

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



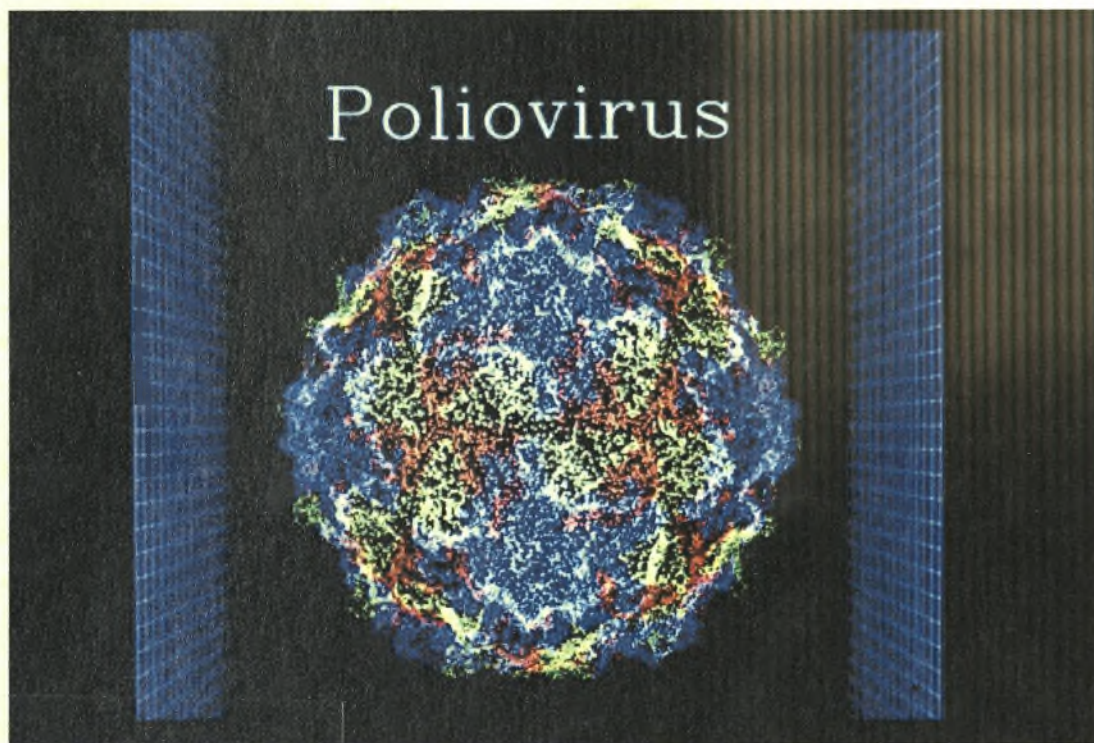
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. 17
Ημερομηνία 11/02/2010

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας**  
**και Βιοτεχνολογίας**  
**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,**  
**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΦΙΛΙΠΟΝΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΤΟ**  
**ΓΕΝΩΜΑ ΕΝΟΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥ»**



**Λάρισα 2010**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

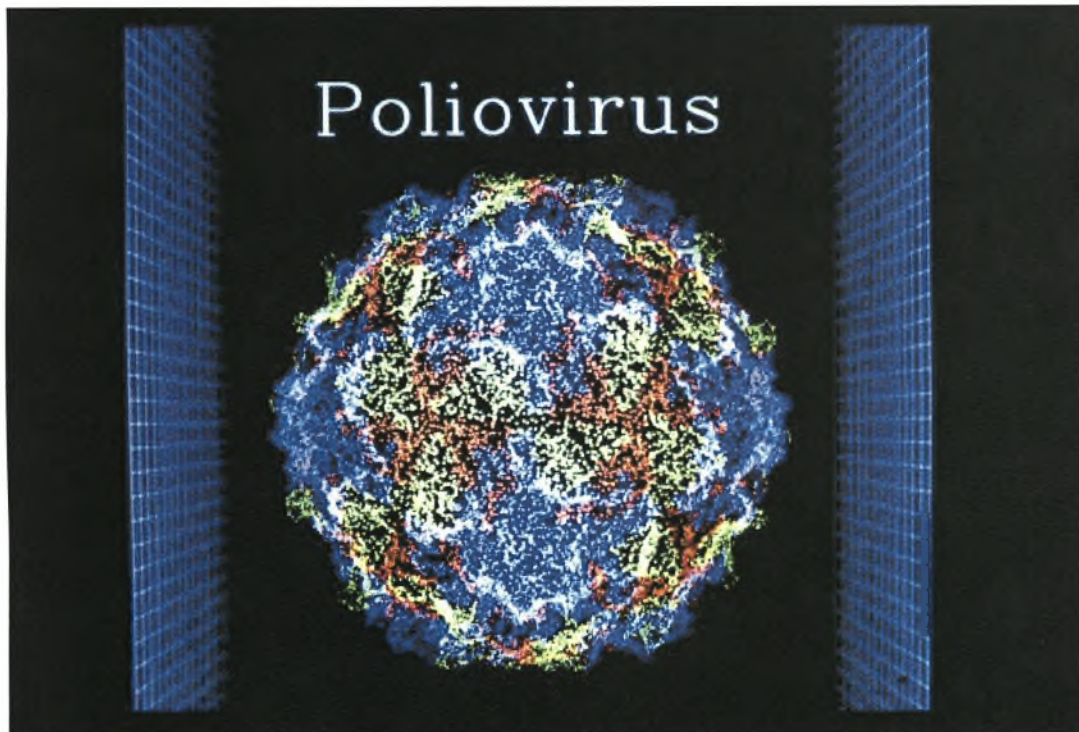


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας  
και Βιοτεχνολογίας  
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**ΦΙΛΙΠΟΝΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΤΟ  
ΓΕΝΩΜΑ ΕΝΟΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥ»**



**Λάρισα 2010**



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

Αριθ. Εισ.: 8128/1  
Ημερ. Εισ.: 12-03-2010  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
579.257 2  
ΦΙΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087128

**«Ανίχνευση ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων σε ολόκληρο το γένωμα  
ενός πολιοϊού»**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (Επιβλέπων):** ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ (Μέλος):** ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Κ. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ (Μέλος):** ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας από το Μάρτιο ως τον Σεπτέμβριο του 2009.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση της παρούσης μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτριο και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Πλιάκα Βίκυ για την αμέριστη συμπαράστασή της, καθώς και για τις πολύ χρήσιμες γνώσεις που μου μετέδωσε ώστε να μπορέσω να διεκπεραιώσω την διπλωματική μου εργασία με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Τσακογιάννη Δημήτρη για τις συμβουλές και τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της ενασχόλησής μου στο εργαστήριο, όπως επίσης και όλους τους συναδέλφους που διεκπεραίωναν τις εργασίες τους κατά την ίδια χρονική περίοδο, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 2 δείγματα, εκ των οποίων το ένα απομονώθηκε από λύματα της Κύπρου (ENP7) και το άλλο απομονώθηκε από μία κλινική περίπτωση εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) (MB1). Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων στα ιϊκά στελέχη, καθώς και η σημασία τους στην αρμοστικότητα του ιού. Κατόπιν ανάλυσης RT-PCR, RFLP (στις κωδικές περιοχές 2C και 3D) και αλληλούχισης (όλου του γονιδιώματος του ιϊκού στελέχους MB1), ανιχνεύθηκε ανασυνδυασμός στο ιϊκό στέλεχος του MB1 δείγματος στην περιοχή 2C, τύπου S3/S1. Με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής Clustalw, εντοπίστηκε η ακριβής θέση του ανασυνδυασμού (Recombination junction) και στη συνέχεια με την χρήση του προγράμματος ανάλυσης Simplot, έγινε η γραφική αναπαράσταση αυτού.

Συγχρόνως με τον ανασυνδυασμό, ανιχνεύθηκαν και 17 μεταλλάξεις στο ιϊκό στέλεχος του δείγματος MB1, στις περιοχές 5'NTR, VP3, VP1, 2A, 3A, 3C και 3D του ιϊκού γενώματος. Από αυτές οι 9 ήταν συνώνυμες (η νουκλεοτιδική αντικατάσταση δεν οδηγούσε σε αλλαγή αμινοξέος), και οι 8 ήταν μη συνώνυμες (η αλλαγή νουκλεοτιδίου οδηγούσε σε αλλαγή αμινοξέος). Για τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις περιοχές VP1 και VP3, απεικονίστηκαν οι ακριβείς τους θέσεις πάνω στο καψίδιο με την χρήση του προγράμματος Rasmol V.2.7.1.1. Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό απόκλισης της VP1 αλληλουχίας του MB1, από την πρότυπη αλληλουχία της VP1 του Sabin 3. Βρέθηκε ότι είναι 0.77% και γι' αυτό χαρακτηρίστηκε ως Sabin – like.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	8
1.2 ΔΟΜΗ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	11
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CD155 ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	23
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	24
1.5 ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ.....	35
1.6 ΠΟΛΙΟΪΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	46
1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	47
1.8 ΕΞΕΛΙΞΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	50
1.9 ΣΚΟΠΟΣ.....	55
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	56
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ / ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	56
2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ.....	56
2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA.....	58
2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT).....	58
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	59
2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLP).....	62
2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	64
2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	64
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	66
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR.....	66
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RFLP.....	67
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	67
3.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ MB1 ΑΠΟ ΤΗΝ VP1 ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SABIN 3.....	72
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	74
4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ.....	76
4.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΜΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	76
4.3 ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	78
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	79



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών και κατατάσσονται στην οικογένεια *Picornaviridae*. Το όνομα *Picornaviridae* δόθηκε εξαιτίας του μικρού μεγέθους των ιών (pico) και του τύπου του νουκλεϊκού οξέος, από το οποίο αποτελείται το ιϊκό γένωμά τους (RNA θετικής πολικότητας). Οι Piconna ιοί έχουν διαδραματίσει σπουδαίους ρόλους στην ανάπτυξη της σύγχρονης ιολογίας.

Οι εντεροϊοί μπορούν να προκαλέσουν διάφορες κλινικές εκδηλώσεις και ασθένειες που ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις και κοινό κρυολόγημα, μέχρι και θανατηφόρες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και πολιομυελίτιδας. Η είσοδός τους στον ανθρώπινο οργανισμό γίνεται δια της στοματικής οδού και ο πολλαπλασιασμός τους πραγματοποιείται στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου. Τελικά, εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον μέσω των περιττωμάτων και είναι δυνατόν να ανιχνευθούν σε λύματα και σε υδάτινες μάζες ποταμών, θαλασσών και λιμνών. Η μελέτη των εντεροϊών στο περιβάλλον έχει συμβάλει επιτυχώς στην αποτίμηση του μεγέθους και της διάρκειας της κυκλοφορίας τους σε συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Ο πρώτος ιός της οικογένειας *Picornaviridae* που ταυτοποιήθηκε ήταν ο ιός FMDV (Foot and Mouth Disease Virus) το 1898 από τους Loeffler και Frosch. Ο πολιοϊός, αιτιολογικός παράγοντας της πολιομυελίτιδας, απομονώθηκε 10 χρόνια αργότερα (1908), από τους Landsteiner και Popper. Αποτελεί στόχο για έρευνα εξαιτίας του πολύ σταθερού καψιδίου του, της ευκολίας με την οποία γίνεται ο καθαρισμός του σε συνδυασμό με τους υψηλούς ιϊκούς τίτλους (Mueller et al, 2005). Η πολιομυελίτιδα θεωρείται αρχαία νόσος και οι πρώτες κλινικές περιγραφές της έγιναν το 1800, με αναφορές σε περιπτώσεις παράλυσης με υψηλό πυρετό. Επιδημίες εμφανίζονταν σε διάφορες χώρες της Ευρώπης και στις Ηνωμένες Πολιτείες, παραμένοντας ένα κύριο πρόβλημα για την δημόσια υγεία στον αναπτυσσόμενο κόσμο κατά το πρώτο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα (Blondel et al, 1998). Η ανακάλυψη της ανάπτυξης του πολιοϊού σε κυτταροκαλλιέργειες το 1949 από τους Enders, Weller και Robbins βοήθησε στη μελέτη της ιϊκής αντιγραφής, στην αναγνώριση των τριών διαφορετικών οροτύπων του ιού καθώς και στη δημιουργία εμβολίων κατά της ασθένειας της πολιομυελίτιδας. Το 1955 οι Salk και Younger παράγααν το πρώτο επιτυχές εμβόλιο IPV μέσω χημικής απενεργοποίησης του ιού με φορμαλδεΰδη, κατόπιν πολλαπλασιασμού του ιού σε ιστοκαλλιέργεια. Το 1962 ο Sabin παράγαγε το εμβόλιο OPV από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών.

Η ευρεία ανοσοποίηση με το IPV και αργότερα με το OPV οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) να εγκαθιδρύσει ένα παγκόσμιο πρόγραμμα για την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας το 1988, αποτελώντας τον μεγαλύτερο στόχο στον τομέα της δημόσιας υγείας στην ιστορία.

## 1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι PicoRNA ιοί θεωρούνται μονοφυλετική ομάδα. Ο διαχωρισμός τους σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες ήταν ασυνεχής και περιελάμβανε κυρίως ανασυνδυασμό. Πιθανώς να οφείλεται σε δομικές διαφορές στα στοιχεία IRES μεταξύ των μεγάλων ομάδων των PicoRNA ιών, των Εντεροϊών και Ρινοϊών από τη μία πλευρά και Καρδιοϊών και Αφθοϊών από την άλλη πλευρά. Στη φύση το γένωμα των PicoRNA ιών είναι ασταθές, με αποτέλεσμα το 1-2 % όλων των νουκλεοτιδίων των πολιοϊών να αλλάζει ετησίως (Ago1, 2001). Η ανάπτυξη της κρυσταλλογράφησης με ακτίνες X των PicoRNA ιών για την ολοκλήρωση των ιικών σωματιδίων βοήθησε στην απόκτηση τεράστιας ποσότητας πληροφοριών για κάθε ένα από τα γένη της οικογένειας *Picornaviridae* (Stanway, 1990).

Η οικογένεια *Picornaviridae* περιέχει περίπου 230 διαφορετικούς ορότυπους και χωρίζεται σε 9 γένη (Πίνακας 1) με βάση ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες (επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός τους, ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού):

Genus	Type Species	Serotypes
Enterovirus	<i>Poliovirus</i>	3
	<i>Human enterovirus A</i>	17
	<i>Human enterovirus B</i>	56
	<i>Human enterovirus C</i>	13
	<i>Human enterovirus D</i>	3
	<i>Simian enterovirus A</i>	1
	<i>Bovine enterovirus</i>	2
	<i>Porcine enterovirus B</i>	2
	<i>Human rhinovirus A</i>	74
Rhinovirus	<i>Human rhinovirus B</i>	25
	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	1
Cardiovirus	<i>Theilovirus</i>	3
	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	7
Aphthovirus	<i>Equine rhinitis A virus</i>	1
	<i>Hepatitis A virus</i>	1
Hepatovirus	<i>Avian encephalomyelitis-like virus</i>	1
	<i>Human parechovirus</i>	3
Parechovirus	<i>Ljungan virus</i>	2
	<i>Equine rhinitis B virus</i>	2
Erbovirus	<i>Aichi virus</i>	1
Kobuvirus	<i>Bovine kobuvirus</i>	1
	<i>Porcine teschovirus</i>	11

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας *Picornaviridae* (De Jesus, 2007).

1) **Αφθοϊοί** (*Aphthoviruses*). Οι Αφθοϊοί σπάνια επηρεάζουν τον άνθρωπο, κυρίως προκαλούν φλύκταινες στα πόδια των ζώων. Έχουν αναγνωριστεί 7 ορότυποι και σε κάθε έναν από αυτούς υπάρχουν διαφορετικοί υπότυποι. Είναι πολύ ευμετάβλητοι ιοί και χάνουν γρήγορα την μολυσματικότητά τους σε pH χαμηλότερο του 7. 2) **Καρδιοϊοί** (*Cardioviruses*). Ο πιο καλά μελετημένος ιός αυτής της κατηγορίας είναι ο ιός της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (EMCV). Όλοι οι Καρδιοϊοί ανήκουν σε έναν ορότυπο και προκαλούν συνήθως εγκεφαλομυοκαρδίτιδα στα τρωκτικά (Stanway, 1990). 3) **Hepatoviruses**. Προέρχονται από την επαναταξινόμηση του ιού της Ηπατίτιδας Α, που αποτελεί μέλος του γένους των Εντεροϊών. Η επαναταξινόμηση στο ξεχωριστό γένος *Hepatovirus*, βασίστηκε στην ανομοιότητα των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών με άλλα μέλη της οικογένειας *Picornaviridae*, στην αντιγραφή του ιού χωρίς να προκαλεί κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα και στην ύπαρξη ενός μόνο ορότυπου. 4) **Ρινοϊοί** (*Rhinoviruses*). Ονομάζονται Ρινοϊοί επειδή αντιγράφονται στο ρινοφάρυγγα, περιλαμβάνουν 101 ορότυπους και ευθύνονται για το απλό κρυολόγημα. 5) **Parechoviruses**. 6) **Kobuviruses**. Οι *Parechoviruses* και οι *Kobuviruses* παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια ενώ οι 7) **Teschoviruses** και 8) **Erboviruses** δεν παρουσιάζουν παθογένεια σε ζωικούς οργανισμούς. 9) **Εντεροϊοί** (*Enteroviruses*).

Οι Εντεροϊοί αρχικά είχαν ταξινομηθεί στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες με βάση τις ασθένειες που προκαλούσαν στους ανθρώπους και την μολυσματικότητά τους σε ενδοκρανιακώς εμβολιασμένα ποντίκια: α) Πολιοϊοί (PV: υπεύθυνοι για την πολιομυελίτιδα στους ανθρώπους και γενικά μη παθογόνοι στα ποντίκια), β) Coxsackie A ιοί (CAV: υπεύθυνοι για ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος των ανθρώπων και για παράλυση στα ποντίκια), γ) Coxsackie B ιοί (CBV: υπεύθυνοι για ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος των ανθρώπων και ασθένειες της καρδιάς, καθώς και της σπαστικής παράλυσης στα ποντίκια) και δ) Echoviruses (E: μη παθογόνοι στα ποντίκια ενώ σχετίζονται με ασθένειες στους ανθρώπους, πχ. εγκεφαλίτιδα). Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, η γενωμική ανάλυση διαδέχτηκε την οροταυτοποίηση ως μέσο ανίχνευσης των Εντεροϊών. Έτσι, σύμφωνα με τα σύγχρονα μοριακά δεδομένα, το γένος των Εντεροϊών χωρίζεται σε 8 είδη (King et al., 2000). Από αυτά, τα πέντε (Poliovirus, και Human Enterovirus A-D) παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 80 ορότυποι Εντεροϊών, οι περισσότεροι από τους οποίους παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Το είδος A (HEV A) αποτελείται από τους Coxsackie ιούς A2-A8, A10, A12, A14, A16 και τον Εντεροϊό 71 καθώς και από τους Εντεροϊούς 76, 89, 90 και 91 (Oberste et al., 2005). Το είδος B (HEV B) περιλαμβάνει όλους τους Coxsackie B ιούς (CBV1-6), όλους τους Echo ιούς (E1-E9, E11-E21,

E24-27, E29-33), τον Coxsackie A9 και τους Enteroviruses 69 και 73 (EV69, EV73) (Oberste et al., 2001). Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και οι Enteroviruses 74, 75 (Oberste et al., 2004a), 77, 78 (Norder et al., 2003), 79-88, 97, 100 και 101 που κατατάσσονται στο είδος B (HEV B) (Oberste et al., 2007). Το είδος C (HEVC) αποτελείται αποκλειστικά από τους Coxsackie A ιούς (A1, A11, A13, A15, A17-22 και A24). Πρόσφατες μελέτες συστήνουν ότι οι πολιοϊοί θα έπρεπε να επαναταξινομηθούν και να συμπεριληφθούν στο είδος C των εντεροϊών λόγω της στενής γενετικής τους συγγένειας (Brown et al., 2003). Το είδος D, περιλαμβάνει τους EV68 και EV70 και το είδος των πολιοϊών περιλαμβάνει τους πολιοϊούς 1,2 και 3 (Πίνακας 2) (Fauquet et al., 2005).

Clusters	Serotypes	Receptors
Poliovirus	poliovirus 1 (PV1), PV2, PV3	CD155 [122]
Human enterovirus A	coxsackievirus A2 (CV-A2) - CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16 enterovirus 71 (EV-71), EV-76, EV-89 - EV-92	
Human enterovirus B	coxsackievirus B1 (CV-B1) - CV-B6 CV-A9 echovirus 1 (E-1) - E-7, E-9, E-11 - E-21, E-24 - E-27, E-29 - E-33 EV-69, EV-73 - EV-75, EV-77 - EV-88, EV-93, EV-97, EV-98, EV-100, EV-101	CAR, [13] DAF [12] $\alpha_5\beta_3$ integrin [69]
Human enterovirus C	CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A22, CV-A24, EV-95, EV-96, EV-99, EV-102	ICAM-1 (CV-A2) [176]
Human enterovirus D	EV-68, EV-70, EV-94	
Simian enterovirus A	simian enterovirus A1 (SEV-A1)	
Bovine enterovirus	bovine enterovirus 1 (BEV-1), BEV-2	
Porcine enterovirus B	porcine enterovirus 9 (PEV-9), PEV-10	

**Πίνακας 2:** Ταξινόμηση του γένους των Εντεροϊών (De Jesus, 2007).

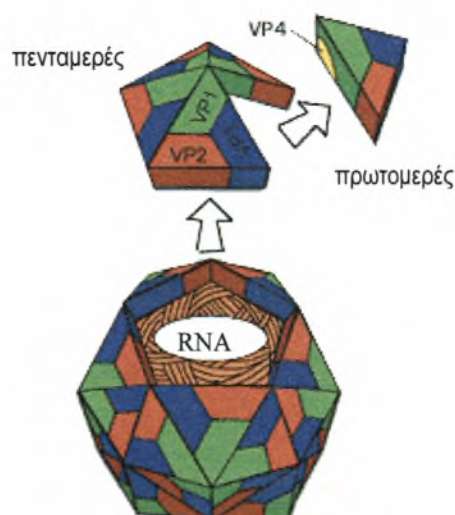
Ο πολιοϊός ήταν ο πρώτος ιός που συντέθηκε *in vitro* και το 1981, το στέλεχος Mahoney του πολιοϊού τύπου 1 αποτέλεσε τον πρώτο PicoRNA ιό που αλληλουχήθηκε. Εξαιτίας της έκφρασης τριών μοναδικών ομάδων τεσσάρων αντιγονικών καθοριστών (N-Ag1, 2, 3A και 3B) στην επιφάνεια του πολιοϊού, ο ιός απαντάται σε 3 ορότυπους (PV1, PV2 και PV3). Οι ορότυποι διακρίνονται με βάση την εξουδετέρωσή τους από διαφορετικά μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα (διαδικασία οροεξουδετέρωσης). Τα αντισώματα που επάγονται κατά του ορότυπου 1 δεν εξουδετερώνουν 100% την μολυσματικότητα των ορότυπων 2 ή 3 (Pfister et al., 1999). Επομένως χρειάζεται ορός διαφορετικής κάθε φορά σύστασης σε αντισώματα, προκειμένου να εξουδετερωθεί ο PV1 ή ο PV2 ή ο PV3. (Hellen et al 1993). Γενικά, <1% των μολύνσεων με τον ορότυπο 1 προκαλούν κλινική πολιομυελίτιδα, ενώ το ποσοστό είναι ακόμα μικρότερο για τους ορότυπους 2 και 3.

## 1.2 ΔΟΜΗ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

### 1.2.1 Δομή Καψιδίου

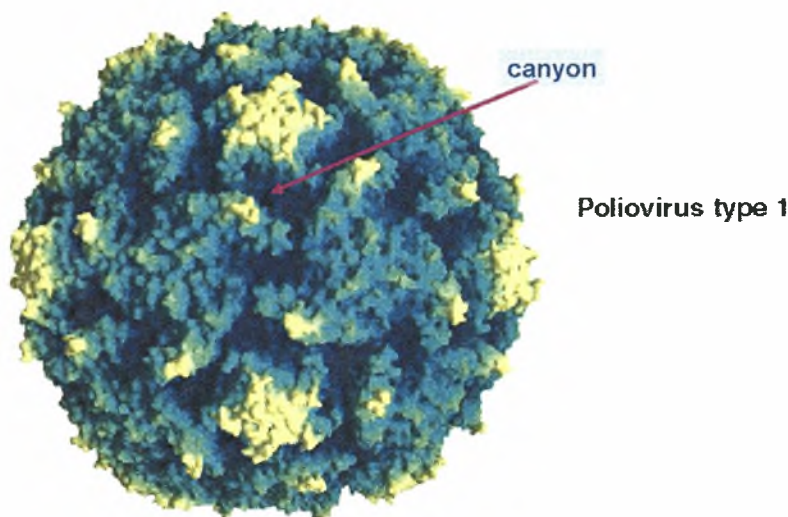
Το καψίδιο των πολιοϊών έχει εικοσαεδρική συμμετρία, αποτελείται από 60 αντίγραφα των 4 ιικών δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4 και περικλείει ένα μόνο αντίγραφο του RNA γενώματος (μονόκλωνο μόριο θετικής πολικότητας) (Solecki et al., 1998). Οι πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 είναι προϊόντα πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης. Κατά την πρωτεόλυση, η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3,VP1). Κατόπιν τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και δίνουν τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)<sub>5</sub>].

Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο 5X άξονας συμμετρίας. Επίσης μεταξύ των πενταμερών βρίσκεται και ο τριμερής 3X και ο διμερής 2X άξονας συμμετρίας. Δώδεκα πρωτομερή συναρμολογούνται και σχηματίζουν το προκαψίδιο [(VP0, VP3,VP1)<sub>5</sub>]<sub>12</sub>. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης, όπου γίνεται ο εγκλεισμός του RNA γενώματος στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2 (**Εικόνα 1**) (Wimmer et al., 1999). Η διάσπαση της VP0 δεν παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις, μιας και στο ώριμο καψίδιο παραμένουν αδιάσπαστα ένα ή δύο αντίγραφα αυτής. Το ώριμο ιικό σωματίδιο είναι πολύ σταθερό και εμφανίζει ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες, σε ισχυρά απορρυπαντικά και σε όξινες συνθήκες (Pfister al. 1999).



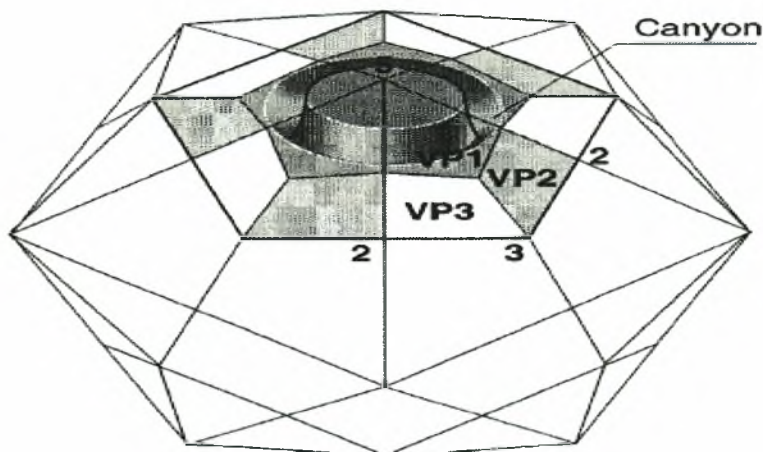
**Εικόνα 1:** Δομή του ιικού καψιδίου. Απεικονίζεται η δομή του πρωτομερούς και του πενταμερούς.

Η τρισδιάστατη δομή του καψιδίου του πολιοϊού έχει καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και για τους 3 ορότυπους του ιού (**Εικόνα 2**) (Filman et al., 1989, Hogle et al., 1985, Lentz et al., 1997).



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση της δομής του πολιοϊού τύπου 1 με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/polio.htm>).

Τοπολογικά, οι VP1, VP2 και VP3 πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η VP4 στην εσωτερική (De Jesus, 2007). Πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας εδράζεται μια εκτεταμένη διαμόρφωση αύλακας (canyon) (**Εικόνα 3**).



**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Απεικονίζονται οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας και οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς. Απεικονίζεται και η αύλακα (canyon) που βρίσκεται γύρω από τον 5X άξονα συμμετρίας (Blondel et al. 1998).

Η αύλακα σχηματίζεται από αμινοξέα των VP1, VP2, VP3 και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα CD155 (He et al., 2000). Οι VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση (αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων το οποίο πλαισιώνεται από 2 α-έλικες, συνδεδεμένες με διαφορετικές θηλιές). Οι κλώνοι των β-βαρελίων συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές, χαρακτηριστικές για κάθε πρωτεΐνη, και προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου. Αυτές οι αμινοξικές θηλιές αποτελούν τις κύριες δομές των αντιγονικών θέσεων του ιού (N-Ags). Στους πολιοϊούς έχουν αναγνωρισθεί 4 θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων (N-AgI, N-AgII, N-AgIIIA, N-AgIIIB). Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1. Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-226 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172 και 270 της VP2. Η N-AgIIIA αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60 και 71-73 της VP3 και τέλος η N-AgIIIB από τα αμινοξέα 76-79 της VP3 και 72 της VP2. Η VP4, η οποία στερείται σχεδόν ολοκληρωτικά δευτεροταγούς δομής, διαμορφώνει μία εκτεταμένη δομή, η οποία εντοπίζεται εσωτερικά κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες έχοντας το N-τελικό της άκρο κοντά στον πενταμερή άξονα και το C-τελικό, κοντά στον άξονα τριμερούς συμμετρίας.

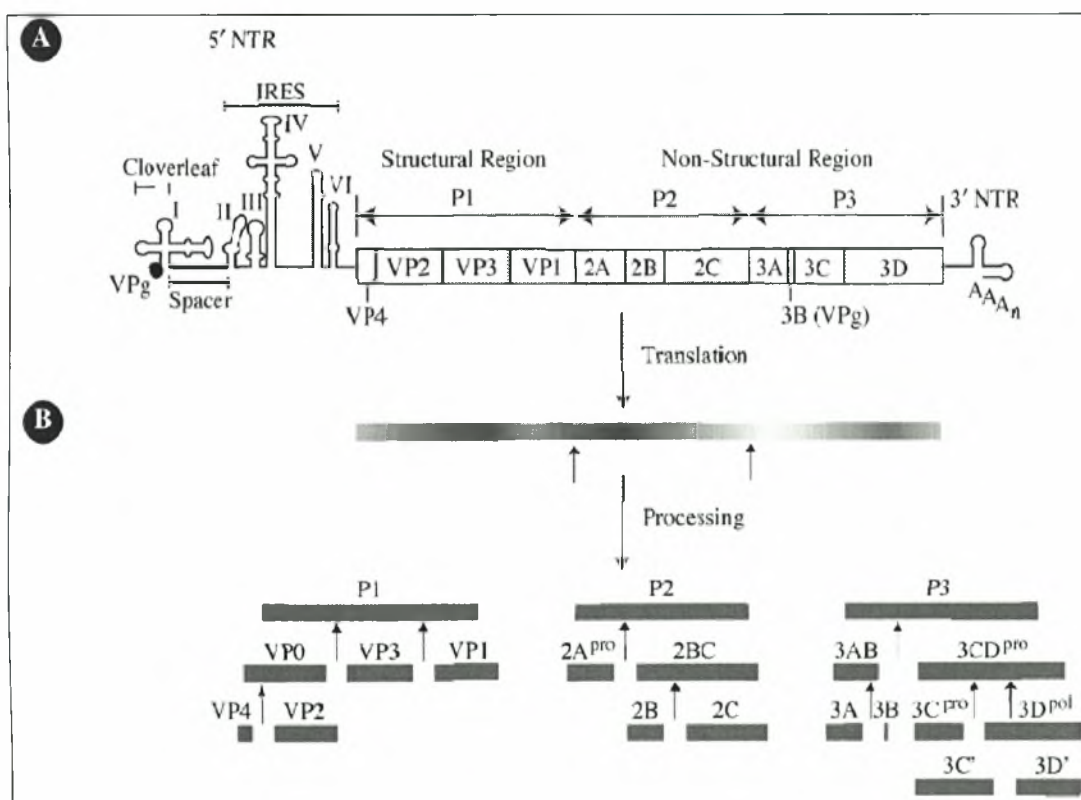
### 1.2.2 Οργάνωση γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του πολιοϊού ήταν το πρώτο γονιδίωμα ιού που αλληλουχήθηκε και χαρτογραφήθηκε γενετικά (Kitamura et al., 1981). Αποτελείται από ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA γένωμα μήκους περίπου 7441 βάσεων. Μία σχετικά μακριά 5' περιοχή (5'NTR) μήκους 742 νουκλεοτιδίων, στην οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη η ιϊκή πρωτεΐνη VPg, ακολουθείται από ένα μονόκλωνο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο κωδικοποιεί για μία πολυπρωτεΐνη μήκους 2209 κωδικονίων και από μία 3' περιοχή (3'NTR) μήκους 70 νουκλεοτιδίων (**Εικόνα 4 A**) (Mueller et al., 2005).

Τα πρώτα 88 νουκλεοτίδια του 5' άκρου του γενώματος σχηματίζουν μία δομή τριφυλλιού (cloverleaf) (Andino et al., 1990), η οποία εμπλέκεται στη δόμηση του συμπλόκου αντιγραφής κατά την σύνθεση του θετικού (+) RNA κλώνου. Τα νουκλεοτίδια 127-608 αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ένα στοιχείο IRES (Internal Ribosome Entry Site), το οποίο είναι υπεύθυνο για την μολυσματικότητα του ιού καθώς και για την μετάφραση του γενώματός του (Wimmer et al., 1993). Το 3' άκρο περιέχει δύο ανάστροφες θηλιές, οι οποίες αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν μία δομή ψευδοκόμπου (Pillipenko et al., 1992). Στο τέλος του 3' άκρου του ιϊκού RNA υπάρχει η poly (A) ουρά που αποτελείται από περίπου 60 αδενυλικά κατάλοιπα και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και μετάφρασης του ιϊκού γενώματος (Yogo and Wimmer, 1972). Αντίθετα με τα περισσότερα ευκαρυωτικά mRNAs το RNA γένωμα του

πολιοϊού δεν έχει τη δομή καλύπτρας στο 5' άκρο, η οποία είναι απαραίτητη για την έναρξη της μετάφρασης στο φυσιολογικό ευκαρυωτικό mRNA.

Η 5' NTR περιοχή είναι μη μεταφραζόμενη και περιέχει συντηρημένα στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της μετάφρασης και αντιγραφής του ιού. Η αλληλουχία της 5' NTR εμφανίζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών, γεγονός πολύ σημαντικό για την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής της και την συμμετοχή της σε σημαντικές λειτουργίες του ιού. Η κωδική περιοχή αποτελεί ένα μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης το οποίο μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία χωρίζεται σε 3 περιοχές. Την περιοχή P1, η οποία περιέχει τις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3, VP4, την περιοχή P2, η οποία αποτελείται από τις λειτουργικές πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C και το λειτουργικό ενδιάμεσο 2BC και τέλος την περιοχή P3, η οποία κωδικοποιεί για τις λειτουργικές πρωτεΐνες 3A, 3B, 3C, 3D καθώς και για τα λειτουργικά ενδιάμεσα 3AB και 3CD (**Εικόνα 4 B**) (Yin et al., 2007).



**Εικόνα 4:** Α) Οργάνωση του γενώματος του πολιοϊού τύπου 1 (Mahoney) [PV1(M)], Β) Πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης. Φαίνονται οι περιοχές P1, P2 και P3 στις οποίες χωρίζεται η πολυπρωτεΐνη (De Jesus, 2007).

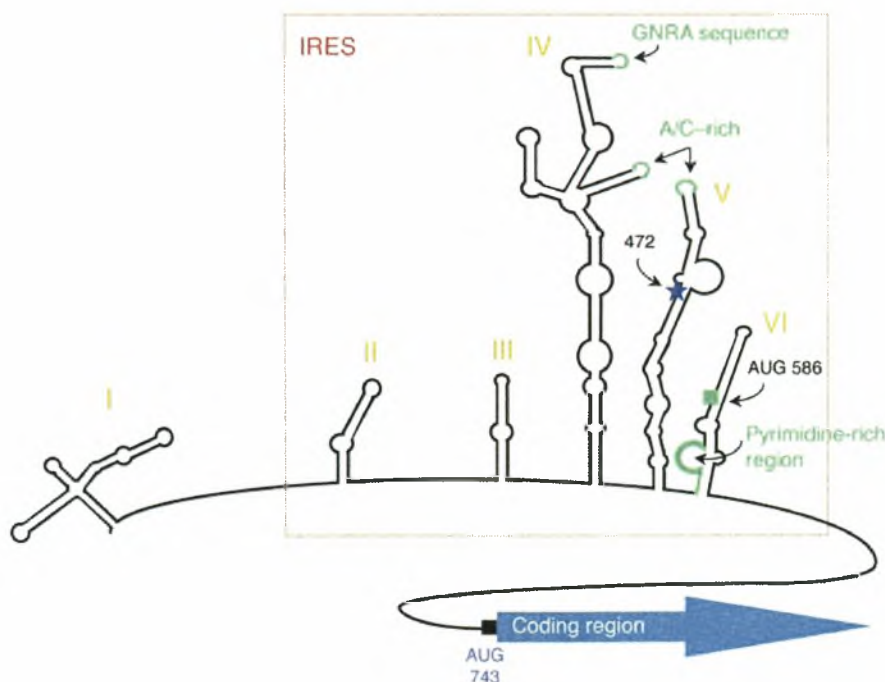
Η πολυπρωτεΐνη υφίσταται πρωτεόλυση με αποτέλεσμα να προκύπτουν οι τελικές δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και οι ενδιάμεσες ιϊκές πρωτεΐνες VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Minor, 1999). Η 3' NTR περιοχή



εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του αρνητικού RNA κλώνου, λόγω της ύπαρξης, σε αυτήν, της χαρακτηριστικής δομής ψευδοκόμπου (Wimmer et al., 1993).

### 1.2.2.1 Μη κωδική περιοχή 5' (5' NTR)

Η 5' NTR περιοχή αποτελεί, γενικά, το πιο ομόλογο τμήμα του γονιδιώματος, μεταξύ στενά συγγενικών ιών, και περιέχει ορισμένες ομάδες νουκλεοτιδίων, οι οποίες είναι μερικώς ή ακόμη και πλήρως συντηρημένες από είδος σε είδος (Stanway et al., 1984). Τέτοιες συντηρημένες αλληλουχίες χρησιμοποιούνται σήμερα ως θέσεις υβριδοποίησης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση μεγάλου εύρους ιών της οικογένειας *Picornaviridae* (Hygyria et al., 1989, Torgensen et al., 1989). Έχει αποδειχθεί (Macadam et al., 1995), ότι η 5' NTR περιοχή εμπλέκεται στην εξασθένηση και των τριών οροτύπων των πολιοϊών, γι αυτό και αποτέλεσε για πολλά χρόνια τον στόχο πολλών προσπαθειών για την κατανόηση της νευρομολυσματικότητας και εξασθένησης των ιών αυτών (Stanway 1990). Η 5' NTR χωρίζεται σε δύο περιοχές: στη δομή τριφυλλιού (cloverleaf) που αποτελεί το δομικό στοιχείο I και στα στοιχεία IRES (Internal Ribosome Entry Site), τα οποία περιλαμβάνουν τα δομικά στοιχεία II-VI (**Εικόνα 5**).



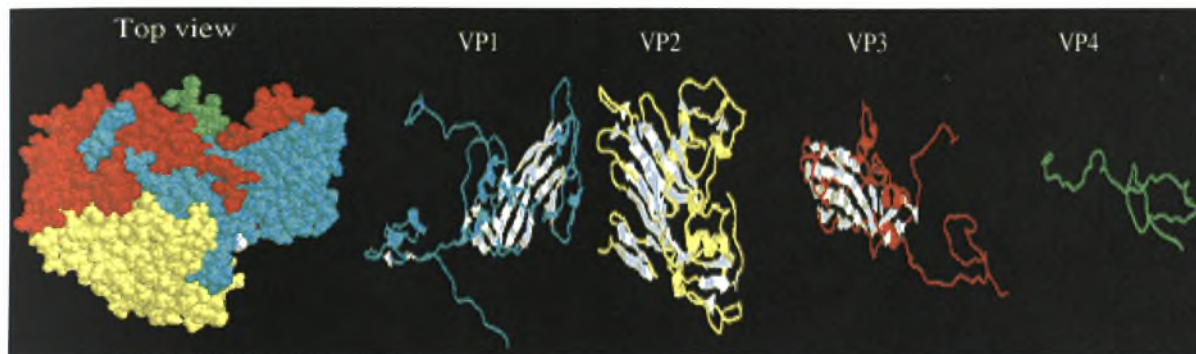
**Εικόνα 5:** Διάγραμμα της δευτεροταγούς δομής της 5' NTR περιοχής ([www.ici.org/cqi/content/full/113/12/1678](http://www.ici.org/cqi/content/full/113/12/1678))

Το δομικό στοιχείο I (cloverleaf) είναι πολύ σημαντικό για την σταθερότητα του ιϊκού RNA και για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας (Barton et al., 2001). Αποτελείται από τις περιοχές A, B, C και D. Στην περιοχή B συνδέεται η κυτταρική πρωτεΐνη PCBP (Poly (rC) Binding Protein ) και το ιϊκό γένωμα σταθεροποιείται, ενώ παράλληλα ευνοείται η μετάφρασή του. Το cloverleaf δρα και σαν μοριακός διακόπτης συντονίζοντας τη μετάβαση από τη μετάφραση του ιϊκού γενώματος στην αντιγραφή, με την πρόσδεση της ιϊκής πρωτεΐνης 3CD μαζί με την PCBP (Gamarnic and Andino , 1998). Τα IRES στοιχεία έχουν μήκος 400 νουκλεοτιδίων και αποτελούνται από πέντε δομικά RNA στοιχεία (II-VI), μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, ένα κωδικόνιο έναρξης AUG και μία υπερμεταβλητή περιοχή. Τα στοιχεία IRES είναι απαραίτητα για την έναρξη της μετάφρασης του ιϊκού RNA, μέσω της πρόσδεσης των ριβοσωμάτων και παραγόντων μετάφρασης στο εσωτερικό των IRES και της μετακίνησής τους μέχρι το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

#### 1.2.2.2 Δομικές πρωτεΐνες

Οι τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP4, VP2, VP3 και VP1 κωδικοποιούνται στο 5' άκρο του γονιδιώματος των πολιοϊών. Οι VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοιο μέγεθος μεταξύ των διαφορετικών μελών της οικογένειας *Picornaviridae* [209-302 (VP1), 218-272 (VP2) και 221-246 (VP3) αμινοξέα], ενώ η VP4 είναι αρκετά μικρότερη (68-85 αμινοξέα) (Stanway, 1990). Ένας σημαντικός ρόλος των δομικών πρωτεϊνών είναι ότι αποτελούν τις αντιγονικές θέσεις του ιού. Η VP4, συμβάλλει στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, στην αποδιάταξη του καψιδίου και στην απελευθέρωση του ιού στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, μέσω λειτουργικής τροποποίησης που περιλαμβάνει σύνδεση με μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο (Chow et al., 1987) και δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κινάσες. Στην αποδιάταξη του καψιδίου συμμετέχει και η VP2, η οποία επίσης παρουσιάζει δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κυτταρικές κινάσες (Ratka et al., 1989).

Οι VP1, VP2 και VP3, παρουσιάζουν ένα κοινό δομικό μοτίβο (αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων) και βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου του ιού, ενώ η VP4 στην εσωτερική (**Εικόνα 6**) (Hogle, 2002).



**Εικόνα 6:** Αριστερά απεικονίζεται το χωροπληρωτικό μοντέλο ενός πρωτομερούς. Η VP1 φαίνεται με θαλασσί χρώμα, η VP2 με κίτρινο χρώμα, η VP3 με κόκκινο και η VP4 με πράσινο χρώμα. Με λευκό απεικονίζεται το μόριο σφιγγοσίνης (rocket factor).

Δεξιά φαίνονται οι δευτεροταγές δομές των δομικών πρωτεϊνών. Οι α-έλικες και οι θηλιές είναι τονισμένες με διαφορετικό χρώμα για την κάθε δομική πρωτεΐνη ενώ τα β-φύλλα είναι λευκά (Airaksinen, 2000).

Οι κλώνοι των β-βαρελίων συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές, χαρακτηριστικές για κάθε πρωτεΐνη και προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου. Αυτές οι αμινοξικές θηλιές αποτελούν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Η VP1, περιβάλλει τον άξονα πενταμερούς συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 είναι τοποθετημένες η μία δίπλα στην άλλη σε μεγαλύτερη απόσταση από τον άξονα. Τα πενταμερή σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων του N-τελικού και του C-τελικού άκρου των VP1, VP3 και VP4. Τα γειτονικά πενταμερή, συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3 πρωτεϊνών και ενδεχομένως αυτή η σύνδεση διευκολύνει την αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιϊκού RNA κατά την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή (Stanway, 1990).

Στο εξωτερικό του καψιδίου, γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας εδράζεται μια εκτεταμένη διαμόρφωση αύλακας (canyon). Το βόρειο τμήμα της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 91-107 και 166-169 της VP1. Το νότιο τμήμα της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 138-142 και 172 της VP2 και 223-226 της VP1. Στη βάση της αύλακας, στο εσωτερικό του β-βαρελίου της VP1 βρίσκεται ένα μόριο σφιγγοσίνης, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου (Filman et al., 1989).

### 1.2.2.3 Λειτουργικές πρωτεΐνες

Γενετικές και βιοχημικές μελέτες καταδεικνύουν την απαίτηση των πρωτεϊνών των περιοχών P2 και P3 του γενώματος των πολιοϊών για την σύνθεση του RNA. Έχει αναγνωριστεί μία cis- acting RNA αλληλουχία στην κωδική περιοχή της πρωτεΐνης 2C, απαραίτητη για την αντιγραφή του γενώματος. Οι λειτουργικές πρωτεΐνες των πολιοϊών και όλων των Picorna ιών κωδικοποιούνται στο 3' άκρο του γονιδιώματός τους και είναι υπεύθυνες εκτός από τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA και για διάφορες μεταβολές στον μεταβολικό κύκλο και στην μορφολογία του ξενιστή. Διακρίνονται συνολικά επτά λειτουργικές πρωτεΐνες, οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D καθώς πολλές φορές και τα πρόδρομα μόρια αυτών είναι λειτουργικά, όπως τα ενδιάμεσα 2BC, 3AB και 3CD.

Η έκφραση της πρωτεΐνης 2BC των πολιοϊών σε κύτταρα ζύμης και θηλαστικών οδηγεί σε ένα μεγάλο αριθμό μεταβολικών και μορφολογικών αλλαγών, όπως αναστολή της αύξησης, ενδοκυτταρικό μεμβρανικό πολλαπλασιασμό, εμπόδιση του μονοπατιού εξωκύτωσης καθώς και αυξημένη μεμβρανική διαπερατότητα (Barco and Carrasco, 1998). Η σημαντικότερη ιδιότητα του λειτουργικού ενδιάμεσου 2BC είναι ότι προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων στα οποία επιτελείται η ιϊκή αντιγραφή.

Η 3AB είναι μία πρωτεΐνη 12 KDA η οποία συνδέεται στα μεμβρανικά κυστίδια των μολυσμένων κυττάρων μέσω μίας υδρόφοβης περιοχής 22 καταλοίπων. Επίσης, προσδένεται στην RNA πολυμεράση 3D, «στρατολογώντας» το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια επάγοντας την έναρξή της. Είναι πιθανόν, ότι η 3AB βοηθά στην πρόσδεση της πρωτεΐνης VPg στις μεμβράνες για την έναρξη της σύνθεσης του RNA. Η VPg καθώς και η 3A προέρχονται από την πρωτεολυτική διάσπαση της 3AB (Strauss and Wuttke, 2003). Τέλος, η 3AB λειτουργεί ως μόριο συνοδός (chaperon), διπλώνοντας το ιϊκό RNA στην ευνοϊκότερη θερμοδυναμικά διαμόρφωση, ξεδιπλώνοντας σύνθετες δευτεροταγείς RNA δομές προκειμένου να προσδεθεί η ιϊκή πολυμεράση και διαχωρίζοντας τους κλώνους θετικής και αρνητικής πολικότητας κατά τη δημιουργία του αντιγραφικού ενδιάμεσου.

Η πρωτεΐνη 3CD είναι μία πρωτεάση, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιϊκή αντιγραφή αλλά δεν παρουσιάζει δραστηριότητα πολυμεράσης (Marcotte et al., 2007). Η 3CD μαζί με την 3AB σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο προσδένεται με μεγάλη ειδικότητα στη δομή τριφυλλίου (cloverleaf) και προάγουν την έναρξη της σύνθεσης της αλυσίδας RNA αρνητικής πολικότητας. Η σύνδεση της 3AB στην 3CD διεγείρει την αυτοκαταλυτική πρωτεολυτική διάσπαση της τελευταίας σε 3C και 3D στον πυρήνα του κυττάρου. Η 3C, πρωτεολύει μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων, σταματώντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου (Weidmann et al., 2003).

### 1.2.2.3.a Λειτουργική πρωτεΐνη 2A

Η πρωτεΐνη 2A ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών της κυστεΐνης και απαιτείται για το πρωτεολυτικό κόψιμο μεταξύ των περιοχών P1 και P2 της ιϊκής πολυπρωτεΐνης χωρίζοντας τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες (Toyoda et al., 1986). Συμμετέχει στη διάσπαση της κυτταρικής πρωτεΐνης, p220, η οποία είναι απαραίτητη για την cap- εξαρτώμενη μετάφραση, και με αυτό τον τρόπο είναι πιθανό να μεσολαβεί στο λεγόμενο «shut-off» (διακοπή) της κυτταρικής μετάφρασης (Krausslich et al., 1987). Η διακοπή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης από την 2A, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης πρωτεϊνών απαραίτητων για τη βιωσιμότητα του κυτάρου, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της κασπάσης 3 (Calandria et al., 2004). Η μετάφραση της πολυπρωτεΐνης των πολιοϊών δεν φαίνεται να επηρεάζεται, αφού χρησιμοποιεί τα στοιχεία IRES της 5'NTR περιοχής για τη δέσμευσή της στα ριβοσώματα και την έναρξη της μετάφρασης.

### 1.2.2.3.b Λειτουργική πρωτεΐνη 2B

Η πρωτεΐνη 2B είναι μία μικρή, υδρόφοβη, μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της σύνθεσης του ιϊκού RNA. Το C τελικό άκρο της 2B περιέχει μία υδρόφοβη περιοχή και μία συντηρημένη κατιονική αμφιπαθητική α-έλικα, η οποία διαδραματίζει ένα κρίσιμο ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης και στη σύνδεσή της στις μεμβράνες. Η 2B έχει επίσης ονομαστεί και ιοπορίνη, πρωτεΐνη η οποία ολιγομερίζεται και εισέρχεται στο εσωτερικό των μεμβρανών δημιουργώντας πόρους, αυξάνοντας έτσι την διαπερατότητά τους για τα ιόντα  $Ca^{2+}$  και πιθανώς και για άλλα ιόντα. Η σύνθεση της πρωτεΐνης 2B οδηγεί στην αναστολή της έκκρισης των πρωτεϊνών από το σύστημα Golgi και στην αύξηση της μεμβρανικής διαπερατότητας, η οποία είναι σημαντική για την απελευθέρωση του ιού από τα κύτταρα. Επίσης, είναι μερικώς υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανικών κυστιδίων στα μολυσμένα κύτταρα, τα οποία μεμβρανικά κυστίδια αποτελούν τις θέσεις της ιϊκής αντιγραφής (Fields Virology, 2007). Τέλος, έχει την δυνατότητα να ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (Van Kuppeveld, 1997).

### 1.2.2.3.c Λειτουργική πρωτεΐνη 2C

Η πρωτεΐνη 2C έχει μήκος 329 αμινοξέα, παρουσιάζει δραστικότητα υδρόλυσης ATP και GTP και είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στους Picorna ιούς (Pfister and Wimmer, 1999). Βρίσκεται προσδεμένη σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου κυρίως μέσω της N-τελικής αλλά και της C-τελικής περιοχής της (Teterina et al., 1997). Μελέτες καταδεικνύουν ότι

η 2C παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Li and Baltimore, 1988) αλλά και στην καψιδίωση του ιϊκού RNA (Li and Baltimore, 1990). Τέλος, η 2C περιέχει μερικά μοτίβα τα οποία εντοπίζονται στην υπεροικογένεια των ελικασών και είναι πολύ σημαντικά κατά τον πολλαπλασιασμό των πολιοϊών.

#### 1.2.2.3.d Λειτουργική πρωτεΐνη 3A

Η πρωτεΐνη 3A μήκους 87 αμινοξέων, προσδένεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του υδρόφοβου αμινοτελικού της άκρου. Η αμινοτελική περιοχή της 3A επίσης είναι σημαντική και για την σύνθεση του κλώνου θετικής πολικότητας καθώς και για την σωστή επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης. Τέλος, η πρωτεΐνη 3A επάγει αλλαγές στις μεμβράνες και τον σχηματισμό κυστιδίων αντιγραφής του ιού μέσω της «στρατολόγησης» του συμπλόκου πρωτεϊνών GBF1/ Arf1 στις μεμβράνες (Belon et al., 2007).

#### 1.2.2.3.e Λειτουργική πρωτεΐνη 3B (VPg)

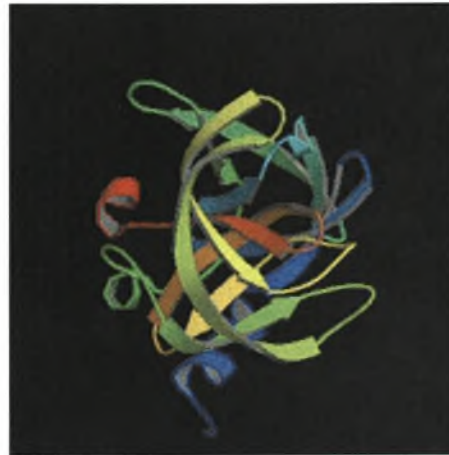
Η πρωτεΐνη VPg είναι πρωτεΐνη μικρού μεγέθους (22 αμινοξέα), η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο κάθε νεοσυντιθέμενου RNA κλώνου των πολιοϊών (Richards et al., 2006). Εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιϊκού RNA και μπορεί να προσκολληθεί ομοιοπολικά στο RNA χωρίς να χρειάζεται την παρουσία άλλων παραγόντων. Η VPg ουρυδιλιώνεται από την 3D πολυμεράση σε VPgpUpU στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, και το τελευταίο χρησιμοποιείται ως εκκινητικό μόριο κατά την αντιγραφή του ιϊκού RNA (Lyle et al., 2002).

#### 1.2.2.3.f Λειτουργική πρωτεΐνη 3C

Η πρωτεΐνη 3C ανήκει στην υπεροικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει ομολογία με την παπαΐνη. Επίσης, έχει στενή δομική ομολογία με πρωτεάσες σερίνης, οι οποίες μοιάζουν με τρυψίνη, γεγονός που επιτρέπει την πρόβλεψη, ότι το ενεργό κέντρο κατάλυσης περιλαμβάνει μία κυστεΐνη (στην θέση 147 στους πολιοϊούς), μία ιστιδίνη (στην θέση 40) και ένα ασπαρτικό οξύ (στην θέση 85). Αυτή η καταλυτική τριάδα είναι υψηλά συντηρημένη σε όλους τους Picorna ιούς (Stanway, 1990). Η 3C είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων και φαίνεται να προτιμά την πέψη καταλοίπων γλουταμίνης – γλυκίνης (Gln-Gly). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις κοντά στο 5' άκρο του RNA των πολιοϊών, που οδηγούν σε ελαττωματική σύνθεση του RNA, μπορούν να αντιστραφούν μέσω μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη 3C (Andino et al., 1990). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι υπάρχει πιθανά, άμεση αλληλεπίδραση της 3C και του ιϊκού

RNA. Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η 3C διεγείρει την ιϊκή μετάφραση αποκόπτοντας το καρβοξυτελικό άκρο της κυτταρικής πρωτεΐνης La, η οποία διεγείρει την ιϊκή μετάφραση προσδενόμενη στα στοιχεία IRES. Επίσης, αποκόπτει και την πρωτεΐνη PABP εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική μετάφραση, ενώ τέλος αποκόπτει και την πρωτεΐνη PTB, η οποία προάγει την ιϊκή μετάφραση επάγοντας την εκκίνηση της ιϊκής αντιγραφής (Kuyumcu-Martinez et al., 2004). Στην **εικόνα 7** φαίνεται η δομή της 3C πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

**Εικόνα 7:** Δομή της 3C πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων X



#### 1.2.2.3.g Πολυμεράση 3D

Η 3D πολυμεράση των πολιοϊών είναι μία RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση, η οποία κωδικοποιείται από το ίδιο το γένωμα του ιού. Είναι η πιο συντηρημένη από τις μη δομικές πρωτεΐνες, παρουσιάζοντας νουκλεοτιδική ομολογία μεγαλύτερη του 95% μεταξύ διαφορετικών οροτύπων εντεροϊών και εκτεταμένη αμινοξική συγγένεια ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών της οικογένειας *Picornaviridae* (Stanway et al., 1984). Η λειτουργική περιοχή της πολυμεράσης περιλαμβάνει ένα μοτίβο γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος-ασπαρτικού οξέος, το οποίο είναι συντηρημένο σε όλους τους Picorna ιούς. Δομικά η 3D πολυμεράση, μοιάζει με δεξί χέρι και αποτελείται από τις περιοχές του αντίχειρα, της παλάμης και των τεσσάρων δακτύλων (Lyle et al., 2002). Η ενεργή πολυμεράση παράγεται μέσω της πρωτεόλυσης του λειτουργικού ενδιάμεσου 3CD. Πρόσφατες μελέτες, έχουν δείξει ότι το αμινοτελικό άκρο της ώριμης 3D πολυμεράσης βρίσκεται εγκολλημένο στο εσωτερικό μιας επιφανειακής αύλακας, όπου σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι ενεργοποιούν στην θέση Asp238, ένα κατάλοιπο ιδιαίτερης σημασίας της ενεργής περιοχής της πρωτεΐνης. Η 3D πολυμεράση εξαρτάται από την παρουσία primer και καταλύει την σύνθεση των RNA κλώνων θετικής αλλά και αρνητικής πολικότητας. Τέλος, επιμηκύνει τους RNA κλώνους πάνω σε κατάλληλο εκμαγείο και ευθύνεται για την ουρουδιλίωση της VPg (Aniko et al., 1998).

#### 1.2.2.4 Μη κωδική περιοχή 3' (3' NTR)- Πολυαδενυλική ουρά [Poly (A)]

Η 3' μη κωδική περιοχή των πολιοϊών έχει μήκος περίπου 72 κατάλοιπα και διαφέρει από τα άλλα μέλη της οικογένειας *Picornaviridae*. Αυτή η διαφορά ίσως να οφείλεται στην παρουσία μιας πλήρους δομής θηλιάς (Stem Loop) στους Coxsackie B, η οποία απουσιάζει από τους πολιοϊούς (Auninen et al., 1989). Αντίθετα, στους πολιοϊούς παρουσιάζονται δύο θηλιές Χ και Ψ, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής.

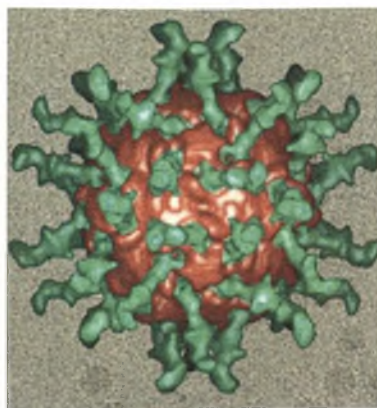
Η 3' NTR περιοχή εμπλέκεται στην σύνθεση του κλώνου RNA θετικής πολικότητας κατά την αντιγραφή του γενώματος των πολιοϊών, περιέχοντας σήματα για την πρόσδεση της πολυμεράσης. Μεταλλάξεις, οι οποίες προκαλούν αφαίρεση νουκλεοτιδίων στην 3' NTR περιοχή, περιορίζουν την σύνθεση του θετικού κλώνου σε κύτταρα νευροβλαστώματος, τα οποία έχουν μολυνθεί από το άγριο στέλεχος του πολιοϊού, ενώ δεν επηρεάζουν την σύνθεση σε κύτταρα HeLa. Το αποτέλεσμα αυτό, ίσως οφείλεται στην έλλειψη συγκεκριμένων κυτταρικών παραγόντων από τα κύτταρα του νευροβλαστώματος, οι οποίοι απαιτούνται για την σύνθεση του θετικού RNA κλώνου (Brown et al., 2004). Η αλληλεπίδραση της 3' NTR με τα στοιχεία IRES της 5' NTR πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της ιϊκής μετάφρασης. Η μη κωδική περιοχή 3' δεν περιέχει κάποιο σήμα πολυαδενυλίωσης, αφού η πολυαδενυλική ουρά [Poly (A)] που βρίσκεται στο άκρο της 3' περιοχής όλων των ιών της οικογένειας *Picornaviridae*, κωδικοποιείται γενετικά από τους ίδιους τους ιούς (Rueckert, 1985).

Η Poly (A) ουρά είναι αρκετά ετερογενής, με μέσο μήκος περίπου 35 κατάλοιπα στους Καρδιοϊούς και 100 στους Αφθοϊούς. Η μολυσματικότητα των πολιοϊών εξαρτάται από την Poly (A) ουρά, η οποία προσδένει την πρωτεΐνη PABP [Poly (A) προσδεδεμένη πρωτεΐνη]. Η PABP διεγείρει την ιϊκή μετάφραση και την σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Τέλος, η Poly (A) ουρά αποτελεί υπόστρωμα για την 3D- καταλυόμενη ουρουδιλίωση της VPg πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί το εκκινητικό μόριο για την σύνθεση του αρνητικού RNA κλώνου (Paul et al., 1998).



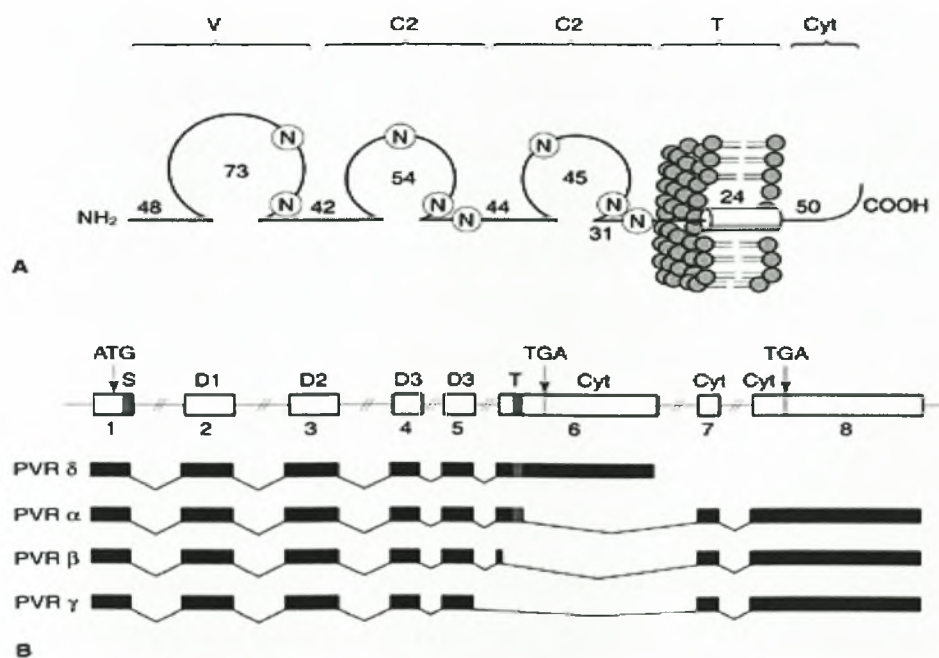
### 1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CD155 ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Έχει αποδειχθεί ότι ποντίκια ή άλλα πειραματόζωα, τα οποία δεν εκφράζουν τον υποδοχέα των πολιοϊών (Εικόνα 8), είναι ανθεκτικά στην μόλυνση από τα περισσότερα στελέχη πολιοϊών. Εξαιρέση αποτελούν συγκεκριμένα στελέχη του πολιοϊού τύπου 2, όπου μετά από ενδοφλοιϊκή ένεσή τους σε ποντίκια, προκαλούν παράλυση και θάνατο σε αυτά (Gromeier et al., 1995).



Εικόνα 8: PV1/CD155 πρόσδεση. Ανάλυση Cryo-EM 22 Å (He et al., 1998)

Στους ανθρώπους, ο κωδικοποιημένος υποδοχέας των πολιοϊών, ο οποίος αναφέρεται ως CD155 (ή hPVR), είναι μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig) και αποτελείται από τρεις εξωκυττάριας περιοχές (V-C2-C2) όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Ig-like), μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά (Εικόνα 9) (Pfister et al., 1999). Η N-τελική V περιοχή του CD155 είναι απαραίτητη για την μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς και συνεπώς για την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Υπάρχουν τέσσερις ισομορφές του CD155 (α, β, γ, δ), οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του CD155. Από αυτές οι CD155α και CD155δ είναι μεμβρανοσυνδεδεμένες, έχουν μικρή κυτταροπλασματική περιοχή και λειτουργούν ως υποδοχείς των πολιοϊών, ενώ οι CD155β και CD155γ είναι εκκρινόμενες.



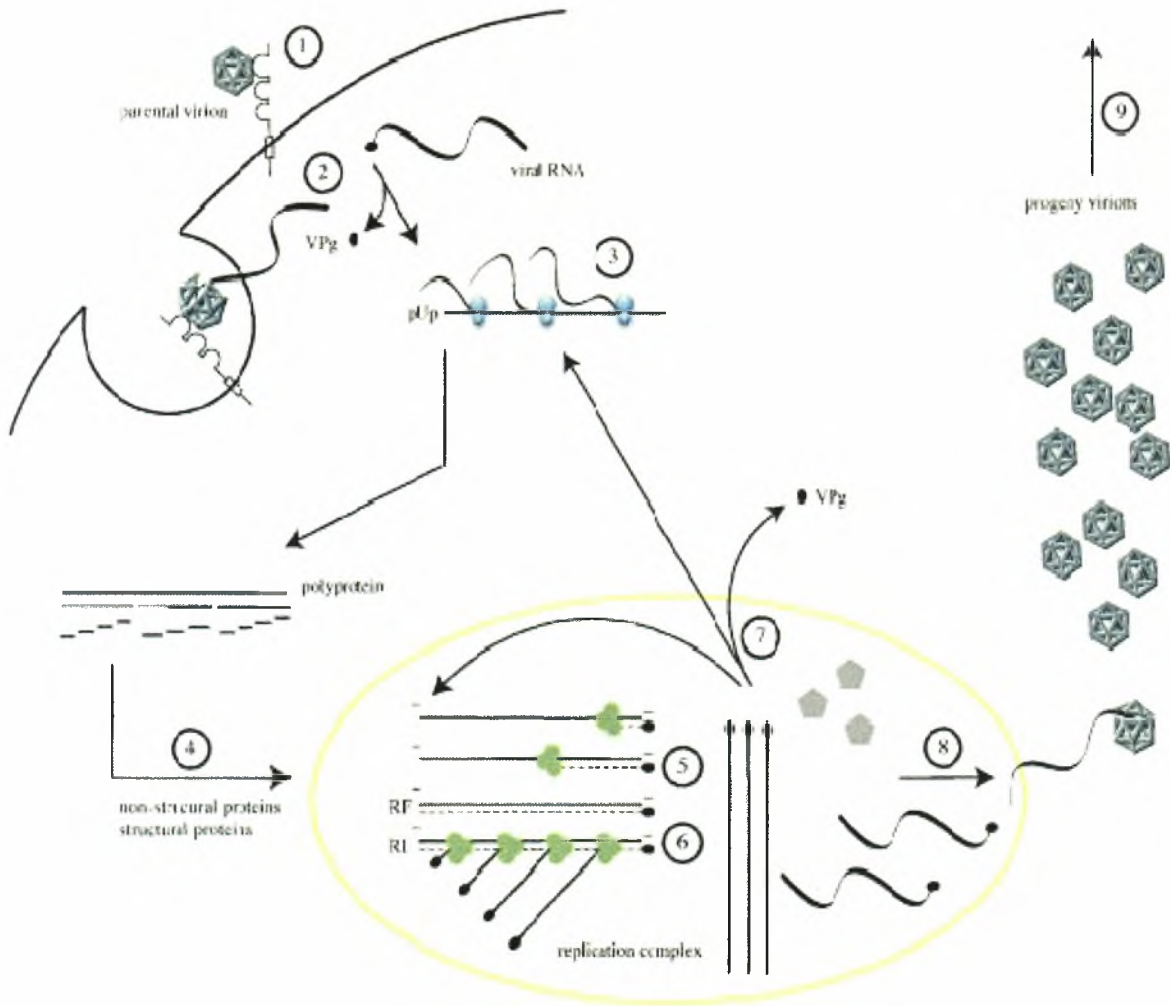
Εικόνα 9: Α) Οι λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα CD155, Β) το γονίδιο του CD155 και οι τέσσερις ισομορφές του (Solecki et al., 1998).

Κατά την μόλυνση των κυττάρων με τον ιό της πολιομυελίτιδας, ο υποδοχέας CD155 προσδένει τον ιό στην κυτταρική επιφάνεια και βοηθά στην αποσταθεροποίηση του ιϊκού σωματιδίου, μέσω μεταβολών της διαμόρφωσης του καψιδίου απαραίτητων για την απελευθέρωση του ιϊκού γενώματος στο κύτταρο. Αυτές οι μεταβολές της διαμόρφωσης περιλαμβάνουν την απώλεια της εσωτερικής πρωτεΐνης του καψιδίου VP4 και την εξώθηση του εσωτερικού N-τελικού άκρου της VP1. Η έκφραση του mRNA του CD155 έχει εντοπιστεί στον εγκέφαλο, στο νωτιαίο μυελό, στους πνεύμονες, στο έντερο, στον πλακούντα, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στο συκώτι και στους νεφρούς, σύμφωνα με αναλύσεις Northern blot, παρόλο που τις περισσότερες φορές τα ακριβή κύτταρα που εμπλέκονται δεν είναι γνωστά (Mueller et al., 2005). Μελέτες συστήνουν ότι με την πρόσδεση του πολιοϊού στον υποδοχέα του, φωσφορυλιώνεται ένα συντηρημένο στοιχείο ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί στην σύνδεση της φωσφατάσης τυροσίνης SHP-2, καταλήγοντας σε μειωμένη προσκόλληση κυττάρου-μήτρας και σε αυξημένη κυτταρική μετανάστευση *in vitro*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι αρκετοί ιστοί, οι οποίοι εκφράζουν τον CD155, όπως το συκώτι και οι νεφροί, δεν αποτελούν θέσεις για την αντιγραφή των πολιοϊών.

#### 1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών, πραγματοποιείται εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή (Rueckert, 1996). Είναι από τους πιο σύντομους κύκλους, με διάρκεια 8h στους 37° C. Συνοπτικά, ο κύκλος ζωής των πολιοϊών είναι ο εξής: Αρχικά, 1) ο ιός προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα CD155 και υφίσταται ενδοκύτωση. Το γένωμά του ελευθερώνεται στο εσωτερικό του κυττάρου με τη διαδικασία της απέκδυσης. 2) Η πρωτεΐνη VPg αποκόπτεται από το ιϊκό RNA, μέσω μίας κυτταρικής φωσφοδιεστεράσης. Στη συνέχεια, η IRES- διεγερόμενη έναρξη της μετάφρασης, οδηγεί στη σύνθεση της πολυπρωτεΐνης, η οποία έπειτα 3) πρωτεολύεται για να παράγει τις διακριτές δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Η σύνθεση του RNA πραγματοποιείται στα μεμβρανικά κυστίδια, διεγερόμενη από ιϊκές πρωτεΐνες. Αρχικά 4) ο κλώνος RNA θετικής (+) πολικότητας χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου RNA αρνητικής (-) πολικότητας με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να παράγεται δίκλωνο RNA (δομή RF). 5) Η έναρξη πολλών θετικών κλώνων από μονόκλωνο αρνητικό κλώνο παράγει το μερικά μονόκλωνο αντιγραφικό ενδιάμεσο (RI). 6) Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, το νεοπαραχθέν θετικό (+) RNA μεταφράζεται και παράγει επιπλέον ιϊκές πρωτεΐνες ή 7) συνδέεται με καψιδικά πρόδρομα ώστε να καψιδιωθεί και να προάγει την διάσπαση ωρίμανσης της VP0, 8) η οποία

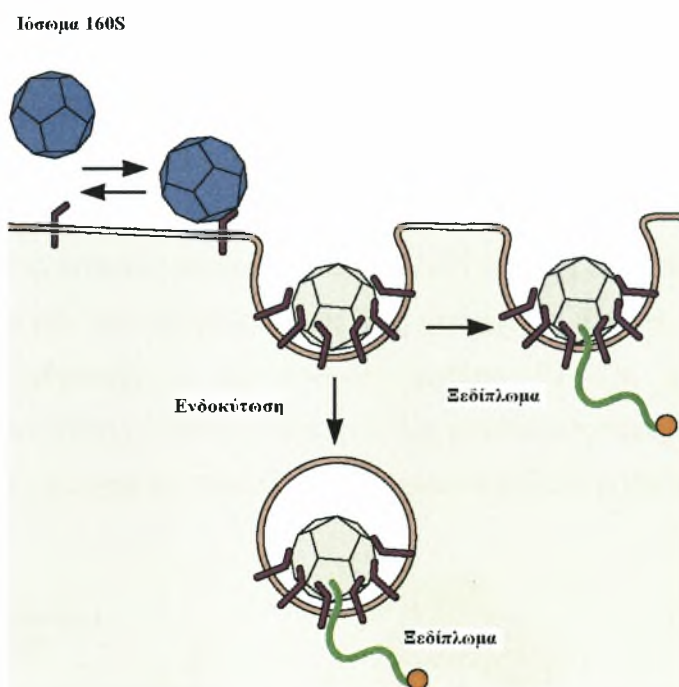
τελικά παράγει απογόνους ιούς. Τέλος, 9) τα νεοσχηματιζόμενα ιϊκά σωματίδια απελευθερώνονται από τα κύτταρα με λύση αυτών (**Εικόνα 10**) (De Jesus, 2007).



**Εικόνα 10:** Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών (De Jesus, 2007).

### 1.4.1 Προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα του και είσοδός του στο κύτταρο ξενιστής

Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο πολιοϊός προσκολλάται στον κυτταρικό υποδοχέα του CD155. Η διείσδυσή του στο κύτταρο στόχο συμβαίνει, φυσιολογικά λίγη ώρα μετά την προσκόλλησή του με τον μηχανισμό της ενδοκύτωσης, όπου εγκλείεται σε μεμβρανικά κυστίδια (**Εικόνα 11**). Η ενδοκύτωση εμπεριέχει μερικούς κινδύνους για τους ιούς, διότι εάν παραμείνουν στο κυστίδιο για πάρα πολύ χρόνο θα καταστραφούν αμετάκλητα λόγω της όξυνσης (πτώση του pH). Στη συνέχεια, μέσω του μηχανισμού της απέκδυσης, το ιϊκό γένωμα των πολιοϊών εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Τα ιϊκά σωματίδια εισχωρούν μέσα στο κύτταρο, είτε απευθείας μέσω της πλασματικής μεμβράνης, αφού προσδεθούν στον υποδοχέα, είτε με ενδοκύτωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα. Έχει αποδειχθεί, ότι δεν απαιτείται στάδιο χαμηλού pH για την απέκδυση του πολιοϊού (Gromeier and Wetz, 1990).



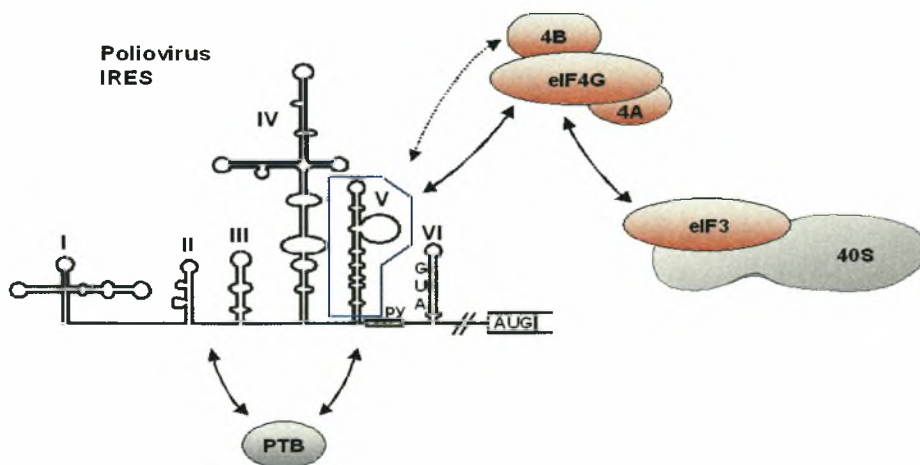
**Εικόνα 11:** Ο μηχανισμός της ενδοκύτωσης του ιοσώματος. (Belnap et al. 2000).

Μετά την προσκόλληση των πολιοϊών στον CD155, επέρχονται ορισμένες δομικές αλλαγές στο καψίδιο, απαραίτητες για την απέκδυση του ιού (Racaniello, 1996, Wimmer et al., 1994). Σχηματίζονται τα A σωματίδια τα οποία περιέχουν το ιϊκό RNA, έχουν όμως χάσει την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, το N-τελικό άκρο της VP1 που κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, έρχεται στην επιφάνεια του A σωματίου. Τα A σωματίδια είναι εξαιρετικά υδρόφοβα κι έτσι έχουν αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες σε

σύγκριση με το φυσιολογικό ιϊκό σωματίο. Η αυξημένη λιπιδική συγγένεια, αποδίδεται στο N-τελικό άκρο της VP1 μήκους 30 αμινοξικών καταλοίπων, όπου σχηματίζεται μια αμφιπαθητική έλικα (Pfister et al., 1999). Σύμφωνα, λοιπόν, με μια υπόθεση εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο, η προσκόλληση στον υποδοχέα οδηγεί στις παρακάτω δομικές αλλαγές: το N-τελικό άκρο της VP1 και το μυριστυλιωμένο N-τελικό της VP4 σχηματίζουν ένα κανάλι στην κυτταροπλασματική ή ενδοσωμική μεμβράνη, μέσω του οποίου επιτρέπουν την είσοδο του ιϊκού RNA στο κύτταρο ξενιστή (Fricks and Hogle, 1990, Blondel et al., 1998, Hogle, 2002).

#### 1.4.2. Μετάφραση ιϊκού RNA

Αμέσως μετά την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα, αυτό λειτουργεί ως mRNA και μεταφράζεται, αφού γίνει αποκοπή της πρωτεΐνης VPg από το 5' άκρο μέσω μίας άγνωστης κυτταρικής φωσφοδιεστεράσης. Η έναρξη της μετάφρασης του mRNA των πολιοϊών δεν απαιτεί τη δομή 5' m<sup>7</sup> G καλύπτρας και η 40S ριβοσωμική υπομονάδα προσδένεται στα στοιχεία IRES της 5' NTR περιοχής, τα οποία βρίσκονται 100 nt ανοδικά του κωδικονίου έναρξης AUG. Στη λειτουργικότητα αυτών των στοιχείων εμπλέκονται επίσης, ένα σιωπηλό κωδικόνιο AUG στη θέση 586 και μία ολιγοπυριμιδική περιοχή που βρίσκεται 22 nt ανοδικά αυτού. Η μετάφραση του mRNA πραγματοποιείται προς την κατεύθυνση 5'-3'. Πολυάριθμες κυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύονται στην 5' NTR περιοχή, είναι απαραίτητες για την διασφάλιση της έναρξης και την διέγερση της ιϊκής μετάφρασης (**Εικόνα 12**). Μερικές από αυτές είναι: το ανθρώπινο La αυτό-αντιγόνο μεγέθους 52 kDa, η πρωτεΐνη PTB (Polyuridylnine Tract-Binding Protein) μεγέθους 57 kDa, ο κυτταρικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF-2α και η Poly (rC) προσδενόμενη πρωτεΐνη 2 (PCBP2) (Blondel et al., 1998).



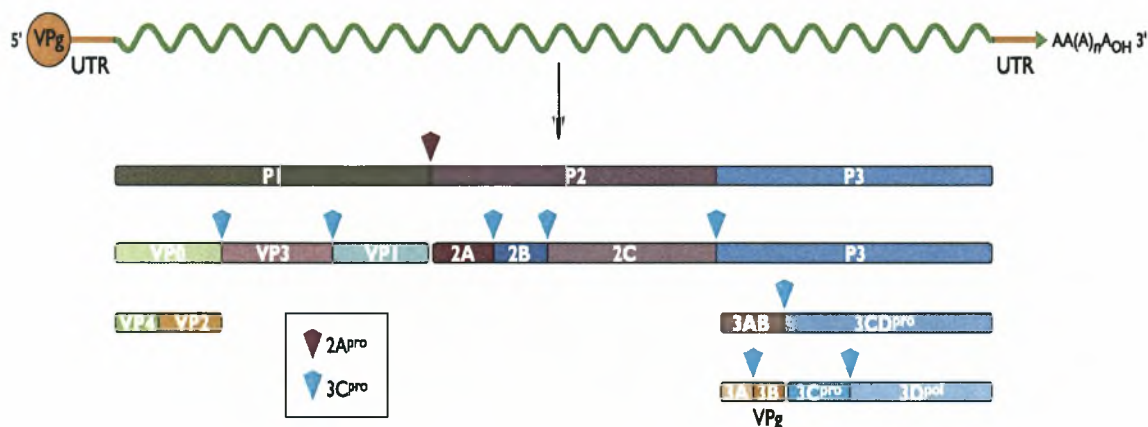
**Εικόνα 12:** Απεικονίζεται η αλληλεπίδραση των eIF παραγόντων με τα στοιχεία IRES κατά την έναρξη της μετάφρασης του ιού. Φαίνεται η PTB πρωτεΐνη που προσδένεται στην ολιγοπυριμιδική περιοχή καθώς και το σιωπηλό κωδικόνιο AUG στην VI περιοχή της 5' NTR. ([http:// www.uniklinikum-giessen.de/ bio/ ag\\_niepmann/research.htm](http://www.uniklinikum-giessen.de/bio/ag_niepmann/research.htm))

Κατά την μετάφραση του ιϊκού RNA, είναι απαραίτητοι επίσης, σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs), εκτός από τον eIF4E, ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα. Αρχικά, ο παράγοντας eIF4G1 αλληλεπιδρά απευθείας με το mRNA στην περιοχή IRES και δρα σαν υπόβαθρο για την πρόσδεση των eIF4A και eIF4B παραγόντων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συμπλόκου eIF4F. Έπειτα, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (40S) προσδένεται στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F-ιϊκό RNA, δημιουργώντας το προεναρκτήριο σύμπλοκο 43S. Το προεναρκτήριο σύμπλοκο κινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος των IRES, ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Prevot et al. 2003). Τελικά, προσδένεται η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα (60S) και σχηματίζεται το πλήρες ριβόσωμα (80S), το οποίο είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση της μετάφρασης (Ochs et al., 2001).

Στην μετάφραση του ιϊκού RNA, εμπλέκονται και οι ιϊκές πρωτεάσες του ιού, οι οποίες βοηθούν στην διεκπεραίωση των προαναφερθέντων διαδικασιών. Η 3C πρωτεάση αναστέλλει την μετάφραση του κυτάρου ξενιστή, μέσω αποκοπής της C-τελικής περιοχής (CTD), η οποία αλληλεπιδρά με διάφορους παράγοντες μετάφρασης, με αποτέλεσμα να προάγεται η μετάφραση του ιϊκού RNA γενώματος (Kuyucu-Martinez et al., 2003). Επιπρόσθετα, η 2A πρωτεάση του ιού, αποκόπτει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4G (eIF4G), που αποτελεί μέλος του συμπλόκου eIF4F, για την αναγώριση της καλύπτρας, και οδηγεί στην διακοπή της cap-εξαρτώμενης μετάφρασης του κυτάρου ξενιστή. Ένα παραπροϊόν της αποκοπής του eIF4G προσδένει το ιϊκό RNA και προάγει την IRES εξαρτώμενη μετάφραση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης, η οποία στη συνέχεια αποκόπεται μεταμεταφραστικά από τις ιϊκές πρωτεάσες για να δημιουργήσει τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιού (De Jesus, 2007).

### 1.4.3 Πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης

Η πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης του RNA γενώματος των πολιοϊών, αμέσως μετά την μετάφραση, οδηγεί στην παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών VP4, VP2, VP3, VP1 και των λειτουργικών πρωτεϊνών 2A (ή 2A<sup>pro</sup>), 2B, 2C, 3A, 3B, 3C (ή 3C<sup>pro</sup>), 3D (ή 3D<sup>pol</sup>) (Εικόνα 13) και μπορεί να χωριστεί σε τρία επιμέρους στάδια: Αρχικά η 2A<sup>pro</sup> πραγματοποιεί μία cis-διάσπαση του δεσμού Tyr-Gly στο δικό της N-τελικό άκρο και οδηγεί στην απελευθέρωση της πρόδρομης πρωτεΐνης του καψιδίου P1. Το δεύτερο στάδιο είναι η απελευθέρωση της P3 από το πρόδρομο πολυπεπίδιο P2- P3, μέσω cis-διάσπασης από την 3C<sup>pro</sup>. Σε μία αλληλουχία γεγονότων trans-διάσπασης από την 3C<sup>pro</sup>, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C<sup>pro</sup>, 3D<sup>pol</sup> και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Το τελευταίο αυτό στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων και για το λόγο αυτό αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης (Pfister et al., 1999).



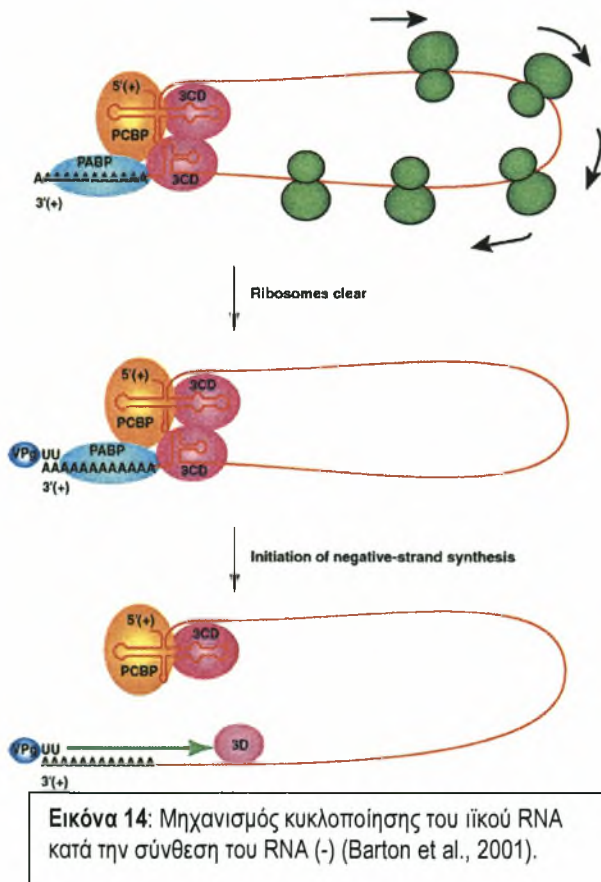
Εικόνα 13: Πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Agol et al., 1999).

Η πρωτεόλυση από τις 3C<sup>pro</sup> και 3CD<sup>pro</sup> συμβαίνει σε δεσμούς Gln-Gly ενώ από την 2A<sup>pro</sup> σε δεσμούς Tyr-Gly. Τα ξεχωριστά σήματα για την αναγνώριση των σημείων διάσπασης για τις 3C<sup>pro</sup> και 3CD<sup>pro</sup> διαφέρουν μεταξύ των πρωτεϊνών, στις αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά του σημείου κοπής, έτσι ώστε να μην υπάρχει η ίδια αποδοτικότητα κατά την διάσπαση. Το γεγονός αυτό, οδηγεί σε δυσανάλογη συσσώρευση μερικών ιικών πρωτεϊνών και των προδρόμων τους. Η 3D<sup>pol</sup> για παράδειγμα, για την παραγωγή των θετικών και αρνητικών RNA κλώνων, βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Συνήθως η 3D<sup>pol</sup> είναι παρούσα με την πρόδρομη μορφή της 3CD<sup>pro</sup>, που αποτελεί την κύρια πρωτεΐνωση για την πρωτεόλυση της

πολυπρωτεΐνης, εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού διάσπασης μεταξύ της 3C<sup>pro</sup> και 3D<sup>pol</sup>. Η 3CD<sup>pro</sup>, δεν κατέχει καμία δραστηριότητα πολυμεράσης, ενώ είναι ικανή να παρουσιάζει όλες τις λειτουργίες της 3C<sup>pro</sup> και να διαδραματίζει, επίσης, ένα πολύ σημαντικό ρόλο ως RNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη κατά την διάρκεια της αντιγραφής του γενώματος. Αυτή η ικανότητα της κωδικοποίησης πολλαπλών λειτουργιών, στην ίδια πρωτογενή αμινοξική αλληλουχία αυξάνει την γενωμική πληροφορία ενώ επιτρέπει παράλληλα στον ιό να έχει μικρό γένωμα (Mueller et al., 2005).

#### 1.4.4 Αντιγραφή του ιϊκού RNA

Μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης, ξεκινά η διαδικασία της αντιγραφής του γενώματος RNA των πολιοϊών, στα μεμβρανικά αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Colgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Αυτά τα μεμβρανικά κυστίδια σχηματίζονται από την δράση των ιϊκών πρωτεϊνών 2BC, 2C και 3A και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου (Cho et al., 1994). Η διαδικασία της αντιγραφής ξεκινά με τη σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας (-), ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί αργότερα ως εκμαγείο για την παραγωγή μορίων RNA (+) πολικότητας (Kirkegaard et al., 1991, Barton, 2003), μέσω ενός μηχανισμού κυκλοποίησης του γενώματος (**Εικόνα 14**).

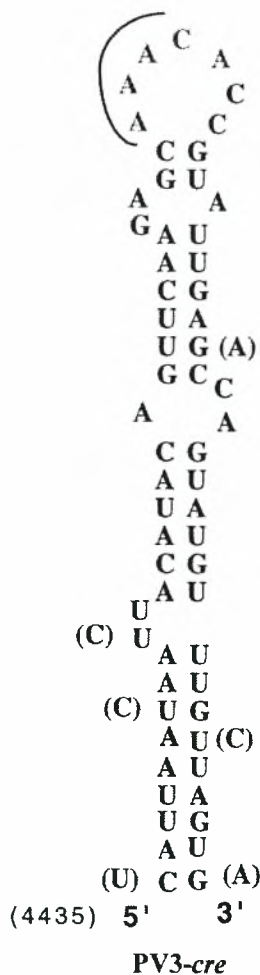




Ο μηχανισμός αυτός, απαιτεί την δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγραφής αποτελούμενο από ιϊκές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D<sup>pol</sup>, η 2C<sup>ATPase</sup>, η 3A, η 3B και οι πρόδρομες αυτών 2BC και 3AB, κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2 καθώς και από ιϊκό RNA, το οποίο περιέχει cis-acting στοιχεία απαραίτητα για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου (Egger et al., 2000).

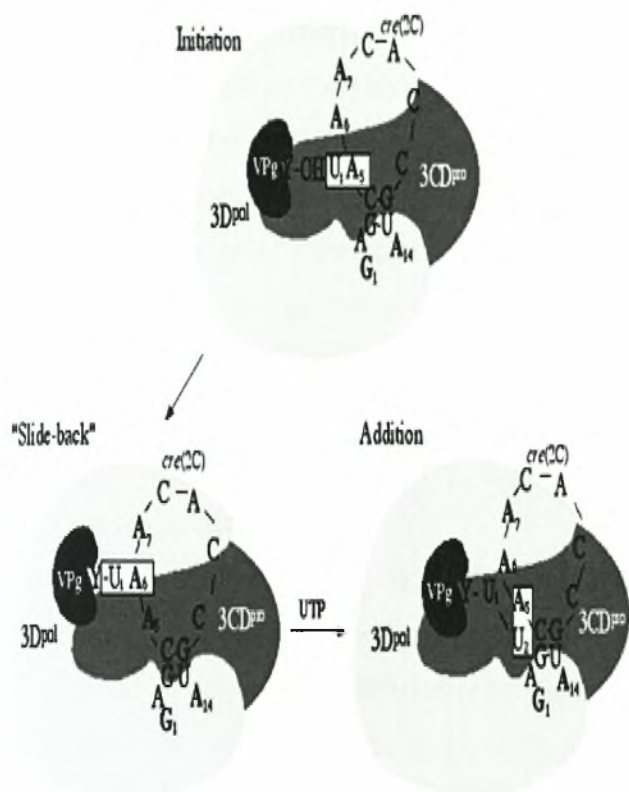
Η διαδικασία της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των PCBP2 και 3CD, οι οποίες είναι προσδεσμένες στη δομή Cloverleaf της 5' NTR περιοχής, και των PABP, 3CD, οι οποίες είναι συνδεσμένες στην poly (A) ουρά και στην 3' NTR περιοχή αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθεί η πρόσδεση της VPg στο 3'-άκρο με τη βοήθεια της PABP. Η VPg στην πορεία θα χρησιμοποιηθεί από την πολυμεράση του ιού (3D<sup>pol</sup>) ως εκκινητικό μόριο, για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου, αφού υποστεί πρώτα ουριδιλίωση σε VPgUrU.

Η παραγωγή της ουριδιλιωμένης VPg (VPgUrU) γίνεται με τη βοήθεια μίας δευτεροταγούς



δομής του γενώματος του πολιοϊού που εδράζει στο 2C κωδικόνιο (Stadler et al., 2001). Αυτή η δομή ονομάζεται CRE (Cis Response Element) και χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα το CRE σχηματίζει μία θηλιά η οποία αποτελείται από 61nt. Στην κορυφή της θηλιάς (hairpin) υπάρχει μια συντηρημένη αλληλουχία, η <sup>1</sup>GXXXAAAXXXXXXA <sup>14</sup>, η οποία αντιπροσωπεύει το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg (Εικόνα 15) (Rieder et al., 2002).

**Εικόνα 15:** Δομή του CRE γενετικού στοιχείου του πολιοϊού 3 (Rieder et al., 2000).



**Εικόνα 16:** Μοντέλο «slide back» μηχανισμού (Paul et al., 2003).

Την κυριότερη σημασία σε αυτή τη δομή έχει το νουκλεοτίδιο A-5, από το οποίο γίνεται η πρόσδεση και των δύο μορίων ουρακίλης, με τη δράση της 3D<sup>pol</sup>, στην υδροξυλική ομάδα του κατάλοιπου τυροσίνης (Y) της VPg (Goodfellow et al., 2003). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του «slide back» μηχανισμού (**Εικόνα 16**), (Paul et al., 2003). Πρόσφατα έχει προταθεί ότι η Cre εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg, εμπλέκεται μόνο στην σύνθεση του RNA (+) και όχι του RNA (-) κλώνου (Morasco et al., 2003).

Αμέσως μετά την σύνθεση του RNA (-) ξεκινά η δημιουργία της VpgrUpU από το στοιχείο CRE, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλης συγκέντρωσης εκκινητικών μορίων για την έναρξη της σύνθεσης RNA (+). Η 3D<sup>pol</sup> χρησιμοποιεί την αλληλουχία 5' AAAC 3' στη θηλιά του CRE σαν καλούπι και ουριδιλιώνει την VPg σε VpgrUpU, το οποίο χρησιμοποιείται ως εκκινητής για την σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας (Murray and Barton, 2003). Εξασφαλίζεται έτσι ένας ικανός μηχανισμός για την έναρξη της παραγωγής πολλών RNA (+) μορίων, σχεδόν ~20 μόρια ανά RNA (-) (Murray et al., 2003).

#### 1.4.5 Σχηματισμός του καψιδίου

Ο VPg-εξαρτώμενος σχηματισμός των ιϊκών σωματιδίων, αποτελεί το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των πολιοϊών και έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με την σύνθεση του RNA, αφού και οι δύο διαδικασίες πραγματοποιούνται στην επιφάνεια των μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων (Pfister et al., 1992). Κάτω από πειραματικές συνθήκες *in vitro*, το στάδιο αυτό διαρκεί 7 έως 8 ώρες.

Αρχικά, η μυριστυλιωμένη P1 πολυπρωτεΐνη, που αποτελεί τον πρόδρομο των καψιδικών πρωτεϊνών, τέμνεται από την 3CD<sup>pro</sup> και σχηματίζει τις VP0, VP1 και VP3, οι οποίες

συσσωματώνονται και σχηματίζουν ένα 5S πρωτομερές (Rueckert et al., 1996). Στη συνέχεια, 5 πρωτομερή συνδέονται και σχηματίζουν ένα καψιδικό 14S πενταμερές, όπου 12 από αυτά ενώνονται και δίνουν το 75S άδειο προκαψίδιο. Υπάρχουν δύο μοντέλα για τον σχηματισμό του προϊού, του επόμενου ενδιάμεσου κατά την συναρμολόγηση του PV σωματιδίου: Είτε το ιϊκό RNA εισάγεται μέσα στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, είτε τα πενταμερή συσσωματώνονται γύρω από το ιϊκό RNA, σχηματίζοντας τον προϊό. Το τελευταίο στάδιο της συναρμολόγησης του ιϊκού σωματιδίου είναι η τομή της VP0 σε VP2 και VP4, μέσω ενός μηχανισμού αυτοκατάλυσης. Αυτό το στάδιο είναι πολύ σημαντικό γιατί μετατρέπει τον προϊό σε ώριμο μολυσματικό ιϊκό σωματίδιο, αυξάνοντας παράλληλα την σταθερότητα του καψιδίου του (De Jesus, 2007).

Μετά την συναρμολόγηση, ο ιός συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου και απελευθερώνεται με τη λύση του κυττάρου-ξενιστή (θάνατο). Επιπλέον, οι πολιοϊοί είναι ικανοί να εγκαθιδρύσουν μόνιμη μόλυνση χωρίς το θάνατο του κυττάρου. Έχει προταθεί, ότι η PV-προκαλούμενη λύση των κυττάρων, μπορεί να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις του ιού με τον υποδοχέα του, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την έναρξη του κύκλου ζωής του (Blondel et al., 1998).

#### 1.4.6 Αποτελέσματα της μόλυνσης με τον πολιοϊό στο κύτταρο- ξενιστής

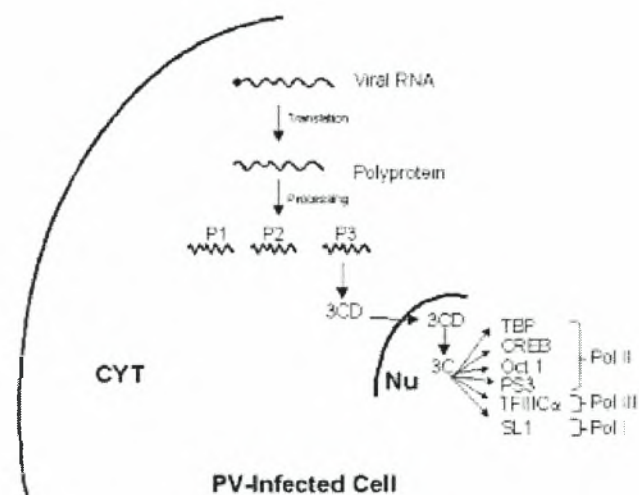
Τα κύτταρα-ξενιστές κατά τη διάρκεια της μόλυνσής τους με τον πολιοϊό, υφίστανται γρήγορες μεταβολικές και μακρομοριακές αλλαγές, οδηγώντας στην αποδοτική αντιγραφή και απελευθέρωση του ιού από αυτά. Παράλληλα, τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και αποκολλώνται από το υπόστρωμα, αλλαγές οι οποίες είναι γνωστές ως κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα CPE (Cytopathic Effect). Παρόλο που ο ιός αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, ωστόσο προκαλεί αναστολή και των τριών συστημάτων μεταγραφής του (Weidman et al., 2003). Το κύτταρο επίσης, επηρεάζεται και σε επίπεδο μετάφρασης και έκκρισης των πρωτεϊνών του.

Η μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς οδηγεί στην γρήγορη αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης, κυρίως μέσω της δράσης της ιϊκής πρωτεΐνης 2A<sup>pro</sup>, η οποία επάγει είτε άμεσα είτε έμμεσα την διάσπαση των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης της μετάφρασης eIF4G (eIF4GI, eIF4GII) (Blondel et al., 1998, Prevot et al. 2003). Άλλες τροποποιήσεις παραγόντων έναρξης της μετάφρασης, όπως η φωσφορυλίωση του eIF2α συνεισφέρουν επίσης στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Επιπλέον, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι οι πολιοϊοί ενεργοποιούν τον καταστολέα της μετάφρασης 4E-BP1, ο οποίος αναστέλλει την cap-εξαρτώμενη μετάφραση μέσω πρόσδεσής του στον παράγοντα

eIF4E (Blondel et al. 1998). Τέλος, η διάσπαση της PABP πρωτεΐνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση των κυτταρικών mRNA, μέσω της δράσης της 3C<sup>pro</sup> και 2A<sup>pro</sup> θεωρείται εξίσου σημαντική στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνσύνθεσης (Kuyumcu-Martinez et al. 2004).

Η 3C<sup>pro</sup> είναι υπεύθυνη για την διακοπή (Shut-off), της κυτταρικής μεταγραφής, προκαλώντας τον τεμαχισμό ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων της RNA pol II, όπως την πρωτεΐνη TBP (TATA-binding protein), την CREB (cyclic-AMP-responsive element binding protein), την Oct-1 (Octamer binding protein), την p53 και τον μεταγραφικό παράγοντα

III $\alpha$  της RNA pol III, καθώς και τον SL-1 παράγοντα της RNA pol I (Εικόνα 17). Οι περισσότερες από αυτές τις τομές γίνονται στους δεσμούς γλουταμίνης-γλυκίνης (Weidman et al., 2003). Επιπρόσθετα, η 2A<sup>pro</sup> τέμνει την πρωτεΐνη TBP σε ένα δεσμό τυροσίνης-γλυκίνης.



Εικόνα 17: Πιθανό μοντέλο διακοπής (shut-off) της μεταγραφής στα μολυσμένα από πολιοϊό κύτταρα (Weidman et al., 2003).

Σε αντίθεση με τις δυσμενείς μεταβολές που επέρχονται στις διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή, η λιπιδική σύνθεση διεγείρεται μετά από την μόλυνση και πολλά νεοσυντιθέμενα λιπίδια εντοπίζονται στα μεμβρανικά κυστίδια τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα (Blondel et al. 1998). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, η ενδοκυτάρια συγκέντρωση του Ca<sup>++</sup> αυξάνεται σημαντικά και η πλασματική μεμβράνη εμφανίζει αυξημένη διαπερατότητα τόσο σε μονοσθενή κατιόντα όσο και σε αναστολείς της μετάφρασης. Επίσης, οι ιικές πρωτεΐνες 2BC, 2B και 3A είναι πιθανόν να αναστέλλουν την έκκριση πρωτεϊνών από το κύτταρο ξενιστή (Barco and Carrasco 1999).

Τέλος έχει αποδειχθεί ότι ο πολιοϊός, κωδικοποιεί για διαφορετικές λειτουργίες, οι οποίες διεγείρουν ή αποσιωπούν την διαδικασία της απόπτωσης στα μολυσμένα κύτταρα (Toskaya et al., 1995).

## 1.5 ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ

Η πολιομυελίτιδα (ασθένεια που ξεκινά με πονόλαιμο, και ήπιο πυρετό, και εξελίσσεται σε μηνιγγίτιδα και παράλυση) προκαλείται από την μόλυνση με τον ιό ρολιονίγους και στο παρελθόν αποτελούσε μάστιγα για την ανθρωπότητα. Η πρώτη γνωστή κλινική περιγραφή της πολιομυελίτιδας αποδίδεται στον Michael Underwood, έναν Βρετανό γιατρό, ο οποίος ανέφερε το 1789, ύστερα από παρατήρηση, μία ασθένεια η οποία κυρίως έπληττε παιδιά προκαλώντας τους σοβαρή παράλυση των κάτω άκρων. Μέσα στα επόμενα χρόνια, πολλές περιπτώσεις πολιομυελίτιδας είχαν αναφερθεί. Από τα τέλη του 1800, επιδημίες εμφανίζονταν σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στις Ηνωμένες Πολιτείες και παρέμειναν ένα κύριο πρόβλημα της δημόσιας υγείας στον αναπτυσσόμενο κόσμο για το πρώτο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Η πολιομυελίτιδα συνήθως εκδηλώνεται σε περιοχές φτωχής υγιεινής και σε συνθήκες κλίματος που ευνοούν τη δράση των πολιοϊών όπως ζέστη και υγρασία. Τα τελευταία χρόνια και μετά την ανακάλυψη των εμβολίων (OPV, IPV), έγιναν πολλές προσπάθειες για την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας. Σε αυτές τις προσπάθειες λήφθηκε υπόψη και η επιδημιολογία καθώς και η παθογένεια της ασθένειας, έτσι ώστε να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα για την εξάλειψή της.

Παρόλο που η πολιομυελίτιδα στην σημερινή εποχή έχει σχεδόν εξαλειφθεί, εντούτοις 25%-40% των ασθενών που ανάρρωσαν από μία οξεία μόλυνση πολιομυελίτιδας, μετά από 30 ή 40 χρόνια κλινικής σταθεροποίησης εμφάνισαν ένα νέο κλινικό σύνδρομο γνωστό ως μεταπολιομυελιτιδικό [post-polio syndrome (PPS)]. Τα συμπτώματα αυτού του συνδρόμου, ποικίλουν από κόπωση και μυϊκό πόνο έως μυϊκή αδυναμία και ατροφία (Blondel et al., 1998). Οι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης αυτού του συνδρόμου είναι: η παρατεταμένη διάρκεια της οξείας νόσου, οι μόνιμες υπολειμματικές παραλυτικές βλάβες μετά την ανάρρωση από την οξεία φάση και το θήλυ φύλο. Το σύνδρομο PPS δεν είναι λοιμώδης διαδικασία και οι ασθενείς δεν αποβάλλουν τον ιό στα κόπρανα, όπως συμβαίνει φυσιολογικά με τον ιό της πολιομυελίτιδας.

### 1.5.1 Επιδημιολογία

Η πολιομυελίτιδα θεωρείται πολύ σοβαρή ασθένεια για την οποία δεν υπάρχουν ειδικές θεραπείες, είναι ενδημική και λοιμώδης με σοβαρές επιπτώσεις και νευρολογικά κατάλοιπα, ιδίως σε παιδιά. Ωστόσο ελάχιστα περιστατικά παράλυσης σε αυτά έχουν παρουσιαστεί, λόγω της προστατευτικής δράσης των εναπομεινάντων αντισωμάτων από τη μητέρα. Η πολιομυελίτιδα, είναι πιο συχνή το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Οι ενήλικοι και τα νέα κορίτσια είναι πιθανότερο να μολυνθούν, αλλά η μόλυνση στα νέα αγόρια είναι πιθανότερο να οδηγήσει σε παράλυση.

Η Ελλάδα ήταν ενδημική χώρα για την πολιομυελίτιδα από το 1950 έως το 1963. Μικρές επιδημίες καταγράφηκαν το 1976, καθώς και τη χρονική περίοδο 1981-1982 σε μη εμβολιασμένα άτομα. Τέλος, πέντε περιπτώσεις πολιομυελίτιδας αναφέρθηκαν στην Ελλάδα το έτος 1996 μετά από μια μεγάλη επιδημία που σημειώθηκε στη γειτονική Αλβανία, εκ των οποίων τρεις καταγράφηκαν στην Νότια Ελλάδα και δύο στη Βόρεια Ελλάδα. Στην Ινδία μετά το 2002, τα κρούσματα μειώθηκαν δραματικά και έτσι σήμερα ο μεγαλύτερος κίνδυνος για πολιομυελίτιδα αφορά σε ταξιδιώτες στη Νιγηρία, όπου καταγράφεται το 70% περίπου των περιπτώσεων πολιομυελίτιδας που παρατηρούνται παγκοσμίως. Η εφαρμογή του αντιπολιομυελιδικού εμβολίου συνέβαλε ουσιαστικά στη διακοπή της κυκλοφορίας του άγριου ιού της πολιομυελίτιδας στην Ευρώπη και την Αμερική, όμως η εμφάνιση μικρών επιδημιών σε ορισμένες χώρες σε συνδυασμό με τις μεταναστεύσεις των πληθυσμών επιβάλλουν την αυξημένη επαγρύπνηση για την επιτήρηση της κυκλοφορίας άγριων στελεχών πολιοϊού ή στελεχών πολιοϊού που προέρχονται από το εμβόλιο έως ότου η πολιομυελίτιδα εξαλειφθεί παγκοσμίως.

Το έτος 1988 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), με σκοπό την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας από τη γη, έθεσε σε εφαρμογή το μεγαλύτερο σχέδιο που έγινε ποτέ για την εξάλειψη λοιμώδους νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο (De Jesus, 2007). Κύριο όπλο του WHO ενάντια στην πολιομυελίτιδα ήταν οι μαζικοί εμβολιασμοί σε ενδημικές χώρες και η καθιέρωση του συστηματικού εμβολιασμού των παιδιών. Συνολικά, στα 20 τελευταία χρόνια από την έναρξη της παγκόσμιας πρωτοβουλίας για την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας, ο αριθμός των κρουσμάτων έχει μειωθεί στο 99% **(Εικόνα 18)**.

#### ΠΟΛΙΟΪΟΣ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ 1988

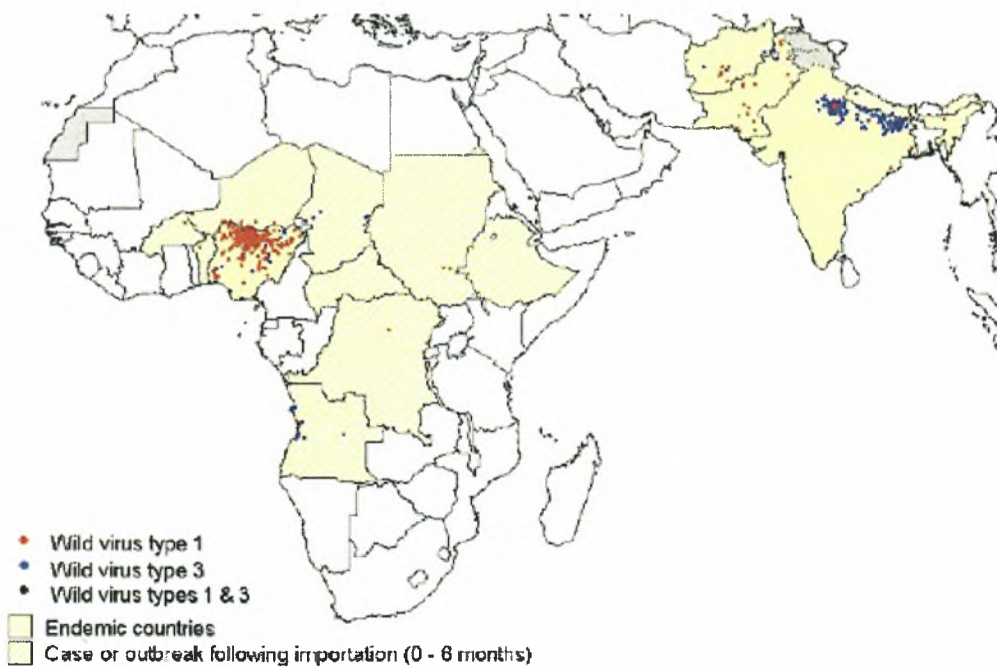
#### ΠΟΛΙΟΪΟΣ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ 2004



**Εικόνα 18:** Απεικονίζεται ο αριθμός των κρουσμάτων του άγριου στελεχούς του πολιοϊού κατά τα έτη 1988 και 2004 (WHO).

Ο WHO, επιβεβαίωσε ότι η νόσος είχε εκριζωθεί το 1994 σε 36 χώρες στην Αμερικανική Ήπειρο, το 2000 σε 37 χώρες στην περιοχή δυτικά του Ειρηνικού (συμπεριλαμβανόμενων και της Κίνας) και τον Ιούνιο του 2002 σε 51 Ευρωπαϊκές χώρες. Το 2007, περισσότερα από 400.000.000 παιδιά είχαν ανοσοποιηθεί σε 27 χώρες. Παγκοσμίως η επιτήρηση της νόσου βρίσκεται σε ιστορικό επίπεδο όπως αναδεικνύει η σημαντική μείωση των περιπτώσεων οξείας χαλαρής παράλυσης τα τελευταία έτη.

Σήμερα μόνο 4 χώρες παραμένουν ενδημικές στην πολιομειλίδα ενώ το 1988 πάνω από 125. Οι χώρες αυτές είναι το Αφγανιστάν, η Ινδία, η Νιγηρία και το Πακιστάν, από τις οποίες η Νιγηρία θεωρείται ότι αποτελεί την κύρια πηγή τροφοδότησης κρουσμάτων στον κόσμο (Arita et al., 2008) **(Εικόνα 19)**.



**Εικόνα 19:** Απεικονίζεται η μετάδοση των πολιοϊών αγρίου τύπου 1 και 3 κατά το έτος 2008 (WHO).

### 1.5.2 Παθογένεια

Ο πολιοϊός εισέρχεται μέσω του στόματος και της μύτης, πολλαπλασιάζεται στο λαιμό και τον εντερικό σωλήνα, και έπειτα απορροφάται και επεκτείνεται μέσω του αίματος και το λεμφικό σύστημα. Βρίσκεται στα κόπρανα και τις εκκρίσεις της στοματοφαρυγγικής κοιλότητας των αρρώστων ή των υγιών φορέων και μεταδίδεται συνήθως από άνθρωπο σε άνθρωπο με την άμεση επαφή, αλλά σπανιότερα και με το μολυσμένο νερό, τα λύματα και τα τρόφιμα.

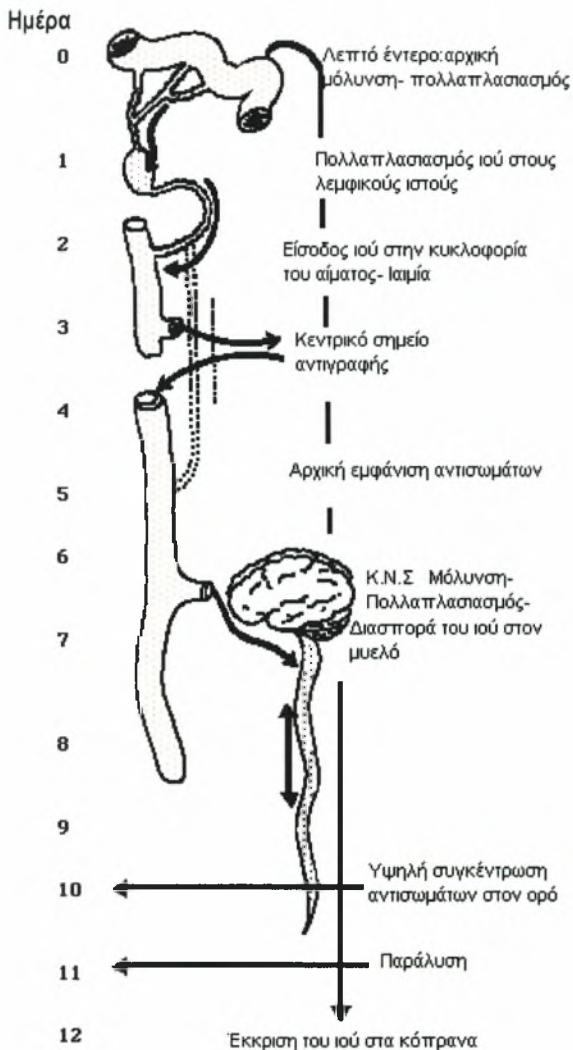
Η επώαση, (ο χρόνος από τη μόλυνση με τον ιό μέχρι να αναπτυχθούν τα συμπτώματα της ασθένειας) κυμαίνεται από 5 έως 35 ημέρες (μέσος όρος 7 έως 14 ημέρες). Οι θέσεις της αρχικής μόλυνσης έχουν προσδιοριστεί και είναι οι αμυγδαλές στο στόμα-φάρυγγα και οι πλάκες Peyer στο λεπτό έντερο. Από τους λεμφικούς ιστούς του στόματος-φάρυγγα και του λεπτού εντέρου, η μόλυνση περνά και σε άλλους λεμφικούς ιστούς, όπως οι μεσεντερικοί λεμφαδένες. Επακόλουθο του εκτεταμένου πολλαπλασιασμού του ιού είναι η παρουσία του στο αίμα, προκαλώντας μια παροδική καιμία. Κατά την καιμία ο ιός μεταφέρεται σε όλα τα όργανα του σώματος προσβάλλοντας και άλλους ευαίσθητους ιστούς, όπως τους περιφερειακούς λεμφαδένες (Mueller et al., 2005). Αντισώματα παράγονται νωρίς και εξαλείφουν την καιμία, συνήθως πριν την εμφάνιση παράλυσης. Η μετάβαση του ιού στο ΚΝΣ είναι πιο σπάνια και δύσκολη γιατί ο ιός πρέπει να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτό γίνεται συνήθως με τη χρήση των μακροφάγων ως φορέων και ίσως μέσω των περιφερειακών νευριτών των κινητικών νευρώνων, για τους οποίους ο ιός εμφανίζει τροπισμό. Η προσβολή του ΚΝΣ, προκαλεί συνήθως παραλυτική πολιομυελίτιδα. Γενικά για την παθογένεια των πολιοϊών έχουν προταθεί 3 μοντέλα (Minor, 1999):

1) Μοντέλο Flexner. Προτάθηκε το 1910 και σύμφωνα με αυτό, η φυσιολογική οδός μετάδοσης της ασθένειας στους ανθρώπους είναι μέσω της μύτης, όπου στη συνέχεια εξαπλώνεται στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό.

2) Μοντέλο Bodian. Προτάθηκε το 1950 και σύμφωνα με αυτό, ο ιός μετά την είσοδό του στον οργανισμό, εγκαθιδρύει μία αρχική μόλυνση στους λεμφαδένες του εντέρου και κατόπιν σε πιο μακρινούς λεμφαδένες, ώσπου τελικά να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και από εκεί σε άλλους ευαίσθητους ιστούς περιλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος.



3) **Μοντέλο Sabin (Εικόνα 20)**. Προτάθηκε την ίδια χρονική περίοδο με το μοντέλο του Bodian. 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. 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 20:** Μοντέλο Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών ([www.micro.msb.le.ac.uk/.../balti4/balti24.html](http://www.micro.msb.le.ac.uk/.../balti4/balti24.html)).

### 1.5.3 Κλινική εικόνα

Υπάρχουν 3 συμπτωματικές μορφές της πολιομυελίτιδας: 1) η ήπια νόσος (abortive disease), 2) η μη παραλυτική μορφή (άσηπτη μηνιγγίτιδα) και 3) η παραλυτική μορφή (De Jesus, 2007). Η πλειονότητα (95%), των μολύνσεων με PV, όπου αναπτύσσεται μια μικρή ιαιμία, δεν εμφανίζουν συμπτώματα (ασυμπτωματική νόσος).

Η ήπια νόσος, εμφανίζεται στο 4-8% των μολύνσεων με συμπτώματα, όπως πυρετός (έως 39.5° C), ανορεξία, ναυτία και έμετοι, φαρυγγίτιδα, κακουχία, δυσκοιλιότητα και κοιλιακό άλγος. Η μη παραλυτική άσηπτη μηνιγγίτιδα έχει παρόμοια συμπτώματα με αυτά της ήπιας νόσου, αλλά η κεφαλαλγία, η ναυτία και οι έμετοι μπορεί να είναι πιο έντονα. Αμέσως μετά τα αρχικά συμπτώματα, που διαρκούν 2 μέρες, ο ασθενής εμφανίζει βελτίωση και στη συνέχεια επιδεινώνεται εκ νέου εμφανίζοντας εικόνα μηνιγγίτιδας με αυχενική δυσκαμψία και έντονες μυαλγίες και άλγη στον αυχένα, τον κορμό και τα άκρα. Τα συμπτώματα της παραλυτικής μορφής είναι παρόμοια με αυτά των άλλων μορφών της νόσου ενώ εμφανίζονται επιπλέον, γενικευμένη μυϊκή αδυναμία, σοβαρή δυσκοιλιότητα, μυϊκή ατροφία, δύσπνοια από αδυναμία των αναπνευστικών μυών, δυσκαταποσία, βήχας, βράγχος φωνής, αδυναμία ελέγχου της ουροδόχου κύστης (ακράτεια ούρων) και χαλαρή παράλυση κυρίως των κάτω άκρων. Η παραλυτική πολιομυελίτιδα εμφανίζεται στο 0.1-1% των μολύνσεων και χωρίζεται σε 3 κατηγορίες: α) νωτιαία, β) βολβοειδής, γ) εγκεφαλιτιδική.

Η νωτιαία πολιομυελίτιδα είναι η πιο συχνή και χαρακτηρίζεται από χαλαρή παράλυση των μυών λόγω της μόλυνσης των κατώτερων κινητήριων νευρώνων. Η βολβοειδής πολιομυελίτιδα, οδηγεί στην καταστροφή των νευρώνων του άξονα του εγκεφάλου. Σε σοβαρές κλινικές περιπτώσεις, εμφανίζεται συνδυασμός της νωτιαίας και βολβοειδούς πολιομυελίτιδας. Η εγκεφαλιτιδική πολιομυελίτιδα, η οποία μολύνει νευρώνες του εγκεφάλου, είναι πιο σπάνια. Η νωτιαία και βολβοειδής πολιομυελίτιδα μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο λόγω αναπνευστικής και καρδιακής ανεπάρκειας, που προκύπτουν από την καταστροφή των νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Blondel et al., 1998).

#### 1.5.4 Μετάδοση Πολιοϊών

Η ικανότητα των πολιοϊών να μεταδίδονται εξαρτάται από την ελάχιστη μολυσματική τους δόση, την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, την ποσότητα και τη διάρκεια της έκκρισής τους στα οροφαρυγγικά υγρά και τα περιττώματα και τέλος την επιβίωσή τους στο περιβάλλον. Η μετάδοση του ιού, επίσης, καθορίζεται από την ανοσία του ξενιστή, την υγιεινή διαβίωση, την συχνότητα και την φύση των κοινωνικών επαφών (Kimman et al., 1999). Συνήθως, η μετάδοση του ιού, ευνοείται από τις κακές συνθήκες υγιεινής, τα τροπικά και υποτροπικά κλίματα, την υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα, καθώς και από την βρώση μολυσμένης τροφής ή ύδατος.

Ο συνήθης τρόπος μετάδοσης των πολιοϊών είναι μέσω της κοπρο-στοματικής οδού, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις μετάδοσης μέσω των αναπνευστικών εκκρίσεων.

### 1.5.5 Θεραπεία

Δεν υπάρχει ουσιαστικά θεραπεία για την πολιομυελίτιδα, αλλά μόνο πρόληψη. Η πολιομυελίτιδα μπορεί να προληφθεί, είτε με εμβολιασμό είτε με την χορήγηση αντισωμάτων ειδικών για τον πολιοϊό. Η λογική της κάθε προσέγγισης είναι να εμποδίσει τον ιό να φτάσει στο ΚΝΣ και να προκαλέσει ανεπανόρθωτη ζημιά (Minor, 1999). Ο αριθμός των περιπτώσεων πολιομυελίτιδας, που προκαλούνται από μόλυνση με το άγριο στέλεχος του πολιοϊού, έχει μειωθεί δραματικά, λόγω της εκτεταμένης χρήσης των δύο διαθέσιμων εμβολίων (IPV, OPV). Η μαζική ανοσοποίηση με το OPV, που αποτελεί το πιο διαδεδομένο εμβόλιο, αποτέλεσε τον πιο σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της εξάλειψης του άγριου πολιοϊού στην Αμερική και αργότερα παγκοσμίως (de-Quadros et al., 1997).

### 1.5.6 Εμβόλια

Η ανακάλυψη των εμβολίων κατά της πολιομυελίτιδας το 1950, αποτέλεσε ένα από τα πιο μεγάλα επιτεύγματα της προληπτικής ιατρικής. Το πρώτο εμβόλιο που ανακαλύφθηκε ήταν το αδρανοποιημένο εμβόλιο IPV, από τον Salk το 1955, και το δεύτερο ήταν το OPV, που περιείχε ζωντανά εξασθενημένα στελέχη και των τριών οροτύπων των πολιοϊών, από τον Sabin το 1963 (Chumakov and Ehrenfeld, 2008). Ο εκτενής εμβολιασμός που ξεκίνησε το 1960, επέτρεψε την σχεδόν ολοκληρωτική εξάλειψη του PV στις αναπτυσσόμενες, βιομηχανικές πόλεις και την πρόοδο της παγκόσμιας προσπάθειας εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας.

#### 1.5.6.1 IPV

Το IPV δημιουργείται με αδρανοποίηση μέσω φορμαλδεϋδης, ιών που αναπτύσσονται σε πληθυσμούς κυττάρων νεφρού πιθήκου. Το εμβόλιο περιέχει σε αδρανοποιημένη μορφή και τους 3 ορότυπους του πολιοϊού. Παρά την τροποποίηση των ιών, οι αντιγονικές τους ιδιότητες διατηρούνται με αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσίας στον εμβολιαζόμενο, αποτρέποντας την προσβολή του ΚΝΣ, αν ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Το IPV, εμποδίζει την αντιγραφή του πολιοϊού στο φάρυγγα, αλλά δεν εμποδίζει την αντιγραφή του ιού στο έντερο, με αποτέλεσμα να μην επάγει ανοσία στην περιοχή αυτή. Αυτό έχει ως συνέπεια, την ενδεχόμενη μετάδοση του ιού από τον εμβολιαζόμενο σε μη εμβολιασμένα άτομα, ενώ ο ίδιος δεν διατρέχει κίνδυνο, αφού είναι φορέας αυτού. Παράλληλα, το IPV παρουσιάζει υψηλό κόστος παρασκευής, παρέχεται μόνο σε ενέσιμη μορφή και επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία (Wagner and Earn, 2008). Αυτοί οι παράγοντες καθιστούν το εμβόλιο εν μέρει αναποτελεσματικό για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό.

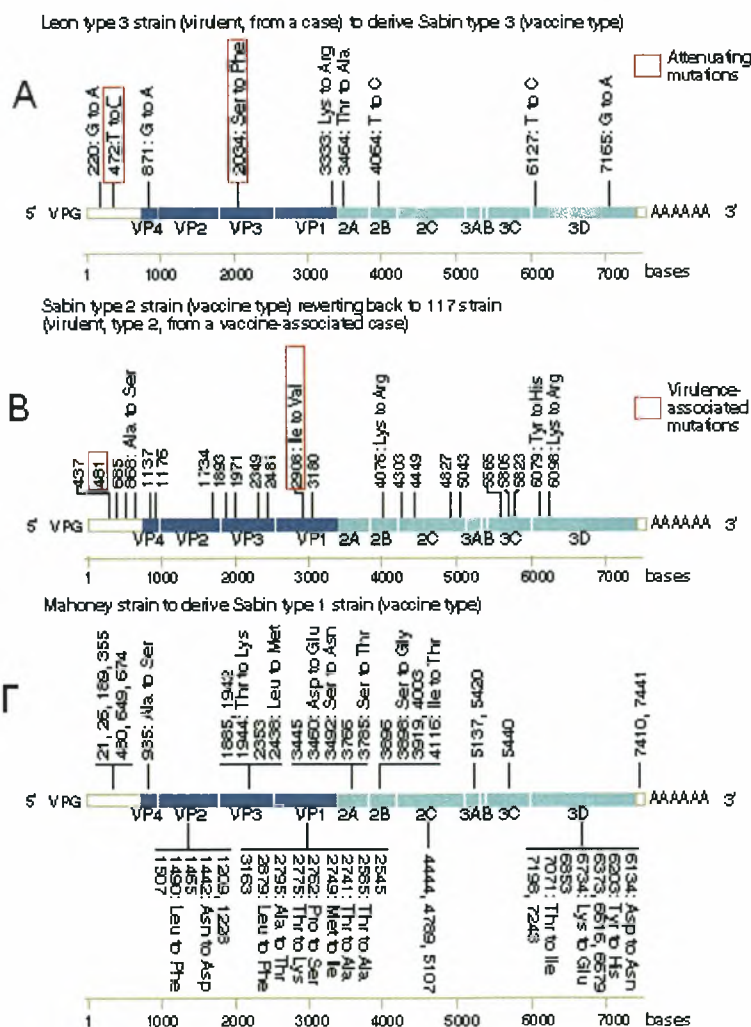
Το 1970, μία ομάδα ερευνητών του Εθνικού Ινστιτούτου για την Δημόσια Υγεία, στην προσπάθειά τους να παράγουν ένα περισσότερο ασφαλές εμβόλιο IPV, δημιούργησαν το ενισχυμένο IPV (eIPV). Για την παραγωγή του eIPV, αντικατέστησαν τα πρωτογενή κύτταρα νεφρού πιθήκου με συνεχείς κυτταρικές σειρές που προέρχονταν από νεφρά πράσινου πιθήκου (T-Vero cells). Το eIPV περιείχε περισσότερα προστατευτικά αντιγόνα D και μπορούσε να συνδυαστεί με άλλα εμβόλια, όπως το DTP, βελτιώνοντας έτσι το κόστος και την αποδοτικότητα του εμβολίου (Chumakov and Ehrenfeld, 2008).

### 1.5.6.2 OPV

Το OPV, περιέχει ζωντανά εξασθενημένα στελέχη και των τριών οροτύπων των πολιοϊών, τα οποία ονομάζονται Sabin (S1, S2, S3). Το εμβόλιο λαμβάνεται από το στόμα (oral), αντιγράφεται στο ρινοφάρυγγα, στην γαστρεντερική κοιλότητα και τα λεμφοζύδια του εντέρου. Επάγει 2 ξεχωριστές ανοσοαποκρίσεις. Αρχικά, επάγει την χυμική ανοσία, οδηγώντας στην παραγωγή αντισωμάτων στο αίμα για όλους τους ορότυπους και στη συνέχεια διεγείρει την επιθηλιακή άνοση απόκριση, που περιλαμβάνει την παραγωγή ιντερφερόνης και Ig-A αντισωμάτων ειδικών για τον ιό, κατά μήκος του επιθηλίου του φάρυγγα και του γαστρεντερικού σωλήνα. Υιοθετήθηκε από τις περισσότερες χώρες του κόσμου, λόγω του χαμηλού κόστους, της εύκολης χορήγησης από το στόμα, της αυξημένης αποδοτικότητάς του ακόμη και σε μικρές δόσεις και της ικανότητάς του να επάγει ανοσοποίηση στην περιοχή του εντέρου. Η σαφής υπεροχή του OPV έναντι του IPV, οφείλεται στο αποτελεσματικότερο τείχος προστασίας που δημιουργεί, το οποίο αποδίδεται στην διασπορά του ιού του εμβολίου σε μη εμβολιασμένα άτομα τα οποία έτσι ανοσοποιούνται, καθώς και στην ικανότητα του OPV να δημιουργεί τοπική ανοσία στο έντερο. Η τοπική ανοσία εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά του φυσικού ιού σε περίπτωση επαναμόλυνσης. Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου αυτού, συνέτεινε στην μείωση των κρουσμάτων της πολιομυελίτιδας ή και την εξαφάνισή της από χώρες της Αμερικής, της Δ. Ευρώπης και της Β. Αφρικής.

Τα εξασθενημένα εμβολιακά στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab), P2/Sabin (P2/P712,Ch, 2ab) και P3/Sabin (P3/Leon 12a<sub>1</sub>, b), προήλθαν από τα άγρια νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41, P2/P712/56 και P3/Leon/37 αντίστοιχα, τα οποία έχασαν τη νευρομολυσματικότητά τους ύστερα από πολλαπλά περάσματα σε κύτταρα Vero ή ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα του συνδετικού ιστού, όπου συσσωρεύσαν μεταλλάξεις. Η σύγκριση του εμβολιακού στελέχους P1/Sabin με το άγριο στέλεχος P1/Mahoney, έδειξε ότι υπήρχαν 56 σημειακές μεταλλάξεις, από τις οποίες οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις στις θέσεις 189 και 480 της 5'NTR περιοχής, συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Στην περίπτωση του P2/Sabin, η νουκλεοτιδική

υποκατάσταση στη θέση 481 της 5'NTR και η αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 143 της VP1, αποτελούν του κύριους καθοριστές του εξασθενημένου/ νευρομολυσματικού φαινότυπου. Τέλος, η σύγκριση του P3/Sabin με το άγριο στέλεχος P3/Leon, έδειξε μόνο 11 σημειακές μεταλλάξεις, από τις οποίες οι 10 ήταν μεταθέσεις, ενώ μόνο η υποκατάσταση στη θέση 472 της 5'NTR και η αμινοξική στη θέση 91 της VP3, αποτελούν ισχυρούς καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου (Blondel et al., 1998) (**Εικόνα 21**). Παρόλο που τα στελέχη αυτά, έχασαν τη νευρομολυσματικότητά τους, ωστόσο παρέμειναν ικανά να πολλαπλασιάζονται στο έντερο και να προκαλούν ειδική προστασία σε μετέπειτα μόλυνση από νευροτοξικά στελέχη πολιοϊών (Guillot et al., 1994).



**Εικόνα 21:** Οι μεταλλάξεις στην αλληλουχία των πολιοϊών που ευθύνονται για την εξασθένηση ή τη μολυσματικότητά τους. Α) Στο πλαίσιο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εξασθένηση του πολιοϊού τύπου 3 (Leon) και την παραγωγή του εμβολιακού στελέχους Sabin 3. Β) Στο κόκκινο πλαίσιο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την μεταστροφή του εμβολιακού στελέχους Sabin 2 σε νευρομολυσματικό. Γ) Μεταλλάξεις που οδηγούν στην παραγωγή του εμβολιακού στελέχους Sabin 1 από το άγριο στέλεχος Mahoney (Minor, 1999).

Πολλές φορές, είναι δυνατόν κατά την αντιγραφή του OPV, να εμφανιστούν στα εξασθενημένα στελέχη ανάστροφες μεταλλάξεις, οι οποίες επαναφέρουν την νευρομολυσματικότητα και μεταδοτικότητα του ιού, προκαλώντας μόλυνση στον εμβολιαζόμενο ή στον κοινωνικό του περίγυρο (Wagner and Earn, 2008). Αυτή η μόλυνση, είναι γνωστή ως εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) και εμφανίζει παρόμοια κλινικά συμπτώματα με την παραλυτική πολιομυελίτιδα. Ανάστροφα στελέχη έχουν απομονωθεί από υγιή άτομα αλλά και από το περιβάλλον (Yoshida et al., 2000). Από τα 3 εξασθενημένα στελέχη του OPV, το P1/Sabin είναι το πιο ασφαλές, αφού έχουν αναφερθεί πολύ λίγες περιπτώσεις VAPP προερχόμενες από αυτό, σε σχέση με αυτές που προκαλούνται από τα S2 και S3 (Wimmer et al., 1999, Guillot et al., 1994).

Το γεγονός αυτό, έχει οδηγήσει πολλές χώρες στην εφαρμογή ενός μικτού σχήματος εμβολιασμού. Αρχικά, γίνεται εμβολιασμός με το ενισχυμένο IPV (eIPV) στον 2<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα και στη συνέχεια με το OPV στον 18<sup>ο</sup> μήνα και το 4<sup>ο</sup> -6<sup>ο</sup> έτος. Με αυτό τον συνδυασμό αφενός μεν, εξασφαλίζεται υψηλού βαθμού τοπική ανοσία, αφετέρου ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος για πολιομυελίτιδα οφειλόμενη στο OPV.

### 1.5.6.3 VAPP

Πολλές φορές ο εμβολιασμός με το εμβόλιο OPV, μπορεί να οδηγήσει στην εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP), η οποία επηρεάζει τα άτομα που έχουν πρόσφατα εμβολιαστεί με το OPV καθώς και μη εμβολιασμένα άτομα τα οποία έρχονται σε άμεση επαφή με υγιείς εμβολιασμένους. Η κατάσταση VAPP, πιθανόν προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, εξαιτίας σημειακών μεταλλαγών και γενετικού ανασυνδυασμού. Σύμφωνα με τον WHO, κάθε χρόνο εμφανίζονται 250-500 περιπτώσεις VAPP, σαν αποτέλεσμα της παρατεταμένης χρήσης του εμβολίου σε χώρες που είναι απαλλαγμένες από πολιοϊούς αγρίου τύπου. Η μετάδοση του ιού από άτομο σε άτομο οδήγησε σε μεγάλες επιδημίες εμβολιοσυνδεόμενης πολιομυελίτιδας. Τέτοιες επιδημίες έχουν αναφερθεί στις Φιλιππίνες το 2001 και στις νήσους Ισπανιόλα τα έτη 2000-2001 που αφορούσαν το στέλεχος PV1/Sabin (Kew et al., 2002). Το 88% των περιπτώσεων VAPP οφείλεται στα στελέχη PV2/Sabin και PV3/Sabin, ενώ το ποσοστό είναι αρκετά χαμηλότερο για τα στελέχη PV1/Sabin.

Ο παθογόνος χαρακτήρας αυτών των στελεχών γενικά σχετίζεται με μεταλλάξεις ή μεταστροφές των μεταλλάξεων αυτών, σε θέσεις που αντιστοιχούν στους καθοριστές της εξασθένησης και της νευρομολυσματικότητας (Blondel et al., 1998). Ο ανασυνδυασμός είναι επίσης ένα συχνό φαινόμενο σε άτομα εμβολιασμένα με το OPV, οδηγώντας πολλές φορές σε

VAPP. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετές VAPP περιπτώσεις, παρουσιάζουν συμμετοχή των στελεχών PV2/Sabin κατά 50%, ενώ κατά 67% συμμετοχή των PV3/Sabin στελεχών. Αντίθετα η συμμετοχή των PV1/Sabin σε ανασυνδυασμούς είναι σπάνια (Liu et al., 2000).

#### 1.5.6.4 Εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (VDPVs)

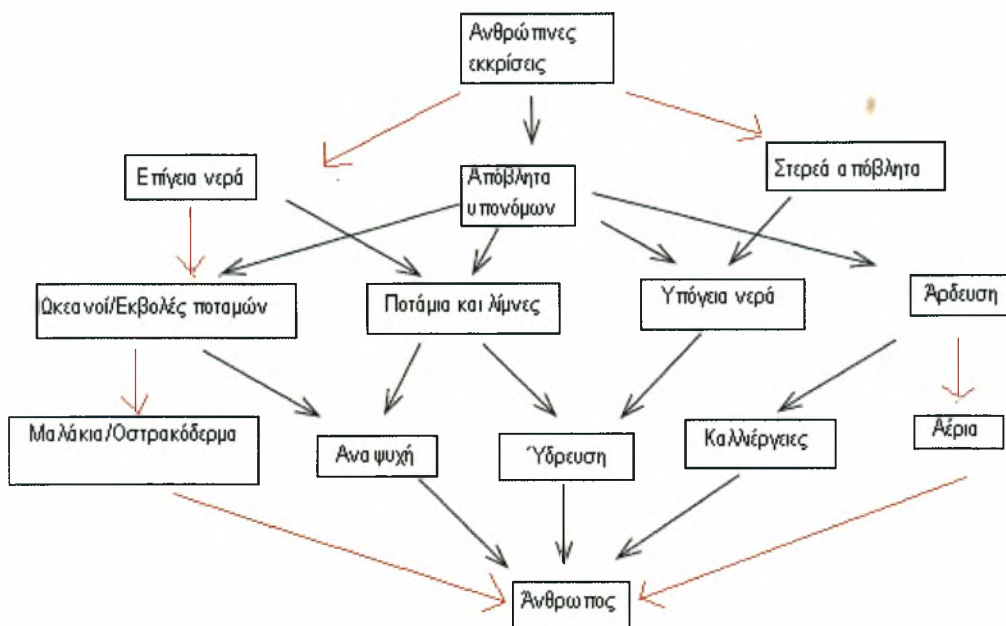
Το μεγαλύτερο μειονέκτημα του OPV αποτελεί η γενετική του αστάθεια, ένα χαρακτηριστικό το οποίο το οδηγεί στο να εξελιχθεί πολύ εύκολα σε εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (VDPV), τα οποία έχουν τις ιδιότητες του άγριου στελέχους του πολιοϊού, περιλαμβάνοντας την νευρομολυσματικότητα. Γενικά, ένα στέλεχος πολιοϊού θεωρείται ως VDPV, όταν φέρει απόκλιση > 1% στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 του αντίστοιχου προτύπου OPV στελέχους (Dowdle et al., 2003). Τα VDPV στελέχη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα (iVDPV) στελέχη, τα οποία απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια, τα κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (cVDPV) και τα αμφιλεγόμενα VDPV (aVDPV). Τα aVDPV στελέχη απομονώνονται είτε από ασθενείς χωρίς ανοσοανεπάρκειες είτε από το περιβάλλον (CDC, 2008).

Στις ΗΠΑ, το 95% των περιπτώσεων παραλυτικής πολιομυελίτιδας που είχαν αναφερθεί κατά το χρονικό διάστημα 1980 και 1999, είχαν προκληθεί από cVDPV (De Jesus, 2007). Η δημιουργία των cVDPV από το OPV, θέτει ένα εμπόδιο στην εξάλειψη της πολιομυελίτιδας. Από το 2000 έχουν αναφερθεί 4 εξάρσεις cVDPVs στη Μαδαγασκάρη, στις Φιλιππίνες, στις νήσους Ισπανιόλα και την Κίνα. Στην Κίνα και τις νήσους Ισπανιόλα, οι εξάρσεις αυτές, έλαβαν χώρα 5 χρόνια μετά την διαβεβαίωση ότι οι περιοχές αυτές ήταν ελεύθερες από τον πολιοϊό αγρίου τύπου (Wagner and Earn, 2008). Ως απάντηση στην έξαρση των cVDPV στις νήσους Ισπανιόλα, ο WHO, έθεσε σε εφαρμογή επιπρόσθετες οδηγίες για την μελέτη των στελεχών VDPV. Τα στελέχη VDPV αναγνωρίζονται σύμφωνα με τις γενετικές τους ιδιότητες με υβριδισμό, με διαγνωστικές PCR ή με PCR-RFLP. Επίσης όλα τα στελέχη των πολιοϊών που έχουν απομονωθεί στο εργαστήριο, εξετάζονται και για αντιγονικές αλλαγές με τη μέθοδο ELISA.

Όλα τα cVDPV που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμών μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου καθώς και ανασυνδυασμών μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (HEVC) (Kilpatrick et al., 2004). Τα cVDPVs κυκλοφορούν ακόμη και σε καλά ανοσοποιημένες κοινωνίες και μπορούν να προκαλέσουν πολιομυελίτιδα σε περιοχές χαμηλής πληθυσμιακής ανοσοποίησης (Chumakov and Ehrenfeld, 2008).

## 1.6 ΠΟΛΙΟΪΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Οι πολιοϊοί μπορούν να βρεθούν φυσιολογικά στο υδάτινο περιβάλλον και εισέρχονται σε αυτό, μέσω ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Πάνω από 100 παθογόνοι ιοί αποβάλλονται από τις ανθρώπινες και ζωικές εκκρίσεις. Οι ιοί αυτοί μπορούν να μεταφερθούν στο περιβάλλον μέσω των υπόγειων υδάτων, των εκβολών διαφόρων ποταμών, των θαλασσών και του πόσιμου νερού (**Εικόνα 22**) (Fong and Lipp, 2005). Από μελέτες έχει δειχθεί ότι παρά την σημαντική μείωση του ιϊκού φορτίου μετά την επεξεργασία των λυμάτων, τα στερεά και υγρά απόβλητα αποτελούν εστία για την εξάπλωση των πολιοϊών στο περιβάλλον. Η απόρριψη των επεξεργασμένων αστικών λυμάτων σε ποτάμια, λίμνες και στη θάλασσα καθώς και η χρήση τους για άρδευση ή λίπανση εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία καθώς είναι πιθανή η διασπορά τους στο περιβάλλον και η επάνοδός τους στην τροφική αλυσίδα (Griffin et al., 2003).



**Εικόνα 22:** Κυκλοφορία των πολιοϊών στο περιβάλλον.

Κατά την πρόβλεψη της παρουσίας των πολιοϊών στο περιβάλλον, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν αρκετοί παράμετροι όπως, η θερμοκρασία των υδάτων, τα στερεά απόβλητα, η ένταση του ηλιακού φωτός, οι εκκρίσεις των ξενιστών και η θρεπτική αξία του νερού. Το 1995 οι Metcalf et al., ήταν από τους πρώτους ερευνητές που υπέθεσαν ότι η μοριακή ανίχνευση πολιοϊών στο περιβάλλον θα επέτρεπε τον καθορισμό των διαφόρων



πηγών μόλυνσης και θα βελτίωνε την παρακολούθηση της δημόσιας υγείας (Fong and Lipp, 2005).

Η παρακολούθηση του περιβάλλοντος έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αποτίμηση του μεγέθους και της διάρκειας της κυκλοφορίας των πολιοϊών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Επιπρόσθετα η περιβαλλοντική παρακολούθηση, μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της δραστηριότητας των εμβολιασμών κατά τη διάρκεια επιδημιών πολιομυελίτιδας και για την ανίχνευση αγρίων στελεχών πολιοϊών σε κοινωνίες οι οποίες είχαν χαρακτηριστεί ως ελεύθερες από πολιοϊούς (Cochi et al., 1995). Τέλος, η παρακολούθηση του περιβάλλοντος μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο και για την μελέτη της εξέλιξης των πολιοϊών, αφού έχουν απομονωθεί ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊών από περιβαλλοντικά δείγματα (Blomqvist et al., 2004). Οι μεταλλάξεις και οι ανασυνδυασμοί αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τους υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης του γονιδιώματος των πολιοϊών.

## 1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, ότι για τη μελέτη της παρουσίας των εντεροϊών στο υδατικό περιβάλλον, η χρήση διαφόρων κυτταρικών σειρών αποτέλεσε την κύρια μέθοδο για την διάγνωση και απομόνωση των μολυσματικών εντεροϊών. Για την διάγνωση των εντεροϊών από κλινικά δείγματα, όπως συστατικά του αίματος, επιχρίσματα του φάρυγγα, κόπρανα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ραδιοανοσοενζυμικές μέθοδοι, μέθοδοι ανοσοφθορισμού καθώς και η μέθοδος ELISA. Αυτές οι μέθοδοι χαρακτηρίζονταν από μειωμένη ευαισθησία στην ανίχνευση των ιών κυρίως σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως αστικά λύματα, αποχετευτικά ύδατα, ποτάμια και λίμνες. Ως αποτέλεσμα, οι μέθοδοι αυτοί, από το 1980 αντικαταστάθηκαν από τις σύγχρονες μοριακές μεθόδους (Fong and Lipp, 2005).

Για την απομόνωση των πολιοϊών συνήθως λαμβάνεται δείγμα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, που αποτελεί την πιο ισχυρή απόδειξη λοίμωξης καθώς και δείγμα από κόπρανα, όπου μπορεί να απομονωθεί ο ιός ακόμα και μετά από 2 ή 3 μήνες μετά την μόλυνση (Hovi et al, 2001).

### 1.7.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Με την μέθοδο των κυτταρικών σειρών επιτελείται η απομόνωση των διαφόρων τύπων των εντεροϊών. Η μέθοδος αυτή, ήταν η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την διάγνωση των εντεροϊών από περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα, πριν την ανακάλυψη των μοριακών τεχνικών. Η επιλογή των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των εντεροϊών είναι πολύ σημαντική. Μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στα κατάλληλα κύτταρα, οι

φλάσκες που τα περιέχουν αξιολογούνται για τυχόν ύπαρξη καταστροφής ή/και στρωγγυλοποίησης των κυττάρων καθώς και για τον αποχωρισμό τους από την κυτταρική επιφάνεια (κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα CPE).

Οι κυτταροκαλλιέργειες είναι αρκετά επίπονη και χρονοβόρα μέθοδος διότι απαιτεί μέχρι και εβδομάδες ενοφθαλμισμού και πολλαπλών περασμάτων του ιού, για να επιβεβαιωθούν τα αρνητικά και θετικά αποτελέσματα. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, η απομόνωση των εντεροϊών μπορεί να είναι εμφανής (παρατήρηση του CPE) μέσα σε λίγες μέρες, ενώ ίσως χρειαστούν περισσότερες από 14-21 ημέρες όταν πρόκειται για δύσκολα στελέχη ή μίγματα ιών (Muir et al., 1998). Επιπρόσθετα, μέχρι σήμερα 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.

Για την απομόνωση των πολιοϊών χρησιμοποιούνται οι κυτταρικές σειρές L<sub>20</sub>B, οι οποίες έχουν τροποποιηθεί γενετικά για να εκφράζουν τον υποδοχέα τους hPVR και προέρχονται από ποντίκια (WHO, 2004), καθώς επίσης και οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του ραβδομυοσάρκωματος (RD κύτταρα) και του επιδερμικού καρκινώματος (Her-2 κύτταρα).

### 1.7.2 Οροτυπική Ταυτοποίηση

Μετά την απομόνωση των πολιοϊών και γενικά των εντεροϊών, μπορεί να γίνει ταυτοποίησή τους με την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης τους, με ειδικούς ως προς τον κάθε ορότυπο αντιορούς (Van der Avoort et al, 1995). Συγκεκριμένα, το δείγμα προς ανάλυση επωάζεται με κάθε διαφορετικό μίγμα αντιορού και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα, σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO). Ύστερα από επώαση αρκετών ημερών καταγράφεται το πρότυπο εξουδετέρωσης της κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού από καθένα από τα μείγματα των αντιορών που χρησιμοποιήθηκαν. 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 (Muir et al., 1998).

### 1.7.3 Ορολογική Ταυτοποίηση

Η ορολογική διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, βασίζεται στην ανίχνευση IgM αντισωμάτων με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα

αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για επιδημιολογικές μελέτες και για την διάγνωση της πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊούς (Magnius et al., 1988).

#### 1.7.4 Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης

Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής - Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (RT – PCR), έδωσε τη δυνατότητα της άμεσης ανίχνευσης του RNA των πολιοϊών από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή, είναι πολύ γρήγορη, παρέχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην διάγνωση των πολιοϊών και είναι λιγότερο επίπονη και χρονοβόρα σε σχέση με τις κυτταροκαλλιέργειες, αφού τα αποτελέσματα της RT-PCR λαμβάνονται εντός 24 h. Η RT-PCR, επίσης είναι ικανή να ανιχνεύει επιτυχώς και τους οροτύπους των εντεροϊών που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταρικές σειρές. Για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκαν ειδικοί primers για τον κάθε ορότυπο, βασιζόμενοι στην κωδική αλληλουχία της VP1 περιοχής (Caro et al., 2001, Oberste et al., 1999), καθώς και primers για την ενίσχυση συντηρημένων περιοχών του RNA γενώματος που εδράζουν στην 5' NTR περιοχή και περιλαμβάνουν τις δευτεροταγείς δομές IRES και cloverleaf (Chapman et al., 1990, Halonen et al., 1995).

Παράλληλα με την RT-PCR αναπτύχθηκαν και άλλες μοριακές τεχνικές, όπως η nested PCR και η semi-nested PCR, οι οποίες αυξάνουν την ειδικότητα και ευαισθησία της RT-PCR, χρησιμοποιώντας εσωτερικούς primers, η RT- multiplex PCR, στην οποία χρησιμοποιούνται πολλοί primers που ενισχύουν διαφορετικούς στόχους και η Real-time PCR, η οποία παρέχει ποσοτική μέτρηση της παρουσίας των εντεροϊών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής (Fong and Lipp, 2005). Επίσης αναπτύχθηκαν και συμπληρωματικές μέθοδοι της RT-PCR, οι οποίες περιλαμβάνουν την ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων προϊόντων της RT-PCR με περιοριστικά ένζυμα, (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) (Siafakas et al., 2003), τεχνικές υβριδισμού με ανιχνευτές συγκεκριμένων οροτύπων, ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνων προϊόντων της PCR (SSCP) καθώς και αλληλούχιση των PCR προϊόντων και σύγκρισή τους με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες άλλων εντεροϊών.

## 1.8 ΕΞΕΛΙΞΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Οι πολιοϊοί έχουν την ικανότητα να εξελίσσονται με ταχύτατους ρυθμούς, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Εξαιτίας αυτής της ποικιλομορφίας, έχουν δημιουργηθεί μείγματα μοριακών «παραλλαγών», γνωστά ως *quasi species* (περίπου είδη), τα οποία αποδεικνύουν την μεγάλη ετερογένεια των γενοτύπων που υπάρχει μέσα στους πληθυσμούς των πολιοϊών (Agoi, 2001). Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην εξέλιξη των πολιοϊών είναι: 1) οι μεταλλάξεις και 2) οι ανασυνδυασμοί.

### 1.8.1 Μεταλλάξεις

Κατά την αντιγραφή του RNA των πολιοϊών, λόγω του υψηλού ποσοστού λαθών της ιϊκής RNA- πολυμεράσης ( $3D^{pol}$ ), η οποία υπολογίζεται ότι ενσωματώνει  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά κύκλο αντιγραφής, καθώς και της απουσίας μηχανισμών ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής, δημιουργείται συσσώρευση μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γένωμα των ιών (Gavrilin et al., 2000). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι δυνατόν να αυξάνουν ή να μειώνουν την αρμοστικότητα των πολιοϊών για μία συγκεκριμένη οικολογική θέση ή να την αφήνουν ανεπηρέαστη. Οι ευνοϊκές μεταλλάξεις, οι οποίες παρέχουν κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα, δηλαδή δημιουργούν ιϊκά στελέχη με αυξημένη αρμοστικότητα, επιλέγονται από την θετική επιλογή, στα πλαίσια της θεωρίας της φυσικής επιλογής που διατύπωσε ο Δαρβίνος. Αντίθετα, οι μη ευνοϊκές μεταλλάξεις, που παρέχουν κάποιο επιλεκτικό μειονέκτημα, δηλαδή δημιουργούν ιϊκά στελέχη με μειωμένη αρμοστικότητα, εξαλείφονται από την αρνητική επιλογή (Domingo and Holland, 1997).

Οι περιοχές στις οποίες συμβαίνουν κυρίως μεταλλάξεις είναι εκείνες που κωδικοποιούν για τις καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3, οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων του ιού, καθώς και στην 5'NTR περιοχή. Το γεγονός αυτό, έχει ως αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να διαφεύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του κυττάρου-ξενιστή. Παράλληλα, οι μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν στο αμινοτελικό άκρο της VP1 είναι δυνατόν να επηρεάσουν την σταθερότητα του ιϊκού καψιδίου και να εμποδίσουν την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο εσωτερικό του κυττάρου, που εκφράζει τον υποδοχέα CD155 (Hogle, 1990). Τέλος, έχει προαναφερθεί ότι στο RNA γένωμα των πολιοϊών και στους 3 ορότυπους συμβαίνουν μεταλλάξεις που οδηγούν στην εξασθένηση του ιού και στη δημιουργία των Sabin εμβολιακών στελεχών, όπως επίσης και επαναμεταλλάξεις σε περιοχές που αποτελούν ισχυρούς καθοριστές της νευρομολυσματικότητας, οι οποίες επαναφέρουν τον άγριο φαινότυπο.

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, όπως μεταπτώσεις (όπου μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πουρίνη και το αντίστροφο) και μεταστροφές (όπου μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη και το αντίστροφο) (Figlerowicz et al., 2003). Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι: 1) Σιωπηλές (silent mutations), δηλαδή η αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου να οδηγεί σε κωδικόνιο συνώνυμο με το προηγούμενο, οπότε το αμινοξύ που κωδικοποιείται δεν αλλάζει, 2) Ουδέτερες (neutral mutations), όπου το νέο κωδικόνιο που δημιουργείται κωδικοποιεί για διαφορετικό αμινοξύ αλλά χημικά ισοδύναμο, οπότε η λειτουργία της πρωτεΐνης δεν επηρεάζεται, 3) Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations), όπου το νέο κωδικόνιο που προκύπτει κωδικοποιεί για διαφορετικό αμινοξύ και με διαφορετικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η δραστικότητα της πρωτεΐνης που παράγεται, και 4) Ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (nonsense mutations), όπου το μεταλλαγμένο κωδικόνιο κωδικοποιεί για ένα κωδικόνιο λήξης της σύνθεσης της πρωτεϊνικής αλυσίδας.

Πολλές φορές είναι δυνατόν, οι μεταλλαγμένοι πολιοϊοί να επιστρέφουν στον αρχικό τους φαινότυπο μέσω τριών τρόπων: α) μιας νέας μετάλλαξης, η οποία ακυρώνει την προηγούμενη και επαναφέρει τον ιό στον φαινότυπο του άγριου τύπου και λέγεται αληθινή αντιστροφή, β) μιας δεύτερης, αντισταθμιστικής μετάλλαξης, η οποία συμβαίνει στο ίδιο γονίδιο με την αρχική μετάλλαξη και διορθώνει και αποκαθιστά τις συνέπειες της πρώτης, και γ) μιας μετάλλαξης, που καταστέλλει τις επιπτώσεις της αρχικής μετάλλαξης σε διαφορετικό γονίδιο του ιού (Βασικές Αρχές Μοριακής Ιολογίας).

### 1.8.2 Ανασυνδυασμοί

Ο ανασυνδυασμός είναι η φυσική αλληλεπίδραση των γενωμάτων ιών κατά την διάρκεια της υπερμόλυνσης, καταλήγοντας σε συνδυασμούς γονιδίων που δεν υπάρχουν σε κανέναν από τους «γονείς» (Wimmer et al., 1993). Ο ανασυνδυασμός είναι ένα συχνό φαινόμενο στους πολιοϊούς. Αποτελεί έναν πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης από τις μεταλλάξεις, γιατί μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων στον αρχικό ιό σε ένα και μόνο γεγονός (Guillot et al., 2000). Επίσης, οδηγεί σε επιλεκτικό πλεονέκτημα, με αποτέλεσμα να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού, καθώς αυξάνει τον ρυθμό αντιγραφής του στο έντερο του ξενιστή, παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα την συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων, που δημιουργούνται από λάθη της RNA-πολυμεράσης (Blomqvist et al., 2003). Παράλληλα, ο ανασυνδυασμός μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας νέας ποικιλίας ιών, με δανεισμό γενετικού υλικού από τα κύπαρα- ξενιστές.

Στους πολιοϊούς ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος, δηλαδή συμβαίνει μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών χωρίς την προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίων (Kirkegaard and Baltimore,

1986). Στις περιπτώσεις μη ομόλογων ανασυνδυασμών συνήθως τα νέα στελέχη δεν είναι βιώσιμα. Ο ανασυνδυασμός είναι κυρίως διατυπικός και συμβαίνει: **1)** μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin (Cuervo et al. 2001, Georgoroulou and Markoulatos 2001), **2)** μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου (Dahourou et al. 2002, Georgescu et al. 1995) και **3)** μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (NPEVs: non-polio Enteroviruses) (Brown et al. 2003).

Στους ανθρώπους, οι πιο κοινοί διατυπικοί ανασυνδυασμοί είναι οι S2/S1 και S3/S2, που έχουν βρεθεί κυρίως σε υγιείς εμβολιασμένους και σε περιπτώσεις VAPP (Guillot et al., 2000). Αυτό ίσως εξηγείται από τη χρονική διάρκεια παραμονής των τριών στελεχών Sabin (S1, S2, S3) στο έντερο των ξενιστών. Τα στελέχη S2, S3 παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο έντερο σε αντίθεση με το στέλεχος S1, το οποίο εκκρίνεται πρώτο. Γι' αυτό και οι ανασυνδυασμοί S1/Sx είναι πιο σπάνιοι. Βέβαια, εκτός από τους 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).

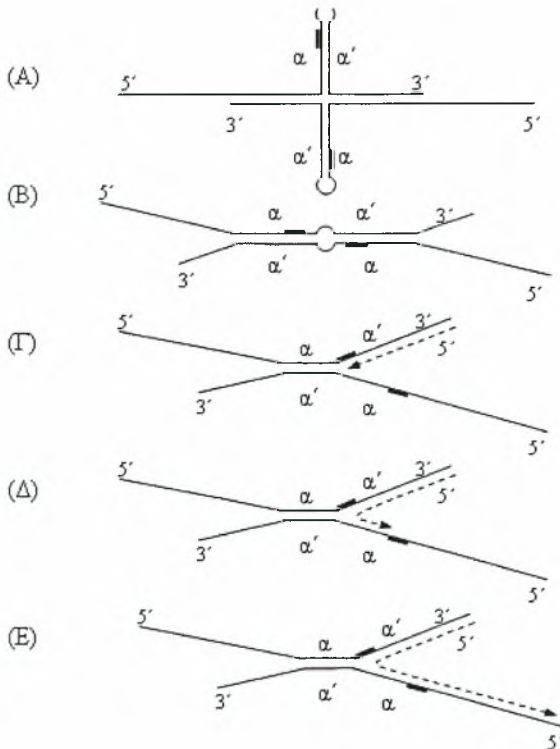
Οι θέσεις πάνω στο ιϊκό γένωμα όπου παρατηρούνται συνήθως ανασυνδυασμοί φαίνεται να είναι διάσπαρτες στις περιοχές που κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μεγαλύτερη συχνότητα ανασυνδυασμών έχει παρατηρηθεί στην 2C περιοχή, με ανασυνδυασμούς S3 και στην 3D περιοχή του ιϊκού γονιδιώματος, με ανασυνδυασμούς S2 (Cuervo et al., 2001, Georgoroulou and Markoulatos, 2001). Ανταλλαγές γενετικού υλικού στην καψιδική περιοχή (VP4-VP2-VP3-VP1) είναι πολύ σπάνιες (Blomqvist et al., 2003, Martin et al., 2002), ωστόσο έχουν αναφερθεί μερικές τέτοιες περιπτώσεις ανασυνδυασμού στα άκρα της καψιδικής περιοχής P1. Στη Ρουμανία απομονώθηκε ένα εμβολιακό στέλεχος τύπου 2, από θανατηφόρο κρούσμα VAPP, το οποίο ήταν ανασυνδυασμένο με μη εμβολιακό στέλεχος, όπου το 5' άκρο της ανασυνδυασμένης περιοχής βρισκόταν στην αρχή της VP4 πρωτεΐνης (Georgescu et al., 1995). Στην Κίνα απομονώθηκε από ασθενείς με πολιομυελίτιδα, την περίοδο 1991-1993, ένα άγριο στέλεχος πολιοϊού τύπου 1 με ένθετη αλληλουχία Sabin 1 στην περιοχή VP1-2A (Liu et al., 2000).

Έχει βρεθεί ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κυρίως στις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (P2 και P3 περιοχές) λόγω της ύπαρξης δευτεροταγών RNA δομών κυρίως στις 2C και 3D περιοχές, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση του ανασυνδυασμού (Georgoroulou and Markoulatos, 2000, Karakasiliotis et al., 2004). Επίσης λόγω του ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το καψίδιο είναι οι πιο ποικιλόμορφες μεταξύ των τριών οροτύπων των

πολιοϊών (μικρότερη ομολογία), συμβαίνει πιο σπάνια ανασυνδυασμός σε αυτές τις περιοχές (Duggal and Wimmer, 1999).

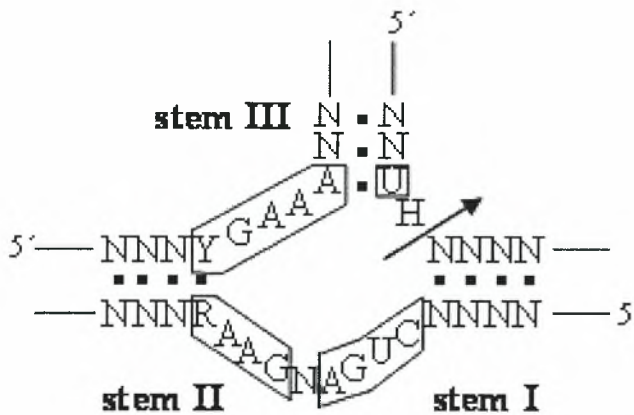
Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί για τον γενετικό ανασυνδυασμό: i) ο αντιγραφικός μηχανισμός (ή μηχανισμός αλλαγής μήτρας) και ii) ο μη αντιγραφικός μηχανισμός (ή μηχανισμός ρήξης και επανένωσης).

- **Αντιγραφικός μηχανισμός:** Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου RNA. Η 3D<sup>pol</sup>, κατά την σύνθεση του αρνητικού κλώνου RNA, συναντά κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία της επιμήκυνσης. Στο σημείο αυτό, το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας ως μήτρα, ένα θετικής πολικότητας ιϊκό RNA, διαφορετικό από το αρχικό (Hellen et al., 1993). Έχει προταθεί, ότι το εμπόδιο που συναντά η ιϊκή πολυμεράση, μπορεί να είναι είτε μια σταθερή δευτεροταγής RNA δομή (Romanova et al., 1986), είτε η προσθήκη ενός λάθος νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο (Piliipenko et al., 1995). Το αποτέλεσμα είναι να μεταπηδά η 3D<sup>pol</sup> από ένα εκμαγείο σε ένα άλλο, παράγοντας ένα ανασυνδυασμένο μόριο (**Εικόνα 23**). Αυτός ο μηχανισμός είναι ο ευρύτερα αποδεκτός για τον ανασυνδυασμό του RNA των πολιοϊών.



**Εικόνα 23:** Ο αντιγραφικός μηχανισμός ανασυνδυασμού. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που χρησιμεύσουν ως μήτρες ανασυνδυασμού. Οι δυο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι α και α', οι συμπαγείς πούλες αποτελούν τις θέσεις στα δύο γενώματα όπου γίνεται ο ανασυνδυασμός (Recombination junction) και η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA (Agol, 1997).

- **Μη αντιγραφικός μηχανισμός:** Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, τα ανασυνδυασμένα μόρια του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτιθέμενα άκρα τους ενώνονται. Υπάρχουν δυο θεωρίες που περιγράφουν τον ανασυνδυασμό μέσω του μηχανισμού αυτού. Σύμφωνα με την πρώτη, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των δύο διαφορετικών μορίων προσβάλλονται από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο  $H_2O$  και τα εκτιθέμενα 5' και 3' άκρα δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης και ενώνονται μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας (Chetverin, 1999). Η δεύτερη θεωρία προτείνει την προσβολή ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε ανασυνδυασμένο μόριο, από ένα παρακείμενο 2'-OH, το οποίο δρα σαν εσωτερικό νουκλεόφιλο. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός κυκλικού 2',3'-φωσφορικού και ενός 5' άκρου που φέρει OH, τα οποία μπορούν να ενωθούν μέσω trans-εστεροποίησης (Gmyl et al., 1999) (**Εικόνα 24**).



**Εικόνα 24:** Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Gmyl et al. Η θέση τομής παρουσιάζεται με ένα βέλος (Gmyl et al., 1999)



## 1.9 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η ανίχνευση ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων σε ολόκληρο το γένωμα ενός πολιοϊού, καθώς και η μελέτη της σημασίας τους στην αρμοστικότητα του ιϊκού στελέχους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα: ένα κλινικό (VAPP) και ένα περιβαλλοντικό (λύματα από την Κύπρο).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ / ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα. Η συλλογή και απομόνωση του ενός, έγινε από λύματα της Κύπρου, ενώ το άλλο δείγμα απομονώθηκε από κάποιο ασθενή με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP). Ο ορότυπος των δειγμάτων ήταν γνωστός, καθώς είχε προηγηθεί η διαδικασία της οροεξουδετέρωσης με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων, σε προηγούμενες μελέτες. Επίσης, σε αυτά τα δείγματα είχε προσδιοριστεί ο γενότυπος των ιϊκών στελεχών, με την εφαρμογή της διαδικασίας του RFLP, στην 5'NTR περιοχή. Σκοπός αυτής της διαδικασίας, ήταν να ταυτοποιηθεί η προέλευση των δειγμάτων, δηλαδή να προσδιοριστεί αν είναι πολιοϊοί αγρίου τύπου ή εμβολιακά στελέχη Sabin. Έτσι ταυτοποιήθηκε το MB1 ως εμβολιακό στέλεχος τύπου S3 και το ENP7 ως εμβολιακό στέλεχος S2 (Georgoroulou and Markoulatos, 2000).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ο ορότυπος και ο γενότυπος του κάθε δείγματος, καθώς και οι κλινικές εκδηλώσεις ή η προέλευση των δειγμάτων (**Πίνακας 3**).

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ/ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
MB1	P3	S3	VAPP
ENP7	P2	S2	Λύματα-Κύπρος

**Πίνακας 3:** Ο ορότυπος, ο γενότυπος και οι κλινικές εκδηλώσεις ή η προέλευση των

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν και τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin (S1, S2, S3), ως θετικοί μάρτυρες για την ανίχνευση των ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων, σε κάθε πειραματική διαδικασία. Οι αλληλουχίες των προτύπων στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3, έχουν κωδικούς καταχώρησης στην παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών (GenBank) AY184219, AY184220 και AY184221 αντίστοιχα.

#### 2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Για την απομόνωση των ιϊκών στελεχών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Hep-2 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος). Αρχικά, έγιναν σειριακές

αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων, οι οποίες κυμάνθηκαν από  $10^{-1}$  μέχρι  $10^{-10}$  της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε errendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π.χ στο πρώτο errendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο errendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου errendorf κ.ο.κ). Έπειτα, το περιεχόμενο των errendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης, οι οποίες περιείχαν τα κύτταρα Hep-2, τα οποία ήταν ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D (**Εικόνα 25**). Ο ενοφθαλισμός της κάθε αραιώσης έγινε 2 φορές, ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε errendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν).

	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 25:** Απεικονίζεται μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην οποία έγινε ο ενοφθαλισμός των σειριακών αραιώσεων των κλινικών δειγμάτων. Η κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλισμό 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.

Οι πλάκες, οι οποίες μολύνθηκαν με τον ιό, παρέμειναν στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι την εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού κυτταροπαθολογικού φαινομένου (CPE), το οποίο οδηγεί σε καταστροφή των κυττάρων. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας της όσο το δυνατόν μεγαλύτερης αραιώσης με CPE, ενοφθαλμίστηκε σε φλάσκες που περιείχαν κύτταρα Hep-2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό FBS. Οι φλάσκες

παρέμειναν στους 37°C μέχρι να εξαπλωθεί το CPE σε όλα τα κύτταρα. Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι φλάσκες διατηρήθηκαν στους -4 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού.

Ο σκοπός των σειριακών αραιώσεων, είναι η αποφυγή των μειγμάτων στελεχών πολιοϊών ή μειγμάτων πολιοϊών και άλλων ιών του γένους των εντεροϊών, στα δείγματα της παρούσης εργασίας.

### 2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση του ιϊκού RNA έγινε με την μέθοδο της θεικονουανιούχου γουανιδίνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas (Casas et al. 1995). Μέσα σε erpendorf των 2ml, τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer, το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate, με σκοπό την λύση των κυττάρων. Προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (-20 °C), και τέλος 100μl δείγματος από την μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια. Ακολούθησε vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14000xg στους 4° C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Στο ίζημα που απέμεινε, προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% σε συνδυασμό με vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα δείγματα επώαστηκαν στους 40° C, ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα που απέμεινε, επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH<sub>2</sub>O.

Τα erpendorf αποθηκεύονται στους -20 °C, μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

### 2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι απαραίτητη, για την μετατροπή του ιϊκού RNA των πολιοϊών σε cDNA, με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το cDNA, που παράγεται είναι απαραίτητο για το επόμενο στάδιο που θα ακολουθήσει, που είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Αρχικά, προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει τυχαίους εκκινητές [random primers d(N9) (Takara)] (1μl/tube), 10mM dNTPs (1μl/tube) και νερό που δεν περιέχει νουκλεάσες (Nuclease-free water) (5μl/tube). Σε erpendorf των 500μl, προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια, τα erpendorf, αφού προηγήθηκε spin down, ώστε να μην υπάρχει ποσότητα του μίγματος στα τοιχώματα, επώαστηκαν στους 65° C για

5min, ώστε να αποδιαταχθούν τα μόρια RNA και να μπορέσουν, έτσι, τα random primers να υβριδοποιηθούν με αυτά. Μετά την επώαση, τα erpendorf τοποθετούνται στον πάγο, με αποτέλεσμα την επαναδιάταξη των μορίων RNA, τα οποία είναι πλέον υβριδισμένα με τα random primers. Έπειτα, προετοιμάζεται το μίγμα της αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο περιέχει 5x first strand Buffer (4μl/tube), το οποίο αποτελεί ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την δράση του ενζύμου, 0,1M DTT (2μl/tube), RNase out (20units/μl) (0,5 μl/tube), αντίστροφη μεταγραφάση (MMLV-RT, 200u/μl, 0,5μl/tube, Invitrogen) και νερό που δεν περιέχει νουκλεάσες (Nuclease- free water, 1μl/tube), ώστε τελικά ο όγκος του μίγματος να είναι 8 μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl αυτού του μίγματος σε κάθε erpendorf, και ακολούθησε spin down, και επώαση των erpendorf διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10min στους 25 °C, 50min στους 37 °C και 15min στους 70 °C.

## 2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Με την διαδικασία της PCR, είναι δυνατόν να ενισχυθούν συγκεκριμένες περιοχές του γένωματος, με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων (primers). Στην παρούσα εργασία, ενισχύθηκε όλο το γένωμα ενός πολιοϊού (από την 5'NTR περιοχή έως την 3'NTR), με τη χρήση ειδικών εκκινητών για κάθε περιοχή (**Πίνακας 4**).

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά, προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Το μίγμα αποτελείται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Pac Buffer 10x), 2μl primers (1μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 0,5μl ενζύμου Pac πολυμεράσης (2,5u/t) (Pac 5000 Strategene) και νερό (nuclease free) μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος, σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή σε συνθήκες, οι οποίες είναι ειδικές για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε. Στην αρχή πραγματοποιείται αποδιάταξη του cDNA στους 95° C για 2min και στο τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται με ένα στάδιο επώασης στους 72° C για 5min. Έπειτα τα δείγματα διατηρούνται στους 4° C. Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για κάθε ζεύγος εκκινητών παρουσιάζονται στον **πίνακα 5**.

Όνομα	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Γενωμική Περιοχή	Μέγεθος προϊόντων
72437	Sense	001-TTAAAACAGCTCTGGGGTTG-020	5'UTR	564bp
216616	Antisense	545-GGAACACGGACACCCAAAGTA-565	5'UTR	
S <sub>3</sub> 309	Sense	309-GTAGCTTGGGCCGATGAGT-327	5'UTR-VP4	735bp
S <sub>3</sub> 044	Antisense	1025-ACTGAATTTGCTGCCTCCTG-1044	VP4	
S <sub>3</sub> 936	Sense	936-CTCCAGCACTCAATTCACCA-955	VP4-VP2	574bp
S <sub>3</sub> 510	Antisense	1491-TCCCAGTAACACCCACATC-1510	VP2	
S <sub>3</sub> 78	Sense	1378-TTATGCAAATGCGAATCCAG-1397	VP2	486bp
S <sub>3</sub> 864	Antisense	1844-AATAGCGGAGTGACATCAA-1864	VP2	
S <sub>3</sub> 709	Sense	1709-CCCAATGTGTAGCGAGTTCA-1728	VP2-VP3	509bp
S <sub>3</sub> 218	Antisense	2200-GTGCCCAACATAGCCTCCT-2218	VP3	
S <sub>3</sub> 40	Sense	2140-TACGGGGAAAATCCTAGTGG-2159	VP3	519bp
S <sub>3</sub> 659	Antisense	2640-CGTTTGAAGTGTGCGGATG-2659	VP3	
UG1	Sense	2402-TTTGTGTCAGCGTGTAAATG-2421	VP1	597bp
222	Antisense	2982-CICCIGGIGGIAYRWACA-2999	VP1	
S <sub>3</sub> 26	Sense	2826-GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC-2847	VP1	662bp
S <sub>2</sub> 688	Antisense	3469-CACATGACACTCACGGCATT-3488	VP1	
71935	Sense	3206-GTCAATGATCACAACCC-3222	VP1-2C	1,268bp
EUC2	Antisense	4454-TTGCCTTGAAGTGTATGTA-4474	2C	
<b>UG23</b>	<b>Sense</b>	<b>4169-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4188</b>	<b>2C</b>	796bp
<b>UC15</b>	<b>Antisense</b>	<b>4948-CATCTCTTGAAGTTTGCT-4965</b>	<b>2C</b>	
S <sub>3</sub> 141	Sense	4741-AGGCATTCTGTTCCATCCAAC-4763	2C-3A	498bp
S <sub>3</sub> 368	Antisense	5239-ATGTTGACGATCCATCCTTTCT-5217	3A	
S <sub>2</sub> 48*	Sense	4968-TCCTTTAGTGTGTGGCAAGG-4988	3A	864bp
S <sub>2</sub> 911*	Antisense	5812-GTTTGTGTCGCCACCGAGATT-5832	3B-3C	
<b>UG16</b>	<b>Sense</b>	<b>5921-GTTGGTGGGAACGGTTCACA-5940</b>	<b>3C-3D</b>	595bp
<b>UC12</b>	<b>Antisense</b>	<b>6516-TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG-6494</b>	<b>3D</b>	
S <sub>1</sub> 70*	Sense	5769-TATGTATGTTCCCTGTCGGTGCT-5791	3D	1,102bp
S <sub>1</sub> 450*	Antisense	6851-ATTGAAGTGCCTGAGCAACC-6871	3D	
S <sub>1</sub> 198*	Sense	6728-GCACTAAAGATGGTGCTTGAGAAA-6752	3D	688bp
S <sub>1</sub> 885*	Antisense	7415-CTACAACAGTATGACCCAATCCAA-7391	3D	
S <sub>2</sub> 107*	Sense	6647-TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA-6668	3D	766bp
S <sub>2</sub> 872*	Antisense	7393-ACAACAGCATGACCCAATCC-7413	3'UTR	

Η αρίθμηση των θέσεων των primers έγινε σύμφωνα με την αρίθμηση του πρότυπου στελέχους Sabin 3 (AY184221), εκτός από τα ζεύγη primers τα οποία έχουν ένα χαρακτηριστικό αστεράκι, στα οποία η αρίθμηση έγινε σύμφωνα με το Sabin 2 (AY184220) και για το ζεύγος S<sub>1</sub>198- S<sub>1</sub>885 σύμφωνα με το Sabin 1 (AY184219).

**Πίνακας 4:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Παρουσιάζεται η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η αλληλουχία τους, η πολικότητά τους καθώς και το μέγεθος των PCR προϊόντων που προκύπτουν.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης	
72437-21661/ S <sub>3</sub> 309- S <sub>3</sub> 044/S <sub>3</sub> 936-S <sub>3</sub> 510/S <sub>3</sub> 78- S <sub>3</sub> 864/S <sub>3</sub> 709-S <sub>3</sub> 218/S <sub>3</sub> 40- S <sub>3</sub> 659/S <sub>3</sub> 141-S <sub>3</sub> 368/S <sub>1</sub> 198- S <sub>1</sub> 885	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	} 40 κύκλοι
71935-EUC2/S <sub>2</sub> 48- S <sub>2</sub> 911/S <sub>1</sub> 70-S <sub>1</sub> 450/S <sub>2</sub> 107- S <sub>2</sub> 872/S <sub>3</sub> 64-S <sub>3</sub> 290/UG23- UC15	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1min	} 40 κύκλοι
UG16-UC12	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 53 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	} 40 κύκλοι
S <sub>3</sub> 26-S <sub>2</sub> 688	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 20sec	} 40 κύκλοι

**Πίνακας 5:** Οι συνθήκες στις οποίες επιτελείται η αντίδραση PCR για τα διάφορα ζεύγη εκκινητικών.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της PCR, έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen agarose), συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,4gr αγαρόζης σε 70ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris Boric EDTA). Προστέθηκαν, επίσης, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl), το οποίο είναι απαραίτητο καθώς παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA, καθιστώντας το ορατό σε υπεριώδη ακτινοβολία. Από το προϊόν της PCR, χρησιμοποιήθηκαν 10μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου εφαρμόστηκε τάση 130V. Συγχρόνως, χρησιμοποιήθηκαν και 5μl ενός μάρτυρα μοριακών βαρών, για να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της μπάντας του υπό εξέταση δείγματος. Ο



μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία είναι ο DNA ladder 100bp της Invitrogen (**Εικόνα 26**).

**Εικόνα 26:** Ο μάρτυρας μοριακού βάρους DNA ladder 100bp, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

## 2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RFLP)

Με την μέθοδο του RFLP, αναλύθηκαν τα προϊόντα της PCR, τα οποία ενισχύθηκαν από τα ζεύγη εκκινητών UG23-UC15 και UG16-UC12 και τα οποία αντιστοιχούν στις περιοχές 2C και 3C/D του γενώματος των πολιοϊών. Στόχος της μεθόδου αυτής, ήταν η ταυτοποίηση του γενότυπου των περιοχών αυτών των δειγμάτων, καθώς και η ανίχνευση πιθανού ανασυνδυασμού. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ένζυμα περιορισμού, τα οποία μπορούν να πέψουν τα συγκεκριμένα προϊόντα σε κατάλληλες θέσεις. Οι πέψεις των PCR προϊόντων των ζευγών, UG23-UC15 και UG16-UC12 καταλήγουν σε διαφορετικά πρότυπα πέψεων ως προς το μήκος των τμημάτων, ανάλογα με τον γενότυπο (S1,S2,S3) του εκάστοτε ιϊκού στελέχους. Αν υπάρχει ανασυνδυασμός, στην συγκεκριμένη περιοχή του στελέχους, εμφανίζεται ένα πρότυπο διαφορετικό από το αναμενόμενο.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII, AfaI και HinfI, για τα προϊόντα της PCR των primers UG23-UC15 και τα ένζυμα HaeIII, HinfI και BstOI, για τα προϊόντα του ζεύγους UG16-UC12. Στον **πίνακα 6**, παρουσιάζονται τα πρότυπα πέψης των στελεχών Sabin,1 Sabin 2 και Sabin 3 (τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία του RFLP, με σκοπό να γίνει σύγκριση των τμημάτων τους με τα τμήματα των δειγμάτων που θα προκύψουν μετά το RFLP), στις 2C και 3C/3D περιοχές, και στον **πίνακα 7** οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών.



ΔΕΙΓΜΑ	2C			3C-D		
	UG23/UC15 (797bp)			UG16/UC12 (596bp)		
	Haelll	Afa1	Hinfl	Haelll	Hinfl	BstOI
Sabin 1	742,55	379,335, 83	489,213, 95	282,280, 34	452,84, 60	386,210
Sabin 2	565,127, 105	380,290, 82,45	422,255, 120	280,213, 69,34	422,102 60,12	211,210, 175
Sabin 3	318,247,127,105	364,194, 116,82,41	576,95, 67,59	562,34	300,212 84	-

**Πίνακας 6:** Πρότυπα πέψης των στελεχών S1, S2, S3 στις 2C και 3C/D περιοχές.

ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
BstOI	CC/AGG
Haelll	GG/CC
Afa1 (RsaI)	GT/AC
Hinfl	G/ANTC

**Πίνακας 7:** Τα ενζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν για την πέψη.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση του RFLP ήταν διαφορετικό για τα 4 τέσσερα ένζυμα περιορισμού. Έτσι για τα ένζυμα περιορισμού Afa1 και BstOI, προετοιμάστηκε, αρχικά, ένα μίγμα το οποίο περιείχε 2μl/tube περιοριστικού ενζύμου (10u/μl), 2μl/tube 10X Buffer (ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την δράση του κάθε ενζύμου), 1μl BSA για το ένζυμο BstOI και 2μl BSA για το ένζυμο Afa1. Κατόπιν σε σωληνάρια των 500μl προστέθηκαν 4μl/tube του παραπάνω μίγματος, 3μl του PCR προϊόντος που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα και το υπόλοιπο συμπληρώθηκε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 20μl /tube. Τα σωληνάρια επώαστηκαν στους 37 °C για 2h για το Afa1 και στους 60° C για 2h, για το BstOI. Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 5μl Loading Buffer (κατάλληλο διάλυμα χρωστικής), για την παύση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η ίδια

διαδικασία γίνεται και για τα ένζυμα περιορισμού HaeIII και HinfI, μόνο που στο μίγμα δεν προστίθεται BSA και ο χρόνος επώασης των ενζύμων είναι 37° C για 2h και για τα 2 ένζυμα.

Τα προϊόντα του RFLP, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων. Στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης, φορτώθηκαν 25μl από τα προϊόντα του RFLP (ήδη αναμειγμένων με χρωστική), καθώς και 5μl του μάρτυρα μοριακού βάρους HinfI ΦΧ174, στην πρώτη θέση του πηκτώματος.

## 2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Τα προϊόντα όλων των PCR διαδικασιών, καθαρίστηκαν με το kit: PCR clean up Gel extraction Nucleospin Extract II, ώστε να μπορούν στη συνέχεια να σταλούν για αλληλούχιση μόνο τα ειδικά προϊόντα. Τυχόν παραπροϊόντα της αντίδρασης PCR, θα οδηγούσαν σε προβλήματα κατά την αλληλούχιση των προϊόντων.

Για αλληλούχιση εστάλησαν μόνο τα προϊόντα της PCR του δείγματος στο οποίο βρέθηκε πιθανότητα ανασυνδυασμού. Το πλήρες γένωμα του ιϊκού στελέχους (από την 5'NTR έως την 3'NTR περιοχή) αυτού του δείγματος, ενισχύθηκε με τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen, στην Κορέα.

## 2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των προϊόντων, έγινε με τα εξής προγράμματα βιοπληροφορικής:

**CLUSTALW:** Αποτελεί πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης και σύγκρισης αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Το πρόγραμμα διατίθεται προς κοινή χρήση στο διαδίκτυο στη σελίδα: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (EMBL-EBI). Οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες του ιϊκού στελέχους, στοιχήθηκαν με τις αλληλουχίες των προτύπων στελεχών Sabin (Sabin 3, Sabin 1). Μέσω αυτής της διαδικασίας, ανιχνεύτηκαν νουκλεοτιδικές και αμινοξικές μεταλλάξεις, όπως επίσης και ανασυνδυασμός στο ιϊκό στέλεχος.

**Gene Runner V. 3.05:** Αποτελεί πρόγραμμα με πολλές ιδιότητες. Στην συγκεκριμένη εργασία, το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ένωση των αλληλουχιών (που ανακτήθηκαν από την αλληλούχιση), όλων των περιοχών του γενώματος του πολιοϊού, ώστε να ανακτηθεί το πλήρες γονιδίωμα του συγκεκριμένου ιϊκού στελέχους. Επίσης, με το

πρόγραμμα αυτό, πραγματοποιήθηκε η μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών όλων των περιοχών, με αποτέλεσμα να ληφθούν οι αμινοξικές αλληλουχίες τους.

**Rasmol V. 2.7.1.1:** Το πρόγραμμα αυτό, επιτρέπει την απεικόνιση τρισδιάστατων δομών πρωτεϊνικών μορίων. Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού, και με τη χρήση της κατατεθειμένης στην Protein Data Bank (pdb) δομής 1VBE.pdb (πολιοϊός αγρίου τύπου 3), απεικονίστηκαν, πάνω στις δομές των VP1 και VP3 περιοχών του ιϊκού στελέχους, οι θέσεις των αμινοξικών αλλαγών που ανιχνεύθηκαν.

**SimPlot:** Αποτελεί πρόγραμμα ανάλυσης ομοιογένειας – ετερογένειας μεταξύ αλληλουχιών. Στην παρούσα εργασία, το συγκεκριμένο πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση της ακριβούς θέσης του ανασυνδυασμού, που ανιχνεύθηκε, υπολογίζοντας το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ του ανασυνδυασμένου στελέχους και των δύο προτύπων στελεχών Sabin (Sabin 3, Sabin1), που εμπλέκονται σε αυτόν.

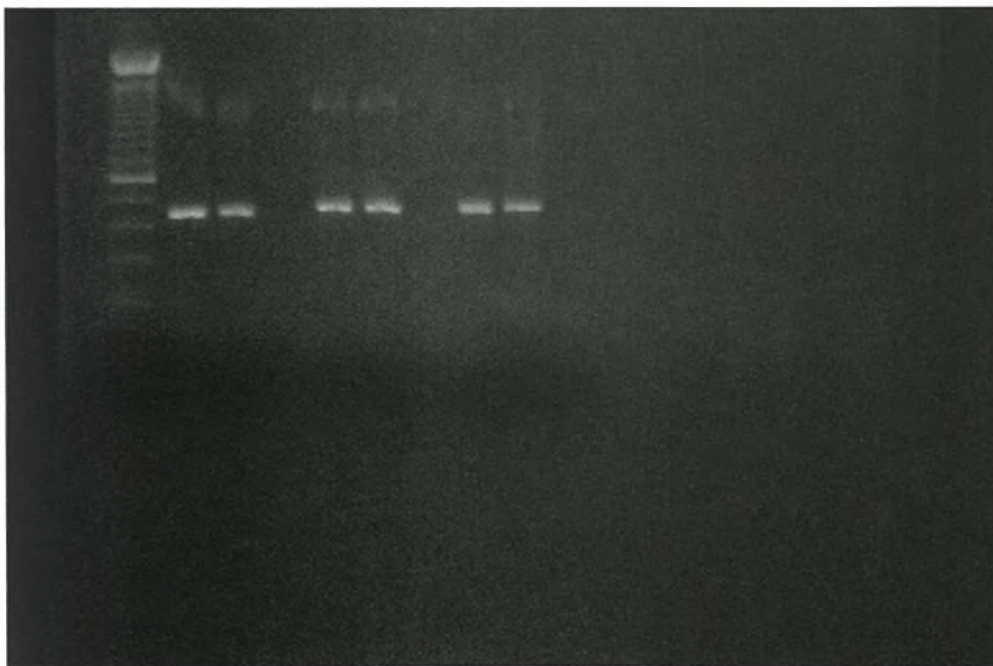
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ****3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR**

Αρχικά, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της PCR, στις κωδικές περιοχές 2C και 3D, με σκοπό να ενισχυθούν αυτές οι περιοχές ώστε στη συνέχεια με την διαδικασία του RFLP, να ανιχνευθεί αν υπήρχε κάποιος ανασυνδυασμός στα δείγματά μας. Όπως έχει προαναφερθεί, στις περιοχές 2C και 3D, παρουσιάζεται πιο συχνά ανασυνδυασμός σε σύγκριση με άλλες περιοχές του γένωματος των πολιοϊών, λόγω μεγαλύτερης ομολογίας των περιοχών αυτών μεταξύ των εμβολιακών στελεχών Sabin, καθώς επίσης και λόγω ύπαρξης ορισμένων δευτεροταγών δομών, οι οποίες ευνοούν την δημιουργία του ανασυνδυασμού.

Στη συνέχεια της παρούσης εργασίας, μετά την διαδικασία του RFLP, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της PCR, σε όλο το γένωμα του ιϊκού στελέχους του δείγματος, στο οποίο ανιχνεύθηκε πιθανότητα ανασυνδυασμού. Ενδεικτικά, παρατίθεται παρακάτω φωτογραφία ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των περιοχών VP2 και VP3, με τα ζεύγη εκκινητών S<sub>3</sub>78-S<sub>3</sub>864, S<sub>3</sub>709-S<sub>3</sub>218 και S<sub>3</sub>40-S<sub>3</sub>659 αντίστοιχα (**Εικόνα 27**).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



**Εικόνα 27:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με τα ζεύγη εκκινητών S<sub>3</sub>78-S<sub>3</sub>864 (θέσεις 1-3), S<sub>3</sub>709-S<sub>3</sub>218 (θέσεις 4-6) και S<sub>3</sub>40-S<sub>3</sub>659 (θέσεις 7-9). Στη θέση M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους DNA ladder 100bp της Invitrogen, στις θέσεις 1-3 είναι αντίστοιχα το δείγμα MB1, το πρότυπο στέλεχος S3 και ο αρνητικός μάρτυρας (ddH<sub>2</sub>O), το ίδιο και για τις θέσεις 4-6 και 7-9.

### 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RFLP

Η διαδικασία του RFLP, όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε, στις κωδικές περιοχές 2C και 3C/D, με σκοπό την ανίχνευση ανασυνδυασμών στα ιικά στελέχη των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Από τα 2 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο το ένα παρουσίασε διαφορετικό πρότυπο πέψης από τα αναμενόμενα πρότυπα. Συγκεκριμένα, το δείγμα MB1, το οποίο ήταν ταυτοποιημένο ως Sabin 3 εμβολιακής προέλευσης (στην 5'NTR), παρουσίασε στην 3C/D περιοχή, πρότυπο πέψης Sabin 1. Ενώ, το δείγμα ENP7, το οποίο ήταν ταυτοποιημένο ως Sabin 2 (στην 5'NTR), παρουσίασε το ίδιο πρότυπο πέψης και στις 2 περιοχές, επομένως ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανασυνδυασμού σε αυτό το δείγμα (Πίνακας 8).

ΔΕΙΓΜΑ	2C			3C-D			5'-NTR	2C	3C-D
	UG23/UC15 (797bp)			UG16/UC12 (596bp)					
	HaeIII	AfaI	HinI	HaeIII	HinI	BstOI			
MB1	318,247, 127,105	364,194, 116,82,41	576,95, 67,59	562,34	452,84, 60	386,210	S3	S3	S1
ENP7	565,127, 105	380,290, 82,45	422,255, 120	280,213 , 69,34	422,102 , 60,12	211,210 , 175	S2	S2	S2

**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα RFLP, των δειγμάτων MB1 και ENP7 στις περιοχές 2C και 3D. Παρατίθεται και το πρότυπο πέψης στην 5'NTR περιοχή, όπου, όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε RFLP στην περιοχή αυτή, για να ταυτοποιηθεί ο γενότυπος των δειγμάτων (Georgoroulou and Markoulatos, 2000).

### 3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Το δείγμα MB1, το οποίο εμφάνισε διαφορετικό πρότυπο πέψης από το αναμενόμενο (πιθανότητα ανασυνδυασμού), αλληλουχίστηκε από την 5'NTR περιοχή μέχρι την 3'NTR περιοχή του ιικού γενώματος (πλήρες γονιδίωμα ιικού στελέχους, από την βάση 1 μέχρι την βάση 7432, σύμφωνα με την αρίθμηση του στελέχους Sabin 3).

Η αλληλουχία του δείγματος MB1, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια, για στοίχιση (μέσω του προγράμματος βιοπληροφορικής Clustalw), με τις δύο εμπλεκόμενες αλληλουχίες στον ανασυνδυασμό, των προτύπων στελεχών Sabin 3 και Sabin 1, οι οποίες είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών (GenBank). Η διαδικασία αυτή, έγινε με σκοπό την

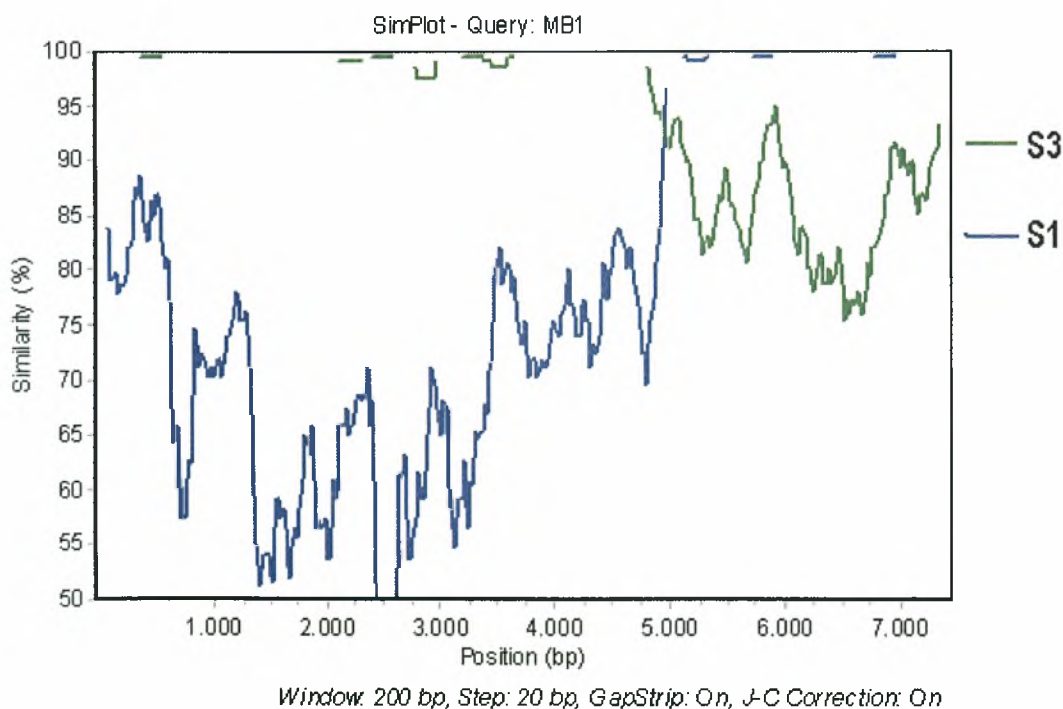
εύρεση πιθανών νουκλεοτιδικών και αμινοξικών μεταλλάξεων, καθώς επίσης και για την επιβεβαίωση της ύπαρξης ανασυνδυασμού. Παράλληλα, με την στοίχιση, κατέστη δυνατή η εύρεση του σημείου ανασυνδυασμού (Recombination junction) (Εικόνα 33), των δύο γενωμάτων (Sabin 3 – Sabin 1).

		4880	4887	
S3	GCTTTCGATATGGATATTCAAAGTGATGGCGGAGTACTCC	AGAGATGG	TAAACTCAACATG	
MB1	GCTTTCGATATGGATATTCAAAGTGATGGCGGAGTACTCC	AGAGATGG	AAAATGAACATG	
S1	GCGTTCGACATGGACATTCAGGTCATGAATGAGTATTCT	AGAGATGG	AAAATGAACATG	
	** **	*****	*****	

**Εικόνα 33:** Απεικονίζεται το σημείο ανασυνδυασμού (Recombination junction) στην 2C περιοχή του ιϊκού γονιδιώματος. Με κίτρινο παρουσιάζονται οι ομοιότητες του MB1 με το Sabin 3, ενώ με πράσινο οι ομοιότητες του MB1 με το Sabin 1.

Σύμφωνα με την ανωτέρω εικόνα, στο δείγμα MB1, το σημείο ανασυνδυασμού που ανιχνεύθηκε, εντοπίστηκε μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4880 – 4887 της 2C περιοχής και ο ανασυνδυασμός ήταν του τύπου Sabin 3/ Sabin 1.

Προκειμένου να απεικονιστεί γραφικά το σημείο του ανασυνδυασμού του MB1, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Simplot, με το οποίο υπολογίστηκε το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ του ανασυνδυασμένου στελέχους και των δύο στελεχών αναφοράς Sabin 3 – Sabin 1, που συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34:** Απεικόνιση Simplot. Παρουσιάζεται η εκατοστιαία ομοιότητα του MB1 με το Sabin 3 (πράσινο) και το Sabin 1 (μπλε).

Από τα αποτελέσματα της στοίχισης, εκτός από τον ανασυνδυασμό, παρατηρήθηκαν επίσης και μεταλλάξεις στις καψιδιακές περιοχές 5'NTR, VP3, VP1 καθώς και στις λειτουργικές περιοχές 2A, 3A, 3C και 3D. Οι μεταλλάξεις στις περιοχές 5'NTR, 3A και 3C ήταν συνώνυμες (η αλλαγή του νουκλεοτιδίου δεν οδήγησε σε αλλαγή αμινοξέος), ενώ οι μεταλλάξεις στις υπόλοιπες περιοχές ήταν και συνώνυμες και μη συνώνυμες (η αλλαγή του νουκλεοτιδίου συνοδεύτηκε από την αλλαγή αμινοξέος). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές μεταλλάξεις του δείγματος MB1 (Πίνακας 9).

ΔΕΙΓΜΑ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
MB1	Sabin 3	5'NTR	T 472 C	---
		VP3	A 2207 T T 2208 G	--- Met 149 Trp
		VP1	C 2493 T C 2855 A T 2857 A C 2863 A T 2865 G G 2882 T A 3248 G	Thr 6 Ile --- --- Asp 129 Glu Met 130 Arg Val 136 Leu Ile 258 Val
		2A	G 3451 A A 3459 T A 3529 G	--- Glu 28 Leu ---
	Sabin 1	3A	A 5191 G G 5230 A	--- ---
		3C	T 5791 C	---
		3D	C 6864 A	Thr 293 Asn

Πίνακας 9: Νουκλεοτιδικές και αμινοξικές μεταλλάξεις του MB1. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις, με μπλε χρώμα τα αμινοξέα των προτύπων στελεχών Sabin και με πράσινο τα μεταλλαγμένα αμινοξέα του στελέχους MB1.

Ενδεικτικά, παρακάτω παρατίθεται η στοίχιση (μέσω του Clustalw) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 περιοχής του δείγματος MB1, με την νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του προτύπου στελέχους Sabin 3.

```

VP1_MB1  -----GGTATATGAAGATTTGATTTCTGAAGTTGCACAGGGCGCCCTAAC 44
S3       ATCTGCGCTTCCACAGGGTATTGAAGATTTGACTTCTGAAGTTGCACAGGGCGCCCTAAC 2520
          *****

VP1_MB1  TTTGTCACTCCCGAAGCAACAGGATAGCTTACCTGATACTAAGGCCAGTGGCCCGGCGCA 104
S3       TTTGTCACTCCCGAAGCAACAGGATAGCTTACCTGATACTAAGGCCAGTGGCCCGGCGCA 2580
          *****

VP1_MB1  TTCCAAGGAGGTACCTGCACTCACTGCAGTCGAGACTGGAGCCACCAATCCTCTGGCACC 164
S3       TTCCAAGGAGGTACCTGCACTCACTGCAGTCGAGACTGGAGCCACCAATCCTCTGGCACC 2640
          *****

VP1_MB1  ATCCGACACAGTTCAAACGCGCCACGTAGTCCAACGACGCAGCAGGTGAGTCCACAAT 224
S3       ATCCGACACAGTTCAAACGCGCCACGTAGTCCAACGACGCAGCAGGTGAGTCCACAAT 2700
          *****

VP1_MB1  AGAATCATTCTTCGCACGCGGGCGTGCCTCGCTATTATTGAGGTGGACAATGAACAACC 284
S3       AGAATCATTCTTCGCACGCGGGCGTGCCTCGCTATTATTGAGGTGGACAATGAACAACC 2760
          *****

VP1_MB1  AACCACCGGGCACAGAACTATTTGCCATGTGGCGCATTACATACAAAGATACAGTGCA 344
S3       AACCACCGGGCACAGAACTATTTGCCATGTGGCGCATTACATACAAAGATACAGTGCA 2820
          *****

VP1_MB1  GTTGCGCCGTAAAGTTGGAGTTTTTACATACTCTAGATTTGAAAGGAATTCACCTTCGT 404
S3       GTTGCGCCGTAAAGTTGGAGTTTTTACATACTCTAGATTTGAAAGGAATTCACCTTCGT 2880
          ***** * *****

VP1_MB1  GTTAACCGCCAACCTCACCAACGCTAATAATGGGCATGCACTCAACCAGGTGTACCAGAT 464
S3       GTTAACCGCCAACCTCACCAACGCTAATAATGGGCATGCACTCAACCAGGTGTACCAGAT 2940
          * *****

VP1_MB1  AATGTACATCCCCCAGGGGCACCCACACCAAAGTCATGGGACGACTACACTTGGCAAAC 524
S3       AATGTACATCCCCCAGGGGCACCCACACCAAAGTCATGGGACGACTACACTTGGCAAAC 3000
          *****

VP1_MB1  ATCTTCCAACCCGTCATATTTTACACCTATGGGGCTGCCCGGCGCGAATCTCAGTGCC 584
S3       ATCTTCCAACCCGTCATATTTTACACCTATGGGGCTGCCCGGCGCGAATCTCAGTGCC 3060
          *****

VP1_MB1  ATACGTGGGGTTAGCCAATGCTTACTCGCACTTTTACGACGGCTTCGCCAAGGTGCCATT 644
S3       ATACGTGGGGTTAGCCAATGCTTACTCGCACTTTTACGACGGCTTCGCCAAGGTGCCATT 3120
          *****

VP1_MB1  GAAGACAGATGCCAATGACCAGATTGGTGATTCCTTGACAGCGCCATGACAGTTGATGA 704
S3       GAAGACAGATGCCAATGACCAGATTGGTGATTCCTTGACAGCGCCATGACAGTTGATGA 3180
          *****

VP1_MB1  CTTTGGTGTATTGGCAGTTCGTGTTGTCAATGATCACAACCCACTAAAGTAACCTCCAA 764
S3       CTTTGGTGTATTGGCAGTTCGTGTTGTCAATGATCACAACCCACTAAAGTAACCTCCAA 3240
          *****

VP1_MB1  AGTCCGCGTTTACATGAAACCCAAACACGTACGTGTCTGGTGCCCTAGACCGCCGCGCGC 824
S3       AGTCCGCGTTTACATGAAACCCAAACACGTACGTGTCTGGTGCCCTAGACCGCCGCGCGC 3300
          *****

VP1_MB1  GGTACCTTATTATGGACCAGGGGTGGACTATAGGAACAACCTGGACCCCTTATCTGAGAA 884
S3       GGTACCTTATTATGGACCAGGGGTGGACTATAGGAACAACCTGGACCCCTTATCTGAGAA 3360
          *****

VP1_MB1  AGGTTTGACCACATAT----- 900
S3       AGGTTTGACCACATATGGCTTTGGGCATCAGAATAAAGCTGTGTACACTGCTGGTTACAA 3420
          *****

```



Τα αστεράκια που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα νουκλεοτίδια υποδεικνύουν ομοιότητα, ενώ τα κενά σημαίνουν ότι στο συγκεκριμένο σημείο υπάρχει μετάλλαξη.

Ακολουθεί, η παράθεση της στοίχισης της αμινοξικής αλληλουχίας της VP1 περιοχής του δείγματος MB1, με την αμινοξική αλληλουχία της VP1 περιοχής του προτύπου στελέχους Sabin 3.

```

VP1aa_MB1      GIEDLISEVAQGALTLISLPKQQDSLDPDKASGPAHSKEVPALTAVETGATNPLAPSDTVQ 60
VP1aa_S3       GIEDLTSEVAQGALTLISLPKQQDSLDPDKASGPAHSKEVPALTAVETGATNPLAPSDTVQ 60
*****

VP1aa_MB1      TRHVVQRRSRSESTIESFFARGACVAIIIEVDNEQPTTRAQKLFAMWRITYKDTVQLRRKL 120
VP1aa_S3       TRHVVQRRSRSESTIESFFARGACVAIIIEVDNEQPTTRAQKLFAMWRITYKDTVQLRRKL 120
*****

VP1aa_MB1      EFFTYSRFREREFTFVLTAFTNANNGHALNQVYQIMYIPPGAPTPKSWDDYTWQTSSNPS 180
VP1aa_S3       EFFTYSRFDMEFTFVVTANFTNANNGHALNQVYQIMYIPPGAPTPKSWDDYTWQTSSNPS 180
*****;*****

VP1aa_MB1      IFYTYGAAPARISVPYVGLANAYSHFYDGFQVPLKTDANDQIGDSLYSAMTVDDFGVLA 240
VP1aa_S3       IFYTYGAAPARISVPYVGLANAYSHFYDGFQVPLKTDANDQIGDSLYSAMTVDDFGVLA 240
*****

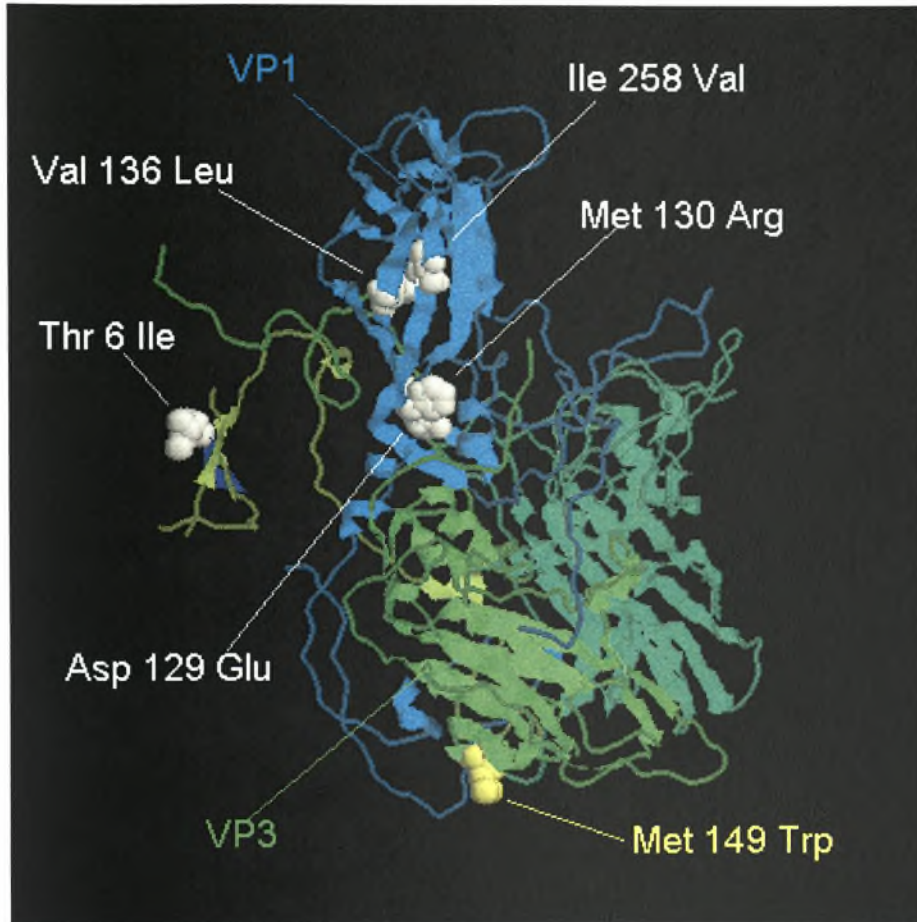
VP1aa_MB1      VRVVDHNPTKVTSKVRVYMKPKHVRVWCPRPPRAVPYYPGVDYRNNLDPLSEKGLTTY 300
VP1aa_S3       VRVVDHNPTKVTSKVRVYMKPKHVRVWCPRPPRAVPYYPGVDYRNNLDPLSEKGLTTY 300
*****;*****

```

Τα αστεράκια που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα αμινοξέα σημαίνουν ομοιότητα, τα κενά σημαίνουν αλλαγή αμινοξέων και το σύμβολο : σημαίνει αλλαγή αμινοξέων με παρόμοιες ιδιότητες.

Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλες τις περιοχές του γενώματος του ιικού στελέχους MB1, με αποτέλεσμα να ανιχνευθούν οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές μεταλλάξεις που παρουσιάζονται στον **πίνακα 9**.

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής Rasmol V.2.7.1.1, απεικονίστηκαν οι θέσεις των αμινοξικών μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν, στις καψιδικές περιοχές VP1 και VP3, με την χρήση της κατατεθειμένης στην Protein Data Bank (pdb) δομής 1VBE.pdb (πολιοιός αγρίου τύπου 3) (**Εικόνα 35**). Με λευκό χωροπληρωτικό μοντέλο απεικονίζονται τα αμινοξέα που αλλάζουν στην VP1 περιοχή, ενώ με κίτρινο χωροπληρωτικό μοντέλο απεικονίζεται το μοναδικό αμινοξύ που αλλάζει στην περιοχή VP3. Στην VP1 περιοχή, οι αμινοξικές αλλαγές Val 136 Leu, Ile 258 Val, Asp 129 Glu και Met 130 Arg, εντοπίζονται στο εξωτερικό του καψιδίου, ενώ η αμινοξική μετάλλαξη Thr 6 Ile, εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου, στο αμινοτελικό άκρο της VP1. Τέλος, η αμινοξική αλλαγή Met 149 Trp της VP3, εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου.



**Εικόνα 35:** Απεικόνιση RasMol των αμινοξικών αλλαγών της VP1 (μπλε χρώμα) και της VP3 (πράσινο χρώμα). Η VP2 απεικονίζεται με κυανό. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαριστάνονται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε λευκό χρώμα για την VP1 και σε κίτρινο για την VP3.

### 3.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ MB1 ΑΠΟ ΤΗΝ VP1 ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SABIN 3

Το ποσοστό απόκλισης ενός ιϊκού εμβολιακού στελέχους, το οποίο έχει απομονωθεί από άτομα τα οποία, τους έχει χορηγηθεί το εμβόλιο OPV, μπορεί να υπολογιστεί διαιρώντας τον αριθμό των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην VP1 περιοχή του δείγματος, με το μήκος της VP1 του πρότυπου εμβολιακού στελέχους στο οποίο αντιστοιχεί το δείγμα. Στην περίπτωση του δείγματος MB1, το ποσοστό απόκλισης της VP1 περιοχής του από την VP1 του πρότυπου στελέχους Sabin 3 είναι 0.7% και χαρακτηρίζεται ως Sabin-like.

Το ποσοστό απόκλισης αποτελεί ένα είδος «μοριακού ρολογιού», για τον υπολογισμό της χρονικής διάρκειας της κυκλοφορίας των πολιοϊών. Με την συγκεκριμένη διαδικασία είναι δυνατόν να χαρακτηριστεί ένα ιϊκό εμβολιακό στέλεχος ως **1) Sabin-like** ή ως **2) εμβολιακής**

προέλευσης κυκλοφορών πολιοϊός (cVDPV). Στην πρώτη περίπτωση, η νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του στελέχους αυτού, διαφέρει 0% έως 0.99% από την αλληλουχία της VP1 του αντίστοιχου πρότυπου εμβολιακού στελέχους OPV (S1, S2, S3). Στην δεύτερη περίπτωση, η νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του στελέχους αυτού, διαφέρει από 1% έως 15% από την αλληλουχία της VP1 του αντίστοιχου πρότυπου εμβολιακού στελέχους OPV.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολιοϊοί χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό εξέλιξης του γενώματός τους, μέσω των ανασυνδρασμών και μεταλλάξεων που λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένες περιοχές του ιϊκού γονιδιώματος. Οι ανασυνδρασμοί συμβαίνουν με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς, μεταξύ των εμβολιακών στελεχών Sabin, μετά την χορήγηση του τριδύναμου εμβολίου OPV. Έχουν απομονωθεί αρκετά ανασυνδρασμένα στελέχη πολιοϊών από υγιείς εμβολιασμένους, από ασθενείς με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP), και από άτομα του κοντινού περιβάλλοντος αυτών. Παράλληλα, ανασυνδρασμένα στελέχη πολιοϊών έχουν απομονωθεί και από περιβαλλοντικά δείγματα, όπως λύματα σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας και του εξωτερικού. Ο έλεγχος του περιβάλλοντος για πολιοϊούς, και δη ανασυνδρασμένους, αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη της έκτασης και της διάρκειας της κυκλοφορίας των πολιοϊών μέσα σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, και καθιστά συγχρόνως δυνατή την μοριακή ανάλυση αυτών των στελεχών. Παράλληλα, η μελέτη των πολιοϊών απομονωμένων από κλινικές περιπτώσεις VAPP, είναι πολύ σημαντική, καθώς επιτρέπει την διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον εμβολιασμό με το εμβόλιο OPV, καθιστώντας δυνατή την παραγωγή πιο ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν δύο δείγματα, εκ των οποίων το ένα ήταν περιβαλλοντικό (ENP7) και το άλλο κλινικό, από περίπτωση εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (MB1). Σκοπός της εργασίας ήταν, η ανίχνευση ανασυνδρασμών και μεταλλάξεων, καθώς και ο καθορισμός της επίδρασης αυτών στην αρμοστικότητα των ιϊκών στελεχών, βοηθώντας στην μελέτη της πορείας της εξέλιξης των πολιοϊών. Έχει αποδειχθεί, ότι οι ανασυνδρασμοί στο γένωμα των πολιοϊών, εμφανίζονται κυρίως στις κωδικές περιοχές 2C (κυρίως S3/Sx) και 3D (κυρίως S2/Sx), ενώ στις κωδικές περιοχές των καψιδιακών πρωτεϊνών οι ανασυνδρασμοί είναι πιο σπάνιοι. Έτσι, αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος του RFLP στις κωδικές περιοχές 2C και 3D, για την ανίχνευση ενός διαφορετικού προτύπου πέψης από το αναμενόμενο, υποδηλώνοντας πιθανό ανασυνδρασμό. Η διαδικασία του RFLP, αποτελεί μέθοδο καθορισμού του γενοτύπου διαφόρων ιϊκών στελεχών και παρέχει πιο ακριβή και γρήγορα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Εντούτοις, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, καθώς τυχόν μεταλλάξεις σε κάποιο από τα σημεία πέψης, μπορούν να

οδηγήσουν σε διαφορετικό πρότυπο πέψης από το αναμενόμενο ή η ύπαρξη μιγμάτων πολιοϊών μπορεί να οδηγήσει σε άθροισμα μπαντών μεγαλύτερο από το αναμενόμενο (Georgoroulou and Markoulatos, 2000).

Τα αποτελέσματα του RFLP, έδειξαν ότι μόνο το δείγμα MB1 εμφάνισε διαφορετικό πρότυπο πέψης από το αναμενόμενο, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πιθανού ανασυνδυασμού. Στη συνέχεια, το δείγμα MB1 αλληλουχίστηκε από την βάση 1 μέχρι την βάση 7432, αφού πρώτα ενισχύθηκε το πλήρες γένωμα του ιϊκού στελέχους με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινήτες και τις συνθήκες που παρουσιάζονται στους **πίνακες 4, 5**. Η αλληλούχιση της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του MB1, αποκάλυψε τον πιθανό ανασυνδυασμό καθώς και την ακριβή θέση του, με την βοήθεια των προγραμμάτων βιοπληροφορικής Clustalw και Gene Runner V. 3.05. Η γραφική αναπαράσταση του σημείου του ανασυνδυασμού, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος ανάλυσης Simplot.

Επιπλέον, από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του MB1, κατέστη δυνατή και η ανίχνευση μεταλλάξεων στις περιοχές 5'NTR, VP3 και VP1, καθώς και στις λειτουργικές πρωτεΐνες 2A, 3A, 3C και 3D του γενώματος του ιϊκού στελέχους. Από το σύνολο των 17 μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν οι 9 ήταν συνώνυμες (η νουκλεοτιδική αντικατάσταση δεν οδηγούσε σε αλλαγή αμινοξέος), και οι 8 ήταν μη συνώνυμες (η αλλαγή νουκλεοτιδίου οδηγούσε σε αλλαγή αμινοξέος). Για τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις περιοχές VP1 και VP3, απεικονίστηκαν οι ακριβείς τους θέσεις πάνω στο καψίδιο με την χρήση του προγράμματος Rasmol V.2.7.1.1.

Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό απόκλισης της VP1 αλληλουχίας του MB1, από την πρότυπη αλληλουχία της VP1 του Sabin 3. Βρέθηκε ότι είναι 0.77% και γι' αυτό χαρακτηρίστηκε ως Sabin – like, γεγονός που δείχνει ότι η χρονική διάρκεια κυκλοφορίας του ιϊκού στελέχους είναι πολύ μικρή. Αν το ποσοστό απόκλισης ήταν πάνω από 1%, το MB1 ιϊκό στέλεχος θα χαρακτηριζόταν ως cVDPV στέλεχος. Έχει βρεθεί, ότι τα cVDPV στέλεχη έχουν αυξημένη νευρομολυσματικότητα ισάξια των πολιοϊών αγρίου τύπου και ότι οι αντιγονικές τους ιδιότητες μοιάζουν με εκείνες των πολιοϊών αγρίου τύπου παρά με εκείνες των Sabin στελεχών. Ο κίνδυνος της εμφάνισης επιδημιών από cVDPV, έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, καθώς η κυκλοφορία των πολιοϊών αγρίου τύπου έχει σταματήσει στις περισσότερες χώρες του κόσμου. Στην περίπτωση του MB1, το ιϊκό στέλεχος προσομοιάζει τις αντιγονικές ιδιότητες του πρότυπου στελέχους Sabin 3.

#### 4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ

Ο ανασυνδυασμός αποτελεί έναν πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης του γονιδιώματος των πολιοϊών, από τις μεταλλάξεις. Ο ανασυνδυασμός γίνεται περισσότερο εμφανής συνήθως σε εμβολιακά στελέχη, εξαιτίας της φύσης του τριδύναμου εμβολίου OPV. Ο εμβολιασμός με το OPV, δημιουργεί ιδανικές συνθήκες για ανασυνδυασμό, μολύνοντας το έντερο των εμβολιασμένων ξενιστών, με τους τρεις διαφορετικούς γενότυπους των πολιοϊών. Αυτή η μόλυνση και ο επερχόμενος ανασυνδυασμός, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις σε θέσεις που αποτελούν ισχυρούς καθοριστές της εξασθένησης και της νευρομολυσματικότητας, προκαλεί την κλινική κατάσταση VAPP.

Ο ανασυνδυασμός πολλές φορές οδηγεί, σε επιλεκτικό πλεονέκτημα, με αποτέλεσμα να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιϊκού στελέχους, με αύξηση της αντιγραφής του, παρεμποδίζοντας την εγκαθίδρυση ορισμένων καταστροφικών μεταλλάξεων, που δημιουργήθηκαν από λάθη της RNA- πολυμεράσης. Επίσης είναι δυνατόν, ο ανασυνδυασμός να οδηγεί στον περιορισμό ορισμένων μεταλλάξεων εξασθένησης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η νευρομολυσματικότητα του ιού. Στο δείγμα MB1, μετά την αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος του ιϊκού στελέχους (από την βάση 1 έως την βάση 7432), ανιχνεύθηκε ο ανασυνδυασμός τύπου S3/S1 στην 2C περιοχή, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4880-4887. Ο συγκεκριμένος ανασυνδυασμός S3/Sx, είναι συχνός στην περιοχή 2C και ίσως παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στην αντιγραφή του ιού. Στην 5'NTR και VP1 δεν βρέθηκαν ανασυνδυασμοί, επιβεβαιώνοντας τη σπανιότητα του φαινομένου (Brown et al., 2003, Wimmer et al., 1993).

Ο ανασυνδυασμός S3/S1 στην 2C, είναι πιθανό να συνετέλεσε στην αύξηση της αρμοστικότητας του στελέχους MB1, μέσω της μετάλλαξης που δημιουργήθηκε στην 3D περιοχή, η οποία αποτελεί την λειτουργική RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση των πολιοϊών, καταλύοντας την σύνθεση των RNA κλώνων θετικής και αρνητικής πολικότητας.

#### 4.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Οι μεταλλάξεις, οι οποίες αποτελούν τον δεύτερο μηχανισμό εξέλιξης των πολιοϊών, μπορούν να αυξάνουν ή να μειώνουν την αρμοστικότητα αυτών των ιών, για μία συγκεκριμένη οικολογική θέση ή να την αφήνουν ανεπηρέαστη. Οι περιοχές στις οποίες συμβαίνουν κυρίως μεταλλάξεις είναι η 5'NTR και οι VP1, VP2, VP3, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του ιϊκού καψιδίου, και σχηματίζουν τις αντιγονικές θέσεις του ιού αντίστοιχα.

Από τις 17 συνολικά μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο κλινικό στέλεχος MB1, οι 9 ήταν συνώνυμες και οι 8 ήταν μη συνώνυμες (από τις οποίες οι 3 ήταν ουδέτερες). Φαίνεται να

προτιμώνται οι συνώνυμες μεταλλάξεις, οι οποίες αλλάζουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία χωρίς όμως, να επηρεάζουν την αρμοστικότητα του ιϊκού στελέχους. Η νουκλεοτιδική μετάλλαξη T 472 C, που εντοπίστηκε στην 5'NTR περιοχή, αποτελεί μεταστροφή του εμβολιακού στελέχους Sabin 3, προς τον άγριο τύπο P3/Leon/USA/1937 (Blomqvist et al., 2003). Αυτή η μετάλλαξη είναι συνήθης σε ιϊκά στελέχη, τα οποία έχουν απομονωθεί από καταστάσεις VAPP. Η μετάλλαξη T 472 C, αποκαθιστά την δευτεροταγή διαμόρφωση αγρίου τύπου του δομικού στοιχείου V του IRES, με αποτέλεσμα την ισχυρότερη πρόσδεση της πρωτεΐνης PTB, η οποία οδηγεί σε υψηλότερους ρυθμούς ιϊκής αντιγραφής (Guest et al., 2004).

Οι μεταλλάξεις Asp 129 Glu, Met 130 Arg, Val 136 Leu και Ile 258 Val (VP1 περιοχή), εντοπίζονται στο εξωτερικό του καψιδίου, και οι μεταλλάξεις Thr 6 Ile (VP1 περιοχή), και Met 149 Arg (VP3 περιοχή), εντοπίζονται στο εσωτερικό του (**Εικόνα 35**). Οι μεταλλάξεις Val 136 Leu και Ile 258 Val βρίσκονται στις αντιγονικές θέσεις του ιού, και ίσως παρέχουν στον ιό το πλεονέκτημα να διαφεύγει της αναγνώρισης από τα αντισώματα του οργανισμού-ξενιστή, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζεται πιο αποτελεσματικά. 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. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις είναι ουδέτερες, δηλαδή οι αλλαγές των νουκλεοτιδίων οδήγησαν σε αλλαγή αμινοξέων, τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες, με αποτέλεσμα να μην αλλάζει η λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Οι μεταλλάξεις Asp 129 Glu και Met 130 Arg, βρίσκονται κοντά στην βάση της αύλακας, με αποτέλεσμα να τροποποιούν, πιθανά, την δομή της αύλακας και κατά συνέπεια την συγγένεια πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μειώνεται ο τίτλος του ιϊκού στελέχους, καθώς δυσκολεύεται η είσοδος στο κύτταρο ώστε να πολλαπλασιαστεί. Είναι πολύ πιο πιθανό η μετάλλαξη Met 130 Arg να δημιουργεί αυτό το αποτέλεσμα, διότι η μετάλλαξη Asp 129 Glu είναι ουδέτερη.

Η νουκλεοτιδική μετάλλαξη C 2493 T, η οποία οδήγησε στην αμινοξική αλλαγή Thr 6 Ile, συνδέεται με αύξηση της νευρομολυσματικότητας του εμβολιακού στελέχους Sabin 3 και συγκεκριμένα ενδυναμώνει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της VP1 και των κυτταρικών μεμβρανών, κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Fricks and Hogle, 1990).

Η μετάλλαξη Met 149 Arg, βρίσκεται κοντά στο αμινοτελικό άκρο της VP3, το οποίο είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο της VP1 (και των πρωτεϊνών VP3 και VP4),

στο εσωτερικό του καψιδίου και αυτή η αλληλεπίδραση παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του καψιδίου.

Τέλος, η μετάλλαξη Thr 293 Asn στην 3D περιοχή, πιθανώς αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού, καθώς έχει αποδειχθεί ότι μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή 3D, αυξάνουν την πιστότητα της αντιγραφής (Chumakov and Ehrenfeld, 2008).

### 4.3 ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η χρήση των μοριακών μεθόδων για την παρακολούθηση των αλλαγών μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των πολιοϊών, μέσω των ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων, ιδιαίτερα των μεταλλάξεων που εμφανίζονται στις καψιδιακές πρωτεΐνες του γονιδιώματος, μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση του ρόλου τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η παρασκευή πιο ασφαλών εμβολίων, που θα παρέχουν ωστόσο αυξημένη ανοσοποίηση.

Στην Ελλάδα, ο μαζικός εμβολιασμός, αρχικά με το εμβόλιο του Salk και στη συνέχεια του Sabin, άρχισε να εφαρμόζεται στις αρχές τις δεκαετίας του '60. Η εμβολιαστική κάλυψη του παιδικού πληθυσμού σε πανελλαδική κλίμακα υπερβαίνει το 90%, αλλά ακόμη και σήμερα η πλήρης εμβολιαστική κάλυψη των βρεφών είναι μόλις 82% (Σταμπολίδου Μ., 2004). Η μείωση των κρουσμάτων πολιομυελίτιδας στη χώρα μας, είναι ανάλογη εκείνης των άλλων ευρωπαϊκών χωρών και έφτανε να είναι σχεδόν μηδενική από τα μέσα της δεκαετίας του '80. Παρόλα αυτά, ο κίνδυνος για την εμφάνιση επιδημικών εξάρσεων εξακολουθεί να υφίσταται. Για το λόγο αυτό, στη χώρα μας, τα σχήματα εμβολιασμού που είναι περισσότερο αποδεκτά είναι το μικτό eIPV/OPV. Η επανεμφάνιση της νόσου υποδεικνύει την αναγκαιότητα της υψηλής εμβολιαστικής κάλυψης, για την επίτευξη συλλογικής ανοσίας και προστατευτικού ανοσιακού τείχους.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agirre A., Barco A., Carrasco L., and Nieva J.L. (2002) Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.*, 277:40434–40441.
- Agol V.I. (2001). Genome instability in picornaviruses. *Molecular biology*, Vol.36, No. 2, 216-222.
- Agol V.I., Belov G.A., Bienz K., Egger D., Kolesnikova M.S., Romanova L.I., Sladkova L.V., and Tolskaya E.A. (2000) Competing death programs in poliovirusinfected cells:commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J. Virol.*, 74:5534–5541.
- Alssadi S., Hassard S., and Stanway G. (1989) Sequences in the 5' non-coding region of human rhinovirus 14 RNA that affect in vitro translation. *J. Gen. Virol.*, 70:2799-2804.
- Andino R., Rieckhof G.E., Trono D., and Baltimore D. (1990) Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.*, 64:607-612.
- Arita M., Koike S, Aoki J., Horie H., Nomoto A. (1998). Interaction of Poliovirus with Its Purified Receptor And Conformational Alteration in the Virion. *J. Virol.* 72(5): p.3578-3586.
- Auvinen P., Stanway G., and Hyypia T. (1989) Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Arch. Virol.*, 104:175-186.
- 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., Morasco B.J., and Flanagan J.B. (1999) Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 73:10104–10112.
- Belnap D.M., McDermott B.M., Filman D.J., Cheng N.Q., Trus B.L., Zuccola H.J., Racaniello V.R., Hogle J.M., and Steven A.C. (2000) Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:73-78.
- Bienz K., Egger D., and Pfister T. (1994) Characteristics of the poliovirus replication complex. *Arch. Virol. Suppl.*, 9:147–157.

- 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.
- Blomquist S., Bruu A.L., Stenvik M., and Hovi T. (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.*, 84:573–580.
- Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A.C., Dautry F., and 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.*, 77:3353-3359.
- Brown B.A., Maher K., Oberste M.S., and Pallansch M.A. (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the non-capsid coding region. *J. Virol.*, 77:8973–8984.
- Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R. (2001) Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 82:79–91.
- Casas I., Powell L., Klapper P.E., and Cleator G.M. (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods.*, 53:25–36.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2002) Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus-Madagascar. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51:662.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2004) Progress toward global eradication of poliomyelitis, January 2003-April 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51:532-535.
- Chapman N.M., Tracy S., Gauntt C.J., and Fortmueller U. (1990) Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 28:843-850.
- Cherkasova E., Laassri M., and Chizhikov V. (2003) Microarray analysis of evolution of RNA viruses:evidence of circulation of virulent highly divergent vaccinederived polioviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 100:9398–9403.
- Chetverin A.B. (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett.*, 22:460:1-5.
- Choe S.S., Kirkegaard Karla. (2004). Intracellular Topology and Epitope Shielding of Poliovirus 3A Protein. *J. Virol.* 78(11): 5973-5982.

- Chumakov K., Ehrenfeld E.** (2008). New generation of inactivated poliovirus vaccines for universal immunization after eradication of poliomyelitis. *Clin Infect Dis* 15;47(12):1587-1592
- Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., and Brown F.** (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327:482-486.
- Cooper P.D.** (1968) A genetic map of poliovirus temperature - sensitive mutants. *Virology*, 35:584–596.
- Cooper P.D., Geissler E., and Tannock G.A.** (1975) Attempts to extend the genetic map of poliovirus temperaturesensitive mutants. *J. Gen. Virol.*, 29:109–120.
- 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.
- Dahourou G., Guillot S., Le Gall O., and Crainic R.** (2002) Genetic recombination on wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.*, 38:3103–3110.
- De Jesus N.** (2007) Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology Journal* 4:70
- Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., van Depol S., Steinhauer D., DePolo N., and Holland J.** (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations:biological relevance-a review. *Gene*, 40:1-8.
- Dowdle W.R., Gourville E.D. , Kew O.M., Pallansch M.A., Wood D.J.** (2003) Polio eradication :the OPV paradox. *Rev. Med. Virol.*13:277-291.
- Duggal R., Cuconati A., Gromeier M., and Wimmer E.** (1997) Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13786–13791.
- Duggal R., and Wimmer E.** (1999) Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology*, 258:30–41.
- Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E. and Bienz K.** (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production and viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 74:6570-6580.
- Egger D., and Bienz K.** (2002) Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J. Virol.*, 76:10960–10971.

-Evans D.M.A., Dunn G., Minor P.D., Schild G.C., Cann A.J., Stanway G., Almond J.W., Carrey K., and Maizel J.V. (1985) Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature*, 314:548-550.

-Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. (2005) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.

-Ferguson M., Evans D.M., Magrath D.I., Minor P.D., Almond J.W., and Schild G.C. (1985) Induction by synthetic peptides of broadly reactive, type-specific neutralizing antibody to poliovirus type 3. *Virology*, 143:505-515.

-Figlerowicz M, Magdalena Alekska, 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.

-Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J., Minor P.D., and Hogle J.M. (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.*, 8:1567-1579.

-Fogg M. H., N. L. Teterina, and E. Ehrenfeld. (2003) Membrane requirements for uridylylation of the poliovirus VPg protein and viral RNA synthesis in vitro. *J. Virol.* 77(21): 11408-11416.

-Fong T., Lipp E. (2005) Enteric viruses of Humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection and potential water quality assessment tools

-Freistadt M.S., Racaniello V.R. (1991) Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus. *J. Virol.* 65: 3873-6.

-Fricks, C. E., and Hogle, J. M. (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.

-Friedrich F. (1996) Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.

-Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y., Kew O.M., and Agol V.I. (2000) Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.*, 74:7381-7390.

- Georgescu M.M., Delpeyroux F., and Crainic R.** (1995) Tripartite organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.*, 76:2343–2348.
- Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., and Vamvakopoulos N.C.** (2000) Improved genotyping vaccine and wild-type length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.*, 38:4337–4342.
- Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., and Vamvakopoulos N.C.** (2001) High sequence divergence in the 50 non-coding region of reference coxsackie B and ECHO viral strains and clinical isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol. Cell. Probes*, 15:317–327.
- Gmyl A.P., Belousov E.V., Maslova S.V., Khitrina E.V., Chetverin A.B., and Agol V.I.** (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.*, 73:8958–8965.
- Goodfellow I.G., Chaudhry Y., Richardson A., Meredith J., Almond J.W., Barclay W., and Evans D.J.** (2000a) Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.*, 74:4590-4600.
- Goodfellow I.G., Powell R.M., Ward T., Spiller O.B., Almond J.W., and Evans D.J.** (2000b) Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59. *J. Gen. Virol.*, 81:1393-1401.
- Goodfellow I.G., Sioofy A.B., Powell R.M., and Evans D.J.** (2001) Echoviruses bind heparan sulfate at the cell surface *J. Virol.*, 75:4918-492.
- Gromeier M., Alexander L., Wimmer E.** (1996). Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(6): 2370-5.
- Guillot S., Caro V., Cuervo N., Korotkova E., Combiescu M., Persu A., Aubert-Combiescu A., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2000) Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.*, 74:8434–8443.
- He Y.N., Chipman P.R., Howitt, J., Bator C.M., Whitt M.A., Baker T.S., Kuhn R.J., Anderson C.W., Freimuth P., and Rossmann M.G.** (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor *Nat. Struct. Biol.*, 8:874-878.
- He Y.N., Mueller S., Chipman P.R., Bator C.M., Peng X.Z., Bowman V.D., Mukhopadhyay S., Wimmer E., Kuhn R. J., and Rossmann M.G.** (2003) Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J. Virol.*, 77:4827-4835.

- Hellen C.U., Witherell G.W., Schmid M., Shin S.H., Pestova T.V., Gil A., and Wimmer E.** (1993) A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7642–7646.
- Herold J., and Andino R.** (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell*, 7:581-591.
- Hirst G.K.** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27:303–309.
- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229:1358-1365.
- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1987) The structure of poliovirus. *Sci. Am.*, 256:42-49.
- Hovi T.** (1986) Immunization against poliomyelitis: still problems to solve in both developed and developing countries. *Ann. Clin. Res.* 18(3):119-20.
- Hyypia T., Auvinen P., and Maaronen M.** (1989) Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 70:3261-3268.
- Hyypia T., and Stanway G.** (1993) Biology of coxsackie A viruses. *Adv. Virus Res.*, 42:343-373.
- Kew O.M., and Nottay B.K.** (1984) "Modern Approaches to Vaccines". *Cold Spring Harbor Press, New York*.
- Kew O.M., and Pallansch M.A.** (2002) "Molecular biology of picornaviruses" *ASM Press, Washington, DC*.
- 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., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47:433–443.

- Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., and Wimmer E.** (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291:547-553.
- Kottaridi C., Bolanaki E. and Markoulatos P.** (2004) Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study. *Mol Cell Probes*. 18:263-9.
- Krausslich H.G., Nicklin M.J., Toyoda H., Etchison D., and Wimmer E.** (1987) Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.*, 61:2711-2718.
- Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, Cox S, Buontempo P, Skelton A, Demartino J, Rozhon E, Schwartz J, Girijavallabhan V, O'Connell J, Arnold E.** (1997) Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent sch48973-comparison of the structural and biological properties of the three poliovirus serotypes. *Structure* 5:961-978.
- Lyle J. M., A. Clewell, K. Richmond, O. C. Richards, D. A. Hope, S. C. Schultz, and K. Kirkegaard.** (2002) Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 277(18): 16324-16331.
- Liu H.M., Zheng D.P., Zhang L.B., Oberste M.S., Kew O.M., and Pallansch M.A.** (2003) Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J. Virol.*, 77:10994-11005.
- Li X., Lu H.H., Mueller S., Wimmer E.** (2001) The C-terminal residues of poliovirus proteinase 2A<sub>pro</sub> are critical for viral RNA replication but not for *cis-or trans-proteolytic cleavage*. *J.G.Virol* 82: 397-408.
- Lloyd R.E., Grubman M.J., and Ehrenfeld E.** (1988) Relationship of p220 cleavage during picornavirus infection to 2A proteinase sequencing. *J. Virol.*, 62:4216-4223.
- 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
- Macadam A.J., Arnold C., Howlett J., John A., Marsden S., Taffs F., Reeve P., Hamada N., Wareham K., and Almond J.** (1989) Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology*, 172:408-414.

- Magnius L.O., Saleh L.H., Vikerfors T., and Norder H.** (1988) A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J. Virol. Methods*, 20:73–82.
- Melnick J.L.** (1996) "Fields Virology". 3<sup>rd</sup> Ed., PA:Lippincott/Raven, Philadelphia.
- Melnick J.L.** (1997). "Viral infections in humans: epidemiology and control". *Plenum Medical Book, New York*.
- Mendelsohn C.L., Wimmer E., and Racaniello V.R.** (1989) Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56:855–865.
- Minor P.D., Schild G.C., Bootman J., Evans D.M., Ferguson M., Reeve P., Spitz M., Stanway G., Cann A.J., Hauptmann R., Clarke L.D., Mountford R.C., and Almond J.W.** (1983) Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. *Nature*, 301:674-679.
- Minor P.D., Pipkin P.A., Hockley D., Schild G.C., and Almond J.W.** (1984) Monoclonal antibodies which block cellular receptors of poliovirus. *Virus Res.*, 1:203-212.
- Minor P.D., John A., Ferguson M., and Icenogle J.P.** (1986b) Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccinee. *J. Gen. Virol.*, 67:693-706.
- Morasco B.J., Sharma N., Parilla J., and Flanagan J.B.** (2003) Poliovirus cre (2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 77:5136-5144.
- Mueller S. Wimmer E.** (2003) Recruitment of Nectin -3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to avb3 integrin- containing membrane microdomains. *J. Biol.* 278(33):31251-31260.
- Mueller S., Wimeer E., Jeronimo C.** (2005) Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus research* 111 175-193.
- 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., and van Loon A.M.** (1997) Enterovirus infections of the central nervous system. *Intervirology*, 40:153-166.



- Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry, T., and Weissbrich, B. (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:202–227.
- Mulders M.N., Reimerink J.H.J., Stenvik M., Alaeddinoglu I., Avoort H. G.A.M., Hovi T., Koopmans M.P.G., (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.* 80:907-916
- Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J. (2001) Poly (rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA*, 7:1126-1141.
- Norder H., Bjerregaard L., and Magnius L.O. (2001) Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing, *J. Med. Virol.*, 63:35-44.
- Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch. (1999) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941-1948.
- 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.
- Ochs K., A. Zeller, L. Saleh, G. Bassili, Y. Song, A. Sonntag, and Michael Niepmann. (2003) Impaired Binding of Standard Initiation Factors Mediates Poliovirus Translation Attenuation. *J. Virol.* 77(1): 115-122
- Palmenberg A.C. (1987) "Positive strand RNA viruses. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New Series" vol. 54, Alan R. Liss, New York.
- Palmenberg A.C. (1989) "Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection". American Society for Microbiology, Washington, D.C. intermediate structures. *J. Virol.*, 44:900–906.
- Paul A.V., van Boom J.H., Filipov D. and Wimmer E. (1998) Protein primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393:280-284.
- Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. (1999) Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.

- Pilipenko E.V., Blinov V.M., Romanova L.I., Sinyakov A.N., Maslova S.V., and Agol V.I. (1989) Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology*, 168:201-209.
- Pollard S.R., Dunn G., Cammack N., Minor P.D., and Almond J.W. (1989) Nucleotide sequence of a neurovirulent variant of the type 2 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.*, 63:4949-4951.
- 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.
- Racaniello V.R., and Baltimore D. (1981) Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78:4887-4891.
- Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U., and Koch G. (1989) Poliovirus-associated protein kinase: destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn<sup>2+</sup>. *J. Virol.*, 63:3954-3960.
- Richards O., Spagnolo J., Lyle J., Vleck S., Kuchta R., Kirkegaard K. (2006) Intramolecular and intermolecular uridylation by poliovirus RNA-dependent polymerase. *Journal of Virology* 7405-7415.
- Rieder E., Paul A., Kim D., Van Boom J., Wimmer E. (2000) Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *Journal of Virology*, 10371-10380.
- Romanova L.I., Tolskaya E.A., Kolesnikova M.S., and Agol V.I. (1980) Biochemical evidence for intertypic genetic recombination of polioviruses. *FEBS Lett.*, 118:109-112.
- Romanova L.I., Blinov V.M., Tolskaya E.A., Viktorova E.G., Kolesnikova M.S., Guseva E.A., and 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.
- Romero J.R. (1999) Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123:1161-1169.
- Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., Johnson J.E., Kamer G., Luo M., and Mosser A.G. (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317:145-153.

- Rossmann M.G., and Palmenberg A.C.** (1988) Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology*, 164:373-382.
- Rossmann M.G.** (1989) The canyon hypothesis:Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* 264:14587–14590.
- Rueckert R.R.** (1985) "Virology". *BN Fields, Raven press, New York, USA*
- Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., and Spyrou N.** (2000) Isolation of Polioviruses and Other Enteroviruses in South Greece Between 1994 and 1998. *J. Clin. Lab. Anal.* 14:157-163.
- Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., and Stanway G.** (2001) Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Lab. Anal.* 15:87-95.
- Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 71:2483-2501.
- Strauss D.M., Glustrom L.W., Wuttke D.S.** (2003) Towards an Understanding of the Poliovirus Replication Complex : The Solution Structure of the Soluble Domain of the Poliovirus 3A Protein. *J.Mol.Biol.*330: 225-234.
- Torgersen H., Skern T., and Blaas D.** (1989) Typing of human rhinoviruses based on sequence variations in the 5' non-coding region. *J. Gen. Virol.*, 70:3111-3116.
- Toyoda H., Nicklin M.J.M., Murray M.T., Anderson C.W., Dunn J.J, Suder F.W., and Wimmer E.** (1986) A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*, 45:761-770.
- 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.
- Van Kuppeveld F.J., Galama J.M., Zoll J., van den Hurk P.J, and Melchers W.J.** (1996) Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J. Virol.*, 70:3876-3886.
- Van Kuppeveld F.J., Hoenderop J.G., Smeets R.L., Willems P.H., Dijkman H.B., Galama J.M., and Melchers W.J.** (1997) Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.*, 16:3519-3532.

- Van Kuppeveld F.J., Melchers W.J., Willems P.H., and Gadella T.W.J. (2002) Homomultimerization of the coxsackievirus 2B protein in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J. Virol.*, 76:9446–9456.
- Wagner B., Earn D. (2007) Circulating Vaccine derived polio viruses and their impact on global polio eradication. *Bulletin of mathematical biology* 70:253-280.
- Wang X., and Bergelson J.M. (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.*, 3:2559-2562.
- Weidman M.K., Yalamanchili P., Tsai B.N.W. and Dasgupta A. (2001) Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology*, 291:260–271.
- Weidman M.K., Sharma R., Raychaudhuri S., Kundu P., Tsai W., and Dasgupta A. (2003) The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.*, 95:75-85.
- Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
- Ypma-Wong M.F., Dewalt P.G., Johnson V.H., Lamb J.G., and Semler B.L. (1988a) Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*, 166:265-270.
- Ypma-Wong M.F., Filman D.J., Hogle J.M., and Semler B.L. (1988b) Structural domains of the poliovirus polyprotein are major determinants for proteolytic cleavage at Gln-Gly pairs. *J. Biol. Chem.*, 263:17846-17856.