Έχουν ταυτοποιηθεί 5 κυτταρικοί trans-δραστικοί παράγοντες (ITAFs), εκ των οποίων οι 4 είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA : PTB, PCBP, τα αντιγόνα La και Uhr και το ITAF 45.(5)

Όπως προαναφέρθηκε ,αρχικά, από το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης παράγεται μια πολυπρωτεΐνη 247KDa, η οποία εν συνεχεία τεμαχίζεται από τις ιικές πρωτεάσες 2Apro, 3Cpro, 3CDpro ώστε να προκύψουν οι λειτουργικές πρωτεΐνες. Η πολυπρωτεΐνη απαρτίζεται από τις P1 (κωδικοποιεί πρωτεΐνες καψιδίου) και P2 και P3 (κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες).(3)

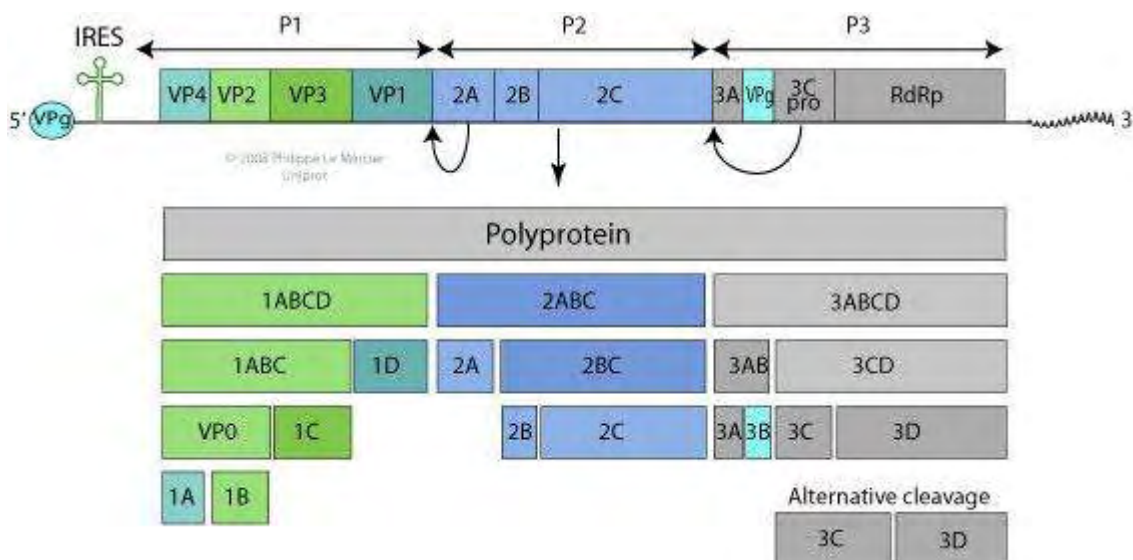
Η πρωτεόλυση από τις 3CDpro, 3Cpro συμβαίνει σε δεσμούς Gln-Gly ,ενώ η πρωτεόλυση από την 2Apro σε δεσμούς Tyr-Gly.

Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης συμβαίνει σε 3 στάδια :

Στάδιο 1 - η 2Apro απελευθερώνει τη P1

Στάδιο 2 - η 3CDpro απελευθερώνει την P3 από το σύμπλοκο P2-P3, ενώ εν συνεχεία ,πάλι η 3CDpro, απελευθερώνει τις μη δομικές πρωτεΐνες 2A,2BC,3AB,2B,2C,3A,3B,3Cpro,3Dpro και τις πρωτεΐνες του καψιδίου VP0,VP1,VP3 από τις πρόδρομες μορφές τους.

Στάδιο 3 -η VP0 τεμαχίζεται στις VP2,VP4. Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι αναγκαίο για τη διαμόρφωση των μολυσματικών ιικών σωματιδίων (διάσπαση ωρίμανσης).(1)

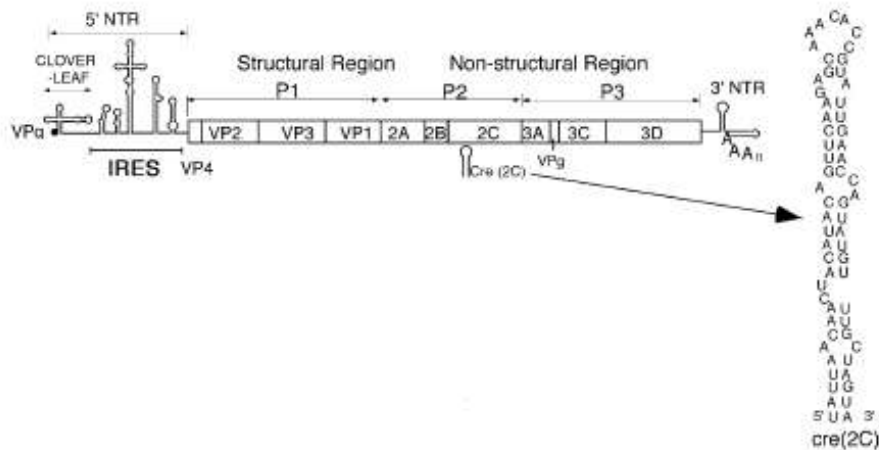


Εικόνα 5 : πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης

Γ) Αντιγραφή ιικού RNA

Όπως προαναφέραμε ,η αντιγραφή του ιικού RNA ακολουθεί το μοτίβο RNA(+)-σύνθεση RNA(-)-RF-σύνθεση RNA(+)-RI-RNA(+), όπου RF (replicative form), το οποίο είναι δίκλωνο RNA και RI (replicative intermediate) , είναι ένας κλώνος RNA(-) μερικά υβριδοποιημένος με πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Βέβαια αυτή η απλή αναπαράσταση δεν αντικατοπτρίζει την πολύπλοκη φύση της αντιγραφής του ιικού RNA.(3)

Γενετικές μελέτες απέδειξαν ότι όλες οι μη δομικές πρωτεΐνες συμμετέχουν σε κάποιο στάδιο της αντιγραφής. Κυριότερη λειτουργία αποδίδεται στην RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση 3Dpol. Η 3Dpol ,η οποία εξαρτάται από τη παρουσία primer, καταλύει τη σύνθεση τόσο RNA(+) όσο και RNA(-). Επίσης εμφανίζει διπλή δραστηριότητα αφού αφενός επιμηκύνει τους RNA κλώνους, αφετέρου ευθύνεται για την ουριδιλίωση της VPg. Η VPg (3B) χρησιμοποιείται ως primer αφού πρώτα ουριδιλιωθεί σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, γεγονός το οποίο αποτελεί το πρώτο στάδιο της σύνθεσης RNA(+) και RNA(-). Με την ανακάλυψη μιας εσωτερικής φουρκέτας στο RNA, γνωστή ως cre, η οποία περιέχεται στη 2C κωδική περιοχή ,αποδείχτηκε ότι μια συντηρημένη αλληλουχία της μορφής GXXΧΑΑΑCXXXXXXA, η οποία βρίσκεται στη θηλιά της φουρκέτας ,αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα για την ουριδιλίωση της VPg. Συγκεκριμένα η A-5 χρησιμοποιείται για τη προσθήκη και των δυο νουκλεοτιδίων ουρακίλης στο -OH της τυροσίνης της VPg από την 3Dpol. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η cre -εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg εμπλέκεται μόνο στην σύνθεση του RNA(+) και όχι του RNA(-).(6)



Εικόνα 6 : Δομή του cre γενετικού στοιχείου. Φαίνεται η συντηρημένη αλληλουχία ${}^1GXXXAACXXXXXA^{14}$ στη κορυφαία θηλιά της δομής

Ένας μηχανισμός ρύθμισης της σύνθεσης RNA, αποτελεί η αλληλεπίδραση της 5' cloverleaf και της πολύ-A ουράς, κατά τη μετάβαση από την μετάφραση στη σύνθεση του RNA, με αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του γενώματος. Η παρατήρηση των Herold και Andino ότι η 3CDpro προσδένεται στην κυτταρική πρωτεΐνη PABP δείχνει ότι το ιικό RNA πιθανόν κυκλοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης του RNP συμπλόκου (3AB-3CDpro-PCBP2) του 5' cloverleaf και της PABP της πολύ-A ουράς. Έτσι η συναρμολόγηση του RNP συμπλόκου στο 5' cloverleaf και η επακόλουθη κυκλοποίηση του ιικού RNA πιθανότατα εμποδίζει τη πρόσβαση κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας τη μετάβαση από μετάφραση στην αντιγραφή. Επίσης αυτός ο μηχανισμός εξασφαλίζει ότι μόνο τα RNA πλήρους μήκους θα αποτελέσουν υπόστρωμα για την 3Dpol.(7)

Γενικά, πολύ λίγα είναι γνωστά για το σύνολο των μηχανισμών που παίρνουν μέρος στην αντιγραφή του RNA(+), με εξαίρεση ότι απαιτείται η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg.(8)

Η αντιγραφή του RNA συμβαίνει σε μεμβρανώδεις δομές που επάγονται από την δράση των ιικών πρωτεϊνών 2C, 2BC. Το μεμβρανικό υλικό προέρχεται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή.

Δ) Καψίδωση και απελευθέρωση νέων ιών

Η καψίδωση και η αντιγραφή του RNA είναι συζευγμένα γεγονότα, μιας και αμφότερα συμβαίνουν στην επιφάνεια των μεμβρανικών κυστιδίων.

Στο πρώτο στάδιο καψίδωσης το P1 πολυπεπτίδιο τεμαχίζεται από την 3CDpro και δίνει τις VP0,VP1,VP3, οι οποίες σχηματίζουν το πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδέονται ώστε να δημιουργηθεί το πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο. Το ιικό σωματίδιο σχηματίζεται είτε μέσω της εισόδου του ιικού RNA στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, είτε μέσω ' ' κτισήματος ' ' των πενταμερών γύρω από το ιικό RNA. Στο τελευταίο στάδιο, η VP0 τεμαχίζεται στις VP2,VP4 δίδοντας ένα ώριμο ιικό σωματίδιο (δίδοντας έτσι τη τελική μορφή και σταθερότητα στο καψίδιο).(1)

Οι πολιοιοί εξέρχονται από το κύτταρο μέσω της λύσης του (ο θάνατος του κυττάρου-ξενιστή συμβαίνει 7-8 ώρες μετά την μόλυνση από τον πολιοιό). Πιθανώς όμως να ακολουθείται ένα εναλλακτικό μονοπάτι απελευθέρωσης των ιικών σωματιδίων καθώς έχουν παρατηρηθεί νέα ιικά σωματίδια πριν τη λύση του κυττάρου. (9)

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΠΟΛΙΟΙΩΝ

A) Μεταλλάξεις

Η υψηλή συσσώρευση μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA οφείλεται τόσο στα λάθη της RNA-εξαρτώμενης-RNA-πολυμεράσης όσο και στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών κατά την αντιγραφή :

Συνέπειες των παραπάνω είναι ότι :

- i. οι πολιοιοί έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να έχουν μικρό γένωμα
- ii. οι πολιοιοί αντιγράφονται κοντά στο όριο καταστροφής λόγω μεταλλάξεων
- iii. οι πολιοιοί υπάρχουν ως πληθυσμοί πολλών διαφορετικών γενότυπων (γι' αυτό χαρακτηρίζονται και ως ' ' περίπου είδη ' ')
- iv. η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους πολιοιούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον.(3)

Οι συχνότερες μεταλλάξεις που απαντώνται στους πολιοιούς είναι οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις και κυρίως οι μεταπτώσεις (αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων) και δευτερευόντως οι μεταστροφές (αποτελούν μόλις το 20%). Η συχνότερα παρατηρούμενη μετάλλαξη είναι η A-G, ενώ διπλασιασμοί και ελλείψεις παρατηρούνται πολύ σπανιότερα.(10)

Χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των πολιοιών αποτελούν οι περιορισμοί της αντικατάστασης αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των

δομικών πρωτεϊνών. Δομικές περιοχές, οι οποίες δεν είναι εκτεθειμένες στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου, διατηρούν τη δομή τους καθώς ξεφεύγουν από την αντιγονική πίεση, ενώ δομικές περιοχές που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων. Αποτέλεσμα είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφεύγει από τον εντοπισμό του ανοσοποιητικού συστήματος.(11)

Επίσης *cis*-δραστικά γενετικά στοιχεία, όπως τα IRES, *cloverleaf* και *cre*, τα οποία εμπλέκονται στις διαδικασίες της μετάφρασης και αντιγραφής αντίστοιχα, δέχονται ακόμα λιγότερες μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία, είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας, κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν τη διατήρηση της δευτεροταγούς δομής και ως εκ τούτου της φυσιολογικής λειτουργικότητας τους. (11)

Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση μεταλλάξεων σε ένα ιικό πληθυσμό δεν είναι απολύτως κατανοητοί. Γενικά μια μετάλλαξη μπορεί να μειώνει, να αυξάνει ή να αφήνει ανεπηρέαστη την αρμοστικότητα του ιού. Η εγκαθίδρυση μεταλλάξεων που παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα γίνεται εύκολα κατανοητή στα πλαίσια της θετικής επιλογής ενώ αντίθετα μεταλλάξεις που παρέχουν επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται από την αρνητική επιλογή. (12)

Τέλος, η πιθανότητα εγκαθίδρυσης μιας μετάλλαξης εξαρτάται όχι μόνο από τις σχετικές αλλαγές στην αρμοστικότητα του ιού, αλλά σε μεγάλο βαθμό και από το μέγεθος του πληθυσμού.(12)

B) Ανασυνδυασμός

Μελέτες προσδιόρισαν ότι η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει σε ισότιμη συχνότητα με την ενσωμάτωση μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή και επίσης ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό ομολογίας μεταξύ πατρικών RNA κλώνων και από την απόσταση των γενετικών δεικτών.

Ο ανασυνδυασμός των RNA γενωμάτων συμβαίνει σε συν-μολυσμένα κύτταρα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου είτε διαφορετικών οροτύπων. Δυο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον γενετικό ανασυνδυασμό :

α) Αντιγραφικός μηχανισμός

Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, το εκμαγείο αλλάζει, δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου, η οποία ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA σταματά και συνεχίζει ξανά πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Όταν η μετάβαση από το ένα εκμαγείο στο άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδιασμός είναι ομόλογος και τέτοιου είδους ανασυνδιασμοί παρατηρούνται στα βιώσιμα ανασυνδιασμένα στελέχη, τα οποία έχουν ανασυνδιαστεί στη κωδική περιοχή τους. Αντίθετα, μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη ομόλογο ανασυνδιασμό (όπως ελλείψεις και διπλασιασμούς). Τέτοιου είδους ανασυνδιασμοί γίνονται κυρίως σε μη κωδικές γενωμικές περιοχές.(13)

Όσον αφορά τον αντιγραφικό μηχανισμό, πρέπει να υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που διευκολύνουν τον τερματισμό της RNA σύνθεσης στο πρώτο εκμαγείο, τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου κλώνου (πιθανώς μαζί με την RNA pol) και την αναγνώριση της σωστής θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο. Ο πρώιμος τερματισμός της RNA σύνθεσης είναι πιθανό να προκαλείται από κάποιες δευτεροταγείς δομές του εκμαγείου ή/και από την ενσωμάτωση ενός μη συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου. Ο εμπλουτισμός δε μιας RNA περιοχής με U (πιθανώς και A), είναι πιθανό ότι διευκολύνει τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου RNA κλώνου από τον μητρικό, μετά τον πρώιμο τερματισμό. Η ακριβής αναγνώριση της θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο εξασφαλίζεται προφανώς από την αλληλεπίδραση μεταξύ του 3' άκρου του αναπτυσσόμενου κλώνου και της συμπληρωματικής περιοχής του δεύτερου εκμαγείου. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση εμπλέκει μόνο λίγα νουκλεοτίδια και έτσι η σύνδεση εύκολα μπορεί να είναι μη ακριβής λόγω των πολλαπλών μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο ιικό RNA.(14)

β) Μη αντιγραφικός μηχανισμός

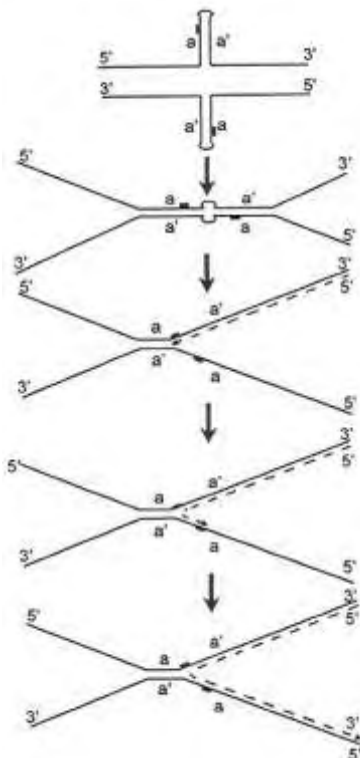
Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, το ανασυνδιασμένο RNA προκύπτει μέσω σύνδεσης προσυντιθέμενων RNA τμημάτων, τα οποία προέρχονται από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA. Τρεις πιθανοί τρόποι μπορούν να δώσουν αυτά τα RNA τμήματα :

- από την πρώιμη λήξη της μετάφρασης
- από την αποικοδόμηση ιικού RNA από κυτταρικές RNAάσες
- από την δραστικότητα ριβοενζύμου του ίδιου του ιικού RNA

Κατόπιν η σύνδεση των RNA τμημάτων πιθανόν προϋποθέτει μια RNA λιγάση. (14)

Γενικά ο ανασυνδιασμός διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών, καθώς :

- βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή ,οπότε συμβάλει στη διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου
- συμβάλει στη διαμόρφωση ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση
- επιταχύνει την εξέλιξη, μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ στελεχών ίδιου ή και διαφορετικού γένους.(3)



Εικόνα 7 : Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτοσυμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως a και a'. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντεθέννο RNA μόριο

4) ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

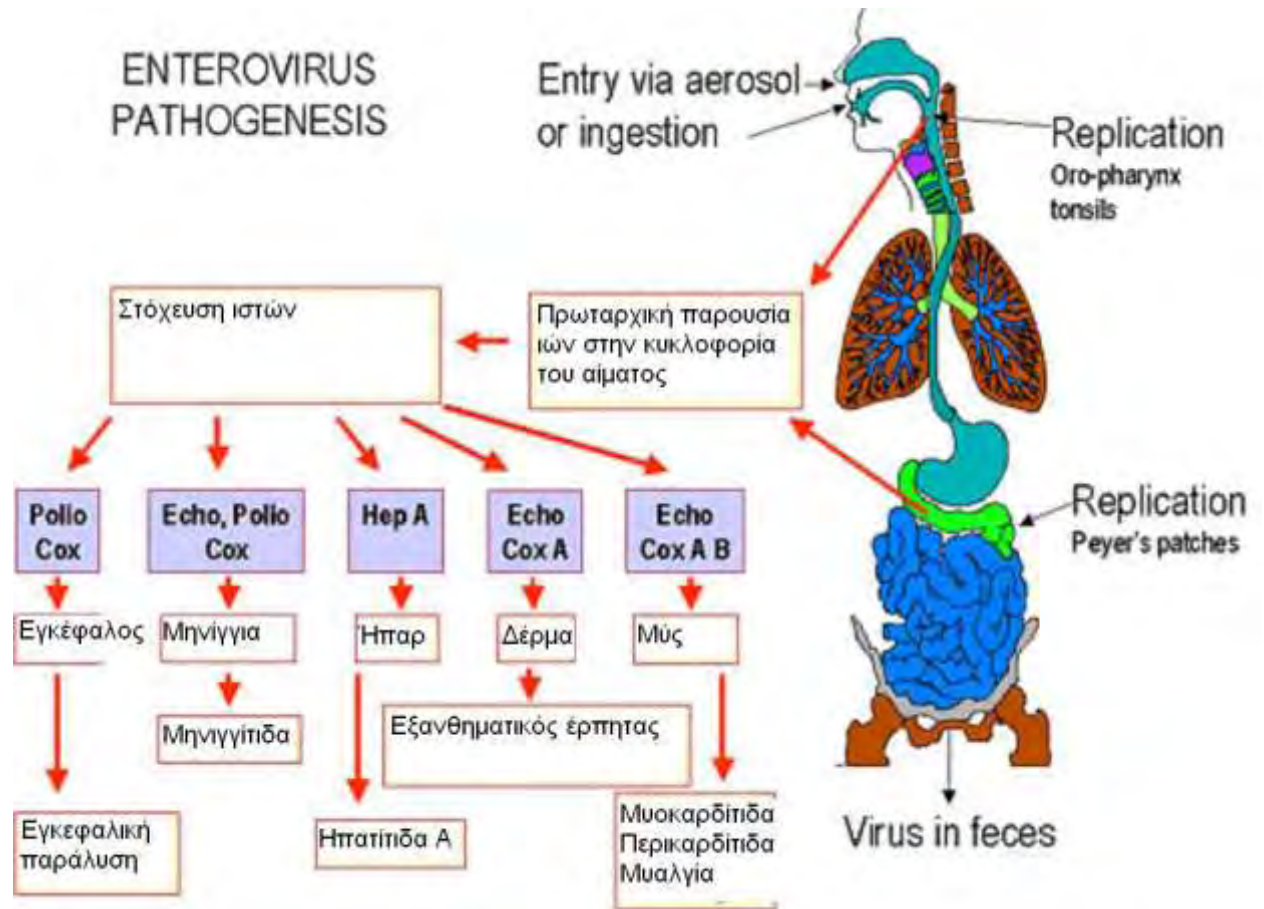
A) Παθογένεια

Όσον αφορά την παθογένεια των πολιοϊών έχουν προταθεί τρία κυρίως μοντέλα (15)

-το μοντέλο του Flexner το οποίο προτάθηκε το 1910, σύμφωνα με το οποίο η φυσιολογική οδός μετάδοσης της ασθένειας στους ανθρώπους είναι μέσω της μύτης.

-το μοντέλο του Bodian το οποίο προτάθηκε το 1950, σύμφωνα με το οποίο ο ιός μετά την είσοδό του στον οργανισμό εγκαθιδρύει μία αρχική μόλυνση στους λεμφαδένες του εντέρου και κατόπιν σε πιο μακρινούς λεμφαδένες έως ότου τελικά εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και από εκεί σε άλλους ευαίσθητους ιστούς περιλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος.

-το μοντέλο του Sabin το οποίο προτάθηκε την ίδια χρονική περίοδο με το μοντέλο του Bodian, φαίνεται πως είναι πιο κοντά στην πραγματική κατάσταση. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο ο ιός εγκαθιδρύει αρχικά μία μόλυνση στις βλεννώδεις επιφάνειες του φάρυγγα και του εντερικού σωλήνα. Στη συνέχεια ο ιός μπορεί να μεταδοθεί από τον βλεννογόνο στους τοπικούς λεμφαδένες από τους οποίους μπορεί να απομονωθεί αλλά αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ο ιός μπορεί να αντιγράφεται εκεί. Κατόπιν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας μία χαμηλού βαθμού ιαιμία και έτσι μπορεί πλέον να μολύνει πιο απομακρυσμένους λεμφικούς ιστούς ή άλλες ευαίσθητες περιοχές. Η αντιγραφή του ιού σε αυτές τις δευτερογενείς θέσεις παράγει την δευτερογενή ή κύρια ιαιμία κατά την οποία ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα λόγω του μεγάλου ιικού φορτίου και τελικά είναι πιθανόν να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ανοσίας του ατόμου.



Εικόνα 8 : Παθογένεια εντεροϊών

B) Κλινικά συμπτώματα

Τα συμπτώματα της κύριας ασθένειας της πολιομυελίτιδας είναι τα ίδια και για τους τρεις οροτύπους. Μηνιγγίτιδα, η οποία είναι επίσης γνωστή ως <αποτυχημένη πολιομυελίτιδα> (abortive poliomyelitis) μπορεί επίσης να εμφανιστεί. Όσον αφορά τις περιπτώσεις παραλυτικής πολιομυελίτιδας, το 5-10% είναι θανατηφόρες, το 10% αναρρώνουν πλήρως και οι υπόλοιποι εμφανίζουν κάποια εναπομείναντα παράλυση. Τα πραγματικά κλινικά συμπτώματα εξαρτώνται από την περιοχή του ΚΝΣ που προσβάλλεται. Πρώτον, η νωτιαία παράλυση (spinal paralysis) προέρχεται από την μόλυνση των κατώτερων κινητικών νευρώνων και επηρεάζει μόνο το ένα πόδι. Δεύτερον, η πιο σοβαρή βολβοειδή πολιομυελίτιδα (bulbar poliomyelitis) επηρεάζει την αναπνοή. Τρίτον, η εγκεφαλίτιδα (encephalitis) προέρχεται από την μόλυνση του ίδιου του εγκεφάλου. Αυτή αποτελεί περίπου το 1% όλων των περιπτώσεων και είναι συνήθως θανατηφόρα.(15)

5) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

A) Παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών:

- απομόνωση του ιού: η απομόνωση ενός εντεροϊού από μολυσμένα όργανα και υγρά του σώματος (π. χ μυοκάρδιο, περικαρδικό υγρό ή CSF) παρέχει την ισχυρότερη ένδειξη μόλυνσης από εντεροϊό. Ωστόσο, οι εντεροϊοί σπάνια απομονώνονται από το μυοκάρδιο. Η απομόνωση εντεροϊού από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη μόλυνσης. Η απομόνωση εντεροϊού από τη θρεπτική οδό (εκκρίματα του λαιμού ή δείγματα κοπράνων) παρέχει μόνο περιστασιακή ένδειξη αιτιολογίας επειδή η ύπαρξη του ιού σε αυτές τις θέσεις μπορεί να συμβαίνει απουσία συμπτωμάτων, ιδιαιτέρως στα βρέφη και κατά τη διάρκεια επιδημιών. Παρόλα αυτά, τα κόπρανα είναι το πιο ευαίσθητο δείγμα για την ανίχνευση εντεροϊών και η καλλιέργεια κοπράνων συνίσταται για την διάγνωση μολύνσεων από πολιοϊούς. Η επιλογή των κυτταρικών τύπων που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των εντεροϊών είναι επίσης σημαντική. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κάποια κυτταρική σειρά που να επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών. Γι' αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυασμοί των διαφόρων κυτταρικών σειρών. Μία πιθανή ταυτοποίηση της ομάδας στην οποία ανήκει κάποιο ιικό στέλεχος μπορεί να γίνει ύστερα από ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, η απομόνωση εντεροϊών μπορεί να είναι εμφανής (παρατήρηση CPE) μέσα σε λίγες μέρες ενώ ίσως χρειαστούν περισσότερες από 14 ημέρες όταν πρόκειται για δύσκολα στελέχη ή μίγματα ιών. (16)

- Ταυτοποίηση του οροτύπου των εντεροϊών: Μετά την απομόνωση του εντεροϊού, η ταυτοποίηση του οροτύπου μπορεί να γίνει μέσω εξουδετέρωσης της μολυσματικότητας με μίγματα αντιορών. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν συνδυασμοί μιγμάτων αντιορών που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων. Συγκεκριμένα, το δείγμα προς ανάλυση επωάζεται με κάθε διαφορετικό μίγμα αντιορού και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και έτσι επιτυγχάνεται τελικά η ταυτοποίηση του οροτύπου μέσω πινάκων. Ωστόσο, προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την ταυτοποίηση ορισμένων τύπων εντεροϊών με τη χρήση άλλων μεθόδων όπως ανοσοενζυμικές μέθοδοι με αντιορό ειδικό για κάθε ορότυπο, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με πολυσθενή και ειδικό για κάθε ορότυπο αντιορό και ανίχνευση αντιγόνων των εντεροϊών στην κυτταροκαλλιέργεια είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ανοσοενζυμική μέθοδο.

-Ορολογική διάγνωση: η ορολογική διάγνωση των εντεροϊικών μολύνσεων περιπλέκεται από τον μεγάλο αριθμό οροτύπων και την εμφάνιση αναμνηστικών, ετεροτυπικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Η ύπαρξη υψηλού τίτλου IgM αντισωμάτων ειδικών των εντεροϊών στον ορό ενός ατόμου παρέχει ένδειξη μιας πρόσφατης μόλυνσης αλλά χρειάζεται μεγάλη προσοχή πριν την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επειδή ο τίτλος των IgM αντισωμάτων μπορεί να είναι υψηλός στον γενικό πληθυσμό ιδιαιτέρως κατά τη διάρκεια επιδημιών. Έτσι ενώ η ανίχνευση των IgM αντισωμάτων στον ορό είναι πιο εύκολη από την απομόνωση του ιού, αυτή παρέχει μόνο περιστασιακή ένδειξη (π. χ όταν παρατηρούνται ταυτόχρονα και κλινικά συμπτώματα). (17)

B) Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών:

- RT-PCR: Η σύγκριση των αλληλουχιών γενωμάτων εντεροϊών επέτρεψε τον εντοπισμό συντηρημένων αλληλουχιών και συνεπώς τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών ικανών προς ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η καλλιέργειά τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη, τα αποτελέσματα μπορούν να αποκτηθούν σε λιγότερο από 5 ώρες και μπορεί να έχει σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μη ικανότητα ταυτοποίησης του ορότυπου του εντεροϊού. Συνεπώς όταν απαιτείται κάτι τέτοιο, η RT-PCR θα πρέπει να συμπληρώνεται με κάποια από τις παραπάνω παραδοσιακές μεθόδους. Εναλλακτικά η ταυτοποίηση του εντεροϊού μπορεί να γίνει με τις εξής μεθόδους: PCR με primers εξειδικευμένα για την ενίσχυση μίας μόνο συγκεκριμένης υποομάδας εντεροϊών, αλληλούχιση των PCR προϊόντων και σύγκρισή τους με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες άλλων εντεροϊών, RFLP ανάλυση των PCR προϊόντων, υβριδισμός των PCR προϊόντων με ανιχνευτές ειδικούς για κάθε τύπο εντεροϊού, SSCP ανάλυση των PCR προϊόντων. (16)

6) ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΙΣΩΝ

Από το 1960, η πολιομυελίτιδα ελέγχεται αποτελεσματικά με την χρήση δύο εμβολίων (IPV και OPV).

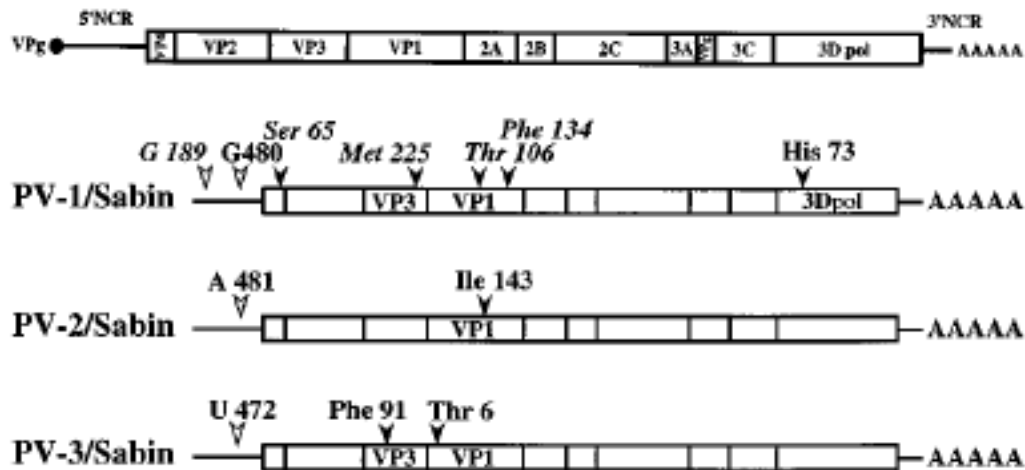
A) IPV: Το απενεργοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine) προέκυψε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεύδη. Το IPV είναι ασφαλές και επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Δυστυχώς ωστόσο,

το IPV επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία και για αυτό δεν είναι αποτελεσματικό για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό.(2)

B) OPV: Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A.B Sabin ύστερα από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων in vitro και in vivo κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin (P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα άγρια νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41 και P2/P712/56 αντίστοιχα τα οποία απομονώθηκαν από τα κόπρανα υγιών παιδιών. Το εξασθενημένο στέλεχος P3/Sabin (P3/Leon 12a₁, b) προήλθε από το άγριο νευρομολυσματικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.(17)

Η μοριακή βάση της εξασθένησης (όπου ο ιός καθίσταται λιγότερο ικανός να προκαλεί ασθένεια) ή της μεταστροφής των εμβολιακών στελεχών (όπου ο ιός επανακτά την ικανότητα να προκαλεί ασθένεια) έχει μελετηθεί συγκρίνοντας την αλληλουχία του εμβολιακού στελέχους του κάθε οροτύπου με αυτή ενός συγγενούς στελέχους, είτε του προδρόμου του εμβολιακού στελέχους είτε ενός νευρομολυσματικού στελέχους που απομονώθηκε από περίπτωση VAPP (vaccine-associated paralytic poliomyelitis).(2) Οι συγκρίσεις των αλληλουχιών για τα ζεύγη των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τους τρεις οροτύπους φαίνονται παρακάτω. Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P3/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P3/Leon/37) σε 11 βάσεις από τις οποίες όμως μόνο οι δύο είναι ισχυροί καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου: μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 472 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 91 της VP3 περιοχής. Επίσης, η αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 6 της VP1 είναι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στον εξασθενημένο φαινότυπο. Στην περίπτωση του εμβολιακού στελέχους P2/Sabin, μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 481 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 143 της VP1 περιοχής είναι οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου. Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P1/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P1/Mahoney/41) σε 54 βάσεις. Οι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου του P1/Sabin βρέθηκε ότι κατανέμονται σε όλο το γένωμα καθιστώντας την ανάλυσή τους πιο περίπλοκη από αυτή των άλλων δύο οροτύπων. Μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 480 της 5'-NTR περιοχής και πιθανόν μία δεύτερη στη θέση 189 της ίδιας περιοχής έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Τέσσερις επιπλέον αμινοξικές υποκατάστασεις στην περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Οι δύο από αυτές (τα αμινοξέα 65 της VP4 και 134 VP1) βρίσκονται στο εσωτερικό του ιού καψιδίου ενώ οι άλλες

δύο (τα αμινοξέα 106 της VP1 και 225 της VP3) βρίσκονται στο εξωτερικό του. Επιπλέον ασθενείς καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου βρίσκονται στο 3' τελικό άκρο του ιικού γενώματος και συγκεκριμένα στη θέση 73 της 3D^{pol} περιοχής.



Εικόνα 9 :Θέση των καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου των εμβολιακών στελεχών Sabin και των τριών οροτύπων. Τα νουκλεοτίδια (λευκά τρίγωνα) και τα αμινοξέα (μαύρα τρίγωνα) που συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο φαίνονται στην 5' -NTR περιοχή και στην κωδική περιοχή αντίστοιχα, των γενωμάτων των Sabin στελεχών.

Το OPV έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με το IPV. Κατ' αρχήν το OPV χορηγείται από το στόμα και όχι σε ενέσιμη μορφή όπως γίνεται στην περίπτωση του IPV. Επιπλέον το OPV επάγει μία ισχυρή και μεγάλης διάρκειας ανοσολογική απόκριση περιλαμβανομένης τοπικής ανοσίας στο έντερο. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του OPV μπορεί να θεωρηθεί η διασπορά των ζωντανών στελεχών του εμβολίου από τα εμβολιασμένα άτομα σε άλλα άτομα του στενού περιβάλλοντός τους με αποτέλεσμα την επίτευξη ευρύτερης ανοσοποίησης. Γι' αυτούς τους λόγους το OPV επικράτησε έναντι του IPV στο μεγαλύτερο μέρος του κόσμου και βοήθησε στην εξάλειψη της πολιομυελίτιδας από τις περισσότερες χώρες.(18)

Γ) OPV και VAPP

Σε έναν πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων ο εμβολιασμός με το OPV συνδέεται με την εμφάνιση εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) η οποία επηρεάζει είτε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, λόγω σημειακών μεταλλάξεων και γενετικού ανασυνδυασμού. Πράγματι,

νευρομολυσματικά στελέχη που προέρχονται από τα αντίστοιχα Sabin εμβολιακά στελέχη έχουν βρεθεί στο έντερο υγιών εμβολιασμένων ατόμων και στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών με VAPP. Νευρομολυσματικά στελέχη προερχόμενα από τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις (περίπου το 88% των περιπτώσεων) πιο συχνά σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το στέλεχος PV-1/Sabin. Προφανώς αυτό σχετίζεται με τον μεγαλύτερο αριθμό των μεταλλάξεων που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στο στέλεχος PV-1/Sabin σε σύγκριση με τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη. (18)

Ο παθογόνος χαρακτήρας αυτών των νευρομολυσματικών στελεχών σχετίζεται γενικά με δύο ειδών μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στα εμβολιακά στελέχη των πολιοϊών έχει βρεθεί ότι αντιστρέφονται (μέσω μεταλλάξεων στα σημεία που αποτελούν τους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου) ή καταστέλλονται (μέσω μεταλλάξεων σε άλλα σημεία εκτός των καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου) σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από VAPP περιπτώσεις. Η απομόνωση νευρομολυσματικών στελεχών από VAPP περιπτώσεις χωρίς επαναμεταλλάξεις σε σημαντικούς καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου έχει οδηγήσει στην άποψη ότι πιθανόν οι επαναμεταλλάξεις δεν είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση της ασθένειας. Είναι πιθανόν ότι άλλες μεταλλάξεις (όπως μεταλλάξεις καταστολής ή μεταλλάξεις στις αντιγονικές θέσεις) θα μπορούσαν να αυξήσουν την νευρομολυσματικότητα ή να συμμετέχουν με κάποιο τρόπο στην εγκαθίδρυση της ασθένειας. (17)

Ο ανασυνδυασμός είναι επίσης ένα συχνό γεγονός σε άτομα εμβολιασμένα με το OPV οδηγώντας σπάνια σε VAPP. Η ανάλυση VAPP περιπτώσεων παρουσιάζει ανασυνδυασμούς πολιοϊών με 50% συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 2 και 67% συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 3. Αντίθετα η συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 1 σε ανασυνδυασμούς είναι σπάνια. Πιθανόν ο αιτιολογικός παράγοντας αυτού του φαινομένου είναι ο μικρότερος χρόνος παραμονής στο έντερο των στελεχών Sabin τύπου 1 σε σύγκριση με τα στελέχη Sabin τύπου 2 και τύπου 3. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι ο ανασυνδυασμός είναι κυρίως διατυπικός και συμβαίνει: i) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin, ii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου και iii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (NPEVs: non-polio Enteroviruses). Μυστήριο παραμένει ακόμα ο εντοπισμός των θέσεων ανασυνδυασμού σε επιλεγμένες περιοχές του γενώματος των πολιοϊών. Έτσι έχει βρεθεί ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κυρίως σε εκείνες τις περιοχές του ιικού γενώματος που κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (P2 και P3 περιοχές). Μία πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου στηρίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το καψίδιο είναι οι πιο ποικιλόμορφες μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών (δυσμενή συνθήκη για ομόλογο

ανασυνδυασμό) και επιπλέον η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων του καψιδίου είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία των προδρόμων τους. Έτσι οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών προτιμούν τον ανασυνδυασμό στις περιοχές P2 και P3 οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας .Ωστόσο, σε κάποιες πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμός έχει εντοπιστεί στα άκρα της περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο (P1). Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων στελεχών χαρακτηρίζονται μόνο από μία θέση ανασυνδυασμού, υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις στις οποίες έχουν εντοπιστεί πολλαπλά σημεία ανασυνδυασμού .

Η απομόνωση στελεχών Sabīn με παρόμοιες γενετικές τροποποιήσεις τόσο από περιπτώσεις VAPP όσο και από υγιή εμβολιασμένα άτομα οδήγησε στην άποψη ότι παράγοντες του ξενιστή παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας. Πιθανόν, κάποιοι τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσε να ήταν αυτοί που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με την 5'-NTR περιοχή. Επίσης ως παράγοντες του ξενιστή θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι ανοσοανεπάρκειες (π. χ λόγω μόλυνσης με τον HIV). Επιπλέον ενδοκυτταρικές ενέσεις μέσα σε περίοδο 30 ημερών μετά την έκθεση στο OPV αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση VAPP περιπτώσεων. Ο συνεχής γενετικός χαρακτηρισμός στελεχών πολιοϊών που απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις και υγιή άτομα ίσως βοηθήσει στην διαλεύκανση των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων παραγόντων του ιού και του ξενιστή που είναι σημαντικές για την εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας.(17)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός μεταλλάξεων στις 5' UTR και VP1 γενωμικές περιοχές εμβολιακών στελεχών πολιοιών και η ερμηνεία του ρόλου των μεταλλάξεων σε συνάρτηση με την αρμοστικότητα των στελεχών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1) ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 9 κλινικά δείγματα. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται τόσο ο ορότυπος όσο και ο γενότυπος του κάθε δείγματος.

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ
742	P1	S1
415	P3	S3
LK3	P3	S3
LK6	P3	S3
LK10	P3	S3
Enp5	P2	S2
Enp6	P2	S2
Enp7	P2	S2
Enp8	P2	S2

Πίνακας 4: Ορότυποι και γενότυποι δειγμάτων

2) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΩΝ

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε erpendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π. χ στο πρώτο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erpendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των erpendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης ,οι οποίες περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε erpendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού κυτταροπαθολογικού φαινομένου (CPE: cytopathic effect) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Hep2 με θρεπτικό υλικό MEM-D). Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας της όσο δυνατόν μεγαλύτερης αραιώσης με CPE

ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργιών που περιείχαν κύτταρα Her2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό. Οι φιάσκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (φιάσκες με κύτταρα Her2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό). Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι φιάσκες διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού. Σκοπός των σειριακών αραιώσεων και του ενοφθαλμισμού των πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιιεργιών με την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αραιώση είναι η αποφυγή μιγμάτων του ιού καθώς όπως αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικό των πολιοϊών η ύπαρξή τους ως quasi-species.

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

Εικόνα 10 : Απεικονίζεται μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην οποία έγινε ο ενοφθαλμισμός των σειριακών αραιώσεων των κλινικών δειγμάτων. Η κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 4 δειγμάτων (AB: το πρώτο δείγμα, CD: το δεύτερο δείγμα, EF: το τρίτο δείγμα, GH: το τέταρτο δείγμα). Οι αριθμοί μέσα στα πηγαδάκια απεικονίζουν τις σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων ενώ με το γράμμα M απεικονίζεται η θέση των μαρτύρων.

3) ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση του ηικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas (Casas et al. 1995). Συγκεκριμένα, μέσα σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (4×10^3 μg/ml) (-20 °C) και τέλος 100μl δείγματος από τη πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιιεργιών . Ακολούθησε vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκε 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Τα eppendorf παρέμειναν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

4) ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των πολιοιών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N9) (Takara) (5μmol/ μl) και ddH₂O. Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 9,2μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 10X AffinityScript RT Buffer (2μl/tube), 100mM dNTPs (0,8μl/tube), 0,1M DTT (2μl/tube) και RNase out (20units/μl). Στη συνέχεια προστέθηκαν 5,8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 37 °C για 2 λεπτά. Τέλος σε κάθε eppendorf προστέθηκε 0,5μl AffinityScript-RT (100units/μl) (Stratagene) και ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C, 1 ώρα στους 42 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

5) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων (primers). Επειδή σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη δυο περιοχών του γενώματος των στελεχών Sabin (5'-NTR και VP1), ήταν απαραίτητη η ενίσχυσή τους με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Πιο συγκεκριμένα για τη μελέτη μέρους της 5'-NTR περιοχής που μας ενδιέφερε χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG52/UC53 το οποίο είναι κατάλληλο για την ανίχνευση όλων σχεδόν των εντεροϊών καθώς στοχεύει στην ενίσχυση μιας υψηλά συντηρημένης περιοχής του ιικού γενώματος. Για την ενίσχυση της VP1 περιοχής χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών ώστε να πετύχουμε την αποτελεσματική αλληλούχηση ολόκληρης της περιοχής. Για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG1/UC1 ενώ για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη primer (S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651) ειδικά για κάθε ένα από τα τρία στελέχη Sabin (S1, S2, S3). Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι πληροφορίες όσον αφορά την αλληλουχία των εκκινητών, τον τύπο του Sabin στελέχους που αναγνωρίζουν και το μήκος του PCR προϊόντος.

Εμβολιακό στέλεχος	Μήκος PCR προϊόντος σε bp	Primer sense 5'→3'	Primer antisense 5'→3'
S1	480	UG1:2402-TTGTGTCAGCGTGTTAATG-2421	UC1:2863-AGATTTGATATGGAATTTAC-2883
S2	480	UG1:2404-TTGTGTCAGCGTGTTAATG-2423	UC1:2865-ATTTGATATGGAATTTACCT-2885
S3	474	UG1:2399-TTGTGTCAGCGTGTTAATG-2418	UC1:2854-ACCTATTCTAGATTTGATAT-2874
S1	614	S ₁ 37:2837-AGGAAATTGGAGTCTTCACC-2857	S1688:3468-TTTGCGTCACTTGCAGTACA-3488
S2	659	S ₂ 30:2830-CAACTGAGACGCAAACTGGA-2849	S2688:3469-TTACGGCACTCACAGTACAC-3488
S3	626	S ₃ 26:2826-GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC-2847	S3651:3430-GATGGTAGAGCGGTGATTCCTC-3451
S1	434	UG52:162-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-182	UC53:577-ACCGACCAATACCACTGTT-595
S2	434	UG52:162-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-182	UC53:578-ACCGACCAATACCACTGTT-596
S3	434	UG52:164-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-184	UC53:580-ACCGACCAATACCACTGTT-598

Πίνακας 5 : Στις τρεις πρώτες οριζόντιες γραμμές φαίνονται πληροφορίες για το ζεύγος εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1, στις τρεις επόμενες γραμμές για τα ζεύγη primer που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1 και στις τρεις τελευταίες γραμμές για το ζεύγος primer που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός μέρους της 5'-NTR περιοχής. Στην τρίτη και τέταρτη στήλη οι αριθμοί αναφέρονται στις θέσεις στις οποίες υβριδίζονται οι εκκινητές

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl, τα οποία αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 2μl διαλύματος MgCl₂ 50mM (τελικής συγκέντρωσης 2mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x), 2μl εκκινητών (1 μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2,5 Units ενζύμου Taq πολυμεράσης (BioTaq) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

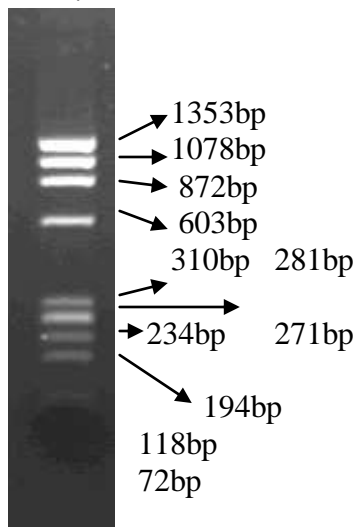
1 κύκλος	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους	-20 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -20 δευτερόλεπτα στους 45 °C για τον υβριδισμό των εκκινητών στους κλώνους του cDNA (45°C για UG52/UC53, 40°C για UG1/UC1 και 50°C για S ₁₃₇ /S ₁₆₈₈ , S ₂₃₀ /S ₂₆₈₈ , S ₃₂₆ /S ₃₆₅₁) -20 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	5 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Πίνακας 6 : Διαδικασία της τεχνικής PCR

6) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αгарόζης. Το πήκτωμα αгарόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αгарόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA). Επίσης προστέθηκαν 85μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl) το οποίο είναι απαραίτητο καθώς προσδένεται στο DNA και το καθιστά έτσι εμφανές σε

υπεριώδη ακτινοβολία. Στα πηγαδάκια του πηκτώματος φορτώνουμε 10μl από κάθε PCR προϊόν, αναμεμιγμένα με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής ώστε να μπορούμε να παρακολουθούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA ladder). Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόζεται τάση 200V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε κατάλληλη συσκευή υπεριωδών ακτίνων.



Εικόνα 9. 1: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους HaeIII ΦΧ174.

7) ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων με τα ζεύγη εκκινητών UG52/UC53, UG1/UC1 και S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651 στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρεία Macrogen στην Κορέα.

8) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

1) **clustalw**: είναι ένα πρόγραμμα που επιτρέπει την στοίχιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και την εύρεση τυχόν ομοιοτήτων ή διαφορών.

Στην συγκεκριμένη εργασία το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την στοίχιση των κατατεθειμένων αλληλουχιών των VP1 και 5'-NTR περιοχών των προτύπων

στελεχών S1, S2 και S3 με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλλοούχιση των δειγμάτων.

2) Gene Runner: είναι ένα πρόγραμμα με πολλές ιδιότητες. Στην συγκεκριμένη εργασία το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την μετάφραση των νουκλεοτιδικών

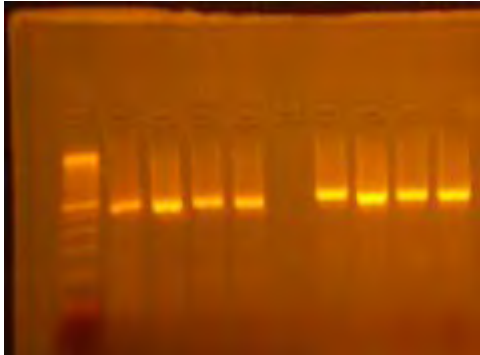
αλληλουχιών των VP1 περιοχών των δειγμάτων μας στα 6 πιθανά πλαίσια ανάγνωσης από τα οποία επιλέξαμε εκείνο το πλαίσιο που δεν περιείχε κωδικόνιο λήξης. Επίσης το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την σύρραψη του πρώτου μισού και του δεύτερου μισού της VP1 των δειγμάτων μας.

3) Rasmol: είναι ένα πρόγραμμα που επιτρέπει την απεικόνιση τρισδιάστατων δομών. Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού και με τη χρήση της κατατεθειμένης στην pdb δομής 1ASJ.pdb (πολιοδός αγρίου τύπου 1) απεικονίσαμε πάνω στη δομή τις θέσεις των αμινοξικών αλλαγών των ιικών στελεχών τύπου Sabin 1 και Sabin 2 ώστε να μπορούμε να προσδιορίσουμε το ρόλο τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών, ενώ με τη χρήση της κατατεθειμένης στην pdb δομής 1VBE.pdb απεικονίσαμε πάνω στη δομή τις θέσεις των αμινοξικών αλλαγών των ιικών στελεχών τύπου Sabin 3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, για την ενίσχυση ενός συντηρημένου τμήματος της 5' - NTR περιοχής χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG52/UC53 ενώ για την ενίσχυση της VP1 περιοχής χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Πιο συγκεκριμένα για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG1/UC1 σε όλα τα δείγματα ενώ για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651) ειδικά για κάθε ένα από τα τρία στελέχη Sabin (S1, S2, S3) αντίστοιχα. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά φωτογραφίες PCR με κάποια εκ των ζευγών εκκινητών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.



Ζεύγος S₃₂₆/S₃₆₅₁

Lane 1: μάρτυρας μοριακού βάρους

Lanes 2-5: PCR προϊόν 626 bp

Lane 6: αρνητικός μάρτυρας

Ζεύγος S₂₃₀/S₂₆₈₈

Lanes 7-10: PCR προϊόν 659 bp



Ζεύγος U652/UC53

Lane 1: μάρτυρας μοριακού βάρους

Lanes 2-8: PCR προϊόντα 434 bp

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι δεν χρειάστηκε να γίνει καθαρισμός των PCR προϊόντων καθώς οι PCR αντιδράσεις δεν οδήγησαν στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

2) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Όπως αναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για στοίχιση, μέσω του clustalw, με τις αλληλουχίες των κατατεθειμένων πρότυπων στελεχών Sabin με σκοπό την εύρεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών μεταλλάξεων. Παρακάτω απεικονίζεται η στοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του PCR προϊόντος UG52/UC53 του δείγματος Epr5 με την 5'-NTR αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin 2.

ENP5	GCGGTTGAAA	GTGATCGATC	CGTTACCCGC	TTGTGTACTT	CGAAAAGCCT	AGTATCGCCT	60
S2	60
ENP5	TGGAATCTTC	GACGCGTTGC	GCTTCAGCAC	CCGACCCCGG	GGTGTAGCTT	AGGCTGATGA	120
S2	120
ENP5	GTCTGGACAT	TCCTCACCGG	TGACGGTGGT	CCAGGCTGCG	TTGGCGGCCT	ACCTATGGCT	180
S2	180
ENP5	AACGCCATAG	GACGTTAGAT	GTGAACAAGG	TGTGAAGAGC	CTATTGAGCT	ACATAAGAGT	240
S2	240
ENP5	CCTCCGGCCC	CTGAATGCGG	CTAATCCTAA	CCACGGAGCA	GGCGGTCGCG	AACCAGTGAC	300
S2A.....	300
ENP5	TGGCTTGTCTG	TAACGCGCAA	GTCTGTGGCG	GAACCGACTA	CTTTGGGTGT	CCGTGTTTCC	360
S2	360
ENP5	TGTTATTTTT	ATCATGGCTG	GTATGGGGTG	ACAAAA			396
S2G.....			396

Οι τελείες που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα νουκλεοτίδια σημαίνουν ομοιότητα ενώ τα διαφορετικά νουκλεοτίδια σε μερικές θέσεις σημαίνουν ότι στο συγκεκριμένο σημείο υπάρχει μετάλλαξη

Παρακάτω παρατίθενται πίνακες με τις μεταλλάξεις στις 5'-NTR και VP1 περιοχές των δειγμάτων.

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη
S1	742	G480A C583G
S2	Enp5	A481G C584G
	Enp6	T398C A481G C584G
	Enp7	A481G C584G
	Enp8	T398C A481G C584G
S3	LK3	C438T A439G T472C C586G
	LK6	C438T A439G T472C C586G
	LK10	C438T A439G T472C C586G
	415	T472C C586G

Πίνακας 7 : Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην 5'-NTR περιοχή (PCR προϊόν UG52/UC53) όλων των δειγμάτων. Οι αριθμοί παριστάνουν τις θέσεις των μεταλλάξεων. Με μπλε χρώμα παριστάνονται τα νουκλεοτίδια των πρότυπων εμβολιακών στελεχών ενώ με κόκκινο τα αλλαγμένα νουκλεοτίδια των στελεχών που μελετήσαμε.

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη	Αλλαγή αμινοξέος
S1	742	G2502A G2776T A2833G T2304G	Ser 8 Asn Lys 99 Asn - Ile 142 Cys
S2	Enp5	G2865T A2908G	- Ile 143 Val
	Enp6	G2865T A2908G A3363G	- Ile 143 Val -
	Enp7	C2783A G2865T	Ala 101 Asp -
	Enp8	G2865T T3382C	- Tyr 301 His
S3	LK3	C2493T C2637T T2790C C2855A T2857A	Thr 6 Ile Ala 54 Val Met 105 Thr - -
	LK6	C2493T C2637T T2790C C2855A T2857A	Thr 6 Ile Ala 54 Val Met 105 Thr - -
	LK10	C2493T C2637T T2790C C2855T T2857A	Thr 6 Ile Ala 54 Val Met 105 Thr - -
	415	C2493T C2855A T2857A A3248G	Thr 6 Ile - - Ile 258 Val

Πίνακας 8 : Συνώνυμες και μη συνώνυμες μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή όλων των δειγμάτων. Οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος παριστάνονται με κόκκινο χρώμα. Τα αμινοξέα των πρότυπων εμβολιακών στελεχών παριστάνονται με μπλε χρώμα ενώ τα αλλαγμένα αμινοξέα των στελεχών που μελετήσαμε παριστάνονται με κόκκινο χρώμα.

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

Όπως ήδη αναφέρθηκε, πολιοϊοί εμβολιακής προέλευσης μπορούν να απομονωθούν από άτομα που τους έχει χορηγηθεί το OPV εμβόλιο ή άτομα του στενού περιβάλλοντός τους, πιο συχνά απουσία κλινικών συμπτωμάτων. Ο βαθμός απόκλισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 περιοχής τους από την αντίστοιχη περιοχή των Sabin στελεχών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα "μοριακό ρολόι" για τον υπολογισμό της χρονικής διάρκειας κυκλοφορίας των πολιοϊών. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά έχουν ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες με βάση το ποσοστό απόκλισης στη γενωμική περιοχή :

"OPV-like viruses": Η πλειονότητα των εμβολιακής προέλευσης πολιοϊών είναι "OPV-like" και έχουν στενή συγγένεια της VP1 αλληλουχίας τους (>99% ομοιότητα) με αυτή των OPV στελεχών.

"Vaccine-derived polioviruses": Τα σπάνια στελέχη VDPV δείχνουν < ή = 99% ομοιότητα στην VP1 αλληλουχίας τους με αυτή των OPV στελεχών και ο βαθμός των γενετικών διαφορών τους είναι ενδεικτικός της παρατεταμένης κυκλοφορίας τους. Έχουν αναγνωριστεί δύο κατηγορίες των VDPV στελεχών: πολιοϊοί εμβολιακής προέλευσης που έχουν απομονωθεί από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPVs: immunodeficient VDPVs) και κυκλοφορούντα στελέχη εμβολιακής προέλευσης πολιοϊών (cVDPVs: circulating VDPVs).

Εμβολιακό στελέχος	Δείγμα	Ποσοστό απόκλισης
S1(906bp)	742	0,4%
S2(903bp)	Ehp5	0,2%
	Ehp6	0,3%
	Ehp7	0,2%
	Ehp8	0,2%
S3(900bp)	LK3	0,5%
	LK6	0,5%
	LK10	0,5%
	415	0,4%

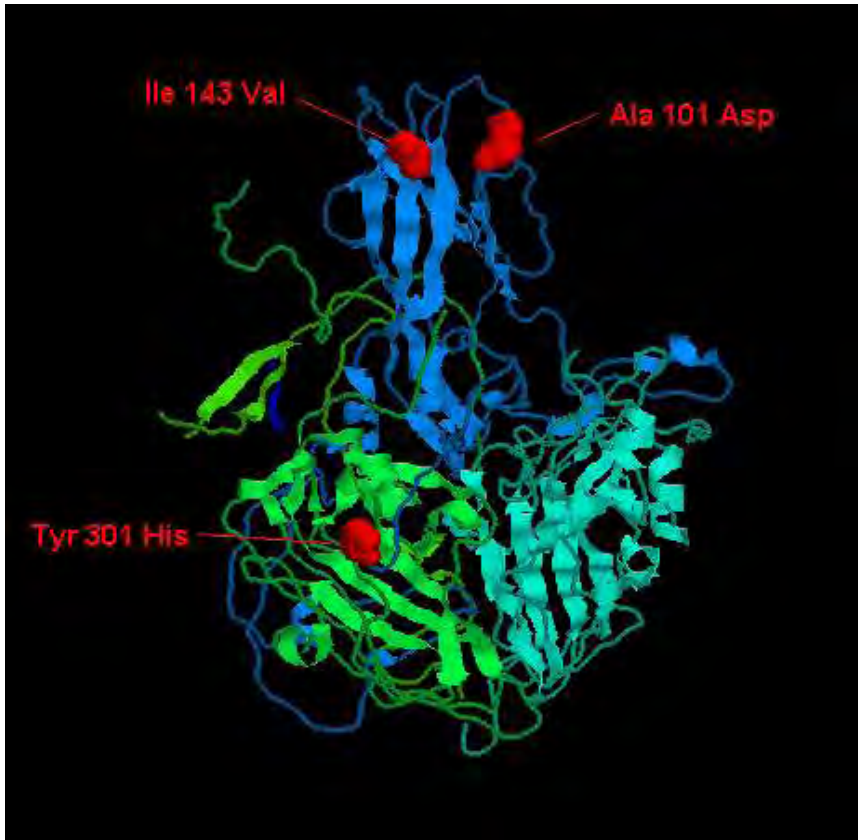
Πίνακας 9 : Το ποσοστό απόκλισης υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην VP1 περιοχή του κάθε δείγματος με το μήκος της VP1 του πρότυπου εμβολιακού στελέχους στο οποίο αντιστοιχεί το δείγμα.

3) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ RASMOL

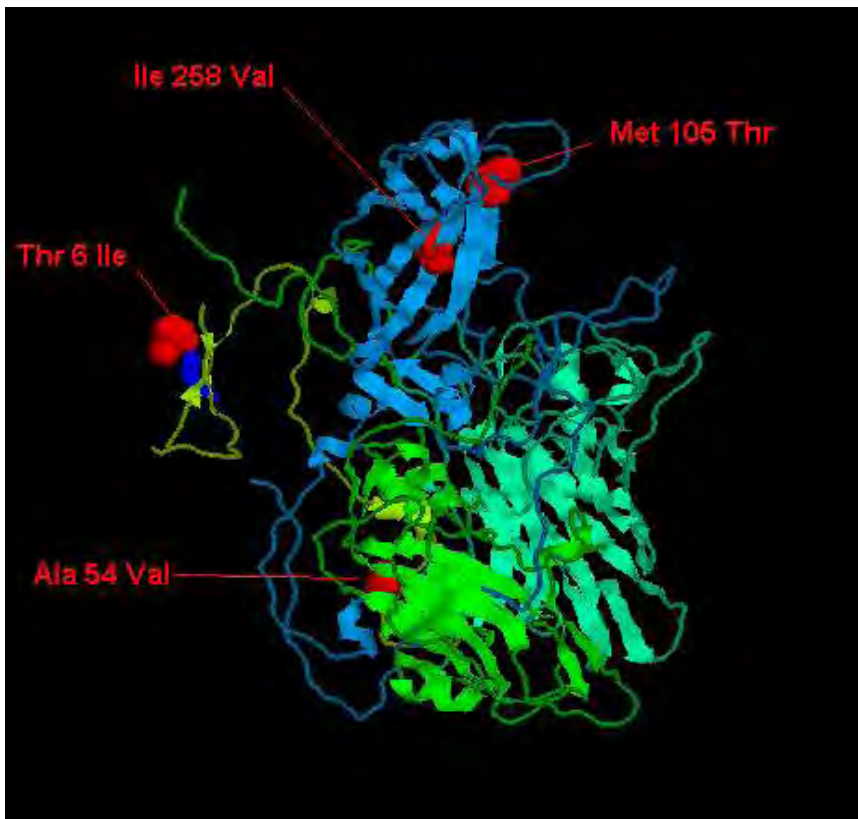
Με τη βοήθεια του παραπάνω προγράμματος έγινε απεικόνιση των θέσεων των αμινοξέων που αλλάζουν στη δομή του πρωτομερούς του καψιδίου. Στις εικόνες που ακολουθούν τα αμινοξέα που αλλάζουν είναι χρωματισμένα κόκκινα και αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο ώστε να διακρίνονται από το υπόλοιπο μόριο που αναπαρίσταται σε μορφή chain. Οι αμινοξικές αλλαγές των Sabin 1 και Sabin 2 απεικονίστηκαν στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) (1ASJ.pdb) ενώ οι αμινοξικές αλλαγές των Sabin 3 απεικονίστηκαν στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Sabin 3 (1VBE.pdb).



Εικόνα 11 : Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 1 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό και η VP3 με πράσινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.



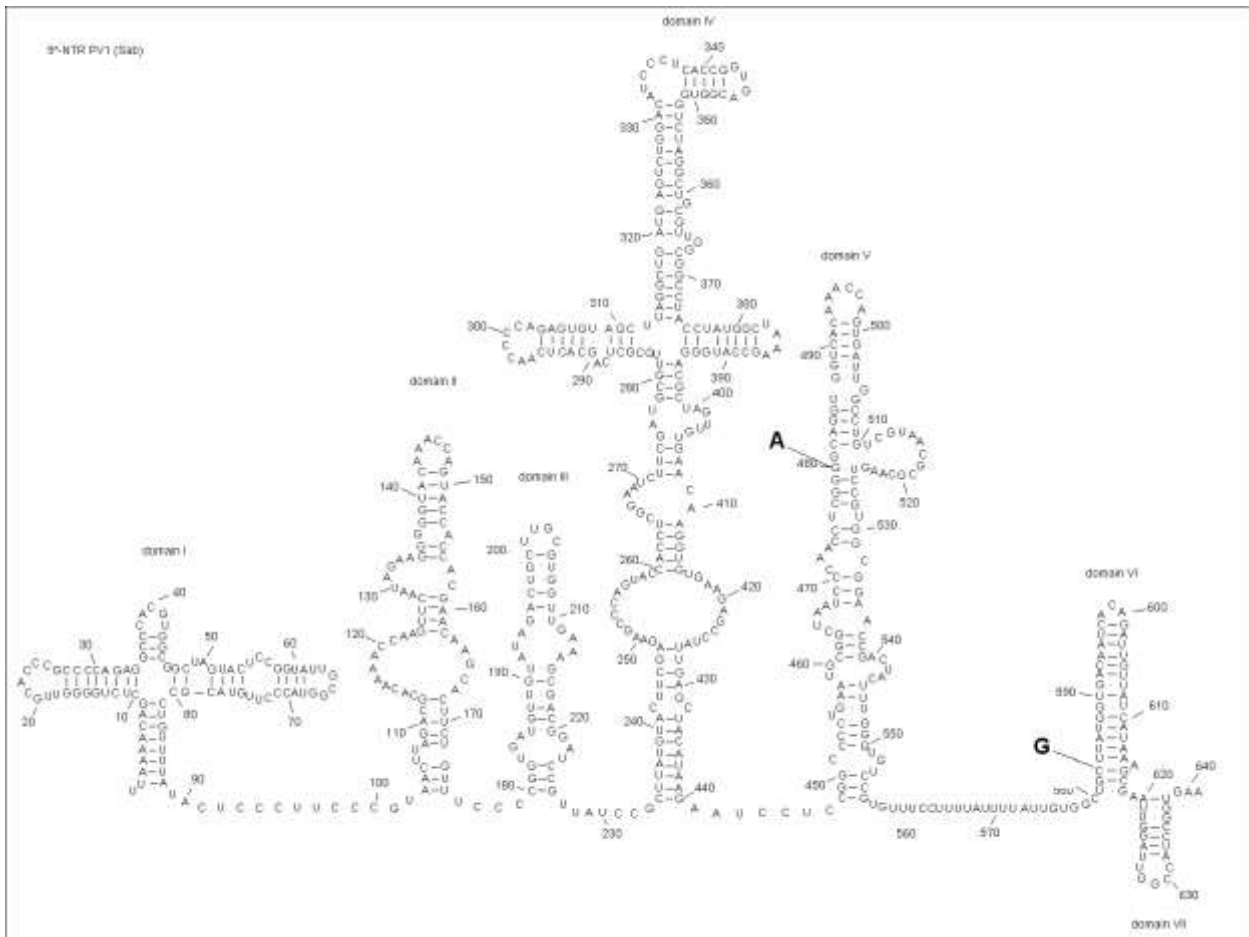
Εικόνα 12 : Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 2 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό, η VP3 με πράσινο και η VP4 με κίτρινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.



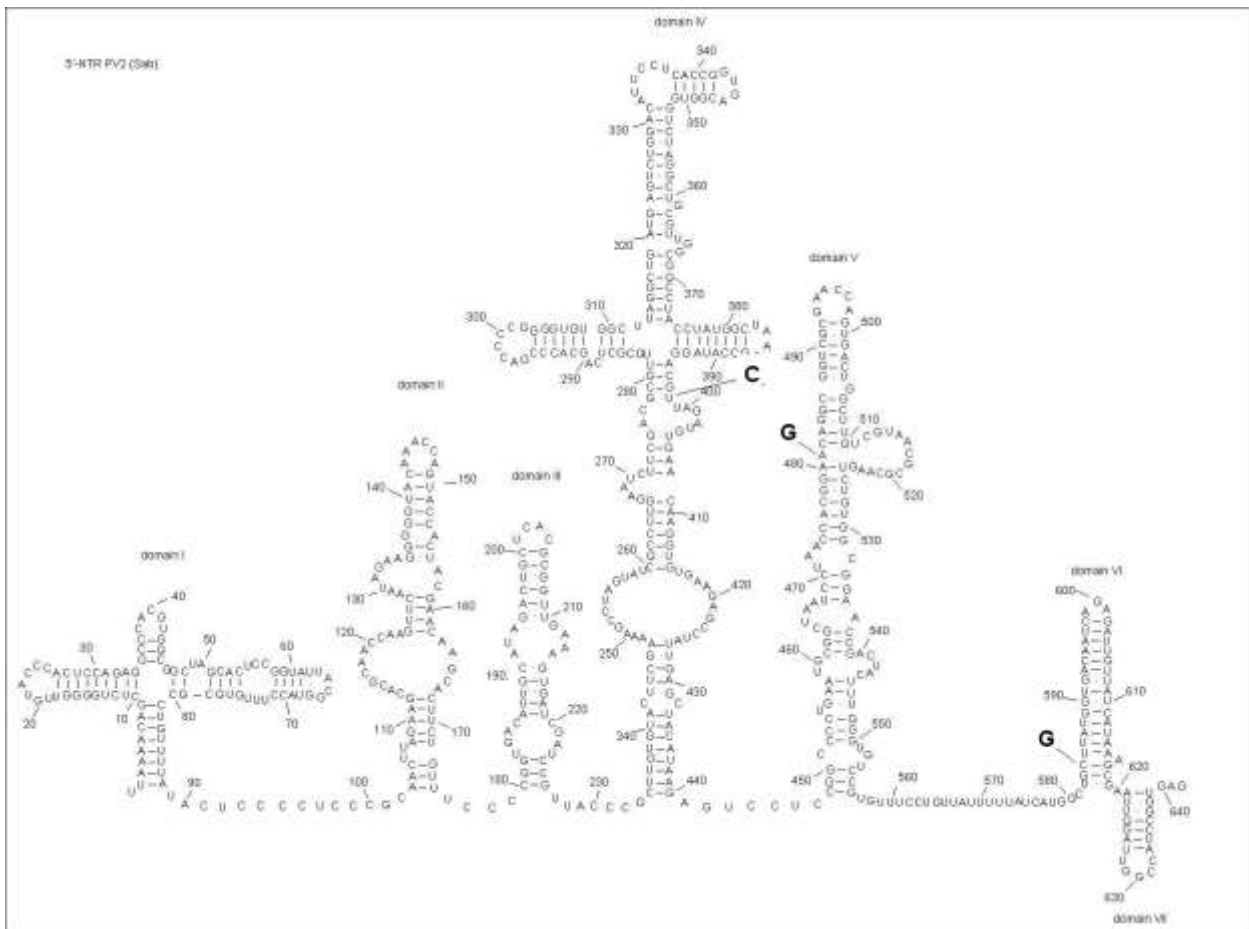
Εικόνα 13 : Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 3 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1VBE.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό, η VP3 με πράσινο και η VP4 με κίτρινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.

4) ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ 5'-UTR ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

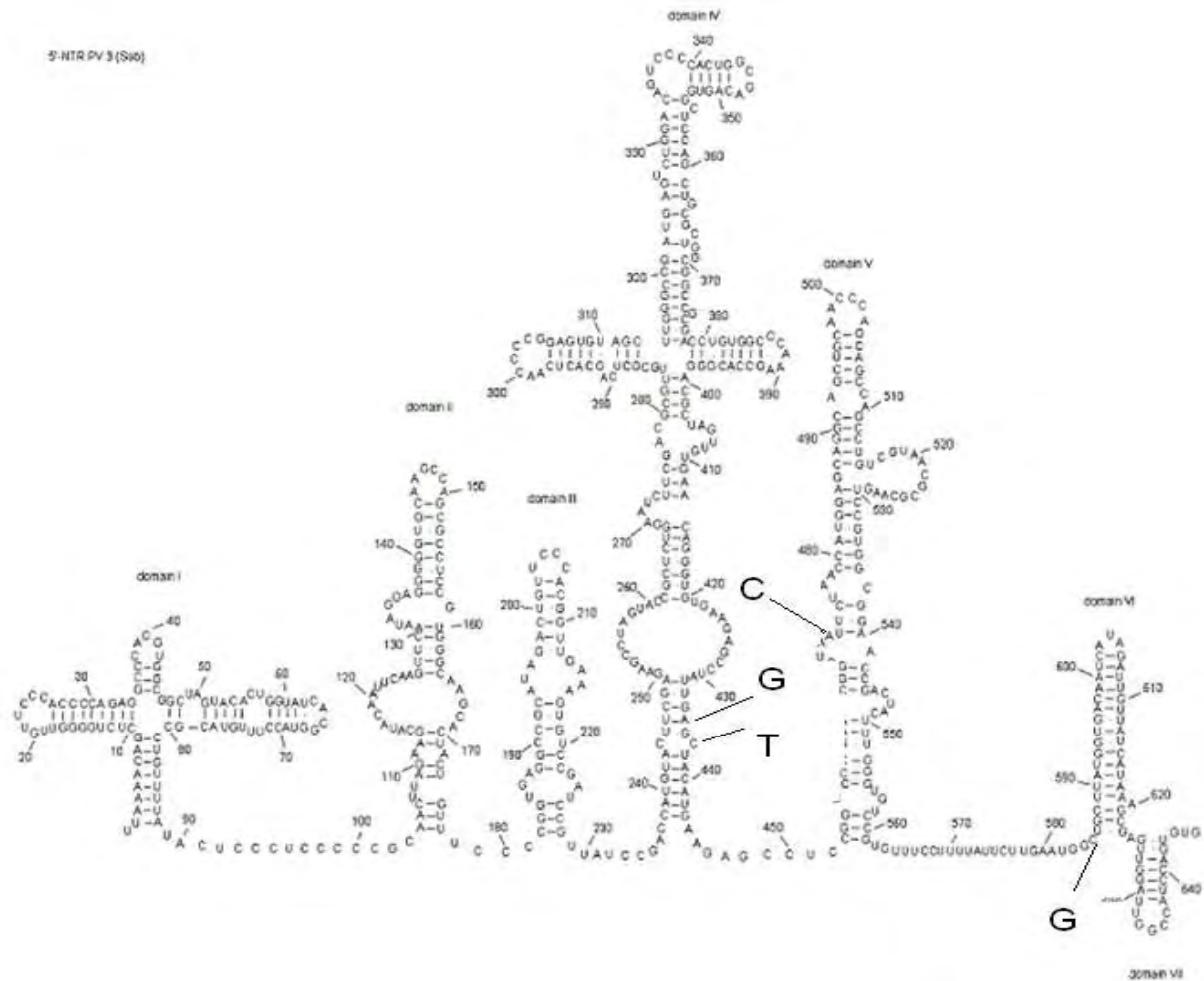
Η ενίσχυση της 5'-UTR περιοχής του ιικού γενώματος με τη χρήση του ζεύγους primer UG52/UC53 οδήγησε στην παραγωγή PCR προϊόντος. Το PCR προϊόν μήκους 434 bp περιλαμβάνει τις περιοχές II-VI του IRES γενετικού στοιχείου. Μετά την αλληλούχιση του PCR προϊόντος και με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής εντοπίστηκαν οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην 5'-NTR περιοχή οι οποίες ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: 1)σε αυτές που εντοπίζονται σε μονόκλωνες περιοχές της δευτεροταγούς δομής του IRES γενετικού στοιχείου και 2)σε αυτές που εντοπίζονται σε δίκλωνες περιοχές του IRES γενετικού στοιχείου. Παρακάτω ακολουθεί ο εντοπισμός των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων των στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 που μελετήθηκαν, με τη χρήση των δευτεροταγών δομών των IRES γενετικών στοιχείων των αντίστοιχων προτύπων στελεχών Sabin.



Εικόνα 14 : Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις των Sabin 1 στελεχών που μελετήθηκαν, με τη βοήθεια της δευτεροταγούς δομής του IRES γενετικού στοιχείου του προτύπου στελέχους Sabin 1.



Εικόνα 15 : Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις των Sabin 2 στελεχών που μελετήθηκαν, με τη βοήθεια της δευτεροταγούς δομής του IRES γενετικού στοιχείου του προτύπου στελέχους Sabin 2.



Εικόνα 16 : Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις των Sabin 3 στελεχών που μελετήθηκαν, με τη βοήθεια της δευτεροταγούς δομής του IRES γενετικού στοιχείου του προτύπου στελέχους Sabin 3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις συνολικά 26 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα στελέχη τύπου Sabin1, Sabin2 και Sabin3, (στο 5' άκρο), οι περισσότερες ήταν μεταπτώσεις. Παρακάτω ακολουθεί μια πιθανή ερμηνεία των μεταλλάξεων ως προς τον ρόλο στην αρμοστικότητα των στελεχών.

Σε όλα τα στελέχη Sabin τύπου 2 εντοπίστηκε η μετάλλαξη A481G η οποία αποτελεί μεταστροφή στον γενότυπο του πατρικού νευρομολυσματικού στελέχους. Η παρουσία της αδενίνης στη θέση 481 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin 2 και έχει προταθεί ότι ο εξασθενημένος φαινότυπος προκύπτει λόγω μείωσης της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης όπως και στην περίπτωση του νουκλεοτιδίου στη θέση 480 των Sabin 1. Η μετάλλαξη A481G έχει εντοπιστεί σε στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή άτομα λίγο μετά την χορήγηση του εμβολίου ή από VAPP περιπτώσεις. Έχει βρεθεί ότι η μετάλλαξη A481G στα στελέχη Sabin τύπου 2 συμβαίνει συχνότερα σε σύγκριση με την μετάλλαξη G480A στα στελέχη Sabin τύπου 1.(19)

Μία άλλη μετάλλαξη που εντοπίστηκε σε τρία από τα δέκα στελέχη Sabin 2 είναι η T398C. Έχει προταθεί ότι τόσο η μετάλλαξη T398C όσο και η μετάλλαξη T437C οδηγούν σε αύξηση της νευρομολυσματικότητας των Sabin 2 αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις A481G και Ile143Thr. Τόσο η μετάλλαξη T398C όσο και η μετάλλαξη T437C εντοπίζονται σε δίκλωνες περιοχές του IRES γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα οδηγούν σε μετατροπή του ζεύγους GU σε GC. Κατά συνέπεια αυξάνεται η σταθερότητα της δευτεροταγής δομής της, η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και η νευρομολυσματικότητα. (17)

Χαρακτηριστική είναι επίσης η παρουσία της μετάλλαξης C584G σε εννιά από τα δέκα στελέχη Sabin 2 . Η συγκεκριμένη μετάλλαξη βρίσκεται σε δίκλωνη περιοχή του IRES γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στην περιοχή VI. Η μετάλλαξη αυτή θα οδηγούσε σε καταστροφή της δευτεροταγής δομής της καθώς μετατρέπει το ζεύγος CG σε GG. Ωστόσο είναι πιθανό ότι κάτι τέτοιο αποφεύγεται λόγω του φαινομένου της συν-μεταβλητότητας.

Στα στελέχη Sabin 1, αντικατάσταση μιας κυτοσίνης από μια αδενίνη στη θέση 480 εντοπίζεται στην περιοχή V του 5' UTR και συνδέεται άμεσα με την εξασθένηση της νευρομολυσματικότητας των στελεχών Sabin 1. Αυτός ο εξασθενημένος φαινότυπος οφείλεται στη μη ομαλή πρόσδεση του παράγοντα eIF4G στην περιοχή V του IRES. Αντίστοιχη δράση προκαλείται από την αντικατάσταση A481G στα Sabin 2 στελέχη.

Και στα τέσσερα στελέχη Sabin 3, επίσης, εντοπίστηκαν οι μεταλλάξεις T472C και C586G. Η μετάλλαξη T472C στα Sabin 3 στελέχη ευθύνεται για τον εξασθενημένο φαινότυπο, μαζί με τη μετάλλαξη στο αμινοξύ στη θέση 91 της VP3 πρωτεΐνης, καθώς και για την ύπαρξη του φαινοτύπου ts (temperature sensitive). Μάλιστα αυτές οι μεταλλάξεις δρουν συνεργιστικά ως προς την εμφάνιση εξασθενημένου φαινότυπου και φαινότυπου ts. (20)

Η μετάλλαξη C586G εντοπίζεται στην περιοχή VI του IRES. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς στη θέση 586 βρίσκεται ένα σιωπηλό κωδικόνιο έναρξης (cryptic AUG). Μεταλλάξεις τόσο στην περιοχή VI όσο και το συγκεκριμένο σιωπηλό AUG επηρεάζουν την πρόσδεση του παράγοντα eIF4B στην περιοχή V και VI αρνητικά. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις φθείρουν χαρακτηριστικά την μετάφραση και την ανάπτυξη των πολιοϊών οδηγώντας σε ts φαινοτύπους γενότυπου Sabin 3.(21)

Τέλος, στα δείγματα LK3, LK6 και LK10, εμφανίζονται οι μεταλλάξεις C438T και A439G. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται στην περιοχή IV του IRES και πιθανών ο ρόλος τους στην αρμοστικότητα του ιού συμπίπτει με το ρόλο της μετάλλαξης T437C των στελεχών Sabin 2 (τα οποία απομονώθηκαν από VAPP περιπτώσεις) , δηλαδή αύξηση της νευρομολυσματικότητας του ιού.

Όσον αφορά την VP1 γενωμική περιοχή, από τις 32 συνολικά μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα στελέχη , οι 18 ήταν μη συνώνυμες ενώ οι υπόλοιπες 14 ήταν συνώνυμες, γεγονός που δεν συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες. Οι συνώνυμες μεταλλάξεις, παρότι δεν οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων, δε σημαίνει ότι δεν επηρεάζουν την βιολογία του ιού, καθώς πιθανών να εντοπίζονται σε σημαντικές δευτεροταγείς δομές. Επίσης ,οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μεταπτώσεις (28 από τις 32), γεγονός το οποίο συμφωνεί με την τάση της 3Dpol να εισάγει κυρίως transitions κατά την ιική αντιγραφή.

Σχεδόν όλα τα στελέχη εμφανίζουν ποσοστό απόκλισης της VP1 αλληλουχίας τους από την αντίστοιχη αλληλουχία των πρότυπων εμβολιακών στελεχών μικρότερη του 1% και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως Sabin-like. Παρακάτω ακολουθεί μια περιγραφή των μη-συνώνυμων μεταλλάξεων όσον αφορά τον εντοπισμό τους στο καψίδιο και τον πιθανό ρόλο στην αρμοστικότητα των στελεχών.

Τα δείγματα LK3,LK6,LK10 (Sabin 3), φέρουν 3 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις, (T6I, A54V, M105T). Η μετάλλαξη C2493T έχει συνδεθεί με την αύξηση της νευρομολυσματικότητας, καθώς η αντικατάσταση αμινοξέων Thr6→Ile ενισχύει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της VP1 πρωτεΐνης και της ενδοσωμικής μεμβράνης του κυττάρου κατά τη διάρκεια της εισόδου του ιού στο κύτταρο.(22)

Η μετάλλαξη C2637T, επιφέρει την αντικατάσταση αμινοξέων Ala54→Val. Έχει βρεθεί ότι μια βαλίνη στη θέση 54 ευθύνεται για τη μερική καταστολή του ts φαινοτύπου (temperature sensitive). Η αντικατάσταση στην θέση 54 στην VP1 πιθανόν δρα συνεργικά με άλλες μεταλλάξεις, ώστε να επιτευχθεί ένας ολοκληρωμένος φαινότυπος ts-, (όπως η μετάλλαξη στη VP3 πρωτεΐνη Phe 91 Ser, η οποία ευθύνεται κατεξοχήν για την καταστολή του φαινοτύπου ts). Πρέπει να αναφερθεί ότι η θερμοευαισθησία και ο εξασθενημένος φαινότυπος του ιού, είναι στενά συνδεδεμένα γεγονότα. (20)

Επίσης η μετάλλαξη M105T φαίνεται να είναι μια μετάλλαξη καταστολής του φαινότυπου ts, όμοια με την μετάλλαξη A54V.(20)

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο εξασθενημένος φαινότυπος των Sabin 3 στελεχών, προκύπτει κυρίως από δυο σημειακές μεταλλάξεις :μια αντικατάσταση βάσης στην περιοχή 472 στην 5'-μη κωδική περιοχή και σε μια αντικατάσταση φαινολλαλανίνης στο αμινοξύ 91 της καψιδιακής πρωτεΐνης VP3. Η τελευταία αυτή μετάλλαξη ευθύνεται και για την εμφάνιση του φαινοτύπου ts. Αντίθετα, η καταστολή του φαινοτύπου ts, πραγματοποιείται από ποικίλες σημειακές μεταλλάξεις τόσο στην VP3 όσο και στις VP1 και VP2 πρωτεΐνες.

Το δείγμα 415 (Sabin 3), φέρει δυο μη-συνώνυμες μεταλλάξεις (T6I και I258V). Όπως είδη αναφέρθηκε η μετάλλαξη T6I αυξάνει την νευρομολυσματικότητα καθώς η αντικατάσταση αμινοξέων Thr6→Ile ενισχύει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της VP1 πρωτεΐνης και της ενδοσωμικής μεμβράνης του κυττάρου κατά τη διάρκεια της εισόδου του ιού στο κύτταρο.

Επίσης η αντικατάσταση, στη θέση 258, της ισολευκίνης από μια βαλίνη, πιθανώς επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης της VP1 πρωτεΐνης και της μεμβράνης του κυττάρου, καθώς η μετάλλαξη στη θέση 258 εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια της VP1 και συγκεκριμένα δίπλα στις αντιγονικές περιοχές N-Ags (καθώς οι πλευρικές αλυσίδες του κατάλοιπου 258 προσανατολίζονται στο εσωτερικό της δομής β-βαρελιού της VP1 πρωτεΐνης). Προφανώς, η μετάλλαξη αυτή διαδραματίζει τον ίδιο ρόλο με την μετάλλαξη I257V στα Sabin 1 στελέχη.

Αμινοξικές αντικαταστάσεις σε περιοχές N-Ags, δίπλα στα N-Ags και στη δομή canyon, αποτελούν πιθανές στρατηγικές του ίδιου του ιού, ώστε να διαφύγει από την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού.

Τα δείγματα Ehp5, Ehp6 (Sabin 2), φέρουν μια μη-συνώνυμη μετάλλαξη (I143V). Η παρουσία της ισολευκίνης στη θέση 143 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin 2 στελεχών. Συνεπώς η αντικατάσταση της ισολευκίνης από κάποιο άλλο αμινοξύ όπως βαλίνη, ασπαραγίνη ή θρεονίνη είναι πιθανό ότι οδηγεί σε αυξημένη νευρομολυσματικότητα των ιικών στελεχών. Η μετάλλαξη Ile143Val πιθανόν έχει μικρότερη επίδραση στο φαινότυπο καθώς εμπλέκει αμινοξέα με παρόμοιες ιδιότητες ενώ αντίθετα οι μεταλλάξεις Ile143Thr και Ile143Asn (οι οποίες εντοπίζονται εξίσου συχνά σε στελέχη Sabin 2), αναμένεται να τον επηρεάζουν περισσότερο καθώς τα αμινοξέα θρεονίνη και ασπαραγίνη είναι λιγότερο υδρόφοβα από την βαλίνη. Το κατάλοιπο 143 της VP1 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου στη DE Θηλιά η οποία συνδέει τα β-πτυχωτά φύλλα D και E της VP1. Η DE Θηλιά αλληλεπιδρά στενά με την BC Θηλιά της VP1 ώστε να σχηματίσουν την N-AgI, ενώ παράλληλα έχει προταθεί ότι η BC Θηλιά επηρεάζει το εύρος ξενιστή των πολιοϊών μέσω εξαρτώμενων από τον υποδοχέα γεγονότων στα αρχικά στάδια της μόλυνσης. Έτσι είναι πιθανό ότι το κατάλοιπο 143 της VP1 επηρεάζει γεγονότα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα στα αρχικά στάδια της μόλυνσης.(22)

Το δείγμα Epr7 (Sabin 2), φέρει μια μη-συνώνυμη μετάλλαξη (A101D). Η μετάλλαξη στη θέση 101 εντοπίζεται πλησίον της BC Θηλιάς. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη αυτή σχετίζεται με την θερμική σταθερότητα του ιού, η οποία επηρεάζει την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα και συνεπώς επηρεάζει την είσοδο του ιού στο κύτταρο.(22)

Το δείγμα Epr8 (Sabin 2), φέρει μια μη-συνώνυμη μετάλλαξη (Y301H). Πρόκειται για μια μετάλλαξη ακριβώς στη τελευταία θέση της VP1 πρωτεΐνης, δηλαδή στο τέλος του καρβοξυλικού άκρου. Το καρβοξυλικό άκρο εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου του ιού και παρόλο που στο καρβοξυλικό άκρο της VP1 (όπως και στα καρβοξυλικά άκρα των VP2, VP3 καθώς και στις περισσότερες θηλιές που εκτίνονται στην εξωτερική επιφάνεια), εμπεριέχονται οι κύριες αντιγονικές θέσεις N-Ags του ιού, η συγκεκριμένη μετάλλαξη δε φαίνεται να επηρεάζει τις θέσεις αυτές ή γενικά να διαδραματίζει κάποιο συγκεκριμένο ρόλο στην αρμοστικότητα του ιού, με βάση τουλάχιστον την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Το δείγμα 742 (Sabin 1), φέρει τρεις μη-συνώνυμες μεταλλάξεις (Lys99Asn, Ile142Cys, Ser8Asn).

Η αντικατάσταση μιας ισολευκίνης από μια κυστεΐνη στη θέση 142 στο δείγμα 742, πιθανώς δρα όμοια με την μετάλλαξη στη θέση 143 των Sabin 2, όπου μια ισολευκίνη αντικαθίσταται από μια βαλίνη, με αποτέλεσμα την αύξηση της νευρομολυσματικότητας.

Η μετάλλαξη Lys99Asn βρίσκεται στην κορυφή της B-C Θηλιάς της VP1 η οποία συνίσταται από τα κατάλοιπα 96-104. Η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει τη δομή της αντιγονικής θέσης N-AgI η οποία όπως αναφέρθηκε σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 90-105 της VP1. Γενικά η συσσώρευση μεταλλάξεων στις αντιγονικές θέσεις του ιού είναι ένα συχνό φαινόμενο λόγω του γεγονότος ότι αυτές οι θέσεις είναι οι πιο εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς υφίστανται υψηλή αντιγονική πίεση. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στις θέσεις αυτές παρέχει στον ιό το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διαφεύγει της αναγνώρισης από τα αντισώματα του οργανισμού και συνεπώς να πολλαπλασιάζεται πιο αποτελεσματικά. (22)

Το δείγμα 742 φέρει μια σημειακή μετάλλαξη στη θέση 2502 του γενώματος της VP1, όπου μια γουανίνη αντικαθίσταται από μια αδενίνη, με αποτέλεσμα την αμινοξική αντικατάσταση μιας σερίνης από μια ασπαραγίνη, στη θέση 8 της VP1 πρωτεΐνης. Πιθανώς αυτή η αντικατάσταση να συντελεί στην αλλαγή της νευρομολυσματικότητας, καθώς η μετάλλαξη εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της VP1 πρωτεΐνης επηρεάζοντας έτσι τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιού και της ενδοσωμικής μεμβράνης των κυττάρων (κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. 1999. Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.
- 2) Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin. 1998. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* 4:1-26.
- 3) Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
- 4) Solecki D., M. Gromeier, J. Harber, G. Bernhardt, and E. Wimmer. 1998. Poliovirus and its cellular receptor: a molecular genetic dissection of a virus/receptor affinity interaction. *J. Mol. Recogn.* 11:2-9.
- 5) Prevot D., D. Decimo, C. H. Herbreteau, F. Roux, J. Garin, J. L. Darlix, and T. Ohlmann. 2003. Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal* 22(8): 1909-1921.
- 6) Paul A. V., J. H. van Boom, D. Filippov, and E. Wimmer. 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *NATURE* 393: 280-284.
- 7) Herold J. and R. Andino. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.
- 8) Morasco B. J., N. Sharma, J. Parilla, and J. B. Flanagan. 2003. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9): 5136-5144.
- 9) Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
- 10) Figlerowicz M, M. Magdalena Alejska, A. Kurzyn´ska-Kokorniak, M. Figlerowicz . 2003. Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518.
- 11) Cherkasova E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76(13):6791-6799.
- 12) Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.

- 13) Agol V. I., 2002. Picornavirus genome:an overview. In: Semler B. L., Wimmer E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 127-148.
- 14) Agol V. I. 1997. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
- 15) 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*
- 16) Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway. 2001. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95.
- 17) Friedrich F. 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.
- 18) Dowdle W. R., E. De Gourville, O. M. Kew, M. A. Pallansch, and D. J. Wood. 2003. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev. Med. Virol.* 13:277-291.
- 19) Guillot S., D. Otelea, F. Delpeyroux and R. Crainic. 1994. Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. *Vaccine* 12(6): 503-507.
- 20) A.J. Macadam, C. Arnold, J.Howlett, A.John, S. Mardsen, F. Taffs, P.Reeve, N. Hamada, K.Wareham, J.Arnold, N.Cammack, P.D.Minor 1989. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* 172, 408-414
- 21) Ochs K., L. Saleh, G. Bassili, V. H. Sonntag, A. Zeller, and M. Niepmann. 2002. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.* 76(5): 2113-2122.
- 22) Evaggelos Dedepsidis, Ioannis Karakasiliotis, Eleni Paximadi, Zaharoula Kyrgiakopoulou, Dimitrios Komiotis, Panayotis Markoulatos 2006. Detection of unusual mutation within the VP1 region of different re-isolates of poliovirus Sabin vaccine. *Virus Genes* (2006) 33: 183-191
- 23) Liu H. M., D. P. Zheng, L. B. Zhang, M. S. Oberste, M. A. Pallansch, and O. M. Kew. 2000. Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* 74(23):11153-11161.

- 24) Georgopoulou A., and P. Markoulatos. 2001. Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11):792-799.
- 25) Brown B., S. Oberste, K. Maher, and M. Pallansch. 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(16):8973-8984.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Karakasiliotis I., P. Markoulatos, and T. Kartsorchis. 2004. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell Probes.* 18(2):103-109.
- 29) T Couderc, J Hogle, H Le Blay, F Horaud and B Blonde. 1993 Molecular characterization of mouse-virulent poliovirus type 1 Mahoney mutants: involvement of residues of polypeptides VP1 and VP2 located on the inner surface of the capsid protein shell. *J Virol* 67 (7) 3808-3817
- 30) Yeates T. O., D. H. Jacobson, A. Martin, C. Wychowski, M. Girard, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1991. Three-dimensional structure of a mouse-adapted type-2/type-1 poliovirus chimera. *EMBO J.* 10: 2331-2341.
- 31) Equestre M., D. Genovese, F. Cavalieri, L. Fiore, R. Santoro, and R. P. Bercoff. 1991. Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J. Virol.* 65(5): 2707-2710.