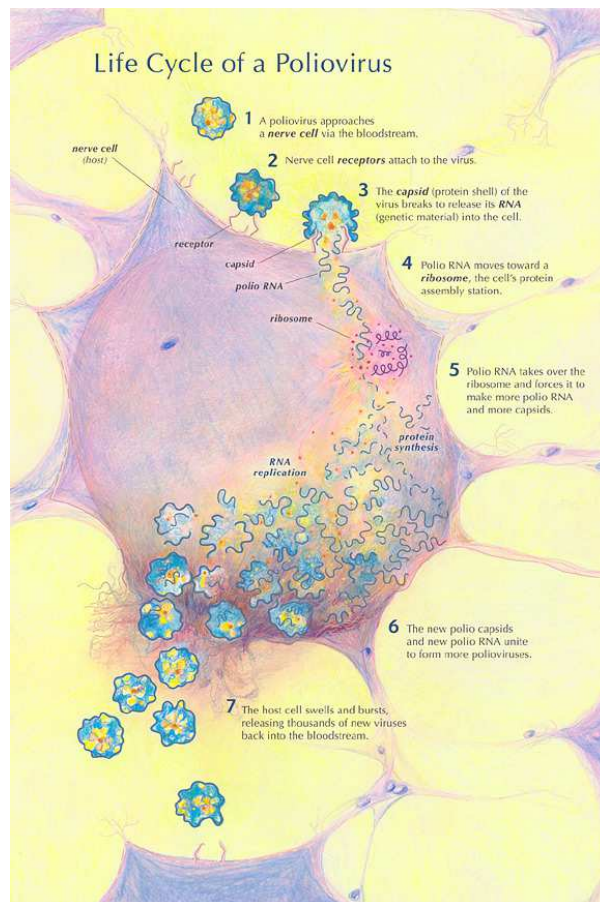


ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΙΣ VP2 , VP3 ΚΑΙ VP4
ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ



ΑΧΙΛΛΕΩΣ ΧΑΡΙΣ

Επιβλέπων καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ : ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ –
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από τον Οκτώβριο 2009 ως και το Μάιο του 2010.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ενθάρρυνση και την βοήθεια σε όποιες δυσκολίες συνάντησα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Δ. Μόσιαλο και τον Επίκουρο Καθηγητή Δ. Καρπούζα που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή μου επιτροπή.

Ακόμη ευχαριστώ την Δρ. Βίκυ Πλιάκα για την καθοδήγηση και την βοήθεια κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τέλος νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την Ειρήνη Ρούτερ και τον Δημήτρη Τσακογιάννη για την φιλία τους και την βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 11 κλινικά δείγματα Sabin που προέρχονταν από ασθενείς που είχαν εμβολιαστεί με το OPV. Συγκεκριμένα τα δείγματα μελετήθηκαν για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στις VP2, VP3 και VP4 γενωμικές περιοχές του ιικού γενώματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε βασισμένη στην εξής πειραματική διαδικασία: εκχύλιση του ιικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA και μετατροπή σε cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της κάθε περιοχής και αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των αλληλουχιών των δειγμάτων με ειδικά προγράμματα βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και τυχόν αμινοξικών αλλαγών. Τέλος, μετά τον εντοπισμό των αμινοξικών αλλαγών, επιτεύχθηκε απεικόνιση των θέσεων των αμινοξικών αλλαγών των VP2, VP3 και VP4, με τη χρήση κατατεθειμένων τρισδιάστατων δομών προτύπων στελεχών ώστε να εντοπιστεί η θέση τους στο ιικό καψίδιο και να προβλεφθεί η επίδρασή τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων ήταν συνώνυμες γεγονός το οποίο συμφωνεί με το γενικό πρότυπο των μεταλλάξεων των πολιοϊών. Η πλειοψηφία των αμινοξικών αλλαγών (Ala59Glu, Lys60Thr, Asp80Asn, Asp56Glu Ile52Val, His97Tyr, Ile231Leu, Ser232Gln, Leu215Met και Ser209Asn) εντοπίζεται στο εξωτερικό του καψιδίου (αντιγονικές θέσεις και θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα) λόγω της υψηλής αντιγονικής πίεσης ενώ μόνο μια (Val4Ile) εντοπίζεται στο εσωτερικό του .

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**
- 2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ**
 - 2.1 Ταξινόμηση
 - 2.2 Δομή και αντιγονικότητα των ικών σωματιδίων
 - 2.3 Οργάνωση του ικού γενώματος
- 3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ**
 - 3.1 Υποδοχέας και είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή
 - 3.2 Μετάφραση του ικού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία
 - 3.3 Αντιγραφή
 - 3.4 Καμψιδίωση και απελευθέρωση νέων ικών σωματιδίων
- 4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ -ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ**
- 5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**
- 6. . ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ**
 - IPV (inactivated poliovirus vaccine)
 - OPV (oral poliovirus vaccine)
 - OPV ΚΑΙ VAPP (vaccine-associated paralytic poliomyelitis)
- 7. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ**
 - 7.1 Μεταλλάξεις
 - 7.2 Ανασυνδυασμός

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**
- 2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ**
- 3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA**
- 4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)**
- 5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**
- 6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR**
- 7. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR**
- 8. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR**

9. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR**
- 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ**
- 3. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ RASMOL**
- 4. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΙΣ VP4, VP3 ΚΑΙ VP2 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΠΚΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολιοϊοί αποτελούν μέλη της οικογένειας των πικο-RNA-ιών (*Picornaviridae*). Οι ιοί αυτοί ονομάζονται έτσι (πικο-RNA-ιοί) γιατί είναι πολύ μικροί και περιέχουν μονόκλωνο RNA. Το σωματίο των πολιοϊών έχει απλή εικοσαεδρική δομή με 60 μορφολογικές μονάδες ανά ιόσωμα, κάθε μία αποτελούμενη από 4 διακριτές πρωτεΐνες. Το RNA τους είναι μονόκλωνο με μήκος περίπου 7500 βάσεις. Οι πολιοϊοί διακρίνονται σε 3 οροτύπους και είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

2.1 Ταξινόμηση

Οι πολιοϊοί αποτελούν μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* που περιλαμβάνει 9 γένη και ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών (πίνακας 2.1.1), (Nidia H De Jesus July 2007). Λόγω της έκφρασης 4 διαφορετικών αντιγονικών καθοριστών που βρίσκονται στην επιφάνεια του ιού και αναφέρονται ως N-Ag1, 2, 3a και 3b, ο ιός χωρίζεται σε 3 οροτύπους (1,2 και 3) και τα ονόματα Mahoney, Lansing, και Leon είναι τα αντίστοιχα του κάθε οροτύπου.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ *Picornaviridae*

ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΗ	ΟΡΟΤΥΠΟΙ
<i>Enterovirus</i>	<i>Human enterovirus A</i>	17
	<i>Human enterovirus B</i>	56
	<i>Human enterovirus C (+ Poliovirus)</i>	13 (+3)
	<i>Human enterovirus D</i>	3
	<i>Simian enterovirus A</i>	1
	<i>Bovine enterovirus</i>	2
	<i>Porcine enterovirus B</i>	2
<i>Rhinovirus</i>	<i>Human rhinovirus A</i>	74
	<i>Human rhinovirus B</i>	25
<i>Cardiovirus</i>	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	1
	<i>Theilovirus</i>	3
<i>Aphthovirus</i>	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	7
	<i>Equine rhinitis A virus</i>	1

<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatitis A virus</i>	1
	<i>Avian encephalomyelitis-like virus</i>	1
<i>Parechovirus</i>	<i>Human parechovirus</i>	3
	<i>Ljungan virus</i>	2
<i>Erbovirus</i>	<i>Equine rhinitis B virus</i>	2
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichi virus</i>	1
<i>Teschovirus</i>	<i>Bovine kobuvirus</i>	1
	<i>Porcine teschovirus</i>	11

Πίνακας 2.1.1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας *Picornaviridae*.

Οι Εντεροϊοί υποδιαιρούνται σε 7 κατηγορίες (*Human enterovirus A*, *Human enterovirus B*, *Human enterovirus C*, *Human enterovirus D*, *Simian enterovirus A*, *Bovine enterovirus*, and *Porcine enterovirus B*). Αρχικά είχαν ταξινομηθεί στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες με βάση τις ασθένειες που προκαλούσαν στους ανθρώπους και την μολυσματικότητα/παθογένεσή τους σε ενδοκρανιακώς εμβολιασμένα ποντίκια: i) πολιοϊοί (PV: υπεύθυνοι για την πολιομυελίτιδα στους ανθρώπους και γενικά μη παθογόνοι στα ποντίκια), ii) coxsackie A ιοί (CAV: υπεύθυνοι για ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος των ανθρώπων και για παράλυση στα ποντίκια), iii) 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 iv) echoviruses (E: μη παθογόνοι στα ποντίκια και γενικά δεν σχετίζονται με ασθένειες στους ανθρώπους). Ωστόσο, με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας το ταξινομικό σχήμα εξελίχθηκε. (πίνακας 2.1.2)

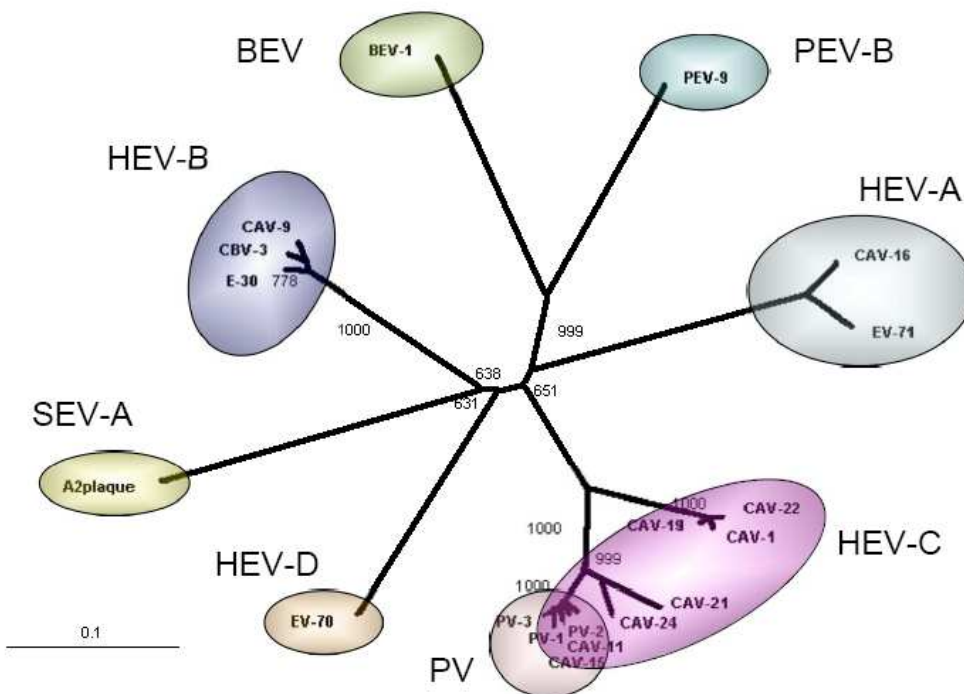
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ

Clusters	ΟΡΟΤΥΠΟΙ	ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ
<i>Human enterovirus A</i>	coxsackievirus A2(CV-A2) - CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16 enterovirus 71 (EV-71), EV-76, EV-89 - EV-92	CD155 ^[122]
<i>Human enterovirus B</i>	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	CAR, ^[13] DAF ^[12] $\alpha_v\beta_3$ integrin ^[169]

<i>Human enterovirus C</i>	EV-69, EV-73 - EV-75, EV-77 - EV-88, EV-93, EV-97, EV-98, EV-100, EV-101 CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A22, CV-A24, EV-95, EV-96, EV-99, EV-102 poliovirus 1 (PV1), PV2, PV3	ICAM-1 (CV-A21 ^[176])
<i>Human enterovirus D</i>	EV-68, EV-70, EV-94	
<i>Simian enterovirus A</i>	simian enterovirus A1 (SEV-A1)	
<i>Bovine enterovirus</i>	bovine enterovirus 1 (BEV-1), BEV-2	
<i>Porcine enterovirus B</i>	porcine enterovirus 9 (PEV-9), PEV-10	

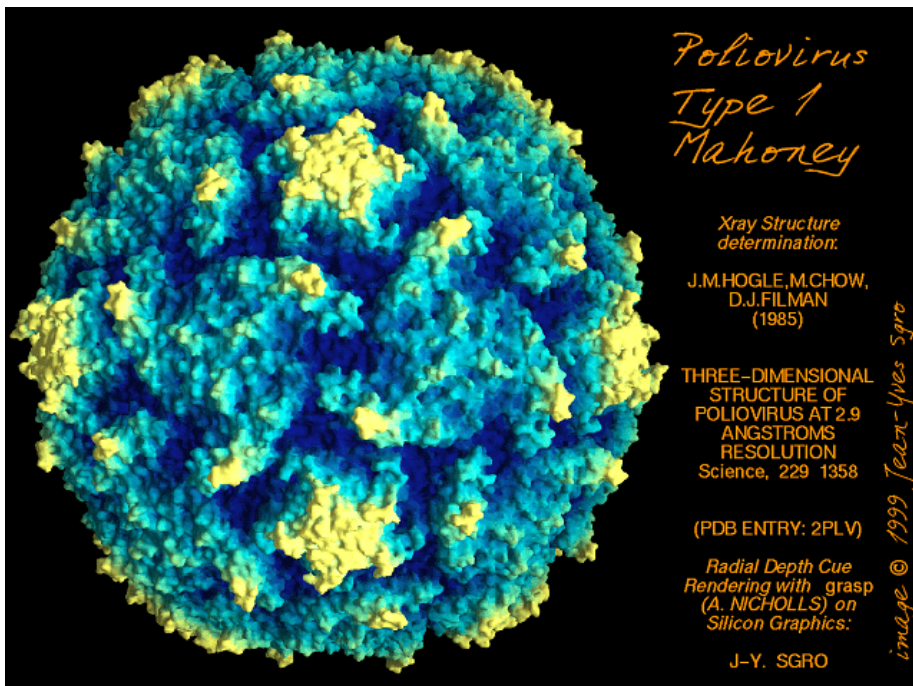
Πίνακας 2.1.2: Ταξινόμηση των εντεροϊών με βάση βιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά τους.

Ακολούθως φαίνεται ένα δέντρο βασισμένο στις 2C+3CD περιοχές, φαίνεται η γενετική συγγένεια μεταξύ των αντιπροσώπων του κάθε είδους των εντεροϊών.



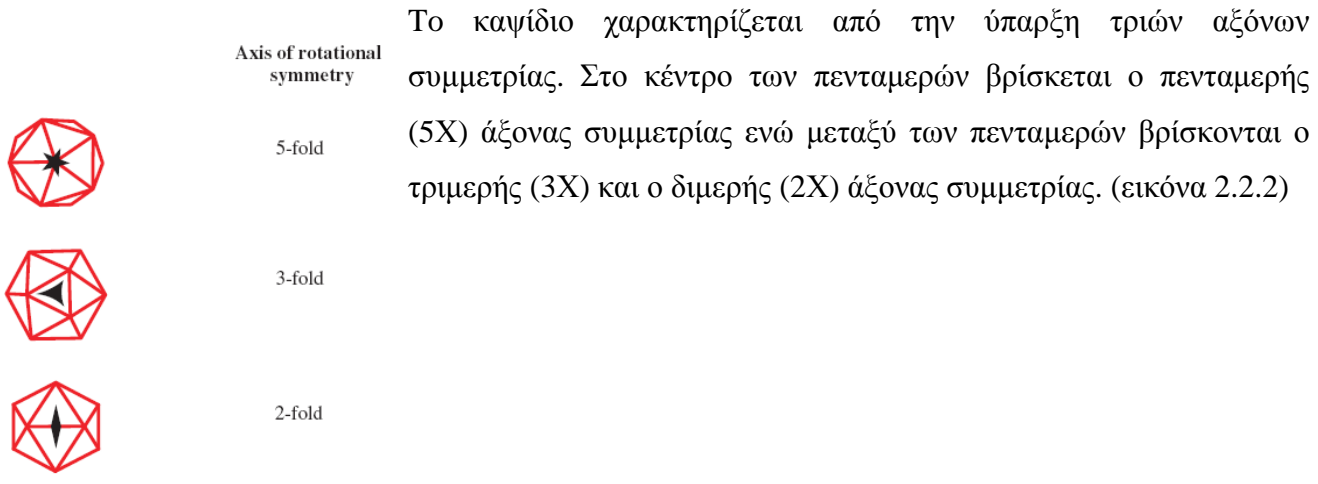
2.2 Δομή του καψιδίου και αντιγονικότητα

Οι πολιοϊοί έχουν ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας με διάμετρο 28nm. Το καψίδιο τους δεν περιβάλλεται από έλυτρο λιπιδικής στοιβάδας. Η τρισδιάστατη δομή του ιικού σωματιδίου και των τριών οροτύπων των πολιοϊών έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (εικόνα 2.2.1).



Εικόνα 2.2.1: Η ατομική δομή του πολιοϊού τύπου 1 ύστερα από ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Είναι εμφανείς οι αυλακώσεις (canyons) που περιβάλλουν τις επιφανειακές προεξοχές (star-like) στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας. (Hogle, Clow and Filman, Science 229:1358)

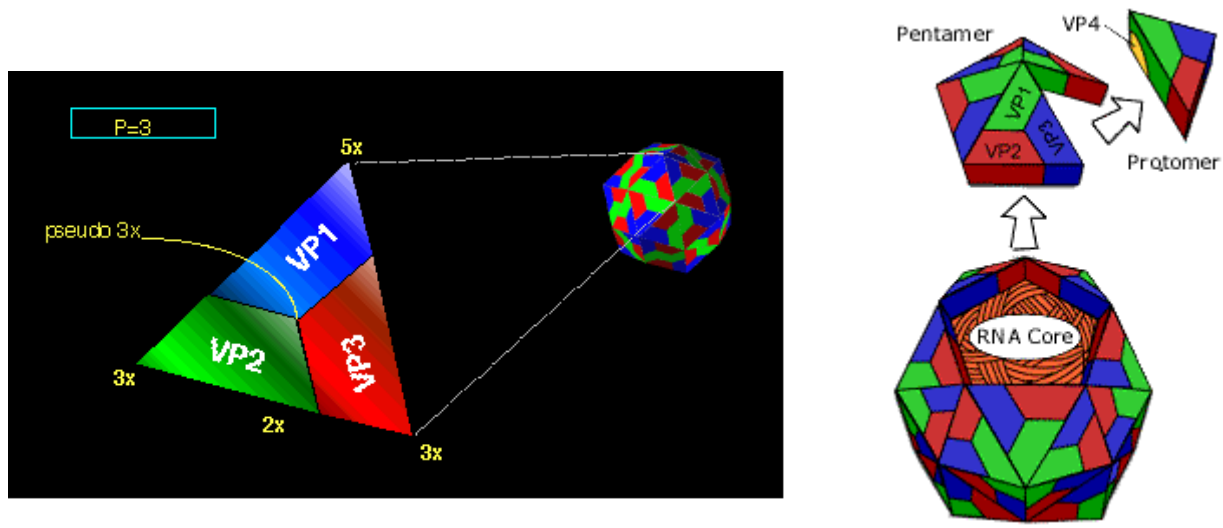
Το καψίδιο των πολιοϊών αποτελείται από 60 πανομοιότυπες υπομονάδες (καψομερίδια) που συντίθενται από ισομοριακά ποσά τεσσάρων πολυπεπτιδικών ιικών αλυσίδων, VP1, VP2, VP3 και VP4, που όλες προέρχονται με πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης. Κατά την πρωτεόλυση, η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται 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)₅]. Τέλος τα πενταμερή συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν το προκαψίδιο [(VP0, VP3, VP1)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA "πακετάρεται" στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2.



Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. (εικόνα 2.2.2)

Εικόνα 2.2.2 : οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο (virology: principles and applications, 2007)

Πιο συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου (εικόνα 2.2.3)



Εικόνα 2.2.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός πρωτομερούς και πενταμερούς του καψιδίου των πολιοϊών. Αριστερά είναι εμφανείς οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας.

Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 εμφανίζουν κοινή τριτοταγή δομή η οποία συνίσταται σε ένα 8-κλωνο αντιπαράλληλο β-βαρέλι το οποίο πλαισιώνεται από δύο α-έλικες συνδεδεμένες με διαφορετικές θηλιές. Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIΑ και N-AgIIIΒ, (Diamond et al., 1985; Minor et al., 1986; Page et al., 1988; Wiegers and Dernic, 1992).

- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1.
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIΒ από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.

Οι συνδιασμοί με τους οποίους συναντώνται στους οροτύπους είναι 3. Κατά συνέπεια οι πολιοϊοί χωρίζονται σε τρεις ομάδες.

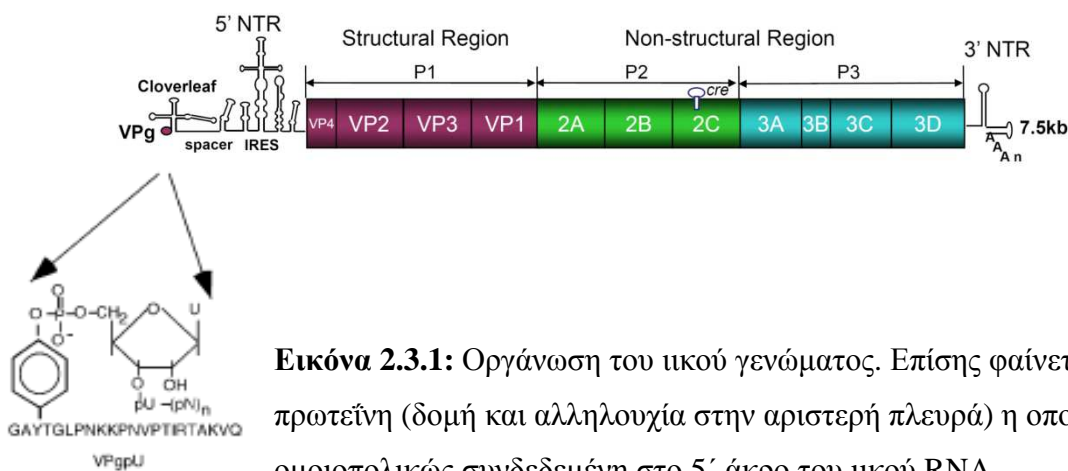
Τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ (στην N-τελική γλυκίνη), (Pfister et al. 1999). Το μυριστικό οξύ πιστεύεται ότι σταθεροποιεί τη σύνδεση μεταξύ VP4 και VP3.

Μία βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας, (Blondel et al. 1998). Έχει βάθος 1,2nm και πλάτος 1,5nm και αποτελεί τη θέση δέσμευσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα. Οι πολύ μικρές διαστάσεις που έχει η αύλακα δυσκολεύουν την αναγνώριση της από τα αντισώματα του οργανισμού-ξενιστή και η διαμόρφωση αυτή επιτρέπει την πιο εύκολη προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα του ξενιστή χωρίς επακόλουθη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Εσωτερικά της αύλακας συναντούμε το μόριο της σφιγγοσίνης που πιθανόν ελέγχει την πλαστικότητα του ιού κατά την προσκόλληση του στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, ώστε να είναι πιο εύκολη η απελευθέρωση του γονιδιώματος του ιού στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου ξενιστή. (Filman et al. 1989).

2.3 Οργάνωση του ιικού γενόματος

Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας μεγέθους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων, (για PV1 είναι 7440nt , για PV2 είναι 7439nt και για PV3 είναι 7434nt). Το RNA των πολιοϊών χωρίζεται σε 3 λειτουργικά τμήματα.

Poliovirus genome

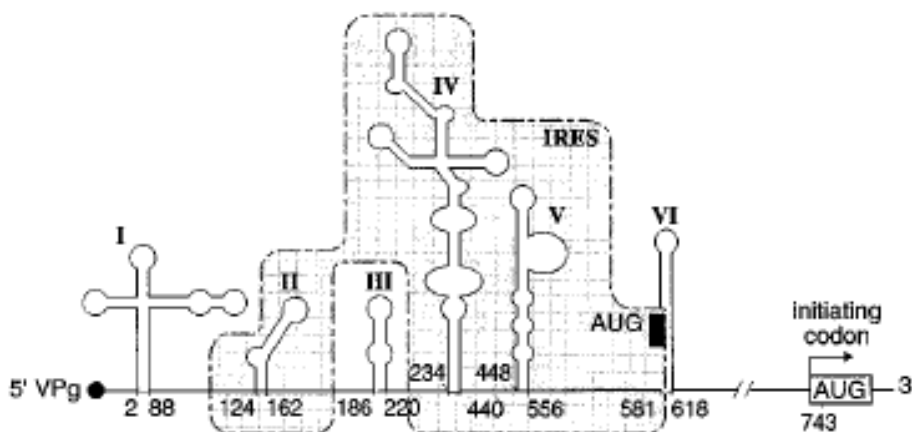


Εικόνα 2.3.1: Οργάνωση του ιικού γενόματος. Επίσης φαίνεται η VPg ική πρωτεΐνη (δομή και αλληλουχία στην αριστερή πλευρά) η οποία είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένη στο 5' άκρο του ιικού RNA.

Τα 3 αυτά τμήματα είναι :

- A) Στο 5' άκρο είναι μια μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'-utr : untranslated region, ή 5'-ncr : non coding region) μεγέθους 742 nt και πλούσια σε περίπλοκες δευτεροταγές δομές. Τα πρώτα 88 nt σχηματίζουν μία δομή που είναι γνωστή ως cloverleaf και η οποία αποτελεί ένα απαραίτητο cis-acting γενετικό στοιχείο που εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας (η δομή αυτή ακολουθείται από μια poly C περιοχή η οποία αποτελεί θέση δέσμησης της πρωτεΐνης PCBP (poly C Binding Protein) του ξενιστή και η οποία είναι απαραίτητη στην αντιγραφή (Gamarnik A.,2000). Αυτή η δομή ακολουθείται από ένα δεύτερο cis-acting γενετικό στοιχείο γνωστό ως IRES (internal ribosomal entry site) μεγέθους περίπου 400 nt το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της μετάφρασης του RNA (εικόνα 2.3.2.) και ακολουθείται από άλλα 154 nt. Η 5'-μη κωδική περιοχή είναι σχετικά συντηρημένη και πλούσια σε περιεκτικότητα αζωτούχων βάσεων GC (γουανίνη και κυτοσίνη) .

Ένα σημαντικό στοιχείο που σχετίζεται με την περιοχή αυτή είναι η σύνδεση του 5' ελεύθερου άκρου με μια μικρή ικής προέλευση πρωτεΐνη την Vpg. Συγκεκριμένα, η 5'-τελική μονοφωσφορική ομάδα του ικού γενώματος σχηματίζει έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του τελικού νουκλεοτιδίου ουρακίλης του RNA και ενός καταλοίπου τυροσίνης της ικής πρωτεΐνης VPg (VPg-Tyr-O⁴-pUUAAA...), (εικόνα 2.3.1), (Wimmer et al. 1993).



Εικόνα 2.3.2: Διάγραμμα της δευτεροταγούς δομής της 5'-NCR περιοχής του γενώματος του στελέχους PV-1/Mahoney. Οι έξι δομές φουρκετών αριθμούνται από I έως VI. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES, (από B. Blondel et al 1998).

Β) Μετά ακολουθεί το δεύτερο τμήμα, η κωδική περιοχή (ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης- open reading frame, ORF), που αποτελεί το μεταφραζόμενο τμήμα του γενώματος του πολιοιού. Το τμήμα αυτό μεταφράζεται σε ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο μεγέθους 247kDa. Αυτό το πρόδρομο μόριο διασπάται σε 3 περιοχές: Την P1 η οποία περιέχει τις δομικές πρωτεΐνες, την P2 η οποία αποτελεί τις μη δομικές πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C και την P3 η οποία κωδικοποιεί για τα πολυπεπτίδια 3A, 3B, 3C, και 3D (σχήμα 2.3.1).

Γ) Η τρίτη περιοχή: Η 3'- NCR περιοχή αποτελείται από 65 nt και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου αρνητικής πολικότητας. Στην περιοχή αυτή του γονιδιώματος παρουσιάζονται 2 θηλιές οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής 'δομή ψευδοκόμβου'. Η δομή αυτή αποτελείται από επιμέρους δομές φουρκέτας. (Wimmer et al. 1993).

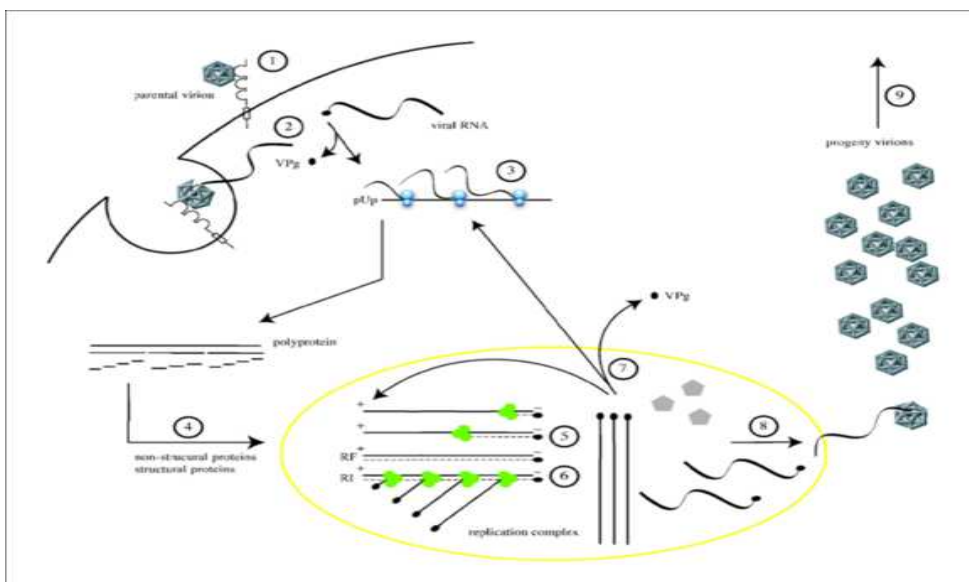
Στο τέλος της 3'- NCR περιοχής ξεκινά η πολυαδενυλιομένη επέκτασή της (ουρά πολυαδενοσίνης). Η πολύ-A ουρά του γενώματος των πολιοϊών κωδικοποιείται από το ίδιο το γένωμα του ιού. Έτσι

στο RNA (-) η πολύ-A ουρά προκύπτει από μία αλληλουχία πολύ-U που βρίσκεται στο 5'-άκρο του RNA (+). Το μέσο μήκος της πολύ-A ουράς των πολιοϊών είναι 60 nt (μεγαλύτερο ή μικρότερο μήκος είναι μη-ιδανικό), (Wimmer et al. 1993).

3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών μπορεί να συνοψιστεί στα ακόλουθα στάδια (εικόνα 3) :

1. Ο ιός προσδένεται και αποσταθεροποιείται από τον κυτταρικό υποδοχέα CD155 και εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή με ενδοκύττωση.
2. Η κυτταρική φωσφοδιεστεράση αποδεσμεύει την VPg πρωτεΐνη από το ιικό RNA και ξεκινά η μετάφραση του ιικού RNA η οποία ελέγχεται από το γενετικό στοιχείο IRES.
3. Το ιικό RNA αμέσως μεταφράζεται σε μία πολυπρωτεΐνη η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$) ώστε να παραχθούν οι δομικές και λειτουργικές ικές πρωτεΐνες.
4. Το RNA θετικής πολικότητας χρησιμοποιείται ως μήτρα για την παραγωγή του RNA αρνητικής πολικότητας, δίνοντας έτσι ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF).
5. Η έναρξη της RNA σύνθεσης από την $3D^{pol}$ απαιτεί την VPg ιική πρωτεΐνη ως εκκινητή . Η αντιγραφή του RNA ακολουθεί το κοινό μονοπάτι
RNA (+) → RNA(-) → RNA (+).
6. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA (+) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μία από τις εξής τρεις διαδικασίες: i) αντιγραφή για την παραγωγή νέων μορίων RNA (+) ii) πρωτεϊνοσύνθεση και
7. iii) καμινδίαση για την παραγωγή μολυσματικών ικών σωματιδίων.
8. Τέλος, πραγματοποιείται η συναρμολόγηση των νέων ικών σωματιδίων
9. Τα νέα ικά σώματα ελευθερώνονται για να μολύνουν νέα κύτταρα.



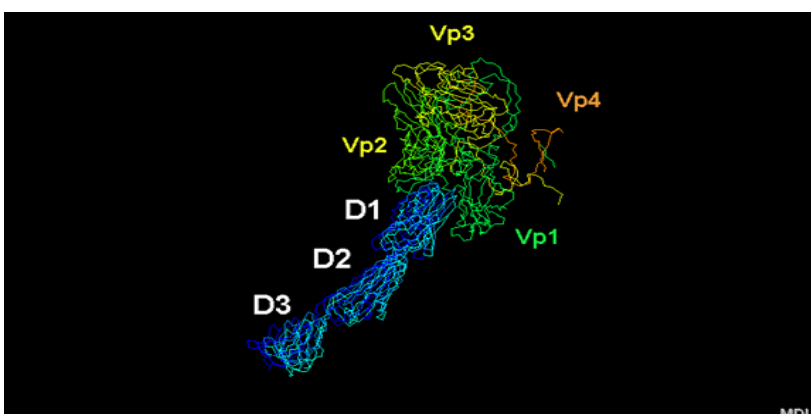
Εικόνα 3: Κύκλος ζωής των πολιοϊών (από De Jesus NH , 2007).

3.1 Υποδοχέας CD155 των πολιοϊών και είσοδος στο κύτταρο ξενιστή.

Για να μπορέσει ο ιός να ξεκινήσει τον παθογόνο κύκλο του θα πρέπει αρχικά να προσδεθεί σε κάποιο υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο υποδοχέας των πολιοϊών (hPVR : human Polio Virus Receptor) είναι ο CD155 (Mendelsohn et al, 1989). Ο CD155 είναι ένα μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών και είναι μία γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 80 KDa, αποτελείται από τρεις εξωκυττάριας περιοχές (V-C2-C2) που έχουν τη δομή αντισώματος, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά (εικόνα 3.1.1.A). Η N-τελική V περιοχή του είναι απαραίτητη για την μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς και συνεπώς για την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Το γονίδιο του έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και περιέχει οκτώ εξόνια. Εκφράζεται ως ένα μίγμα τεσσάρων ισομορφών οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του.

Ο hPVR έχει μία διπλή λειτουργία κατά την μόλυνση των πολιοϊών: είναι υπεύθυνος τόσο για την πρόσδεση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια όσο και για την αποσταθεροποίηση του ιικού σωματιδίου η οποία επιτυγχάνεται μέσω μεταβολών της διαμόρφωσης του καψιδίου απαραίτητων για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κύτταρο. Όσο οι πολιοϊοί είναι ελεύθεροι ο συντελεστής καθίζησης τους είναι 160S (ανενεργός). Όταν ο ιός προσδεθεί στον υποδοχέα αλλάζει η στερεοδιάταξη του καψιδίου και τα ιοσωμάτια καλούνται ως A σωματίδια με συντελεστή καθίζησης 135S (ενεργοποιημένος). Τα 135S ιικά σωματίδια είναι ικανά να μολύνουν κύτταρα με τρόπο ανεξάρτητο υποδοχέα όταν είναι παρόν σε υψηλές συγκεντρώσεις και πιστεύετε ότι αποτελούν ένα απαραίτητο ενδιάμεσο στην διαδικασία εισόδου του ιού στο κύτταρο. Επίσης, θεωρείται πιθανό ότι η ικανότητα του καψιδίου να υφίσταται αυτές τις μεσολαβούμενες από τον υποδοχέα δομικές μεταβολές ρυθμίζεται από ένα υδρόφοβο λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης γνωστό και ως <rocket factor> το οποίο προσδέεται στη βάση της αύλακας (canyon) και συγκεκριμένα στον πυρήνα του β-βαρελίου της VP1. Τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο, είτε απευθείας μέσω της πλασματικής μεμβράνης μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα είτε με ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα., (Blondel et al. 1998, Hogle 2002).

Παρόλο όμως που ο CD155 εκφράζεται από όλους τους κυτταρικούς τύπους, οι πολιοϊοί δεν μπορούν να μολύνουν όλους τους ιστούς. Αυτή η ικανότητα αναφέρεται ως τροπισμός του ιού.

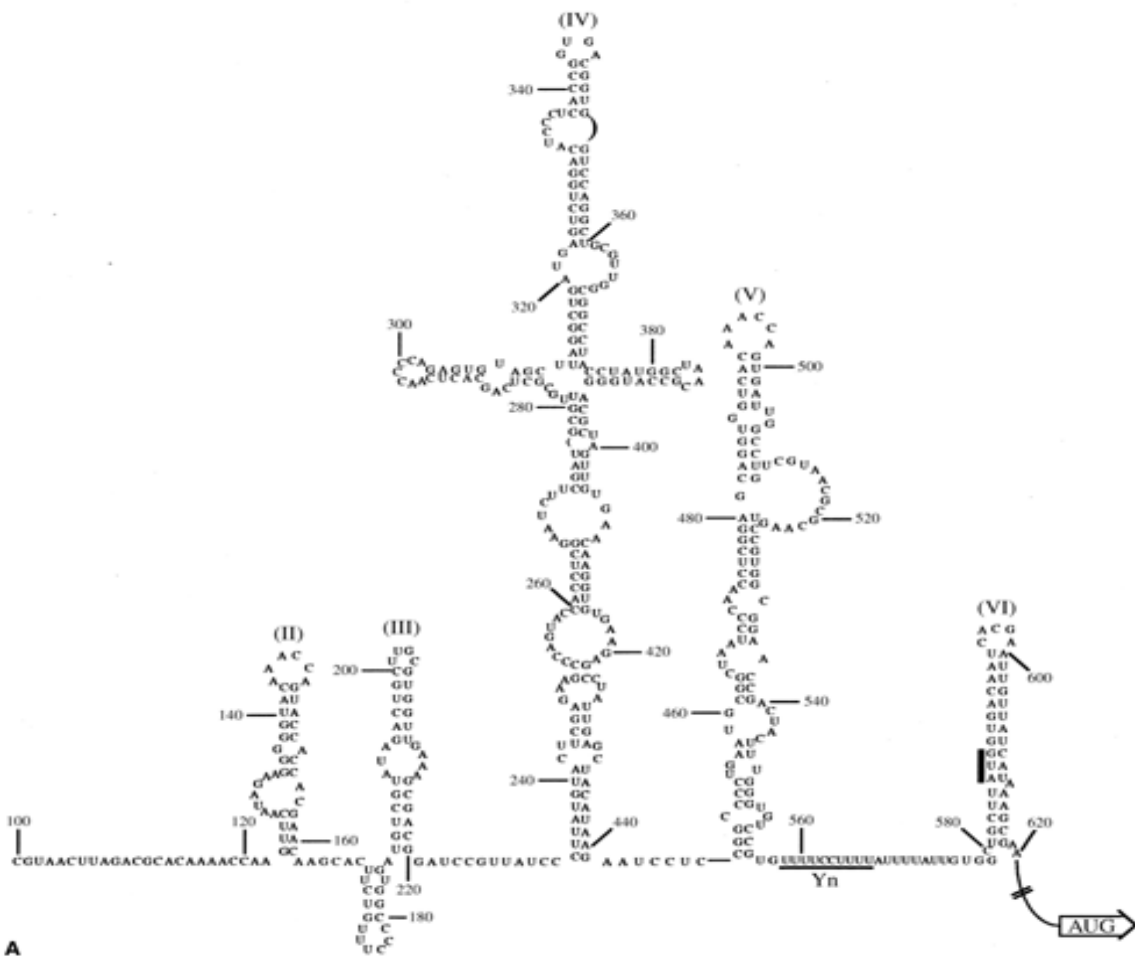


Εικόνα: Ο υποδοχέας CD155 σε σύνδεση με τις ιικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4

3.2 Μετάφραση του ιικού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία

Οι μονόκλωνοι RNA ιοί θετικής πολικότητας χρησιμοποιούν το RNA τους άμεσα για τη μετάφραση μετά την είσοδο τους στο κύτταρο. Αρχικά μία κυτταρική πρωτεάση (ηVPg-Unlinkase) απομακρύνει την VPg από το 5' άκρο του ιικού γενώματος για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η μετάφραση από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Η μετάφραση ξεκινά με την πρόσδεση της αλληλουχίας IRES του ιικού RNA (η οποία βρίσκεται 100 nt upstream του κωδικονίου έναρξης AUG) στην ριβοσωμική υπομονάδα 40S με τη βοήθεια των παραγόντων εκκίνησης της μεταγραφής (eIF4).

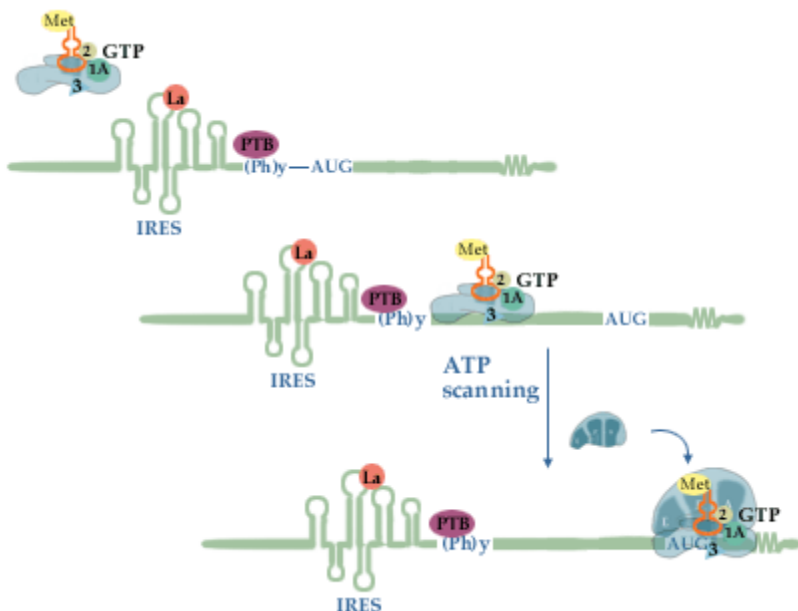
Τόσο ένα σιωπηλό κωδικόνιο AUG στη θέση 586 όσο και μία περιοχή ολιγοπυριμιδίνης που βρίσκεται 22 nt upstream αυτού είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική λειτουργία του IRES γενετικού στοιχείου (αποτελεσματική είσοδο των ριβοσωμάτων).



Εικόνα 3.2.1: Δομή του γενετικού στοιχείου IRES του πολιοϊού τύπου 1. (Από T. Pfister et al. 1999).

Για την μετάφραση του ιικού RNA σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs) είναι απαραίτητοι, με μοναδική εξαίρεση τον παράγοντα eIF4E ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα (cap). Κατά την μετάφραση του ιικού RNA, ο παράγοντας eIF4G1 αλληλεπιδρά απευθείας με το mRNA στην περιοχή IRES και κατόπιν συνδέεται με τον παράγοντα eIF4A προάγοντας την συναρμολόγηση του 48S συμπλόκου. Τελικά, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αφού προσδεθεί στο mRNA κινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Deborah Prevet et al. 2003).

Εκτός από τους παράγοντες eIFs, στο IRES στοιχείο των πολιοϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν την μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί trans-acting παράγοντες (ITAFs), εκ των οποίων οι τέσσερις είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: PTB (polypyrimidine tract-binding protein), PCBP2 [poly(rC)-binding protein 2], το αυτοαντιγόνο La και η Uhr η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο upstream του N-ras. Τέλος ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF₄₅, μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο (Kerstin Ochs et al. 2002,). (εικόνα 3.2.2)



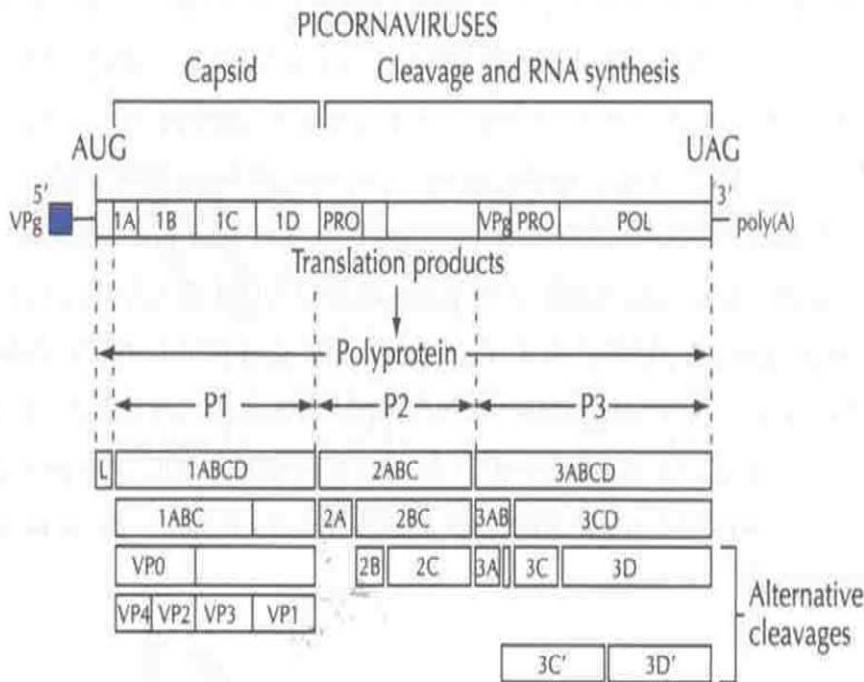
Εικόνα 3.2.2 : Οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και η πρόσδεση τους στο IRES στοιχείο (http://www.ewa.cz/pages1/813_soubory/alternative.gif)

Σε μολυσμένα από πολιοιούς κύτταρα, η πρωτεΐνη 2A του ιού η οποία είναι μια πρωτεάση διασπά τον παράγοντα p220 του eIF-4F (ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών οι οποίες απαιτούνται για την

“cap-dependent” μετάφραση των mRNAs στα ριβοσώματα). Καθώς το RNA των πολιοιών δεν φέρει μεθυλιωμένη καλύπτρα στο 5' (methylated cap) αλλά είναι τροποποιημένο από την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης, το RNA του ιού συνεχίζει να μεταφράζεται. Έτσι με αυτό τον τρόπο ο ιός καταστέλλει την μετάφραση του κυττάρου ξενιστή ενώ δεν επηρεάζεται η μετάφραση του δικού του RNA.

Όπως αναφέρθηκε το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο μεταφράζεται ώστε να παράγει αρχικά μία 247 KDa πολυπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται από τις ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$) και έτσι προκύπτουν οι λειτουργικές ικές πρωτεΐνες. Το πρώτο 1/3 της πολυπρωτεΐνης ονομάζεται P1 και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του καψιδίου ενώ τα υπόλοιπα 2/3 της, τα οποία χωρίζονται στις P2 και P3 περιοχές, κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες (εικόνα 3.2.3) (Wimmer et al. 1993).

Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης συμβαίνει σε τρία στάδια μόλις ολοκληρωθεί η μετάφραση. Αρχικά η $2A^{pro}$ 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 πολυπεπτίδιο P2- P3. Αυτό πραγματοποιείται μέσω cis-διάσπασης από την $3CD^{pro}$. Σε μία αλληλουχία γεγονότων trans-διάσπασης από την $3CD^{pro}$, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), $3C^{pro}$, $3D^{pol}$ 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 ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ικών σωματιδίων και γι' αυτό αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης (Pfister et al. 1999).

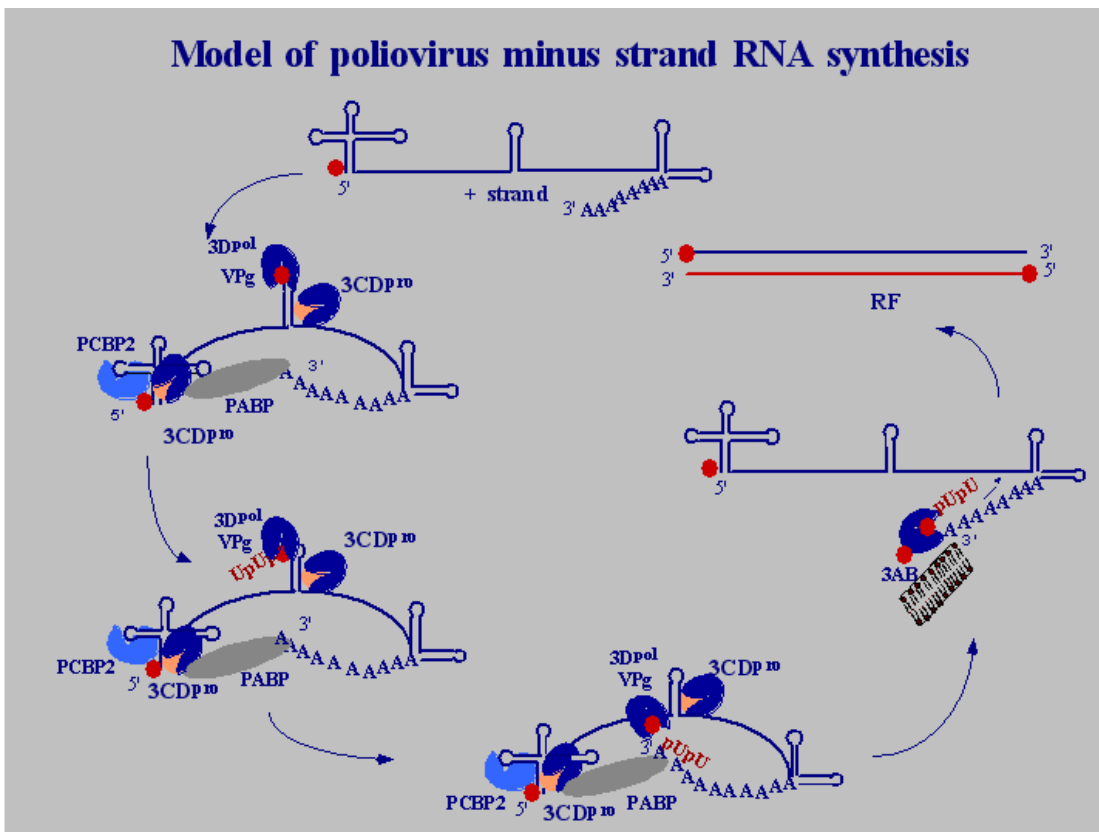


Εικόνα 3.2.3: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης.

3.1 Αντιγραφή του ιικού RNA

Αμέσως μετά την μετάφραση του, το ιικό RNA χρησιμεύει σαν μήτρα για την παραγωγή ενός συμπληρωματικού μορίου RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο στη συνέχεια δρα ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων κλώνων θετικής πολικότητας (D.J. Barton 2003). Η διαδικασία της αντιγραφής λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) του ξενιστή, όπου συμμετέχουν όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες του ξενιστή (Pfister et al. 1999). Αρχικά απαιτείται ο σχηματισμός κυστιδίων (rosette-like) που προέρχονται από το ΕΔ με τη βοήθεια των 2BC, 2C και 3AB πρωτεϊνών του ιού οι οποίες προωθούν την αναδιάταξη των μεμβρανικών δομών σε κυστίδια με περιπυρηνική διάταξη. (Cho et al. 1994, Mark H. Fogg et al. 2003). Μία υδρόφοβη περιοχή στην ιική πρωτεΐνη 3AB είναι πιθανόν να ευθύνεται για την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης σε αυτές τις μεμβρανικές δομές και συνεπώς και του συμπλόκου αντιγραφής λόγω συγγένειας της 3AB προς τις 3D^{pol} και 3CD^{pro} (John M. Lyle et al. 2002, Sunny S. Choe and Karla Kirkegaard 2004). Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου ξεκινά με την κυκλοποίηση του γενώματος στην οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες 3CD, PCBB και οι δομές 5' cloverleaf και 3' UTR του ιικού γενώματος. Η 5' cloverleaf και η πολύ-Α ουρά αλληλεπιδρούν κατά την μετάβαση από την μετάφραση στην σύνθεση του RNA(-). Η 3CD^{pro} μπορεί να προσδεθεί στην κυτταρική πρωτεΐνη PABP (poly(A) binding protein).

Το ικό RNA(+) πιθανόν κυκλοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης του 3AB/3CD^{pro}/PCBP2 ριβονουκλεοπρωτεϊνικού (RNP) συμπλόκου του 5' cloverleaf και της PABP της πολύ-A ουράς (εικόνα 3.3.2) , (Jens Herold and Raul Andino 2001). Η συναρμολόγηση του RNP συμπλόκου στο 5' cloverleaf και η επακόλουθη κυκλοποίηση του ικού RNA είναι πιθανόν ότι εμποδίζουν την πρόσβαση των κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας έτσι την μετάβαση από την μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al. 1993).



Εικόνα 3.3.2: Μοντέλο κυκλοποίησης του ικού RNA και ουριδιλίωσης της VPg κατά την σύνθεση του RNA(-) .

(<http://www.mgm.stonybrook.edu/wimmer/images/polio2.gif>)

Απαραίτητη για την αντιγραφή είναι η RNA πολυμεράση (3D^{pol}). Η 3D^{pol} η οποία εξαρτάται από την παρουσία εκκινητή καταλύει τόσο τη σύνθεση των κλώνων RNA(-) όσο και τη σύνθεση των RNA(+). Επίσης, εμφανίζει δύο τύπους καταλυτικής δραστηριότητας, α) επιμηκώνει τους RNA κλώνους πάνω σε ένα κατάλληλο εκμαγείο και β) ευθύνεται για την ουριδιλίωση της VPg (Aniko V. Paul et al. 1998). Η μικρή πρωτεΐνη VPg (3B) λειτουργεί ως εκκινητής αφού πρώτα ουριδιλιωθεί σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης ώστε να προκύψει η μορφή VPg-pU- pU, γεγονός το οποίο αποτελεί το πρώτο στάδιο της σύνθεσης τόσο του RNA(+) όσο και του RNA(-). Σημαντική πρόοδος στην κατανόηση αυτής της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με την ανακάλυψη

μιας εσωτερικής δομής φουρκέτας στο RNA γνωστή ως cre (cis-replicating element). Μετά την ανακάλυψη του cre γενετικού στοιχείου, αποδείχτηκε ότι μία συντηρημένη αλληλουχία ${}^1\text{GXXXAAACXXXXXA}^{14}$ η οποία βρίσκεται στη θηλιά της φουρκέτας αντιπροσωπεύει το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg. Πιο συγκεκριμένα, η A-5 χρησιμοποιείται για την προσθήκη και των δύο νουκλεοτιδίων ουρακίλης στο -OH της τυροσίνης της VPg από την 3D^{pol} (Aniko V. Paul et al. 2003). Πρόσφατα έχει προταθεί ότι η cre εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg εμπλέκεται μόνο στην σύνθεση του RNA(+) και όχι του RNA(-), (B. Joan Morasco et al. 2003, Kenneth E. Murray et al. 2003).

Πολύ λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην σύνθεση του RNA(+), με εξαίρεση ότι απαιτείται cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg. Στο μολυσμένο κύτταρο υπάρχουν 50 φορές περισσότεροι κλώνοι RNA(+) σε σύγκριση με τους κλώνους RNA(-). Αυτό είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης αντιγραφής κατά την οποία είναι εφικτή η ταυτόχρονη σύνθεση πολλαπλών κλώνων RNA(+) από έναν μόνο κλώνο RNA(-). Η μοριακή βάση της ασύμμετρης αντιγραφής βρίσκεται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών για την ουριδιλίωση της VPg κατά την σύνθεση του RNA(-) (εξαρτώμενη από την πολύ(A) ουρά) και του RNA(+) (cre-εξαρτώμενη), (B. Joan Morasco et al. 2003).

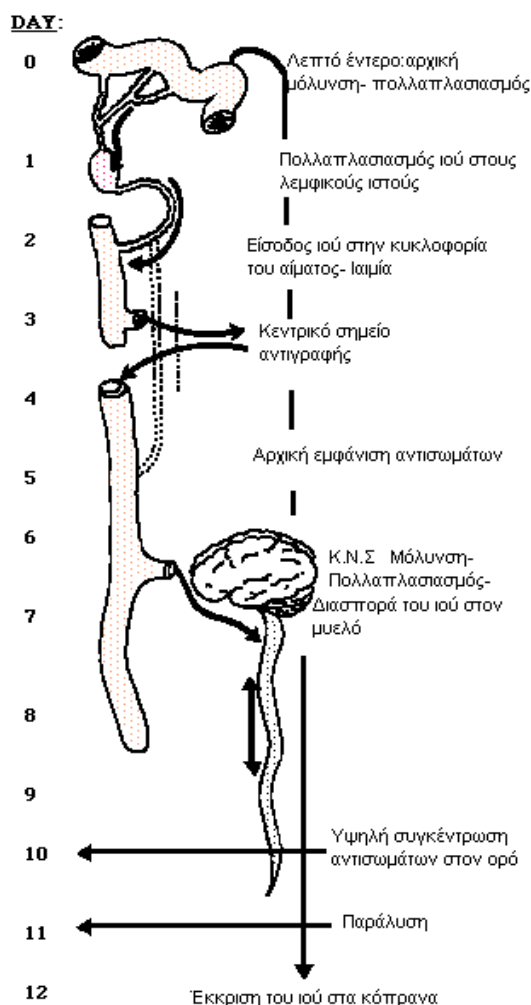
3.1 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων

Η καψιδίωση του RNA πρέπει να είναι συνυφασμένη με τη διαδικασία της αντιγραφής, αφού και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, (Ansardi et al. 1996). Αρχικά, το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπτίδιο τεμαχίζεται από την 3CD^{pro} και δίνει τις VP0, VP3 και VP1 οι οποίες τότε συσσωματώνονται ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al. 1999). Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της καψιδίωσης, η VP0 τεμαχίζεται στις VP2 και VP4 (πιθανόν αυτοκαταλυτικά) δίνοντας έτσι το ώριμο ιικό σωματίδιο (Basavappa et al. 1994). Η μυριστιλίωση της VP0 και συνεπώς και της VP4 είναι απαραίτητη για την μορφογένεση και την σταθερότητα του καψιδίου (Krausslich et al. 1990). Οι πολιοϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή με λύση του κυττάρου (Tucker et al. 1993).

4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Οι πολιοϊοί εισάγονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της στοματικής κοιλότητας. Συχνά είναι αποτέλεσμα πτωχής υγιεινής των χεριών ή της βρώσης μολυσμένης τροφής ή ύδατος. Οι αναπνευστικές εκκρίσεις μπορεί επίσης να διασπείρουν τον ιό. Οι μολυσμένοι ασθενείς μπορεί να αποβάλουν τον ιό από τα κόπρανα για πολλές εβδομάδες. Οι ασθενείς είναι περισσότερο μολυσματικοί αμέσως πριν και αμέσως μετά την εκδήλωση των συμπτωμάτων.

Από την στοματική κοιλότητα ακολουθώντας τη ροή του πεπτικού συστήματος φτάνουν στο φάρυγγα και το λεπτό έντερο, όπου εκεί πραγματοποιείται το αρχικό στάδιο μόλυνσης του οργανισμού από τον ιό. Στη συνέχεια ο ιός μπορεί να μεταδοθεί από τον βλεννογόνο στους τοπικούς



λεμφαδένες (από τους οποίους μπορεί να απομονωθεί) και μετά 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. Η περίοδος επώασης του ιού είναι περίπου 7 - 14 ημέρες αλλά μπορεί και να κυμαίνεται και από 2-35 ημέρες.

Δεν υπάρχει ουσιαστικά θεραπεία για την πολιομυελίτιδα αλλά μόνο πρόληψη.

Εικόνα 7. 1: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών

Η νόσος μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή να εκδηλωθεί με διαφόρου βαθμού σοβαρότητας κλινικές μορφές οδηγώντας μέχρι και στο θάνατο. Οι περισσότεροι ασθενείς (90-95%) δεν εμφανίζουν συμπτώματα (ασυμπτωματική νόσος). Υπάρχουν 3 συμπτωματικές μορφές της νόσου:

- Ήπια νόσος (abortive disease)
- Μη παραλυτική μορφή
- Παραλυτική μορφή

ΉΠΙΑ ΝΟΣΟΣ (4-8%)	ΜΗ ΠΑΡΑΛΥΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (1-2%) Άσυπτη μηνιγγίτιδα	ΠΑΡΑΛΥΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (<1%)
<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετός (έως 39.5°C) • Ανορεξία • Ναυτία και/ή έμετοι • Φαρυγγίτιδα • Κακουχία • Δυσκοιλιότητα • Κοιλιακό άλγος 	<ul style="list-style-type: none"> • Τα συμπτώματα της μη παραλυτικής νόσου είναι παρόμοια με αυτά της ήπιας νόσου, αλλά η κεφαλαλγία, η ναυτία και οι έμετοι μπορεί να είναι πολύ πιο έντονα. • Αρχικά μετά τα αρχικά συμπτώματα που διαρκούν 2 μέρες το παιδί 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 	<p>Τα συμπτώματα της παραλυτικής μορφής είναι παρόμοια με αυτά των άλλων μορφών της νόσου ενώ επιπλέον εμφανίζονται :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Γενικευμένη μυική αδυναμία • Σοβαρή δυσκοιλιότητα • Δύσπνοια από αδυναμία των αναπνευστικών μυών • Δυσκαταποσία • Βήχας και Βράγχος φωνής • Αδυναμία ελέγχου της ουροδόχου κύστης • Χαλαρή παράλυση κυρίως των κάτω άκρων

Μεταπολιομυελιτιδικό Σύνδρομο

Μετά από την πάροδο 30-40 ετών , 25%-40% των ατόμων που εκδήλωσαν την παραλυτική μορφή της νόσου σε παιδική ηλικία εμφανίζουν εκ νέου, μυικά άλγη, επιδείνωση της προϋπάρχουσας αδυναμίας και νέες παραλύσεις. Το μεταπολιομυελιτιδικό σύνδρομο δεν είναι μια λοιμώδης διαδικασία και οι ασθενείς δεν αποβάλλουν τον ιό στα κόπρανα.

5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι πρώτες αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για ξεσπάσματα επιδημίας πολιομυελίτιδας εντοπίζονται στις αρχές του 19^{ου} αιώνα στην Ευρώπη και στη Β. Αμερική. Το 1916, η επιδημία της πολιομυελίτιδας που ξέσπασε στις ΗΠΑ προκάλεσε το θάνατο 6,000 ανθρώπων και μόνιμη παράλυση σε άλλους 27,000. Στις αρχές της δεκαετίας του 1950, σημειώνονταν περισσότερα από 20,000 περιστατικά πολιομυελίτιδας ετησίως.

Η Παγκόσμια Πρωτοβουλία για την Εκρίζωση της Πολιομυελίτιδας ξεκίνησε το 1988. Ο αριθμός των κρουσμάτων πολιομυελίτιδας που καταγράφονται ετησίως έχει μειωθεί πάνω από 99% - από 350.000 το 1988 σε 1.651 το 2008. Αυτή η ραγδαία βελτίωση οφείλεται σε μια παγκόσμια εκστρατεία για την ανοσοποίηση κάθε παιδιού κάτω των πέντε ετών. Από το τέλος της δεκαετίας του 1990, το εμβόλιο κατά της νόσου έχει αποσταλεί στις ενδημικές χώρες μέσω εκστρατειών για μαζική ανοσοποίηση, γνωστών ως «Εθνικές Ημέρες Εμβολιασμών». Μόνον όταν έχει περάσει ένα χρονικό διάστημα τριών χρόνων και έχει πιστοποιηθεί σ' όλες τις χώρες του κόσμου η εξάλειψη της πολιομυελίτιδας, θα μπορούμε να πούμε ότι πετύχαμε την παγκόσμια εξάλειψή της.

Πλέον η πολιομυελίτιδα είναι ενδημική σε τέσσερις χώρες: το Αφγανιστάν, την Ινδία, τη Νιγηρία και το Πακιστάν, στις οποίες σημειώθηκαν συνολικά 1.505 κρούσματα πολιομυελίτιδας το 2008, δηλαδή 91% του συνολικού αριθμού κρουσμάτων. Η διάδοση του ιού στις χώρες αυτές αναμένεται να περιοριστεί, κατ' αρχήν σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές με εξακριβωμένα προβλήματα, όπως ανασφάλεια, κακό οδικό δίκτυο και διοικητικές και διαχειριστικές αδυναμίες, που επηρεάζουν την ποιότητα των δραστηριοτήτων σ' αυτές τις περιοχές. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων εξακολουθούν να καταβάλλονται συντονισμένες προσπάθειες, για να μπορούν όλα τα παιδιά να εμβολιάζονται και να σταματήσει η διάδοση του ιού.

Στη Βόρεια Νιγηρία είχε παρατηρηθεί μια νέα επιδημία του άγριου ιού τύπου 1 της πολιομυελίτιδας (WPV1) και η οποία πλέον έχει ξεκινήσει να μεταδίδεται σε διεθνές επίπεδο.

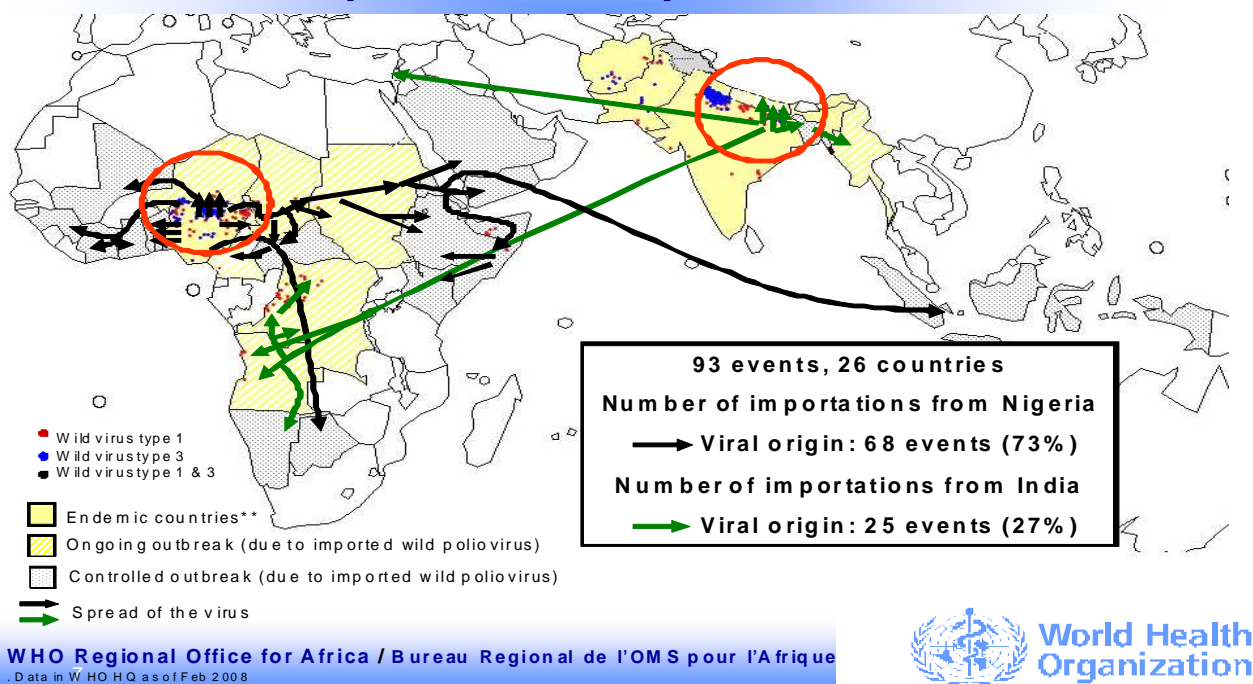
- Έως τις 18 Ιουνίου του 2008, είχε παρατηρηθεί μια εννεαπλάσια αύξηση των κρουσμάτων πολιομυελίτιδας οφειλόμενης στο συγκεκριμένο ορότυπο, σε σύγκριση με την αντίστοιχη περίοδο του περασμένου έτους.

Η νέα αυτή επιδημία στη Νιγηρία λαμβάνει χώρα εξαιτίας της μη ανοσοποίησης των παιδιών, τα οποία κατοικούν σε διάφορες περιοχές στα βόρεια τμήματα της χώρας.

- Την περίοδο 2003-2006, μία επιδημία στην περιοχή της βόρειας Νιγηρίας οδήγησε σε μια εθνική και διεθνή μετάδοση της ασθένειας, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί επανεμφάνισή της σε 20 χώρες στις οποίες είχε εξαλειφθεί ο ιός της πολιομυελίτιδας.

Ο κίνδυνος μιας νέας μετάδοσης του ιού σε διεθνές επίπεδο, από τη Νιγηρία σε άλλες περιοχές, ενισχύεται, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των κρουσμάτων στη βόρεια Νιγηρία την περίοδο των τροπικών βροχοπτώσεων, η οποία σχετίζεται με αυξημένη δυνατότητα μετάδοσης του ιού, και την μετακίνηση μεγάλου αριθμού προσκυνητών προς τη Μέκκα.

Wild poliovirus spread, 2003-08



Οι προσπάθειες που έγιναν το 2009 δεν κατάφεραν να εξαλείψουν τελείως τα κρούσματα, όμως το 2010 καταγράφηκαν μόνο 2 κρούσματα.

6. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

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

-IPV: Το IPV ανακαλύφθηκε από τον Jonas Salk το 1955. Το απενεργοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine) προέκυψε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεύδη. Το IPV διεγείρει την παραγωγή

αντισωμάτων στον ορό του αίματος (χορηγείται με ενδομυϊκή ένεση), παρεμποδίζοντας έτσι τους πολιοιούς να φτάσουν στα νευρικά κύτταρα. Το IPV είναι ασφαλές και επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Δυστυχώς ωστόσο, το IPV επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία και για αυτό δεν είναι αποτελεσματικό για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό (Blondel et al. 1998).

-OPV: Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) σε αναλογία 10:1:6 αντίστοιχα τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A.B Sabin ύστερα από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων *in vitro* και *in vivo* κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Με την είσοδο τους στον άνθρωπο πολλαπλασιάζονται στην περιοχή του στόμαχου επάγοντας χυμική ανοσία σε όλο το γαστρεντερικό σύστημα με συνεπακόλουθη αναστολή του πολλαπλασιασμού του ιού. Μια δόση εμβολίου επάγει ανοσία σε ποσοστό 50%, ενώ 3 δόσεις σε ποσοστό 95%.



Εικόνα: Ο David Beckham δίνει ένα OPV εμβόλιο σε ένα νεογέννητο.

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

OPV και VAPP

Η επιτυχία του εμβολίου επισκιάζεται από το σπάνιο φαινόμενο, όπου τα στελέχη του μεταλλάσσονται ή μεταστρέφονται σε νευροτοξικά, με αποτέλεσμα την νόσο της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Η ασθένεια αυτή αναφέρεται ως εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) η οποία επηρεάζει είτε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε μη εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, λόγω σημειακών μεταλλάξεων και γενετικού ανασυνδυασμού.

Έχει βρεθεί ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κυρίως σε εκείνες τις περιοχές του ιικού γενώματος που κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (P2 και P3 περιοχές) (Cuervo NS et al. 2001, Guillot et al. 2000). Μία πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου στηρίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το καψίδιο είναι οι πιο ποικιλόμορφες μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών (δυσμενή συνθήκη για ομόλογο ανασυνδυασμό) και επιπλέον η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων του καψιδίου είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία των προδρόμων τους (Rohit Duggal and Eckard Wimmer 1999). Ωστόσο, σε κάποιες πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμός έχει εντοπιστεί στα άκρα της περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο (P1) (Blomqvist et al. 2003, Cherkasova et al. 2002, Martin et al. 2002). Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων στελεχών χαρακτηρίζονται μόνο από μία θέση ανασυνδυασμού, υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις στις οποίες έχουν εντοπιστεί πολλαπλά σημεία ανασυνδυασμού (Georgescu et al. 1995, Karakasiliotis et al. 2004).

Ο συνεχής γενετικός χαρακτηρισμός στελεχών πολιοϊών που απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις και υγιή άτομα ίσως βοηθήσει στην διαλεύκανση των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων παραγόντων του ιού και του ξενιστή που είναι σημαντικές για την εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας (F. Friedrich 1996).

7. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

7.1 Μεταλλάξεις

Η πολυμεράση των πολιοϊών, η 3Dpol, δεν έχει διορθωτικές ικανότητες και η συχνότητα λάθους σε κάθε κύκλο αντιγραφής είναι περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση. Έτσι, οι πολιοϊοί εμφανίζουν έναν υψηλό ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων : $6,3 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές

υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες (Figlerowicz et al. 2003). Οι περισσότερες μεταλλάξεις εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP4 (οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό του καψιδίου και δέχονται αντιγονική πίεση) καθώς και στην 5' UTR περιοχή με εξαίρεση τις cis δραστικές περιοχές cloverleaf και IRES. (Martin and Minor, 2002).

Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη. Οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις που οδηγούν σε αλλαγές στο "νόημα" των κωδικονίων (μη-συνώνυμες μεταλλάξεις) είναι λιγότερο πιθανό να είναι ουδέτερες σε σύγκριση με τις υποκαταστάσεις που δεν επηρεάζουν το "νόημα" των κωδικονίων (συνώνυμες μεταλλάξεις). Η εγκαθίδρυση μεταλλάξεων που παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα είναι εύκολα κατανοητή στα πλαίσια της θετικής επιλογής του Δαρβίνου. Αντίθετα, μεταλλάξεις που παρέχουν ένα επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται από την αρνητική επιλογή, (E. Domingo and J. J Holland 1997).

7.2 Ανασυνδυασμός

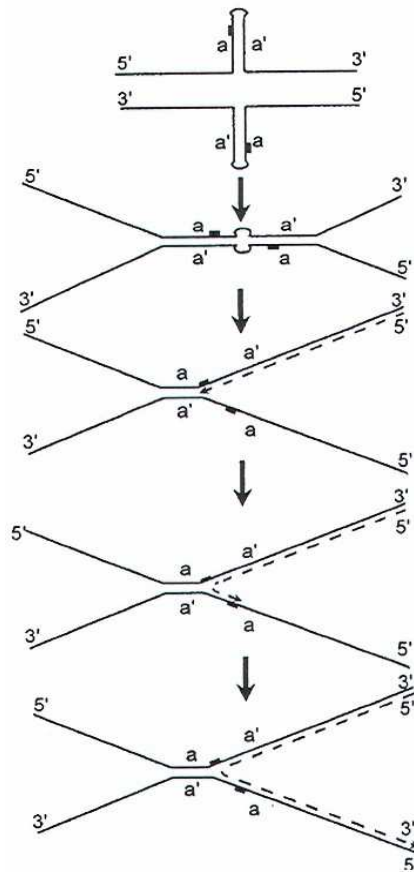
Ανασυνδυασμός είναι μια διαδικασία που οδηγεί στην παραγωγή ενός νέου γενώματος, που προέρχεται από δύο γονικά γονιδιώματα. Ο ανασυνδυασμός των ιικών γενωμάτων λαμβάνει χώρα σε κύτταρα συν-μολυσμένα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου είτε διαφορετικών οροτύπων. Ο καλύτερος τρόπος αναζήτησης ανασυνδυεμένων πολιοϊών είναι η μελέτη των περιπτώσεων VAPP. Αυτό οφείλεται στο ότι το εμβόλιο OPV περιέχει και τους 3 οροτύπους με αποτέλεσμα να ευνοεί την ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου με διάφορους συνδυασμούς οροτύπων.

Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό:

1) ο αντιγραφικός μηχανισμός (replicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA και ξαφνικά σταματά και ξανασυνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch).

2) ο μη-αντιγραφικός μηχανισμός (nonreplicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από την σύνδεση προσυντιθέμενων RNA τμημάτων προερχόμενων από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων.

Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών και επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή και ακόμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (Wimmer et al. 1993).



Εικόνα 8.2.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτο-συμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως a και a'. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντιθέμενο RNA μόριο (Από V. I. Agol 1997).

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων στις VP4, VP2 και VP3 περιοχές του γενόματος εμβολιακών στελεχών πολιοϊών (Sabin) και η ερμηνεία του ρόλου τους στην αρμοστικότητα των Sabin στελεχών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλινικά δείγματα

Για την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 11 κλινικά δείγματα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο ορότυπος του κάθε δείγματος ο οποίος ήταν ήδη γνωστός καθώς είχε προηγηθεί η διαδικασία της οροεξουδετέρωσης. Επίσης φαίνεται ο γενότυπος των δειγμάτων ο οποίος ήταν ήδη γνωστός.

Πίνακας 1. 1: Φαίνεται ο ορότυπος και ο γενότυπος των κλινικών δειγμάτων.

Ορότυπος	Γενότυπος	Δείγμα
P1	s1	742
P1	s1	522
P1	s1	ii
P2	s2	i34
P2	s2	580
P2	s2	iD
P2	s2	8001
P3	s3	738
P3	s3	584
P3	s3	581
P3	s3	744

2. Καλλιέργεια των ιών

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε erppendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π. χ στο πρώτο erppendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο erppendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erppendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των erppendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (εικόνα 2.1) οι οποίες περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε erppendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού κυτταροπαθολογικού φαινομένου (CPE: cytopathic effect) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Hep2 με θρεπτικό υλικό MEM-D). Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας της όσο το δυνατόν μεγαλύτερης αραιώσης με CPE ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες που περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό. Οι πλαστικές φιάλες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (μη ενοφθαλμισμένες πλαστικές φιάλες με κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό

υλικό MEM-D με 10% ορό). Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι πλαστικές φιάλες διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού. Σκοπός των σειριακών αραιώσεων και του ενοφθαλμισμού των πλαστικών φιαλών με την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αραιώση είναι η αποφυγή μιγμάτων του ιού καθώς όπως αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικό των πολιοϊών η ύπαρξή τους ως quasi-species.

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

Εικόνα 2.1: Απεικονίζεται μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην οποία έγινε ο ενοφθαλμισμός των σειριακών αραιώσεων των κλινικών δειγμάτων. Η κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 4 δειγμάτων (AB: το πρώτο δείγμα, CD: το δεύτερο δείγμα, EF: το τρίτο δείγμα, GH: το τέταρτο δείγμα). Οι αριθμοί μέσα στα πηγαδάκια απεικονίζουν τις σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων ενώ με το γράμμα M απεικονίζεται η θέση των μαρτύρων.

3. Εκχύλιση RNA

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

4. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

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

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N9) (Takara) (50nmol/ μl) (1μl/tube), 10mM dNTPs (1μl/tube) και ddH₂O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5 λεπτά σε ειδικό μηχάνημα. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M DTT (2μl/tube) και RNase out (20units/μl) (0,5μl/tube), ddH₂O (1μl/tube) και RT (100units/μl) (Invitrogen) (0,5μl/tube). Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δευτέρου μίγματος σε κάθε eppendorf, ξανά φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 12 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 42 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR αποτελεί μια επαναστατική ανακάλυψη της Μοριακής Βιολογίας, η οποία σταδιακά αποκτά συνεχώς διευρυνόμενες κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές. Εφαρμόστηκε αρχικά από τον εφευρέτη Kary Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993.

Έχει πάρει το όνομά της από ένα αντιδραστήριο που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση αυτή, την DNA πολυμεράση, η οποία είναι ένζυμο που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος. Οδηγεί στην απομόνωση και στον πολλαπλασιασμό μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους. Οι περισσότερες εφαρμογές της PCR χρησιμοποιούν θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση – Taq DNA πολυμεράση – και θερμοκυκλοποιητή.

Η PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων (primers). Επειδή σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη τριών δομικών περιοχών των στελεχών Sabin (VP2, VP3 και VP4), ήταν απαραίτητη η ενίσχυσή τους με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Στον πίνακα 5.1 δίνονται οι πληροφορίες όσον αφορά την θέση των αντίστοιχων γονιδίων.

Sabin 1	
vp4	743-949
vp2	950-1765
vp3	1766-2479
sabin 2	
vp4	748-954
vp2	955-1767
vp3	1768-2481
Sabin 3	
vp4	743-949
vp2	950-1762
vp3	1763-2476

Πίνακας 5.1

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι πληροφορίες όσον αφορά την αλληλουχία των primers, τον τύπο του Sabin στελέχους που αναγνωρίζουν, το μήκος του PCR προϊόντος και το Tm τους.

Στέλεχος που αναγνωρίζει	Primers	Αλληλουχία	Μήκος PCR προϊόντος	Tm
sabin 1	s1 23 κ.	323-GAGTCTGGACATCCCTCACC-342	653 bp	64
sabin 1	s1 976 α.	957-TACCCGCAAGCCTCTATGTT-976		60
sabin 1	S ₁ 82 κ.	882-CTCAAGACCCTTCCAAGTTCA-902	660bp	62

sabin 1	S ₁ 542 α.	1523-ATTATCTGGTGC GGGAACAC-1542		60
sabin 1	S ₁ 350 κ.	1350-GGGATAGCAACACCACTACCA-1370	343bp	64
sabin 1	S ₁ 693 α.	1675-TGGAATCTCTGGGGAGGAC-1693		60
sabin 1	S ₁ 476 κ.	1476- CGGTGGATTACCTCTTTGGA-1495	678 bp	60
sabin 1	S ₁ 154 α.	2136-AGTTTGC CAGTTGCCATCA-2154		56
sabin 1	S ₁ 013 κ.	2013-TCTGCCTGTCACTCTCTCCA-2032	656bp	62
sabin 1	S ₁ 669 α.	2648-TGGTTTGC ACTGTATCAGAAGG-2669		64
sabin 2	S ₂ 397κ	396-CGTTAGATGTGAACAAGGTGTG-417	625bp	64
sabin 2	S ₂ 021α.	1002-TCGTTGAATTGCC CAGAGTT-1021		58
sabin 2	S ₂ 753κ.	753-CGCCCCAAGTTTCATCACA-770	648bp	54
sabin 2	S ₂ 401α	1381-TGGATTTCGCA TTCTCGTACTT-1401		60
sabin 2	S ₂ 253κ.	1253-ATCTTGGGAGGGCTGGCTAC-1272	780bp	64
sabin 2	S ₂ 033α.	2014-GGGGACAACGAGAGACACAA-2033		62
sabin 2	S ₂ 914κ.	1914-AGACACCATGATACCCCTCAA-1934	655bp	62
sabin 2	S ₂ 569α.	2551-GTCCAGGCAGGCTATTGGT-2569		60
sabin 3	S ₃ 309 κ.	309-GTAGCTTGGGCCGATGAGT-327	735bp	60
sabin 3	S ₃ 044 α.	1025-ACTGAATTTGCTGCCTCCTG-1044		60
sabin 3	S ₃ 936 κ.	936-CTCCAGCACTCAATTCACCA-955	574bp	60
sabin 3	S ₃ 510 α.	1491-TCCCAGTAACACCCACATC-1510		62
sabin 3	S ₃ 78 κ.	1378-TTATGCAAATGCGAATCCAG-1397	486bp	56
sabin 3	S ₃ 864 α.	1844-AATAGGCGGAGTGACATCAAA-1864		60
sabin 3	S ₃ 709 κ.	1709-CCCAATGTGTAGCGAGTTCA-1728	509bp	60
sabin 3	S ₃ 218 α.	2200-GTGCCCAACATAGCCTCCT-2218		60
sabin 3	S ₃ 40 κ.	2140-TACGGGGAAAATCCTAGTGG-2159	519bp	60
sabin 3	S ₃ 659 α.	2640-CGTTTGA ACTGTGTCGGATG-2659		60

Πίνακας 5.2: Το κ. που βρίσκεται δίπλα από το όνομα του κάθε εκκινητή υποδεικνύει τον sense primer και το α. τον antisense primer. Επίσης στα άκρα της αλληλουχίας φαίνεται η θέση πρόσδεσης.

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Pac Buffer 10x), 2μl primers (1 μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2 Units ενζύμου DNA πολυμεράσης (Pac5000 strategene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -30 δευτερόλεπτα στους 55 °C για τον υβριδισμό των primers στους κλώνους του cDNA (το 55 °C είναι ενδεικτικό. Η πραγματική θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε PCR υπολογίστηκε με τη σχέση $T_a = T_m \text{ primer} - 5$ -30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	5 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Σε μια τυπική αντίδραση, πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στο στάδιο έναρξης με θέρμανση στους 94-96°C για 1-5 λεπτά. Το στάδιο της αποδιάταξης, που αποτελεί το πρώτο βήμα των κυκλικών γεγονότων θέρμανσης και ψύξης, γίνεται σε θερμοκρασία 94-98°C για 30 δευτερόλεπτα-1 λεπτό. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται σπάσιμο των υδρογονικών δεσμών και κατ' επέκταση αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA. Στη συνέχεια, στο στάδιο υβριδισμού εκκινητών, οι εκκινητές σε περίσσια υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50-65°C για 30 δευτερόλεπτα-1 λεπτό. Η πολυμεράση συνδέεται στο υβρίδιο του εκκινητή και της μονόκλωνης αλυσίδας και αρχίζει τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας το 3' ελεύθερο άκρο του εκκινητή. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για το στάδιο επιμήκυνσης των εκκινητών από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Η πολυμεράση συνθέτει μια νέα αλυσίδα DNA, προσθέτοντας dNTPs, τα οποία είναι συμπληρωματικά στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA, με κατεύθυνση 5' → 3'. Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο τελικής επιμήκυνσης, το οποίο λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία επίσης 72°C για 5-15 λεπτά και συμβαίνει μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR, ώστε οποιαδήποτε μονόκλωνη αλυσίδα DNA να επεκταθεί πλήρως. Τέλος, έχουμε το τελικό στάδιο σε θερμοκρασία 4°C για ακαθόριστο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας την προσωρινή αποθήκευση της αντίδρασης.

6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κ.α.

Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια διαδικασία που ακολουθεί τις αντιδράσεις PCR, για ποιοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων αντιδράσεων. Χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση της ενίσχυσης προϊόντων που θα χρησιμοποιήσουμε κατά την αλληλούχιση.

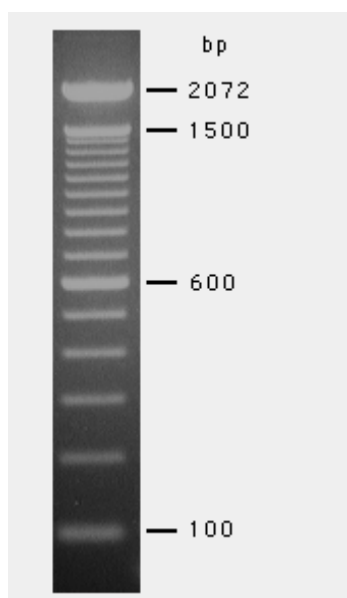
Η πηκτή, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, εισαγόταν σε οριζόντιες δεξαμενές. Την πηκτή, διαπερνούσε ηλεκτρικό ρεύμα 100Volts, το οποίο ανάγκαζε το αρνητικά φορτισμένο DNA, να μετακινηθεί από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση αυτή οδηγούσε σε διαχωρισμό των τμημάτων του DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Κομμάτια DNA μικρότερου μεγέθους κινούνται γρηγορότερα από κομμάτια μεγαλύτερου μεγέθους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA.

Στη συνέχεια, με τη χρήση συσκευής με UV ακτινοβολία, η οποία ανιχνεύει το βρωμιούχο αιθίδιο, οπτικοποιούμε το DNA και φωτογραφίζουμε τα αποτελέσματά μας. Το βρωμιούχο αιθίδιο συνδέεται ισχυρά με το DNA παρεμβαίνοντας ανάμεσα στις δίκλωνες βάσεις και απορροφά στο άορατο υπεριώδες φως ενώ εκπέμπει στο ορατό πορτοκαλί φως.

Για την παρατήρηση της μετακίνησης των τμημάτων του DNA κατά την εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης γίνεται ανάμιξη του προϊόντος της PCR με το βρωμιούχο αιθίδιο πριν τη μεταφορά του στα πηγαδάκια.

Τα προϊόντα των προϊόντων PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης [INVITROGEN AGAROSE]. Το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA). Επίσης προστέθηκαν 100μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl). Στα πηγαδάκια του πηκτώματος φορτώνουμε 10μl από κάθε προϊόν PCR, αναμεμιγμένα με κατάλληλο

διάλυμα χρωστικής. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 7μl μάρτυρα μοριακού βάρους της εταιρίας INVITROGEN (100 bp DNA Ladder). Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόζεται τάση 100V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε κατάλληλη συσκευή υπεριωδών ακτίνων.



Εικόνα 7. 1: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 bp DNA Ladder

7. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των δειγμάτων έγινε με το QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT της εταιρίας QIAGEN

8. Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR

Ο όρος αλληλούχιση DNA αλληλουχιών αναφέρεται σε βιοχημικές μεθόδους, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της σειράς των νουκλεοτιδικών βάσεων σε μια αλληλουχία DNA. Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen στην Κορέα.

9. Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

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

Στην συγκεκριμένη εργασία το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την στοίχιση των κατατεθειμένων αλληλουχιών των VP4, VP3 και VP2 περιοχών των προτύπων στελεχών S1(AY184219), S2(AY184220) και S3(AY184221) με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλλούχιση των δειγμάτων. Η διαδικασία έγινε ως εξής: αρχικά έγινε στοίχιση χωριστά της κάθε αλληλουχίας με κάθε ζεύγος εκκινητών των δειγμάτων με ολόκληρο το γονιδίωμα του εκάστοτε προτύπου κατατεθειμένου στέλεχους που αντιστοιχούσε. Στη συνέχεια έγινε σύρραψη των αλληλουχιών των δειγμάτων με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος (δες παρακάτω). Κατόπιν η κάθε γενωμική περιοχή (πχ. VP4) του κάθε δείγματος στοιχήθηκε πάλι με ολόκληρο το γονιδίωμα του εκάστοτε προτύπου κατατεθειμένου στελέχους. Οι νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών αποτελούσαν μεταλλάξεις των εμβολιακών στελεχών που μελετήσαμε. Τέλος το πρόγραμμα clustalw χρησιμοποιήθηκε για την στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των VP4, VP3 και VP2 περιοχών των δειγμάτων μας με τις αλληλουχίες των VP4, VP3 και VP2 περιοχών των αντίστοιχων κατατεθειμένων προτύπων στελεχών για τον εντοπισμό τυχόν αμινοξικών διαφορών.

-Gene Runner V. 3.05: είναι ένα πρόγραμμα με πολλές ιδιότητες. Στην συγκεκριμένη εργασία το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των VP4, VP3 και VP2 περιοχών των δειγμάτων μας στα 3 πιθανά πλαίσια ανάγνωσης από τα οποία επιλέξαμε εκείνο το πλαίσιο που δεν περιείχε κωδικόνιο λήξης. Επίσης το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την σύρραψη των αλληλουχιών των δειγμάτων μας.

-Rasmol V. 2.7.1.1: είναι ένα πρόγραμμα που επιτρέπει την απεικόνιση τρισδιάστατων δομών. Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού και με τη χρήση των κατατεθειμένων στην pdb δομών 1ASJ.pdb (πολιοϊός αγρίου τύπου 1) και IVBE (sabin τύπου 3) απεικονίσαμε τις θέσεις των αμινοξικών αλλαγών ώστε να μπορούμε να προσδιορίσουμε το ρόλο τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών.

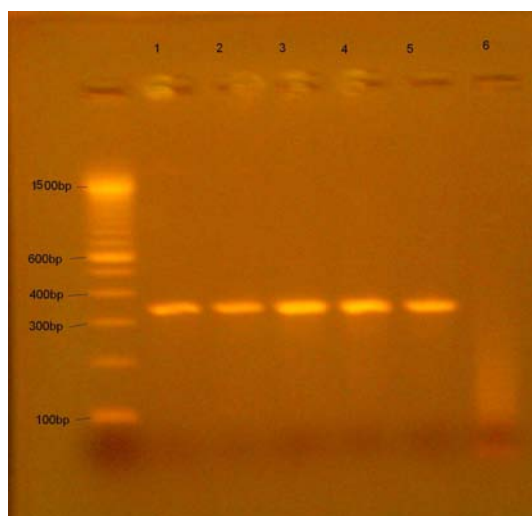
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αποτελέσματα PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την ενίσχυση των VP4, VP2 και VP3 περιοχών χρησιμοποιήθηκαν 14 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών .

Στέλεχος που αναγνωρίζει	Primers	Αλληλουχία	Μήκος PCR προϊόντος	Tm
sabin 1	s1 23 κ.	323-GAGTCTGGACATCCCCTCACC-342	653 bp	64
sabin 1	s1 976 α.	957-TACCCGCAAGCCTCTATGTT-976		60
sabin 1	S ₁ 82 κ.	882-CTCAAGACCCTTCCAAGTTCA-902	660bp	62
sabin 1	S ₁ 542 α.	1523-ATTATCTGGTGC GGGAACAC-1542		60
sabin 1	S ₁ 350 κ.	1350-GGGATAGCAACACCACTACCA-1370	343bp	64
sabin 1	S ₁ 693 α.	1675-TGGAATCTCTGGGGAGGAC-1693		60
sabin 1	S ₁ 476 κ.	1476- CGGTGGATTACCTCTTTGGA-1495	678 bp	60
sabin 1	S ₁ 154 α.	2136-AGTTTGCCAGTTGCCATCA-2154		56
sabin 1	S ₁ 013 κ.	2013-TCTGCCTGTCACTCTCTCCA-2032	656bp	62
sabin 1	S ₁ 669 α.	2648-TGGTTTGCCTGTATCAGAAGG-2669		64
sabin 2	S ₂ 397κ	396-CGTTAGATGTGAACAAGGTGTG-417	625bp	64
sabin 2	S ₂ 021α.	1002-TCGTTGAATTGCCCAGAGTT-1021		58
sabin 2	S ₂ 753κ.	753-CGCCCAAGTTTCATCACA-770	648bp	54
sabin 2	S ₂ 401α	1381-TGGATTCGCATTCTCGTACTT-1401		60
sabin 2	S ₂ 253κ.	1253-ATCTTGGGAGGGCTGGCTAC-1272	780bp	64
sabin 2	S ₂ 033α.	2014-GGGGACAACGAGAGACACAA-2033		62
sabin 2	S ₂ 914κ.	1914-AGACACCATGATACCCCTCAA-1934	655bp	62
sabin 2	S ₂ 569α.	2551-GTCCAGGCAGGCTATTGGT-2569		60
sabin 3	S ₃ 309 κ.	309-GTAGCTTGGGCCGATGAGT-327	735bp	60
sabin 3	S ₃ 044 α.	1025-ACTGAATTTGCTGCCTCCTG-1044		60
sabin 3	S ₃ 936 κ.	936-CTCCAGCACTCAATCACCA-955	574bp	60
sabin 3	S ₃ 510 α.	1491-TCCCAGTAACCCCCACATC-1510		62
sabin 3	S ₃ 78 κ.	1378-TTATGCAAATGCGAATCCAG-1397	486bp	56
sabin 3	S ₃ 864 α.	1844-AATAGGCGGAGTGACATCAAA-1864		60
sabin 3	S ₃ 709 κ.	1709-CCCAATGTGTAGCGAGTCA-1728	509bp	60
sabin 3	S ₃ 218 α.	2200-GTGCCCAACATAGCCTCCT-2218		60
sabin 3	S ₃ 40 κ.	2140-TACGGGGAAAATCCTAGTGG-2159	519bp	60
sabin 3	S ₃ 659 α.	2640-CGTTTGAAGTGTGTCGGATG-2659		60

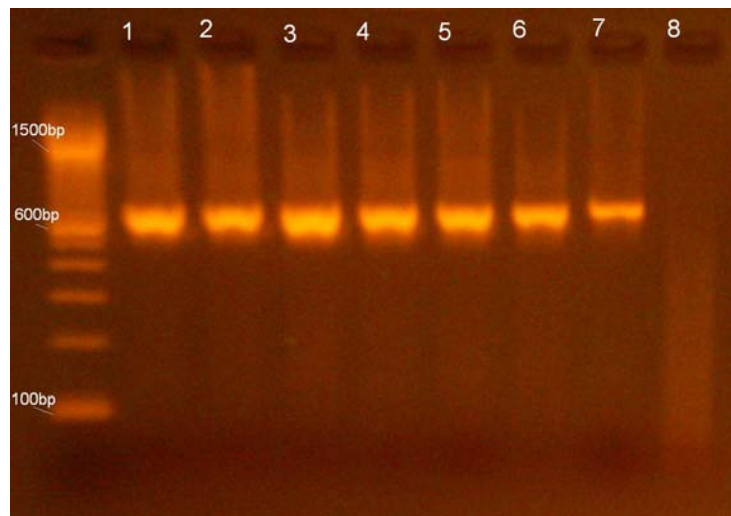
Παρακάτω φαίνονται φωτογραφίες από PCR με μερικά ενδεικτικά ζεύγη εκκινητών .



Ζεύγος S₁350/S₁693

(Lanes 1-5: PCR προϊόντα 343 bp,

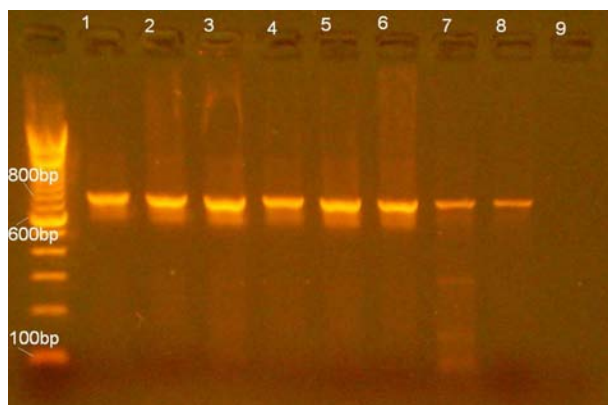
Lane 6: αρνητικός μάρτυρας).



Ζεύγος S₂914/S₂569,

(Lanes 1-7: PCR προϊόντα 655 bp,

Lane 8: αρνητικός μάρτυρας) .



Ζεύγος S₃309/S₃044

(Lanes 1-8: PCR προϊόντα 735 bp,

Lane 9: αρνητικός μάρτυρας).

2. Αποτελέσματα ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Όπως αναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για στοίχιση (μέσω του clustalw) με τις αλληλουχίες των κατατεθειμένων πρότυπων στελεχών Sabin με σκοπό την εύρεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών μεταλλάξεων. Παρακάτω απεικονίζεται η

στοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP2 περιοχής του δείγματος 581 με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin 3.

```

581_VP2      -----TCACCAAATGT 11
Sabin3      CACCGAGCCACTAAAGGACGTGCTCATAAAAACAGCTCCAGCACTCAATTCACCAAATGT 960
                                           *****

581_VP2      GGAAGCGTGTGGGTATAGTGATAGAGTGTGCAACTCACTTTAGGCAATTCACCTATTAC 71
Sabin3      GGAAGCGTGTGGGTATAGTGATAGAGTGTGCAACTCACTTTAGGCAATTCACCTATTAC 1020
*****

581_VP2      TACACAGGAGGCAGCAAATTCAGTAGTGGCTTACGGACGTTGGCCTGAGTTTATTAGAGA 131
Sabin3      TACACAGGAGGCAGCAAATTCAGTAGTGGCTTACGGACGTTGGCCTGAGTTTATTAGAGA 1080
*****

581_VP2      TGACGAAGCAAACCCGGTGGACCAACCAACTGAACCAGATGTGGCTACATGCAGATTCTA 191
Sabin3      TGACGAAGCAAACCCGGTGGACCAACCAACTGAACCAGATGTGGCTACATGCAGATTCTA 1140
*****

581_VP2      CACACTAGACACTGTAATGTGGGGTAAGGAGTCGAAAGGCTGGTGGTGGAAAGTTACCTGA 251
Sabin3      CACACTAGACACTGTAATGTGGGGTAAGGAGTCGAAAGGCTGGTGGTGGAAAGTTACCTGA 1200
*****

581_VP2      CGCACTGAGAGACATGGGTCTGTTTGGACAAAACATGTATTACCACTACCTAGGAAGATC 311
Sabin3      CGCACTGAGAGACATGGGTCTGTTTGGACAAAACATGTATTACCACTACCTAGGAAGATC 1260
*****

581_VP2      CGGGTACACTGTGCACGTGCAGTGTAAATGCATCCAAATTCACCAAGGTGCACTCGGGGT 371
Sabin3      CGGGTACACTGTGCACGTGCAGTGTAAATGCATCCAAATTCACCAAGGTGCACTCGGGGT 1320
*****

581_VP2      GTTTGCGATTCCCTGAGTATTGTCTGGCGGGTGACAGTGACAAGCAAAGGTACACTAGTTA 431
Sabin3      GTTTGCGATTCCCTGAGTATTGTCTGGCGGGTGACAGTGACAAGCAAAGGTACACTAGTTA 1380
*****

581_VP2      TGCAAATGCGAATCCAGGTGAAAGAGGGGGAAAAATTTTACTCCCAATTCACAAGGATAA 491
Sabin3      TGCAAATGCGAATCCAGGTGAAAGAGGGGGAAAAATTTTACTCCCAATTCACAAGGATAA 1440
*****

```

```

581_VP2      CGCAGTAACATCCCCAAAAAGAGAGTTCTGCCAGTGGATTATCTCCTGGGATGTGGGGT 551
Sabin3      CGCAGTAACATCCCCAAAAAGAGAGTTCTGCCAGTGGATTATCTCCTGGGATGTGGGGT 1500
*****

581_VP2      GTTACTGGGAAATGCCTTTGTATAACCCACATCAAATCATTAATCTGAGGACCAACAACAG 611
Sabin3      GTTACTGGGAAATGCCTTTGTATAACCCACATCAAATCATTAATCTGAGGACCAACAACAG 1560
*****

581_VP2      CGCAACTATTGTCCTACCATATGTGAATGCTATGGCCATTGATTCAATGGTTAAACACAA 671
Sabin3      CGCAACTATTGTCCTACCATATGTGAATGCTTTGGCCATTGATTCAATGGTTAAACACAA 1620
*****

581_VP2      CAACTGGGGCATTGCCATTCTGCCCTTATCACCGCTGGATTTTGCTCAAGATTCATCAGT 731
Sabin3      CAACTGGGGCATTGCCATTCTGCCCTTATCACCGCTGGATTTTGCTCAAGATTCATCAGT 1680
*****

581_VP2      TGAAATTCCAATTACTGTGACAATTGCCCAATGTGTAGCGAGTTCAACGGCCTTCGCAA 791
Sabin3      TGAAATTCCAATTACTGTGACAATTGCCCAATGTGTAGCGAGTTCAACGGCCTTCGCAA 1740
*****

581_VP2      CGTGACTIONCACCTAAATTTCAA----- 813
Sabin3      CGTGACTIONCACCTAAATTTCAAGGACTACCAGTGTGTAACACTCCTGGTAGTAACCAGTA 1800
*****

```

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

Παρακάτω απεικονίζεται η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της VP2 του δείγματος 581 με την VP2 του πρότυπου στελέχους Sabin 3. Όπως ήδη αναφέρθηκε η αμινοξική αλληλουχία όλων των δειγμάτων ανακτήθηκε μέσω του προγράμματος GeneRunner.

```

581      SPNVEACGYSDRVLQLTLGNSTITTTQEAANSVVAYGRWPEFIRDDEANPVDQPTPEPDVAT 60
sabin3  SPNVEACGYSDRVLQLTLGNSTITTTQEAANSVVAYGRWPEFIRDDEANPVDQPTPEPDVAT 60
*****

581      CRFYTLDTVMWGKESKGGWWWKLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNASKFHQG 120
sabin3  CRFYTLDTVMWGKESKGGWWWKLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNASKFHQG 120
*****

```

```

581      ALGVFAIPEYCLAGDSDKQRYTSYANANPGERGGKFYSQFNKDNAVTSPKREFCPVDYLL 180
sabin3  ALGVFAIPEYCLAGDSDKQRYTSYANANPGERGGKFYSQFNKDNAVTSPKREFCPVDYLL 180
*****

581      GCGVLLGNAFVYPHQIINLRTNNSATIVLPYVNAMAIDSMVKHNNWGIAILPLSPLDFAQ 240
sabin3  GCGVLLGNAFVYPHQIINLRTNNSATIVLPYVNALAIIDSMVKHNNWGIAILPLSPLDFAQ 240
*****:*****

581      DSSVEIPITVTIAPMCSEFNGLRNVTPAKFQ 271
sabin   DSSVEIPITVTIAPMCSEFNGLRNVTPAKFQ 271
*****

```

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

Η παραπάνω διαδικασία έγινε για όλα τα δείγματα και επέτρεψε την ανίχνευση συνώνυμων και μη συνώνυμων μεταλλάξεων στις VP4, VP3 και VP2 γενωμικές περιοχές .

Παρακάτω παρατίθενται πίνακες με τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν.

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Γονίδιο	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη	Αμινοξική μετάλλαξη
Sabin1	522	Vp4	-	-
		VP2	C1119A	Asp56Glu
			G1207A	-
			G1479A	-
	522	VP3	C1695T	-
			G1775T	Val4Ile
			C1941A	Ala59 Glu
	II	VP3	G2003A	Asp 80Asn
			-	-
		VP4	-	-
Vp2			C1294T	-
Vp3	A1944C	Lys60Thr		
	C2002T	-		

			C2027T	-
	742	Vp4	-	-
		Vp2	C1441T	-
		Vp3	-	-

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Γονίδιο	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη	Αμινοξική μετάλλαξη
Sabin 2	580	Vp2	T1086C	-
	8001	Vp3	G1881A	Ile52Val
			A1924G	-
			A1926G	-
			G2067 A	-
			T2226C	-
			A2457C	Ile231Leu
		Vp4	T918C	-
		Vp2	T1086C	-
			G1185A	
			G1323A	
	C1749T			
	I34	Vp2	A1365T	--
			T1557C	
			T1569C	
			C1695A	
		Vp3	-	-
		Vp4	-	-
	ID	Vp4	-	-
		Vp2	A1365 G	-
		Vp3	G2028A	
			C2056T	His97Tyr
			T2448C	-
A2458C			Ile231Leu	

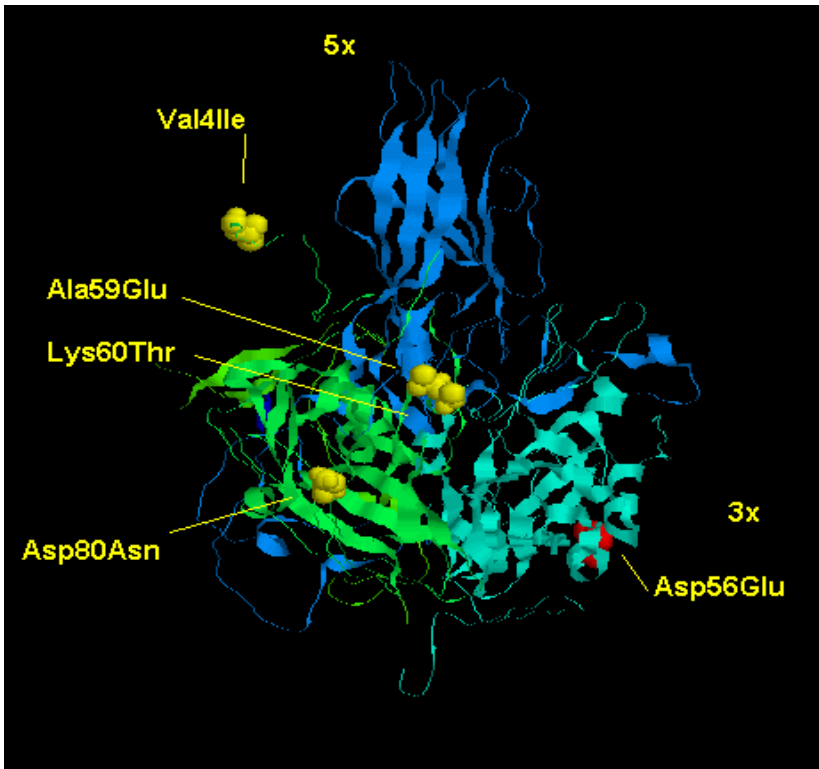
			A2461T	Ser232Gln
--	--	--	--------	-----------

Εμβολιακό στελεχος	Δείγμα	Γονίδιο	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη	Αμινοξική μετάλλαξη
Sabin3	581	VP4	-	-
		VP2	T1592A	Leu215Met
		Vp3	G2358A	-
	584	VP4	-	-
		VP2	T1592A	Leu 215 Met
		VP3	-	-
	738	VP4	-	-
		VP2	A1291G	-
		Vp3	G2386A	Ser209Asn
	744	Vp4	T790C	-
		Vp2	-	-
		Vp3	-	-

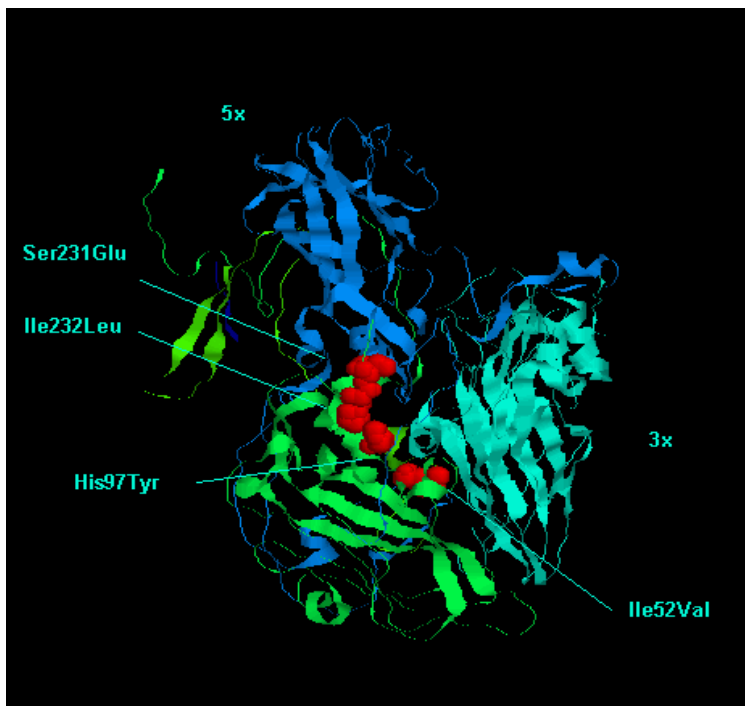
Πίνακας 2 : Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις όλων των δειγμάτων. Οι αριθμοί δηλώνουν τις θέσεις των μεταλλάξεων. Με μπλε χρώμα είναι τα νουκλεοτίδια των πρότυπων εμβολιακών στελεχών ενώ με κόκκινο τα αλλαγμένα νουκλεοτίδια των στελεχών που μελετήσαμε. Με κίτρινο χρώμα είναι τα αμινοξέα των πρότυπων εμβολιακών στελεχών ενώ με πράσινο τα αλλαγμένα αμινοξέα των στελεχών που μελετήσαμε.

3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων με Rasmol V. 2.7.1.1

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



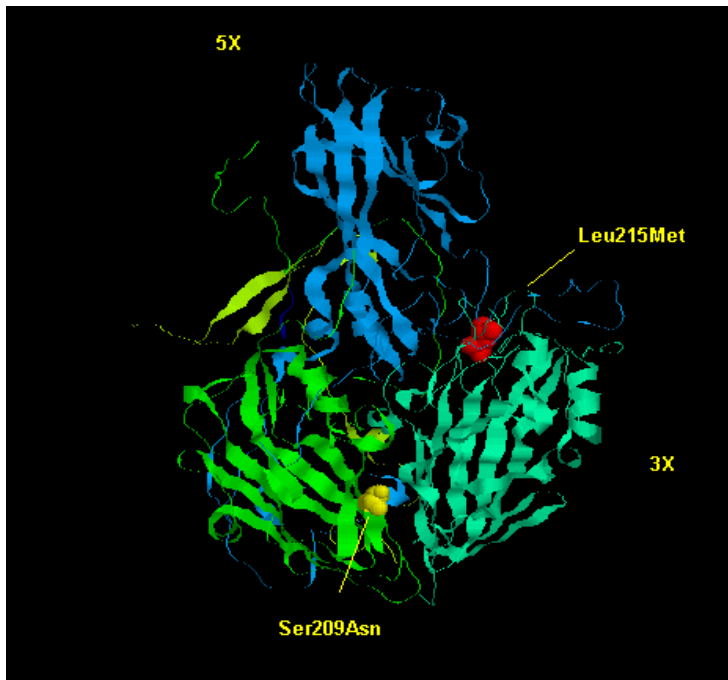
Εικόνα 3.1: Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 1 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό και η VP3 με πράσινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα στην VP2 περιοχή και κίτρινο στην VP3 .



Εικόνα 3.2: Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 2 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους

Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η

VP2 με κυανό, η VP3 με πράσινο και η VP4 με κίτρινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 3.3: Οι αμινοξικές αλλαγές των στελεχών Sabin3 αναπαρίστανται στην τρισδιαστατη δομή 1VBE.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό, η VP3 με πράσινο και η VP4 με κίτρινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα στην VP2 και κίτρινο στην VP3.

Με τη βοήθεια των εικόνων 3.1 3.2 και 3.3 αλλά και μέσω άλλων φωτογραφιών που απεικονίζουν τη δομή του πενταμερούς του ιού και ολόκληρου του καψιδίου ταξινομήσαμε τις αμινοξικές αλλαγές σε δύο κύριες κατηγορίες: 1) σε αυτές που βρίσκονται στο εξωτερικό του καψιδίου και 2) σε αυτές που βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου. Εξωτερικά είναι στα στελέχη Sabin1: οι Ala59Glu, Lys60Thr, Asp80Asn και Asp56Glu ενώ στα στελέχη Sabin 2 και Sabin 3 όλες. Εσωτερικά είναι η Val4Ile στα στελέχη Sabin1.

Συζήτηση

Από τις 40 συνολικά μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα κλινικά στελέχη μόνο οι 11 ήταν μη-συνώνυμες ενώ οι υπόλοιπες 29 ήταν συνώνυμες. Έτσι το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων (72,5%) ήταν συνώνυμες γεγονός το οποίο συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (Cherkasova et al. 2002, Figlerowicz et al. 2003). Οι συνώνυμες μεταλλάξεις παρά το γεγονός ότι δεν οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων δεν σημαίνει ότι είναι πάντα φαινοτυπικά ουδέτερες καθώς μπορεί να εντοπίζονται σε σημαντικές δευτεροταγείς δομές και έτσι να επηρεάζουν την βιολογία του ιού (Agol 2002). Επίσης οι περισσότερες μεταλλάξεις (28 από τις 40) είναι μεταπτώσεις (transitions) γεγονός το οποίο συμφωνεί με την τάση της 3D^{pol} να εισάγει κυρίως μεταπτώσεις κατά την ιική αντιγραφή (Agol 2002).

Σε όλα τα στελέχη δεν εμφανίστηκαν μη-συνώνυμες μεταλλάξεις στην VP4 γενωμική περιοχή και αυτό συμβαίνει γιατί η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου και δεν δέχεται αντιγονικές εξελικτικές πιέσεις επιλογής. Αντίθετα τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIΑ και N-AgIIIΒ (Diamond et al., 1985, Minor et al., 1986, Page et al., 1988, Wieggers and Dernic, 1992).

- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1.
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIΒ από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.

Οι μεταλλάξεις στα δείγματα μας που σχετίζονται με τις αντιγονικές θέσεις είναι:

Στέλεχος	Δείγμα	Γονίδιο	Μετάλλαξη	Αντιγονική θέση
Sabin 1	522	VP3	Ala59 Glu	N-AgIIIΑ
	II	VP3	Lys60Thr	N-AgIIIΑ
	522	VP3	Asp 80Asn	Κοντά στην N-AgIIIΒ
Sabin 2	8001	VP3	Ile52Val	Κοντά στην N-AgIIIΑ

Γενικά η συσσώρευση μεταλλάξεων στις αντιγονικές θέσεις του ιού είναι ένα συχνό φαινόμενο λόγω του γεγονότος ότι αυτές οι θέσεις είναι οι πιο εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς υφίστανται υψηλή αντιγονική πίεση. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στις θέσεις αυτές παρέχει στον ιό το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διαφεύγει της αναγνώρισης από τα αντισώματα του οργανισμού και συνεπώς να πολλαπλασιάζεται πιο αποτελεσματικά.

Στα στελέχη Sabin τύπου 1 (522 και II) εντοπίζονται 5 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις. Στα στελέχη Sabin τύπου 2 (8001 και ID) εντοπίζονται 5 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις (1 μετάλλαξη είναι ίδια σε 2 δείγματα) και στα στελέχη Sabin τύπου 3 (738, 584 και 581) εντοπίζονται 2 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις (1 μετάλλαξη είναι ίδια σε 2 δείγματα). Στα δείγματα 744, I34, 580 και 742 δεν εντοπίστηκαν μη-συνώνυμες μεταλλάξεις. Παρακάτω ακολουθεί μια περιγραφή των μη-συνώνυμων μεταλλάξεων όσον αφορά τον εντοπισμό τους στο καψίδιο και τον πιθανό ρόλο τους στην αρμοστικότητα των στελεχών.

Τα δείγματα των Sabin1 συγκεντρώνουν 5 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις από τις οποίες οι 4 (Ala59Glu, Lys60Thr, Asp80Asn και Asp56Glu) είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και μόνο μία (Val4Ile) εντοπίζεται στο εσωτερικό του (εικόνα 3.1). Οι μεταλλάξεις Ala59Glu, Lys60Thr εντοπίζονται στην αντιγονική θέση N-AgIIIΑ και η Asp80Asn κοντά στην αντιγονική θέση N-AgIIIΒ. Η μετάλλαξη Asp56Glu βρίσκεται στην VP2 περιοχή ενώ οι υπόλοιπες στην VP3. Οι μεταλλάξεις αυτές (εκτός τις μεταλλάξεις Asp56Glu και Val4Ile που είναι αμινοξέα με παρόμοιες ιδιότητες) αναμένεται να επηρεάζουν τον φαινότυπο καθώς εμπλέκουν αμινοξέα με διαφορετικές ιδιότητες. Η Αλανίνη (Ala) είναι μη πολικό αμινοξύ, το Γλουταμινικό οξύ (Glu) και το Ασπαργανικό οξύ (Asp) είναι όξινα, η Λυσίνη (Lys) βασικό ενώ η Θρεονίνη (thr) και Ασπαργανίνη (asn) είναι ουδέτερα πολικά αμινοξέα. Η μετάλλαξη Val4Ile βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της VP3 το οποίο όπως είναι γνωστό αλληλεπιδρά με τα αμινοτελικά άκρα των υπόλοιπων πρωτεϊνών (VP1, VP2, VP4) στο εσωτερικό του καψιδίου και αυτή η αλληλεπίδραση παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του (Pfister et al. 1999).

Τα δείγματα των Sabin2 συγκεντρώνουν 4 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις στην VP3 περιοχή. Οι μεταλλάξεις αυτές (Ile52Val, His97Tyr, Ile231Leu, Ser232Gln) είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου, και συγκεκριμένα οι His97Tyr, Ile231Leu, Ser232Gln βρίσκονται στην βάση της αύλακας (εικόνα 3.2) η οποία όπως αναφέρθηκε αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα ενώ η μετάλλαξη Ile52Val εντοπίζεται κοντά στην αντιγονική θέση N-AgIIIΒ. Οι μεταλλάξεις Ile231Leu, Ser232Gln και Ile52Val πιθανόν να έχουν μικρότερη επίδραση στο φαινότυπο καθώς εμπλέκουν αμινοξέα με παρόμοιες ιδιότητες ενώ αντίθετα η μετάλλαξη His97Tyr αναμένεται να τον επηρεάζει περισσότερο καθώς το αμινοξύ Ιστιδίνη (His) είναι βασικό και το αμινοξύ Τυροσίνη (Tyr) είναι όξινο.

Τα δείγματα των Sabin3 συγκεντρώνουν 2 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις. Την Leu215Met στην VP2 περιοχή στα δείγματα 584 και 581 και την Ser209Asn στην VP3 περιοχή στο δείγμα 738 (εικόνα 3.3) . Στο δείγμα 744 δεν παρουσιάστηκε καμία μη συνώνυμη μετάλλαξη. Και οι 2 μεταλλάξεις είναι με αμινοξέα που παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με τα αρχικά. Η μετάλλαξη Leu 215 Met βρίσκεται στην βάση της αύλακας ενώ η μετάλλαξη Ser209Asn όπως φαίνεται από το Rasmol εντοπίζεται στην διεπιφάνεια μεταξύ των πρωτεϊνών VP3 και VP2.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Papers:

- 1) **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- 2) **Barton, D. J., Murray, K. E., (2003).** *Poliovirus CRE-Dependent VPg Uridylylation Is Required* for Positive-Strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol.* 2003 Apr;77(8):4739-50.
- 3) **Basavappa R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 angstrom resolution. *Protein Sci.* 3:1651-1669.
- 4) **Blomqvist S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi. 2003.** Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* 84(3):573-580.
- 5) **Cherkasova E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002.** Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76(13):6791-6799.
- 6) **Choe S. S. and K. Kirkegaard. 2004.** Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* 78(11): 5973-5982.
- 7) **Déborah Prévôt, Didier Décimo, Cécile H. Herbreteau, Florence Roux, Jérôme Garin, Jean-Luc Darlix and Théophile Ohlmann** Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning *The EMBO Journal* (2003) 22, 1909 – 1921
- 8) **Diamond, C.D., Jameson, B. A., Bonin, J., Koara, M., Abes, S., Itoh, H., Komatsu, T., Arita, M., Kuges, S., Nomoto, A., Osterhaus, A.D.M.E., Crainic, R. & Wimmer, E. (1985).** Antigenic variation and resistance to neutralization in poliovirus type 1. *Science* 229, 109~1093.
- 9) **Duggal R. and E. Wimmer. 1999.** Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology* 258:30-41.
- 10) **Filman, D. J., Seed, R., Chow, M., Macadam, A., Minor, P. D. & Hogle, J. M. (1989).** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO Journal* 8, 1567-1579.

- 11) **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.
- 12) **Gamarnik A. and Andino R., (2000)** The Viral Protein 3CD Alters PCBP-RNA Interactions Within the Poliovirus 5' UTR, *J. Virology* 74, (5) 2219-2226
- 13) **Georgescu M. M., F. Delpeyroux, and R. Crainic. 1995.** Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* 76(9):2343-2348.
- 14) **Herold J. and R. Andino. 2001.** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.
- 15) **Hogle, J.M., Chow, M. & Filman, D.J.** Three-dimensional structure of polio virus at 2.9A resolution. *Science* 229, 1358–1565 (1985).
- 16) **Karakasiliotis I., P. Markoulatos, and T. Kartsorchis. 2004.** Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell Probes.* 18(2):103-109.
- 17) **Kerstin Ochs, Lanja Saleh, Gergis Bassili, Volker H. Sonntag, Amandus Zeller, and Michael Niepmann** *J. Virol.* March 2002 76: 2113-2122
- 18) **Krausslich H. G., C. Holscher, Q. Reuer, J. Harber, and E. Wimmer. 1990.** Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of the capsid and for viral infectivity. *J. Virol.* 64:2433-2436.
- 19) **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.
- 20) **Martin J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor. 2002.** Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76(21):1092-10928.
- 21) **Mendelsohn Cl, Wimmer E, Racaniello VR (1989).** "Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily". *Cell* 56 (5): 855–865.
- 22) **Minor, P.D., Ferguson, M., Evans, D. M. A., Almond, J.W. & Icenogle, J.P. (1986).** Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *Journal of General Virology* 67, 1283-1291.

- 23) **Morasco B. J., N. Sharma, J. Parilla, and J. B. Flanagan. 2003.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9): 5136-5144.
- 24) **Murray K. E. and D. J. Barton. 2003.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(8): 4739-4750.
- 25) **Page, S. G., Mosser, A. G., Hogle, J. M., Filman, D. J., Rueckert, R. R. & Crtow, M. (1988).** Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants. *Journal of Virology* 62, 1781-1794.
- 26) **Paul A. V., J. H. van Boom, D. Filippov, and E. Wimmer. 1998.** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *NATURE* 393: 280-284.
- 27) **Paul A. V., J. Yin, J. Mugavero, E. Rieder, Y. Liu, and E. Wimmer. 2003.** A 'Slide-back' mechanism for the initiation of Protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Biol. Chem.* 278(45): 43951-43960.
- 28) **Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993.** Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
- 29) **Wiegers, K. & Dernick, R. (1992).** Molecular basis of antigenic structures of poliovirus: Implications for their evolution during morphogenesis. *Journal of Virology* 66, 4597-1600.

Reviews:

- 1) **Agol V. I. 1997.** Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
- 2) **Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin. 1998.** Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* 4:1-26.
- 3) **Domingo E. and J. J. Holland. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
- 4) **Figlerowicz M, M. Magdalena Alejska, A. Kurzyn'ska-Kokorniak. 2003.** Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518.
- 5) **Friedrich F. 1996.** Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.

- 6) **Hogle, J. M., 2002.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.
- 7) **Nidia H De Jesus, 2007** Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis.(Review). *Virology Journal* July 10, 2007
- 8) **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. 1999.** Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.
- 9) **Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.

Books:

Virology: principles and applications, 2007 (John Carter, Venetia Saunders)