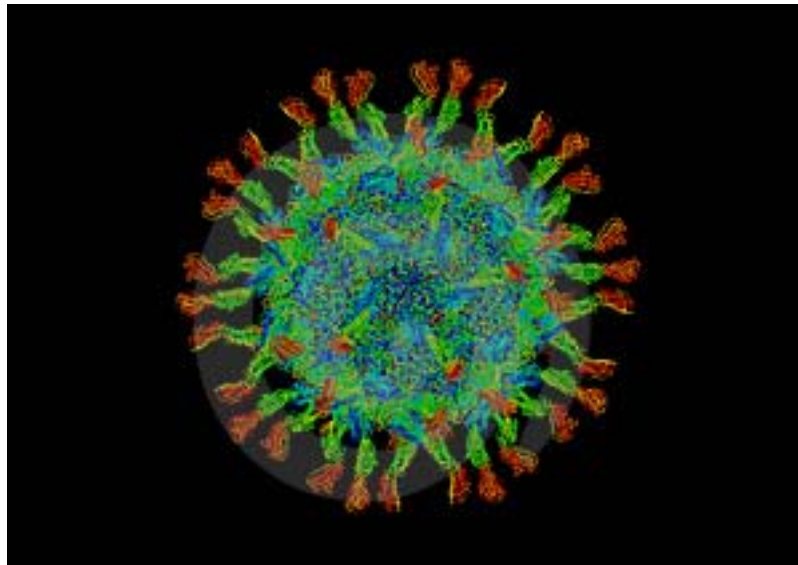




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

*ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΔΙΠΛΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΙΩΝ*



ΣΑΝΑΛΙΔΟΥ ΣΤΕΛΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: κ. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Λάρισα 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- κ. Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
- κ. Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
- κ. Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Το πειραματικό τμήμα της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της ήταν μεταξύ Μαρτίου-Ιουλίου 2009.

- Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου εργασίας και της βοήθειάς του σε διάφορα σημεία της εργασίας αυτής. Επίσης τη Διδάκτορα Πλιάκα Βάια για την πολύτιμη αρωγή της στην πραγματοποίηση των εργαστηριακών πειραμάτων, όπως επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Μαμούρη Ζήση και κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη	σελ. 6
2. Εισαγωγή	
2.1. Εντεροϊοί	σελ.8
2.2. Πολιοϊοί	
2.2.α. Γενικά για τους πολιοϊούς	σελ.9
2.2.β. Η δομή του καψιδίου των πολιοϊών	σελ.11
2.γ. Το γένωμα των πολιοϊών	σελ.15
2.3. Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών	σελ.19
2.3.α. Πρόσδεση του ιού στο κύτταρο και απελευθέρωση του RNA	σελ. 20
2.3.β. Μετάφραση του ιού RNA	σελ. 22
2.3.γ. Αντιγραφή του ιού RNA	σελ. 29
2.3.δ. Καψιδίωση των τελικών ιικών σωματιδίων	σελ. 33
2.4. Κυτταρικές αποκρίσεις (CPE) στην πολιοϊική μόλυνση	σελ. 36
2.5. Πολιοϊοί και πρόκληση παθογένειας	σελ. 38
2.6. Κλινικά συμπτώματα παραλυτικής πολιομυελίτιδας	σελ. 42
2.7. Εμβολιακά στελέχη κατά των πολιοϊών	σελ. 43
2.8. Επιδημιολογία	σελ. 49

2.9. Μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί των πολιοϊών	
2.9.α. Μεταλλάξεις	σελ. 50
2.9.β. Ανασυνδυασμοί	σελ. 51
2.10. Μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της ασθένειας	σελ. 53
3. Υλικά και μέθοδοι	
3.1.Υλικά	σελ. 57
3.2.Μέθοδοι	σελ. 58
4. Αποτελέσματα	
4.1. Αποτελέσματα BLAST-ClustalW	σελ. 65
4.2. Αποτελέσματα της RCT δοκιμής	σελ. 68
4.3. Οι καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου	σελ. 69
5. Συζήτηση	σελ. 76
6. Βιβλιογραφία	σελ.78

1. Περίληψη

Οι πολιοϊοί είναι μέλη της οικογένειας των Εντεροϊών, οι οποίοι με τη σειρά τους είναι μέλη της υπεροικογένειας των Picornaviridae. Φυσικός ξενιστής των πολιοϊών είναι ο ανθρώπινος οργανισμός.

Οι πολιοϊοί αποτελούνται από τρεις οροτύπους, τους PV1, PV2 και PV3 βάσει αντιγονικών καθοριστών που φέρουν. Το καψίδιο των πολιοϊών αποτελείται από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες παρατίθενται σε εικοσαεδρική συμμετρία. Το καψίδιο αυτό προστατεύει το γενετικό υλικό του ιού, το οποίο εμφανίζεται ως μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Το RNA τους έχει μια 5' αμετάφραστη περιοχή, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF, το οποίο κωδικοποιεί για τις δομικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες και την 3' αμετάφραστη περιοχή. Οι πολιοϊοί φέρουν πολύ υψηλό βαθμό σφαλμάτων κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας, λόγω λαθών στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων και λόγω έλλειψης διορθωτικής ικανότητας της RNA πολυμεράσης. Επίσης ενδοκυτταρικοί ανασυνδυασμοί πραγματοποιούνται ανάμεσα στους τρεις οροτύπους των Sabin πολιοϊικών εμβολιακών στελεχών.

Βασικό στοιχείο της παθογένειας των πολιοϊών είναι η πολιομυελίτιδα, στην οποία εμφανίζεται νευροτοξικότητα περιφερειακών και κρανιακών νεύρων, καθώς και του νωτιαίου μυελού έχοντας ως τελικό στάδιο την παράλυση.

Για την παρεμπόδιση πρόκλησης της παραλυτικής πολιομυελίτιδας, έχουν κατασκευαστεί δύο εμβόλια. Αρχικά κατασκευάστηκε το ενδομυϊκό απενεργοποιημένο εμβόλιο του Salk (IPV) και στη συνέχεια το στοματικό εξασθενημένο εμβόλιο Sabin (OPV), αποτελούμενο από τα τρία εξασθενημένα στελέχη PV1, PV2 και PV3. Λόγω της εμφάνισης της εμβόλιο-συνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) και των εμβολιακά σχετιζόμενων στελεχών (VDPV), που προκαλούν παραλυτική πολιομυελίτιδα, πραγματοποιήθηκε μια αλλαγή προς χρήση του εμβολίου του Salk (IPV). Οι περιπτώσεις VAPP προκαλούνται εξαιτίας της συσσώρευσης των μεταλλάξεων και των γενετικών ανασυνδυασμών που πραγματοποιούνται μεταξύ των εμβολιακών στελεχών. Πλέον έχουν σχεδόν εξαλειφθεί τα άγρια στελέχη πολιοϊού και έχουν παραμείνει μόνο επικίνδυνα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη που μπορούν να προκαλέσουν πολιομυελίτιδα. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας έχει εγκαθιδρύσει έναν μελλοντικό στόχο διακοπής του εμβολιασμού από το OPV όταν δεν θα κυκλοφορούν πλέον τα άγρια στελέχη του πολιοϊού σε παγκόσμια κλίμακα.

Μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί που εμφανίζονται μεταξύ των εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών μπορούν να επηρεάσουν την κινητική ανάπτυξης, όπως επίσης και τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο των στελεχών, επιφέροντας επιβλαβή φαινότυπο. Για την εύρεση τέτοιου είδους μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών, καθώς και συσχέτισή τους με την κινητική ανάπτυξης και τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο των στελεχών αυτών, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα

προγράμματα BLAST και ClustalW, καθώς και η RCT δοκιμή. Βάση της RCT δοκιμής, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου στα οκτώ προς μελέτη στελέχη: II, 742, EPA, EPB, LK3, LK6, LK10 και 729, καθώς και στα δύο πρότυπα στελέχη Sabin 1 και Sabin 3, βάση των οποίων εξήχθησαν τα ανάλογα αποτελέσματα και συμπεράσματα.

2. Εισαγωγή

2.1. Εντεροϊοί

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί είναι μέλη της οικογένειας Picornaviridae (Pallansh et al., 2007). Τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι απλοί RNA ιοί χωρίς λιπιδικό φάκελο. Εξωτερικά καλύπτονται από ένα υψηλά δομημένο πρωτεϊνικό καψίδιο και στο εσωτερικό τους περιέχουν μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Το όνομα των Picorna ιών προδίδει το μικρό μέγεθός τους και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που αποτελεί το ιικό γένωμα, δηλαδή το RNA (Racaniello, 2007). Η εξέλιξη στους Picorna ιούς αποτέλεσε στον άμεσο διαχωρισμό των μελών σε διάφορους οροτύπους. Έτσι οι Picorna ιοί διαχωρίζονται σε εννέα γένη: Enterovirus, Rhinovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Cardiovirus, Aphthovirus, Erbovirus, Kobuvirus και Teschovirus (Li et al., 2001).

Το γένος των Εντεροϊοών με τη σειρά του διαχωρίζεται σε πολιοϊούς, coxsackie A και B ιούς, echo ιούς κι έναν αριθμό άλλων μη κατηγοριοποιημένων ανθρωπίνων και μη εντεροϊών. Ο διαχωρισμός στους οροτύπους αυτούς γίνεται βάσει της βιολογικής δραστηριότητάς τους και της ασθένειας που προκαλούν (Racaniello, 2007, Li et al., 2001). Καθένας από τους παραπάνω οροτύπους σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. (Pallansch et al., 2007).

Οι εντεροϊοί διαχωρίζονται από τους υπόλοιπους Picorna ιούς κατά βάση σε φυσικά χαρακτηριστικά, όπως χαμηλή πυκνότητα σε χλωριούχο καΐσιο και σταθερότητα σε διάλυμα ασθενούς οξέος. Ο μολυσματικός ιός είναι σχετικά σταθερός σε πολλά κοινά εργαστηριακά απολυμαντικά καθώς και σε απολυμαντικά σε θερμό περιβάλλον, ενώ δεν επηρεάζεται από λιποδιαλύτες. Διαλύματα που απενεργοποιούν τον ιό είναι η φορμαλδεΰδη, η γλυκεραλδεΰδη, ισχυρά οξέα, υποχλωρίδιο του νατρίου και αδέσμευτη υπολειμματική χλωρίνη. Η συγκέντρωση, το pH, εξωκυτταρικά οργανικά υλικά καθώς και ο χρόνος επαφής επιδρούν στον βαθμό απενεργοποίησης του ιού από τα παραπάνω μείγματα. Γενικά τα περισσότερα αντιδραστήρια που απενεργοποιούν τους εντεροϊούς, βασίζονται στην ενεργό χημική τροποποίηση του ιού.

Οι εντεροϊοί είναι σχετικά θερμοσταθεροί. Οι περισσότεροι απενεργοποιούνται άμεσα στους 42°C αν και κάποια σουλφωδρυλικά αναγωγικά μέσα και τα κατιόντα μαγνησίου μπορούν να σταθεροποιήσουν τον ιό και να αυξήσουν το όριο θερμοκρασίας στους 50°C. Απενεργοποίηση των εντεροϊών μπορεί να επιφέρει και η χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας καθώς και η ξήρανση (Pallansch et al., 2007).

Η εισαγωγή μοριακών μεθόδων εμπλουτίζει το διαχωρισμό των μελών της γενιάς των εντεροϊών σε διάφορα είδη, βάσει της οργάνωσης του γενώματος και της αλληλουχικής ομοιότητας, εκτός από τις βιολογικές ιδιότητές τους. Βασικές γενωμικές περιοχές για τον διαχωρισμό των διαφόρων ειδών των εντοροϊών είναι η VP1 κωδική περιοχή που περιέχει μια

αξιόπιστη συσχέτιση μεταξύ της γενωμικής αλληλουχίας και του ορισμού του οροτύπου. Η ομοιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 γενωμικής περιοχής, το λιγότερο κατά 75%, μεταξύ ενός απομονωμένου δείγματος και ενός προτύπου οροτύπου, προτείνει ότι το απομονωμένο δείγμα είναι οροτυπικά όμοιο με το πρότυπο. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια μεταξύ των δειγμάτων. Εκτός της γενετικής συγγένειας μεταξύ διαφορετικών οροτύπων εντεροϊών, πολλοί εμφανίζουν επίσης κοινή αντιγονικότητα. Ο άνθρωπος εμφανίζεται ως ο φυσικός ξενιστής όλων των ανθρώπινων εντεροϊών. Οι διάφοροι τύποι εντεροϊών σχετίζονται τόσο με σποραδικά όσο και με επιδημικά περιστατικά ασθενειών (Pallansh et al., 2007).

2.2. Πολιοϊοί

2.2.α. Γενικά για τους πολιοϊούς

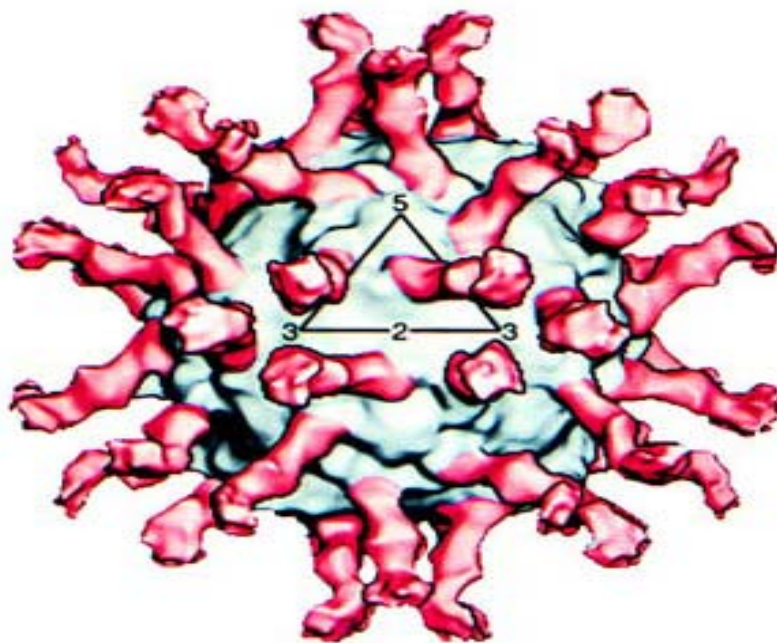
Πολλά απ τα ορόσημα των πολιοϊών είναι ορόσημα και για τους εντεροϊούς και στην πραγματικότητα και για την γενικότερη έννοια της ιολογίας. Οι πολιοϊοί ανακαλύφθηκαν και απομονώθηκαν λόγω της ανάγκης επίλυσης της επιδημικής πολιομυελίτιδας στον 20^ο αιώνα. Πιο συγκεκριμένα, ο πολιοϊός ανακαλύφθηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας από τους Landsteiner και Popper το 1908 (Pallansh et al., 2007, Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

Ο πολιοϊός ήταν ο πρώτος ιός των ζώων που πλήρως κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε. Επίσης ήταν ο πρώτος RNA ιός των ζώων για τον οποίο κατασκευάστηκε ένας μολυσματικός κλώνος και τέλος ο πρώτος ανθρώπινος ιός για τον οποίο είχαμε την τρισδιάστατη δομή του, με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας μέσω ακτίνων χ. Ακόμα η πρωτεϊνοσύνθεση της αρχικής πολυπρωτεΐνης απ' την οποία έχουμε την παραγωγή των ικών πρωτεϊνών έπειτα από πρωτεόλυση, αρχικά αναγνωρίστηκε σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊό. Το RNA των πολιοϊών ήταν το πρώτο αγγελιοφόρο RNA χωρίς 5' καλύπτρα, γεγονός που εξηγείται από τις ενδείξεις ότι το γένομα του ιού μεταφράζεται από εσωτερικές ριβοσωμικές δομές (Pallansh et al., 2007, Racaniello, 2007).

Οι πολιοϊοί αναπτύσσονται σε καλλιέργειες κυττάρων διαφόρων ιστών και τα κύτταρα in vitro παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική κυτταροπαθογόνο δράση. Για πολλά έτη, οι πολιοϊοί ήταν οι πρωτότυποι οργανισμοί για την λυτική ιική μόλυνση σε καλλιέργεια κυττάρων. Τέλος η μόλυνση των κυττάρων στόχων, εξαρτάται στη σύνδεση των ικών μορίων σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια. Λόγω του ότι τα ιικά σωματίδια αναγνωρίζονται από συγκεκριμένους υποδοχείς, μπορούν να μολύνουν μόνο κυτταρικές σειρές που φέρουν τους υποδοχείς αυτούς (Pallansh et al., 2007).

Ορολογικά τεστ επιβεβαίωσαν ότι τα περισσότερα μολυσμένα άτομα δεν παρουσιάζουν την κλινική ασθένεια. Στη συνέχεια δοκιμές οροεξουδετέρωσης έναντι βασικών αντιγονικών θέσεων,

αποκάλυψαν ότι ο πολιοϊός έχει τρεις οροτύπους, τους PV1, PV2 και PV3. Οι τρεις ορότυποι αναπαράγονται στον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα και μπορούν να προκαλέσουν παράλυση μολύνοντας και καταστρέφοντας κινητήριους νευρώνες. Παραταύτα ο πολιοϊός προκαλεί νευρολογική ασθένεια μόνο στην τάξη του 10^{-2} για τον ορότυπο 1 και 10^{-3} για τους οροτύπους 2 και 3. Αυτό συμβαίνει καθώς η τάση του πολιοϊού να εισβάλλει στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ιδιαίτερα σε στοχευμένους κινητήριους νευρώνες είναι σπάνια, τυχαία και κυρίως εξαρτάται από την ηλικία, το φύλο ή την κοινωνικοοικονομική θέση που βρίσκεται το μολυσμένο άτομο (Pallansh et al., 2007, Georgescu et al., 1995, Mueller et al., 2005).



PV1:CD155

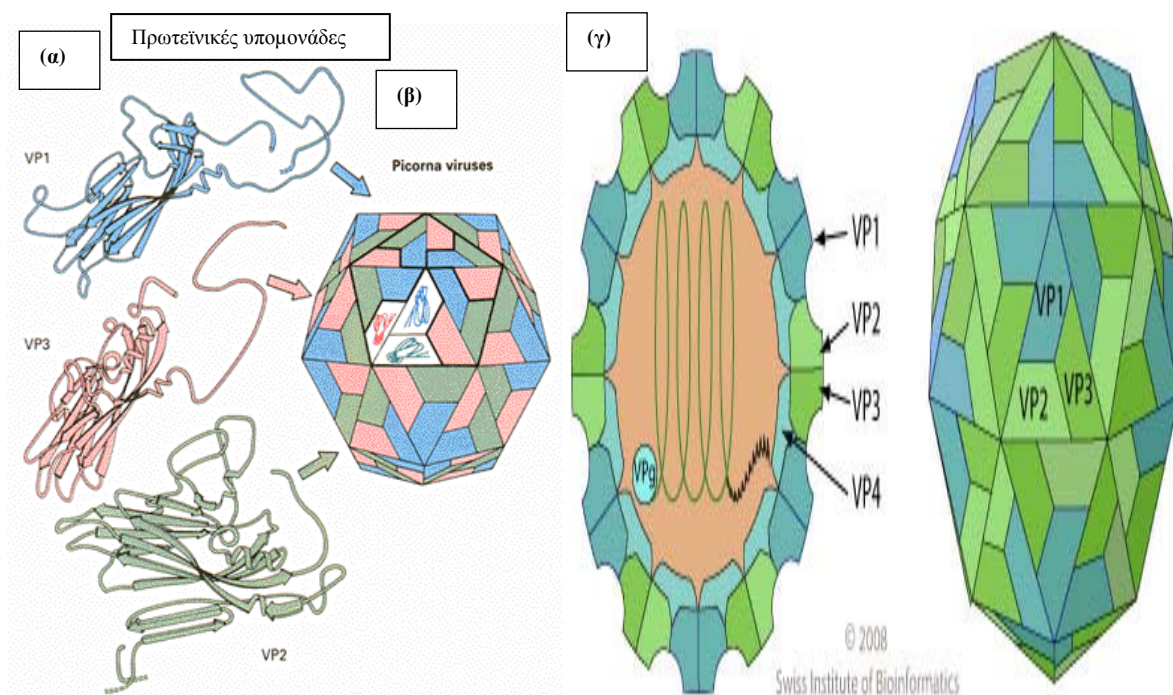
Εικόνα 1. Απεικόνιση της δομής του πολιοϊικού οροτύπου 1 προσδεμένου στον υποδοχέα CD155. Οι αριθμοί 5, 3 και 2 προδίδουν τη θέση του πενταπλού, τριπλού και διπλού άξονα αντίστοιχα. Το μόριο του υποδοχέα είναι ένα μακρύ μόριο, το οποίο προεξέχει από την επιφάνεια του κυττάρου και προσδέεται στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου

(<http://cmbi.bjmu.edu.cn/www-learn/micro-ac-uk/335/Picornaviruses.html>)

2.2.β. Η δομή του καψιδίου των πολιοϊών

Τα ιικά σωματίδια είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30nm. Αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό κέλυφος, το οποίο περιβάλλει το RNA γένωμα. Το πρωτεϊνικό αυτό κέλυφος συντίθεται από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4.

Η βασική δομική μορφή του καψιδίου των πολιοϊών είναι το πρωτομερές. Το πρωτομερές περιέχει ένα αντίγραφο καθεμιάς από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι προϊόντα της πρωτεόλυσης μιας πρόιμης ιικής πολυπρωτεΐνης. Κατά τη σειριακή πρωτεόλυση, η πρωταρχική P1 καψιδιακή πρωτεΐνη τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1. Τα πολυπεπτίδια αυτά παραμένουν σαν πρωτομερή, όμως άμεσα συναθροίζονται προς το σχηματισμό των πενταμερών (VP0,VP3,VP1)₅. Έπειτα τα πενταμερή διαδοχικά συναρμολογούνται ώστε να διαμορφωθεί το τελικό προκαψίδιο [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂. Το πακετάρισμα του RNA τότε οδηγεί στον αυθόρμητο τεμαχισμό ωρίμανσης, κατά τον οποίο η πρωτεΐνη VP0 αποκόπτεται στις πρωτεΐνες VP4 και VP2. Το ώριμο ιικό καψίδιο φέρει πενταπλό, τριπλό και διπλό άξονα συμμετρίας όπως παρουσιάστηκε και στην Εικόνα 1 (Racaniello, 2007, Wimmer et al., 1993, Jesus et al., 2007).



Εικόνα 2. Απεικόνιση **α)** της τριτοταγούς δομής των τριών πρωτεϊνών της επιφάνειας του πρωτεϊνικού καψιδίου, **β)** της θέσης τους στον τριπλό και πενταπλό άξονα συμμετρίας και **γ)** τη θέση των τεσσάρων δομικών πολυπεπτιδίων του ιικού καψιδίου, το οποίο περικλείει το RNA γένωμα. (<http://www.biol.vt.edu/faculty/lederman/biol4664/text/text78.html>, http://expasy.org/viralzone/all_by_species/97.html)

Τελικά εξήντα δομικές πρωτεΐνες παρατίθενται σε εικοσαεδρική συμμετρία και σχηματίζουν ένα εικοσαεδρικό πλέγμα. Το πλέγμα αυτό αποτελεί μια σταθερή δομή, συντιθέμενη από είκοσι τριγωνικές επιφάνειες και δώδεκα κορυφές. Το κέλυφος αποτελείται από τις VP1, VP2 και VP3, οι οποίες έχουν κοινή διαμόρφωση, όχι όμως αλληλουχική ομολογία και τέλος από την VP4 που βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της δομής. Το κοινό μοτίβο που παρουσιάζουν οι VP1, VP2 και VP3 είναι ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων, με δύο πλευρικές α-έλικες να συνδέονται μαζί μέσω ανόμοιων θηλιών. Η μορφή αυτή διευκολύνει στο πακετάρισμα των δομικών μονάδων, ώστε να σχηματιστεί ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

Το πακετάρισμα των δομικών μονάδων, ενδυναμώνεται από ένα δίκτυο αμινοξικών αλληλεπιδράσεων στο εσωτερικό του καψιδίου. Το δίκτυο αυτό σχηματίζεται από τα N-τελικά άκρα των πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, καθώς και τη VP4 πρωτεΐνη, η οποία είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα του ιικού σωματιδίου. Η πρωτεΐνη VP4 διαφέρει από τις τρεις υπόλοιπες πρωτεΐνες στο ότι έχει μια εκτεταμένη διαμόρφωση των αμινοξέων της. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ίδια σε θέση και διαμόρφωση με τα NH₂-τελικά άκρα των VP1 και VP3 πρωτεϊνών και λειτουργεί ως «ένα διαχωρισμένο NH₂-τελικό άκρο της VP2», παρά σαν μια ανεξάρτητη καψιδική πρωτεΐνη.

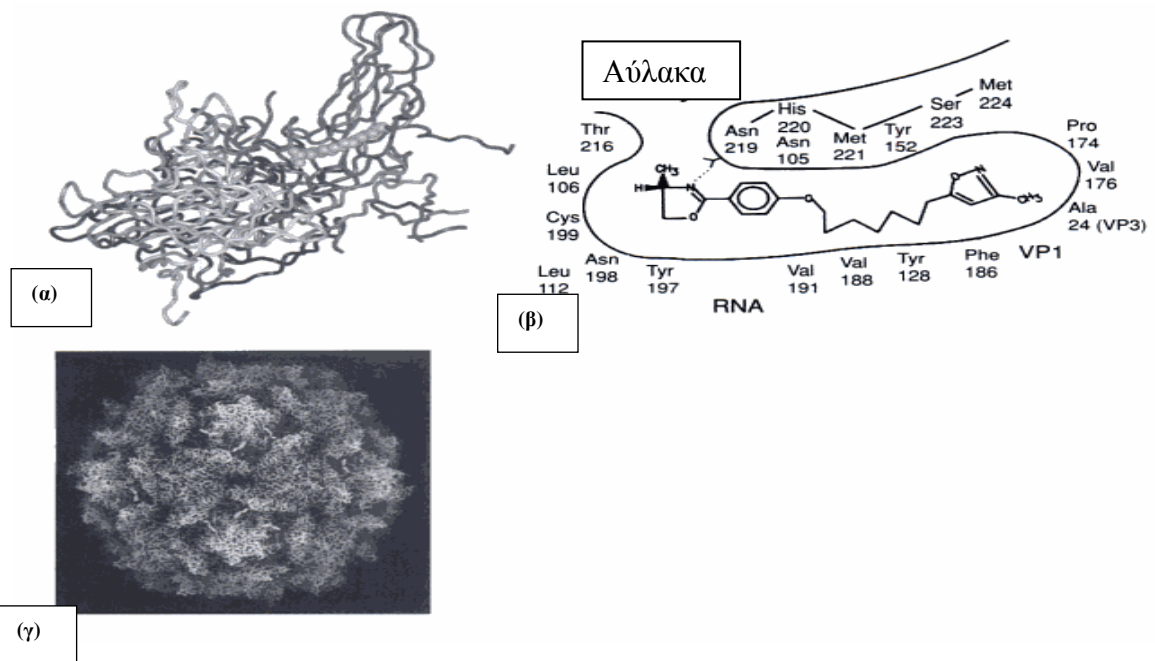
Οι βασικές δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών στηρίζονται στις θηλιές που συνδέουν τους β-κλώνους και στις N- και C- τελικές αλληλουχίες που εξέρχονται από τη δομή β-βαρελιού. Οι αμινοξικές αλληλουχίες αυτές δίνουν στους διαφορετικούς οροτύπους την μοναδική μορφολογία και αντιγονικότητά τους. Οι C-τελικές αλληλουχίες τοποθετούνται στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου και οι N-τελικές αλληλουχίες στο εσωτερικό του, γεγονός που φανερώνει μια σημαντική επαναδιευθέτηση των παραγόμενων πρωτεϊνών έπειτα από την πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης P1 πρωτεΐνης (Racaniello, 2007).

Η επιφάνεια του καψιδίου

Η επιφάνεια του καψιδίου των πολιοϊών περιέχει μια αύλακα. Φέρει μια χαρακτηριστική δομή που προεξέχει. Η δομή αυτή έχει σχήμα αστεριού και βρίσκεται συγκεκριμένα στον πενταπλό άξονα συμμετρίας. Πέντε μόρια της πρωτεΐνης VP1 πλαισιώνουν τον πενταπλό άξονα συμμετρίας, ενώ οι πρωτεΐνες VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριπλό άξονα συμμετρίας, στον οποίο υπάρχει επίσης μια προεξοχή. Η προεξέχουσα δομή περιβάλλεται από ένα βαθύ κοίλωμα, το οποίο ονομάζεται αύλακα (canyon). Έχει αποδειχθεί ότι η αύλακα είναι η περιοχή πρόσδεσης με τον υποδοχέα των κυττάρων του ξενιστή (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

Μέσα στον πυρήνα της πρωτεΐνης VP1, ακριβώς κάτω από την επιφάνεια της αύλακας

βρίσκεται μια υδρόφοβη κοιλότητα. Η κοιλότητα αυτή καταλαμβάνεται από ένα μυριστικό οξύ, το οποίο προσδέεται ομοιοπολικά σε μια γλυκίνη του άκρου της πρωτεΐνης VP4. Το κατάλοιπο αυτό είναι αναπόσπαστο κομμάτι του ιικού καψιδίου. Τα N-τελικά τμήματα της πρωτεΐνης VP3 πλέκονται γύρω από τον πενταπλό άξονα, ώστε να σχηματίσουν έναν πόρο παράλληλης β-δομής. Οι πέντε μυριστικές ομάδες εκτείνονται από τα N-τελικά άκρα της πρωτεΐνης VP4 και πλαισιώνουν τον σχηματιζόμενο πόρο. Έχει βρεθεί πως η τροποποίηση των μυριστικών οξέων επηρεάζει την ιική συναρμολόγηση, όπως επίσης και την σταθερότητα του καψιδίου. Η υδρόφοβη αυτή κοιλότητα θεωρείται σημαντικός ρυθμιστής των προκαλούμενων από τον υποδοχέα δομικών μεταβολών του πολιοϊού και ενάντια της στοχεύουν πολλά αντικά σκευάσματα (Racaniello, 2007).



Εικόνα 3. Παρουσίαση της υδρόφοβης κοιλότητας του καψιδίου και συγκεκριμένα **α)** του πρωτομερούς. Το RNA βρίσκεται στην κάτω πλευρά και ο πενταπλός άξονας στην πάνω δεξιά πλευρά. Οι σφαίρες αναπαριστούν τα μόρια σφιγγοσίνης της υδρόφοβης κοιλότητας. Το λιπίδιο βρίσκεται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια της αύλακας, **β)** πρόσδεση του WIN52084 στην υδρόφοβη κοιλότητα και απομάκρυνση του λιπιδίου, οδηγώντας σε απώλεια της μολυσματικότητας και **γ)** πρόσδεση όμοιου με WIN σκευάσματος, το οποίο είναι το μικρό λευκό μόριο στη βάση της αύλακας. Τα άτομα που βρίσκονται κοντά στο κέντρο του ιού είναι μαύρα και όσο απομακρύνονται είναι πιο άσπρα (Racaniello, 2007).

Το εσωτερικό του καψιδίου

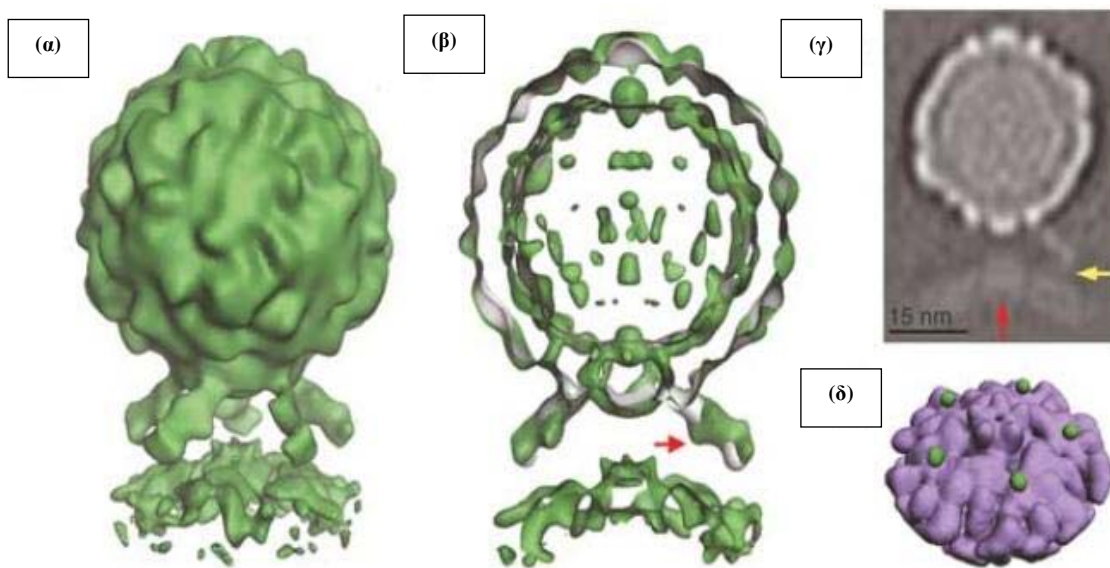
Στο εσωτερικό του καψιδίου σχηματίζεται ένα δίκτυο από τις N-τελικές περιοχές των πρωτεϊνών, το οποίο συμβάλλει στην σταθερότητα του ιικού σωματιδίου. Στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, οι N-τελικές περιοχές πέντε πρωτεϊνών VP3, σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β-έλασμα. Η δομή αυτή περικλείεται από πέντε β-έλασματα των τριών κλώνων, που σχηματίζονται από τις N-τελικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών VP1 και VP4. Η ομάδα των μυριστικών οξέων προσδένεται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης VP4, διαμεσολαμβάνοντας στην αλληλεπίδραση των δύο αυτών δομών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται από ένα β-έλασμα των επτά κλώνων. Από τους κλώνους αυτούς, τέσσερις είναι του β-βαρελίου των πρωτεϊνών VP3 και ένας από το N-τελικό άκρο της VP1, το οποίο περιβάλλει ένα β-έλασμα των δύο τελευταίων κλώνων, προερχόμενο από τις N-τελικές περιοχές των πρωτεϊνών VP2, από ένα γειτονικό πενταμερές (Racaniello, 2007).

Οι β-κλώνοι των καψιδικών πρωτεϊνών, που σχηματίζουν τα β-βαρέλια, συνδέονται με αμινοξικές θηλιές. Οι θηλιές αυτές είναι χαρακτηριστικές για καθεμιά από τις τρεις καψιδικές πρωτεΐνες και παρατίθενται στο εξωτερικό τμήμα της επιφάνειας του ιικού σωματιδίου. Οι περιοχές αυτές αποτελούν βασικά συστατικά αντιγονικών θέσεων εξουδετέρωσης του ιού (N-Ags), καθώς αντισώματα ικανά να εξουδετερώσουν την ιική μολυσματικότητα κατευθύνονται κατά αυτών των αλληλουχιών των θηλιών. Ο πολιοϊός έχει τέσσερις μεγάλες N-Ags. (Wimmer et al., 1993).

Παραταύτα υπάρχουν μόνο τρεις μοναδικές τάξεις των τεσσάρων αυτών θέσεων και έτσι τρεις μόνο ορότυποι του πολιοϊού. Η VP1 είναι η πιο εκτεθειμένη πρωτεΐνη της επιφάνειας του καψιδίου και παίζει ακρογωνιαίο ρόλο στην επαγωγή αντισωμάτων ουδετεροποίησης και για τους τρεις οροτύπους του πολιοϊού. Η αντιγονική θέση 1 της πρωτεΐνης αυτής συντίθεται από τα αμινοξέα 89 έως και 100 και είναι μια θεμελιώδης αντιγονική θέση για τους οροτύπους 2 και 3 του πολιοϊού. Η θέση αυτή είναι συνήθως υπολειπόμενη στον ορότυπο 1 του πολιοϊού. Η αντιγονική θέση 2 είναι μια σύνθετη θέση αποτελούμενη από τα αμινοξέα 220 έως 222 (θέση 2α) της πρωτεΐνης VP1 όπως και από τα κατάλοιπα 169 και 170 (θέση 2β) της πρωτεΐνης VP2. Αμφότερες οι θέσεις 2α και 2β έχουν βρεθεί στον ορότυπο 1, αντιθέτως με τον ορότυπο 3 όπου έχει βρεθεί μόνο η θέση 2β. Η θέση 3 είναι επίσης μια σύνθετη θέση, η οποία περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 286 έως 290 της VP1 πρωτεΐνης (θέση 3α) όπως και τα αμινοξέα 58,59 και άλλα της VP3 πρωτεΐνης (θέση 3β). Οι θέσεις 3α και 3β έχουν και οι δύο βρεθεί στον ορότυπο 3 του πολιοϊού, ενώ στον ορότυπο 1 έχει παρατηρηθεί η παραγωγή αντισωμάτων μόνο για τη θέση 3β (Wimmer et al., 1993, Herremans et al., 2000).

Η θέση των αμινοξέων αυτών σε συνδυασμό με την τριτοταγή δομή του ιικού σωματιδίου, προδίδουν πως η πλειοψηφία των καταλοίπων αυτών είναι υψηλά εκτεθειμένα και τοποθετούνται

στις προεξέχουσες χαρακτηριστικές δομές της ιικής επιφάνειας (Herremans et al., 2000).



Εικόνα 4. Αναπαράσταση **α)** της δομής του πολιοϊού και της πυκνότητας των υποδοχέων της μεμβράνης, **β)** του γλυκοσυλιωμένου τμήματος της περιοχής 2 του πολιοϊού που δείχνεται με το βέλος, **γ)** της προεξοχής του πενταπλού άξονα και το κίτρινο βέλος δείχνει τη σύνδεση του υποδοχέα με τον ιό και **δ)** του πενταπλού άξονα και της σχηματιζόμενης αλάκας όπου συνδέεται ο υποδοχέας (Bubeck et al., 2005).

2.2.γ. Το γένωμα των πολιοϊών

Το ιικό RNA των πολιοϊών, όπως και όλων των Picorna ιών είναι μολόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και είναι μολυσματικό, εξαιτίας της μετάφρασής του κατά την είσοδο στο κύτταρο προς παραγωγή όλων των ιικών πρωτεϊνών που απαιτούνται για την ιική αντιγραφή. Νουκλεοτιδική ανάλυση του RNA του ιού, αποκάλυψε ένα μοτίβο για τη δομή του γενώματος του, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις περιοχές. Οι περιοχές αυτές αποτελούν ένα μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης συνοδευόμενο από δύο πλευρικές μη κωδικές περιοχές. Στον ορότυπο PV-1, το γένωμα αποτελείται από 7.441 νουκλεοτίδια και είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3' τελικό του άκρο. (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

5' αμετάφραστη περιοχή

Το 5' άκρο RNA είναι μοναδικό, λόγω του ότι συνδέεται ομοιοπολικά με την Vrg ική πρωτεΐνη. Η Vrg πρωτεΐνη συδέεται με το 5'-ουριδινυλιωμένο τμήμα του RNA μέσω ενός δεσμού τυροσίνης. Η τυροσίνη αυτή είναι πάντα το τρίτο αμινοξύ από το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το μέγεθος της Vrg πρωτεΐνης κυμαίνεται από 22 έως 24 αμινοξέα και κωδικοποιείται από ένα απλό ικό γονίδιο. Η παρουσία της Vrg σε αναπτυσσόμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και σε αρνητικής πολικότητας RNA, οδήγησε στη θεώρηση της Vrg ως πρόδρομου μορίου για τη σύνθεση του ικού RNA (Racaniello, 2007).

Κατά το βασικό μοτίβο, η 5' μη κωδική περιοχή του γενώματος είναι μακριά, καθώς αριθμείται από 742 νουκλεοτίδια και υψηλά δομημένη. Από την περιοχή αυτή απουσιάζει η 5' καλύπτρα, ενώ περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και μεταγραφή του γενώματος. Μια σημαντική ποσότητα σύνθετων δευτεροταγών δομών έχει προβλεφθεί για την 5' αμετάφραστη περιοχή. Τα πρώτα 100 νουκλεοτίδια σχηματίζουν μια δομή τριφυλλίου, η οποία εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής της θετικής πολικότητας αλυσίδας. Επίσης η δομή τριφυλλίου αυτή περιέχει μια βασική θηλιά, η οποία είναι ιδιαίτερος σταθερή (Blondel et al., 1998) .

Παρακάτω στο γένωμα περιέχεται η περιοχή IRES, η οποία θεωρείται η περιοχή εισόδου στο εσωτερικό του ριβοσώματος και καθοδηγεί την μετάφραση του mRNA μέσω εσωτερικού ριβοσωμικού δεσμού. Η περιοχή αυτή αποτελείται από 400 περίπου νουκλεοτίδια και προσφάτως έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην αντιγραφή του ικού γενώματος. Στο ικό RNA γένωμα, η θέση IRES βρίσκεται πιο κάτω από τη δομή τριφυλλίου. Η μετάφραση μέσω της περιοχής αυτής είναι ένας μηχανισμός πρωτεϊνικής σύνθεσης ανεξάρτητης από καλύπτρα για τους picorna ιούς. Τέλος το 5' άκρο λαμβάνει χώρα και στην εξασθένηση και των τριών οροτύπων (Blondel et al., 1998, Pfister et al., 1999, Wimmer et al., 1993) .

Στο 3' άκρο της περιοχής IRES, υπάρχει ένα μοτίβο το οποίο περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες η οποία διαχωρίζεται από το παρακάτω πρωταρχικό κωδικόνιο AUG μέσω ενός διαστήματος 15-20 νουκλεοτιδίων. Το μοτίβο αυτό έχει τη μορφή: Y_n-X_m-AUG , όπου Y είναι πυριμιδίνη, $n=6-8$, X είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και $m=18-20$ νουκλεοτίδια. Στο μοτίβο αυτό η τριπλέτα AUG είναι το εναρκτήριο αμινοξύ στου τύπου 2 IRES στοιχεία, ενώ στου τύπου 1 IRES στοιχεία το εναρκτήριο αμινοξύ βρίσκεται 19-154 νουκλεοτίδια πιο κάτω, στο επόμενο κωδικόνιο AUG. Έτσι οκτώ AUG κωδικόνια βρίσκονται διασκορπισμένα στο 5' άκρο, όπου προηγούνται του εναρκτήριου AUG στο νουκλεοτίδιο 743. Τουλάχιστον ένα από τα κωδικόνια αυτά τοποθετείται σε ένα σωστό νουκλεοτιδικό περιβάλλον για την αποτελεσματική μετάφραση του ικού γενώματος (Wimmer et al., 1993, Pfister et al., 1999).

3' αμετάφραστη περιοχή

Η 3' μη κωδική περιοχή είναι μικρή σε μήκος, καθώς αριθμείται από μόλις 72 νουκλεοτίδια και περιέχει δευτεροταγείς δομές. Η περιοχή αυτή ωστόσο, δεν απαιτείται για τη μολυσματικότητα του ιού. Αμφότερα τα RNA και mRNA του πολιοϊού περιέχουν 3' πολύ-A επεκτάσεις και εμπλέκονται στην έναρξη της αντιγραφής της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας. Το αρνητικής πολικότητας RNA περιέχει μια 5' πολύ-U επέκταση, η οποία κατά την αντιγραφή σχηματίζει την πολύ-A επέκταση του θετικής πολικότητας RNA. Η πολύ-A επέκταση κατέχει σημαντική θέση και στη μολυσματικότητα του ιού. Η βιολογική λειτουργία του 3' άκρου στηρίζεται σε ένα ψευδόκομπο, ο οποίος αποσκοπεί στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA. Στην περιοχή αυτή έχουν βρεθεί αλληλεπιδράσεις ενός νέου τύπου, ο οποίος εμπλέκει μια αλληλεπίδραση «φιλί» μεταξύ δύο θηλιών σε σχήμα φουρκέτας στην περιοχή αυτή. (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

Η 3' αμετάφραστη περιοχή αποτελείται από 65 ετεροπολυμερικά νουκλεοτίδια που σχηματίζουν μια σύνθετη διπλής βασικής θηλιάς δομή και έπειτα ακολουθεί η πολύ-A ουρά. Η πολύ-A ουρά είναι μια έκταση που περιέχει γύρω στα 60 αδενυλικά κατάλοιπα και κωδικοποιείται γενετικά, καθώς αντιγράφεται από την πολύ-U ουρά των αρνητικών αλυσίδων. Η 3' τελική αλληλουχία των περισσοτέρων πολιοϊών είναι ...GGAA-πολύ-A. Διαφορές στο μέγεθος των πολύ-A ουρών μπορούν να εξηγηθούν πιθανότατα λόγω ολίσθησης της μήτρας που παρατηρείται κατά τη σύνθεση των ομοπολυμερών. Έχει παρατηρηθεί όμως πως σε ιικά RNA με 20 αδενυλικά κατάλοιπα ή λιγότερα, έχουμε μείωση της μολυσματικότητας των ιών. Επίσης έχουν βρεθεί mRNA του ιού σε μολυσμένα κύτταρα με περισσότερα των 60 αδενυλικών νουκλεοτιδίων στις πολύ-A ουρές τους, γεγονός που υποδεικνύει ότι κυτταροπλασματικές αδενυλικές τρανσφεράσες μπορούν να τροποποιήσουν το RNA. Παραταύτα σε ιικά RNA με μακριές πολύ-A ουρές ποτέ δεν παρατηρείται καψιδίωση (Pfister et al., 1999, Mueller et al., 2005, Wimmer et al., 1993).

Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Στην ενδιάμεση περιοχή των τμημάτων RNA των πολιοϊών, περιέχεται ένα μονό, μεγάλο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο αποσκοπεί στον σχηματισμό χαρακτηριστικών ικών πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική κωδική περιοχή κωδικοποιεί μια μόνο πολυπρωτεΐνη, η οποία πρωτεολυτικά τέμνεται στις επιμέρους πρόδρομες πρωτεΐνες. Η αρχική παραγόμενη πολυπρωτεΐνη αποτελείται από 2209 αμινοξέα (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005, Airaksinen, 2000).

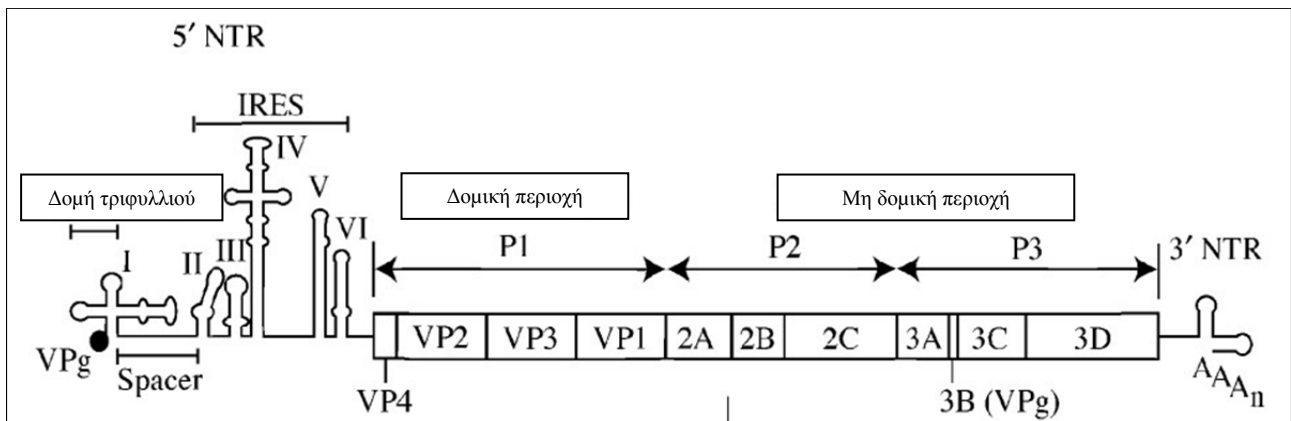
Οι πρόδρομες αυτές πολυπρωτεΐνες έχουν διαχωριστεί σε τρεις περιοχές: τις P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του ικού καψιδίου VP1-VP4. Αντιθέτως οι περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν τις επτά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επεξεργασία πρωτεϊνών και στην αντιγραφή του γενόματος. Πολλά από τα ενδιάμεσα προϊόντα τεμαχισμού είναι λειτουργικά. Έτσι οι πρωτεΐνες 2A, 3C και 3CD είναι πρωτεάσες, η πρωτεΐνη 3D είναι η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και η πρωτεΐνη 2C είναι η ελικάση και παίζει ρόλο στην καψιδίωση του RNA. Επίσης οι πρωτεΐνες 2B, 2BC, 3A και 3AB σχετίζονται με πολλές λειτουργίες κατά την αντιγραφή του ικού RNA (Racaniello, 2007, Airaksinen, 2000).

Η σύνθεση ενός μόνο πολυπεπτιδίου από ένα μόνο mRNA στους πολιοϊούς έχει το πλεονέκτημα ότι γενετικά στοιχεία, τα οποία καθορίζουν τη ρύθμιση της μεταγραφής του mRNA, είναι περιττά. Αυτό επιτρέπει τη συμπίεση του RNA γενόματος. Επιπλέον λόγω της αστάθειας του γενετικού κώδικα, μια λάθος ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην τρίτη βάση των κωδικονίων, που καθορίζουν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μπορεί να μην είναι τόσο καταστροφική όσο οι αυθόρμητες σημειακές μεταλλάξεις σε ρυθμιστικά RNA τμήματα.

Η σύνθεση μιας πολυπρωτεΐνης έχει το μειονέκτημα ότι πολύ συγκεκριμένες πρωτεάσες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες για την πραγματοποίηση του τεμαχισμού της. Οι πολιοϊοί κωδικοποιούν τις δικές τους πρωτεάσες που χρησιμοποιούνται για περισσότερες από μία λειτουργίες, όπως για την αντιγραφή του γενόματος. Επιπλέον τα πρόδρομα πολυπεπτίδια μπορεί να χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένες λειτουργίες στην ική αντιγραφή, ξεχωριστά από τη λειτουργία των προϊόντων τομής τους. Έχουν ανιχνευτεί περίπου 29 πολιοϊικά εξειδικευμένα πολυπεπτίδια στα μολυσμένα κύτταρα. Ωστόσο, το φαινόμενο μιας συγκεκριμένης ικής πρωτεΐνης που έχει πολλαπλές λειτουργίες και η χρήση των προδρόμων πολυπεπτιδίων για μοναδικές λειτουργίες αυξάνει το επιδραστικό γενετικό περιεχόμενο ενός ιού, ο οποίος πρέπει να επιβιώσει με την ελάχιστη γενετική πληροφορία.

Η ική πολυπρωτεΐνη είναι ένα πολύ ενεργό μόριο. Η αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκόπτεται κατά τη μετάφραση στο σύνδεσμο μεταξύ των περιοχών P1 και P2 από την 2A^{pro}, την πρωτεάση που χαρτογραφείται παρακείμενα της θέσης τομής. Από τις τρεις πρωτεάσες που καταλύουν την πρωτεολυτική διεργασία, η 2A^{pro} αποκόπτει ζεύγη τυροσίνης-γλυκίνης, ενώ οι

3C^{pro} και 3CD^{pro} αποκόπτουν ζεύγη γλουταμίνης-γλυκίνης (Wimmer et al., 1993).



Εικόνα 5. Απεικόνιση της γενώμικής δομής του γενώματος του τύπου 1 πολιοϊού με τις δυο δευτεροταγείς δομές στο 5' άκρο, τη δομή τριφυλλιού και την περιοχή IRES. Επίσης την VPg προσδεμένη στο 5' άκρο πρωτεΐνη και το 3' άκρο με την πολυαδενολιωμένη περιοχή του. Ενδιάμεσα περιέχεται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF. (H De Jesus, 2007)

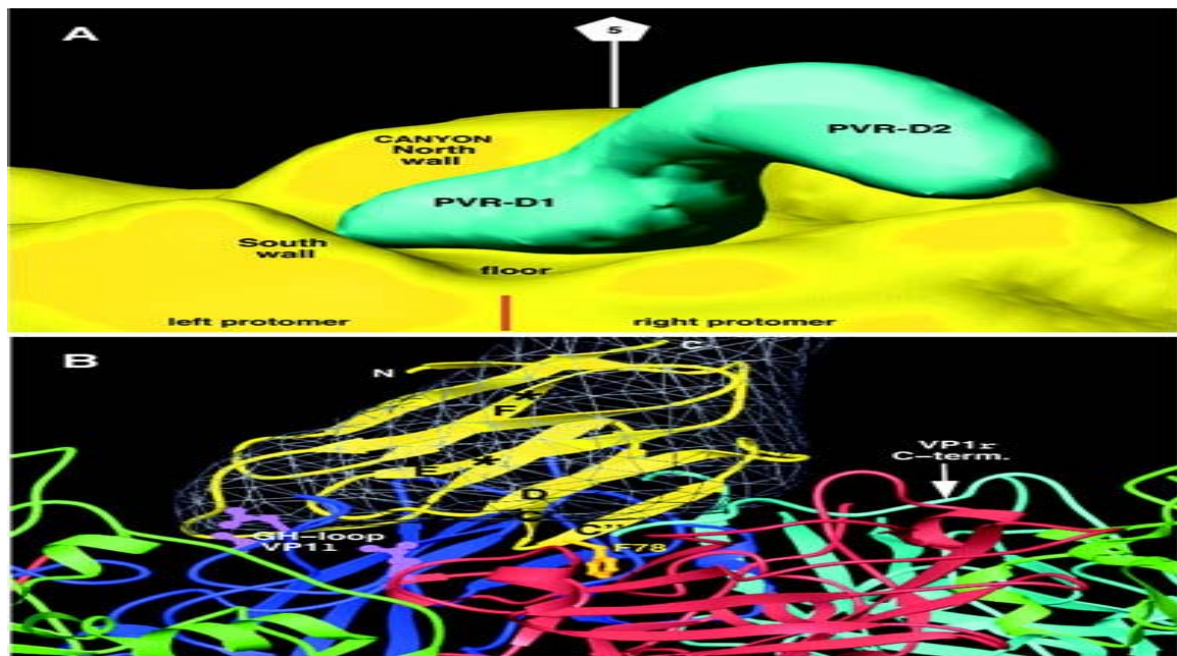
2.3. Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών

Οι πολιοϊοί εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα διαμέσου της στοματικής και σε μικρότερο βαθμό και της αναπνευστικής διόδου. Στη συνέχεια οδηγούνται στο στομάχι, όπου εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην οξύτητα, μετατρέποντας το λεπτό έντερο σε κατάλληλο περιβάλλον για την ιική αντιγραφή ακολουθούμενη από την απορρόφηση του ιού (Racaniello, 2007). Ο ιικός κύκλος των πολιοϊών σε κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιείται εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Βρίσκεται μεταξύ των μικρότερων γνωστών ιικών κύκλων, καθώς διαρκεί περίπου 8 ώρες στους 37°C (Blondel et al., 1998).

2.3.α. Πρόσδεση του ιού στο κύτταρο και απελευθέρωση του RNA

Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που εισέρχεται ο ιός. Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση του ιικού μορίου με τον υποδοχέα στην επιφανειακή μεμβράνη του κυττάρου στόχου. Ο υποδοχέας των πολιοϊών είναι η πρωτεΐνη CD155 (PVR), μέλος της υπερικογένειας ανοσοσφαιρινών Ig. Ο υποδοχέας hPVR είναι μια υψηλά γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη με ένα φαινομενικό μοριακό βάρος των 80kDa. Το γονίδιο του υποδοχέα hPVR χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και περιέχει 8 εξώνια, τα οποία καλύπτουν 20kbps του χρωμοσωμικού DNA. Περιέχει τρεις εξωκυττάριας όμοιες με δομές ανοσοσφαιρίνης (V-C2-C2), μια διαμεμβρανική δομή και μια κυτταροπλασματική ουρά. Ο υποδοχέας αυτός είναι επαρκής για την είσοδο των ιών στα κύτταρα, με πρόσδεση του πολιοϊού σε περιοχή της πρώτης, όμοιας με μεταβλητή Ig εξωκυττάριας δομής. Η επιπλέον επιφάνεια της σύνδεσης του υποδοχέα CD155 με τον πολιοϊό περιλαμβάνει την προεξοχή της VP3 και το C-τελικό άκρο της VP1. Ο CD155 προσδένεται στον πολιοϊό με μια γωνιακή διαμόρφωση, παρόμοια με ένα «λουκάνικο σε ψωμάκι» (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005, Blondel et al., 1998, Solecki et al., 1998).

Ο υποδοχέας των πολιοϊών έρχεται σε επαφή με την ιική επιφάνεια σε δύο κύριες θέσεις. Η πρώτη βρίσκεται σε μια σχισμή στο νότιο σύνορο της αύλακας και η δεύτερη στην πλευρά της αύλακας του βόρειου συνόρου (Racaniello, 2007).



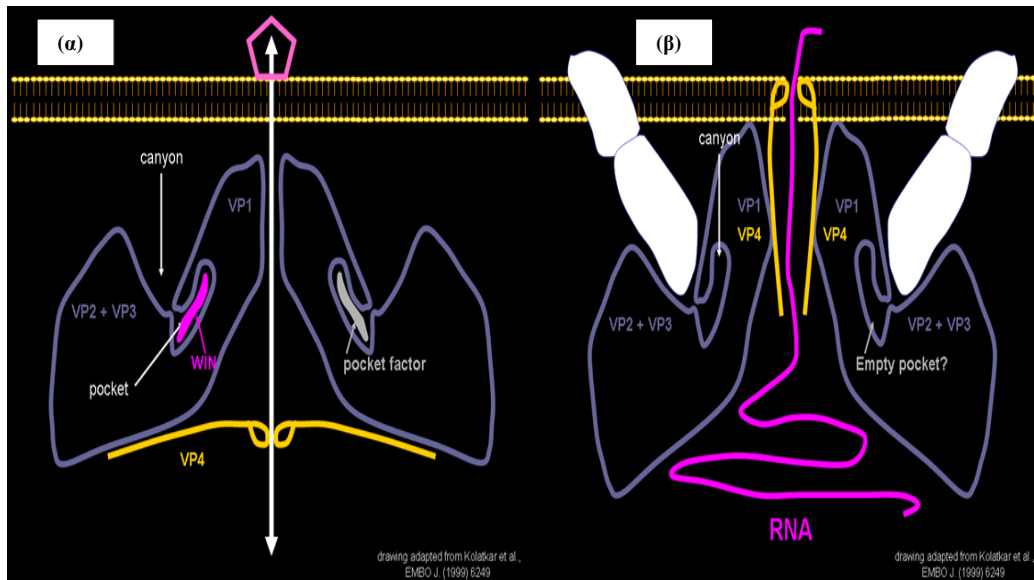
Εικόνα 6. Αναπαράσταση **A)** των ηλεκτρονικών χαρτών πυκνότητας σύνδεσης του υποδοχέα των πολιοϊών (πράσινο) με το καψιδικό πενταμερές του *PV1* και **B)** των επαφών της δομής *I* του υποδοχέα(κίτρινο) και των καψιδικών πρωτεϊνών του ιού. Με μπλε και κίτρινο είναι οι *VP1* πρωτεΐνες γειτονικών πρωτομερών, με πράσινο η πρωτεΐνη *VP2* και με κόκκινο η πρωτεΐνη *VP3*. (Xing et al., 2000).

Ο υποδοχέας κατέχει διττό ρόλο στη μόλυνση. Είναι υπεύθυνος τόσο για την προσκόλληση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια, όσο και για την αποσταθεροποίηση του ιικού σωματιδίου. Η δεύτερη οδηγεί στις δομικές μεταβολές του ιικού καψιδίου, απαραίτητες για την απελευθέρωση του γενώματος. Οι δομικές αυτές αλλαγές στον ιό, έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κάποιων σωματιδίων. Τα σωματίδια αυτά ονομάζονται μεταβαλλόμενα ή σωματίδια A και περικλείουν το ιικό RNA, έχοντας όμως χάσει την εσωτερική πρωτεΐνη VP4 του καψιδίου. Επιπλέον το υδρόφοβο N-τελικό άκρο της VP1 από το εσωτερικό του καψιδίου μεταφέρεται στην επιφάνεια του A σωματιδίου. Έτσι αυξάνεται η συγγένεια των A σωματιδίων για την μεμβράνη, καθώς αυξάνεται αξιοσημείωτα η υδροφοβικότητα σε σχέση με τον αρχικό ιό. Παράλληλα μειώνεται ο συντελεστής ιζηματοποίησης των σωματιδίων αυτών σε σχέση με τον αρχικό ιό, μεταβάλλονται οι αντιγονικές ιδιότητες και αυξάνεται η ευαισθησία των πρωτεασών (Blondel et al., 1998, Racaniello, 2007, Airaksinen, 2000).

Εξαιτίας των κινήσεων των καψιδικών δομών των A σωματιδίων, σχηματίζονται κενά στην περιοχή όπου οι VP1, VP2 και VP3 συναντιούνται. Τα κενά αυτά επιτρέπουν την εμφάνιση του συνδεδεμένου με μυριστικές ομάδες N-τελικού άκρου της VP4 και του εκτεθειμένου λιπόφιλου N-τελικού άκρου της VP1 στην επιφάνεια, τα οποία εξωθούνται στην άκρη της δομής όμοιας με προπέλα. Στη συνέχεια τακτοποιούνται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, όπου οι πέντε έλικες στο N-τελικό άκρο της VP1 είναι σε θέση να εισέλθουν στην κυτταρική μεμβράνη σχηματίζοντας έναν πόρο. Μέσω του σχηματιζόμενου αυτού πόρου, το γενώμικό RNA του ιού εξέρχεται από το A σωματίδιο και να απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998, Mueller et al., 2005).

Επιπλέον μετακίνηση της σφιγγοσίνης της υδρόφοβης κοιλότητας, που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια της αύλακας, είναι απαραίτητη για την παροχή της ζητούμενης ελαστικότητας στο καψίδιο. Η εκκίνηση της μεταφοράς των λιπιδίων αυτών, προωθείται από την αλληλεπίδραση του πολιοϊού με τον υποδοχέα PVR, ακριβώς πάνω από την υδρόφοβη κοιλότητα. Αυτό διευκολύνει το καψίδιο να υποβληθεί στις μεταβολές που οδηγούν στην απελευθέρωση του RNA. Το παραπάνω προέρχεται από μελέτες με αντικά φάρμακα, όπως τα WIN μείγματα, τα οποία αντικαθιστούν το λιπίδιο και προσδένονται στην υδρόφοβη κοιλότητα. Τα ιικά σωματίδια διαπερνούν το κύτταρο είτε άμεσα μέσω της πλασματικής μεμβράνης έπειτα από πρόσδεση στον υποδοχέα του πολιοϊού, είτε μέσω ενδοκύττωσης διαμεσολαβούμενης από τον υποδοχέα (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

Στο μικροσκόπιο, η μόλυνση συνήθως γίνεται ορατή σε μια με επτά μέρες από την εμφάνιση μιας χαρακτηριστικής κυτταροπαθολογικού επίδρασης (συρρίκνωση, πυρηνική συμπίκνωση, διαθλαστικότητα και κυτταρικό εκφυλισμό) (Racaniello, 2007).



Εικόνα 7. α) Φυσιολογική διάταξη των καψιδιακών ικών πρωτεϊνών και **β)** έπειτα από πρόσδεση του υποδοχέα, μετακίνηση της VP4 πρωτεΐνης και του N-τελικού άκρου της VP1 πρωτεΐνης στην επιφάνεια του καψιδίου, αλλαγή της διαμόρφωσης και άνοιγμα του πόρου προς απελευθέρωση του ικού RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Hunt, 2010).

2.3.β. Μετάφραση του ιού RNA

✚ Σχηματισμός του προεναρκτηρίου συμπλόκου για τη μετάφραση του ικού RNA

Αφότου το θετικής-πολικότητας RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, θα πρέπει να μεταφραστεί. Το πολιοϊκό mRNA φανερώνει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά, τα οποία διαφέρουν από αυτά του ευκαριωτικού mRNA. Με την απομάκρυνση της VPg πρωτεΐνης από τα ικά RNA μόρια, μέσω ενός κυτταρικού ενζύμου όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μόρια αυτά προορίζονται να οδηγηθούν στην πρωτεϊνική σύνθεση.

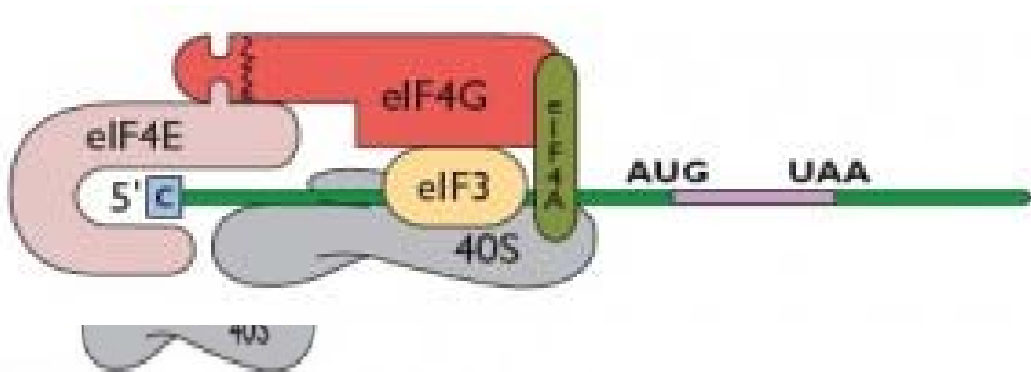
Για τη μετάφραση του RNA τα ριβοσώματα δεν σαρώνουν τις 5' μη κωδικές περιοχές του γενώματος, αλλά συνδέονται στις εσωτερικές θέσεις IRES και τότε ξεκινάει η σάρωση για την εύρεση του αρχικού AUG κωδικονίου. Η σύνδεση στις θέσεις IRES μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες έναρξης της μετάφρασης. Οι αλληλουχίες αυτές με τις δευτεροταγείς δομές που σχηματίζουν, είναι απαραίτητες και επαρκείς για την άμεση εκκίνηση της εσωτερικής πρόσδεσης της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας. Η ταυτοποίηση μιας μεγάλης περιοχής νουκλεοτιδίων, που καθορίζει τα στοιχεία IRES, συνδιαλέγεται την ύπαρξη μεγάλης έκτασης τριτογενών αλληλεπιδράσεων μεταξύ cis-ενεργών νουκλεοτιδικών στοιχείων και trans-ενεργών παραγόντων. Το μοτίβο Y_n-X_m-AUG μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ριβοσωμική πρόσδεση.

Ανάλογα με την προέλευση του στοιχείου, εξειδικευμένες ομάδες κυτταρικών trans-ενεργών παραγόντων έναρξης για την πρωτεϊνική σύνθεση απαιτούνται για τη λειτουργία των στοιχείων IRES (eIFs). Αρχικά η πρωτεάση 2A^{pro} τέμνει τον παράγοντα eIF4G, αδρανοποιώντας τη μετάφραση των περισσοτέρων κυτταρικών mRNA. Ο εναρκτήριο μεταφραστικός παράγοντας eIF4GI δρα σαν πρωτεΐνη σκαλωσιάς, προς πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών. Το καρβοξυτελικό τεμάχιο του eIF4G, το οποίο περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες eIF3 και eIF4A, προκαλεί τη διαμεσολαβούμενη από τα στοιχεία IRES μετάφραση. Έτσι τελικά η 40S ριβοσωμική υπομονάδα καθοδηγείται στην περιοχή IRES μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα eIF3. Έτσι έχουμε τον τελικό σχηματισμό του προεναρκτηρίου συμπλόκου της μετάφρασης πάνω στο μόριο RNA, του 48S συμπλόκου. Το σύμπλοκο αυτό είναι που σαρώνει το RNA με κατεύθυνση 5' με 3', ώσπου να αναγνωρίσει το εναρκτήριο κωδικόνιο. Μια περιοχή 40 αμινοξέων του παράγοντα eIF4GI, η οποία εκθέτει περιοχές πρόσδεσης στο RNA, έχει χαρακτηριστεί ως κρίσιμη για το ριβοσωμικό σάρωμα (Racaniello, 2007, Pfister et al., 1999, Prevot et al., 2003).

Μια άλλη πρωτεΐνη που φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές αλληλεπιδράσεις κατά την έναρξη της μετάφρασης είναι ο παράγοντας eIF4B. Ο παράγοντας αυτός διεγείρει την ενεργότητα της RNA ελικάσης, eIF4A και αλληλεπιδρά με τη ριβοσωμικά προσδεμένη eIF3 πρωτεΐνη. Ο παράγοντας αυτός προσδέεται στην περιοχή IRES με μια ενεργώς εξαρτώμενη διεργασία. Μόνο μετά την πρόσδεση του παράγοντα αυτού η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα εισέρχεται σε αυτό το RNA-πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Οι καθοριστικές περιοχές για την πρόσδεση του eIF4B στο πολιοϊικό IRES στοιχείο τοποθετούνται στις περιοχές κυρίως V και λιγότερο VI και πιθανότατα και στο μυστικό AUG νουκλεοτίδιο στη θέση 586 της δευτερεύουσας αυτής δομής (Ochs et al, 2002.)

Έμμεσα η σύνδεση με τη ριβοσωμική υπομονάδα μπορεί να γίνει και με άλλες πρωτεΐνες, τους IRES-εξειδικευμένους κυτταρικούς trans- ενεργούς παράγοντες (ITAFs). Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η La πρωτεΐνη (p52, La αυτοαντιγόνο), η οποία προσδέεται στο 3' άκρο του στοιχείου IRES. Δύο άλλες πρωτεΐνες είναι η προσδεμένη σε πολυπυριμιδική περιοχή πρωτεΐνη (PTB, p57) και η unρ (p96, άνω της N-ras), η οποία προσδέεται στο RNA και συμπλοκοποιείται με την unρ-αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη (unρip, p38). Επίσης σύνδεση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας μπορεί να προκληθεί και από τη ριβοσωμικά συσχετιζόμενη πολύ r(C)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PCBP1, 2, p38), η οποία προσδέεται σε πολλαπλές θέσεις των περιοχών IRES. Οι πρωτεΐνες αυτές απαιτούνται για τη λειτουργία του τύπου I, αλλά όχι του τύπου II στοιχείων IRES. Έχει ταυτοποιηθεί και μια δεύτερη θέση πρόσδεσης για την πολύ r(C)-συνδεόμενη πρωτεΐνη στην δομή τριφυλλίου του θετικής πολικότητας RNA γενώματος. Η θέση αυτή φαίνεται να παίζει ρόλο στο να ρυθμίζει το αν το θετικής πολικότητας RNA μόριο θα μεταφραστεί ή θα αντιγραφεί. Αυτών των τεσσάρων ειδών πρωτεΐνες μπορούν να δρουν σαν RNA συνοδευόμενα μόρια, διατηρώντας τις περιοχές IRES σε μια συγκεκριμένη δομή, η οποία επιτρέπει τον σχηματισμό πολυμερών και την

άμεση πρόσδεση των μορίων RNA στη μεταγραφική μηχανή. (Boussadia et al., 2002, Racaniello, 2007, Pfister et al., 1999).



Εικόνα 8. Απεικόνιση του εναρκτήριου συμπλόκου του ιικού RNA με τους *trans*-προσδεμένους παράγοντες και την 40S ριβοσωμική υπομονάδα, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης της ιικής πολυπρωτεΐνης (Racaniello, 2009).

Η περιοχή V του IRES στοιχείου φαίνεται να είναι σημαντική στην πολιοϊκή νευρομολυσματικότητα καθώς περιέχει μια εξασθενημένη μετάλλαξη για καθένα από τα εμβολιακά στελέχη του Sabin. Έτσι προτείνεται πως η ιική εξασθένιση προκαλείται από ελάττωση της αποτελεσματικότητας της διαμεσολαβούμενης από IRES στοιχεία μετάφρασης. Αυτό συμβαίνει μέσω αποσταθεροποίησης της δομής V του IRES. Τελική κατάληξη είναι η μείωση της αναγνώρισης της περιοχής αυτής από παράγοντες απαραίτητους για την έναρξη της πολιοϊκής μετάφρασης και μπορεί να φέρει θανάσιμους ή θερμοευαίσθητους φαινοτύπους (Malnou et al., 2004, Ochs et al., 2002).

Τελικό βήμα για την έναρξη της μετάφρασης είναι η συναρμολόγηση του ολοκληρωμένου 80S ριβοσώματος, με την ενεργώς εξαρτώμενη πρόσδεση της μεγάλης 60S ριβοσωμικής υπομονάδας. Πιθανότατα εναρκτήριοι μεταγραφικοί παράγοντες παραμένουν συνεχόμενα προσδεμένοι στο 3' άκρο της IRES περιοχής αφότου συναρμολογηθεί η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα και ίσως ακόμη και κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων ριβοσωμικών εισόδων (Ochs et al., 2002).

Πρωτεολυτική αποκοπή της παραγόμενης πολυπρωτεΐνης

Καθώς το θετικής πολικότητας ιικό RNA μεταφράζεται, συντίθεται μια πολυπρωτεϊνική πρόδρομη δομή των 247kDa. Η πολυπρωτεΐνη που παράγεται από αυτό το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, είναι πολύ ασταθής και τέμνεται κατά τη μετάφραση, από ιικά κωδικοποιούμενες πρωτεΐνάσες, στα τελικά μικρότερα πρόδρομα προϊόντα της P1, P2 και P3. Η καψιδιακή πρόδρομη πρωτεΐνη P1 μυριστιλιώνεται. Οι πρωτεΐνες P2 και P3 αποκόπτονται δίνοντας επτά μη δομικές πρωτεΐνες, εκτός από τις διάφορες μορφές λειτουργικών ενδιάμεσων μορίων που παράγονται.

Η τομή της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται αρχικά με τις κύριες τομές, οι οποίες λαμβάνουν χώρα παράλληλα με τη μετάφραση από ενδομοριακές *in cis* αντιδράσεις. Στη συνέχεια ακολουθούν οι δευτερεύουσες τομές, όπου έχουμε *in cis* ή *in trans* ενδομοριακές αντιδράσεις. Κάποιες από τις πρόδρομες ακέραιες πρωτεΐνες έχουν διάφορες λειτουργίες κατά την αντιγραφή. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που συντίθενται, είναι η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και επιπλέον πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη σύνθεση ή επεξεργασία του mRNA (Racaniello, 2007, Airaksinen et al., 2000, Pfister et al., 1999).

Το πρώτο τρίτο των αρχικών συμεταφραστικών τομών, που τοποθετείται στο N-τελικό άκρο, ονομάζεται P1 περιοχή και κωδικοποιεί τις τέσσερις ανόμοιες καψιδιακές πρωτεΐνες κατά την εξής σειρά: VP4-VP2-VP3-VP1. Τα υπόλοιπα δύο τρίτα διαχωρίζονται στις περιοχές P2 και P3, οι οποίες κωδικοποιούν για μη-δομικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνάσες που κυρίως πραγματοποιούν τις πρωτεϊνικές τομές είναι δύο ειδών: οι 2A^{pro} και οι 3C^{pro} ή 3CD^{pro}, οι οποίες αποκόπτουν την πολυπρωτεΐνη και έτσι παράγονται οι τελικές ικές πρωτεΐνες. Οι τελικές αυτές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τη γενωμική αντιγραφή όπως επίσης και την παραγωγή των νέων ιικών σωματιδίων. Αμφότερα τα δύο είδη πρωτεασών είναι ενεργά στο αναπτυσσόμενο πολυπεπτιδίο και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με αυτοκατάλυση. Έτσι στη συνέχεια τέμνουν την πολυπρωτεΐνη *in trans* σε διάφορες περιοχές (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998, Pfister et al., 1999).

Οι πρωτεΐνες 2A, 3CD και 3C είναι ικές πρωτεάσες, οι οποίες εμπλέκονται στην πολυπρωτεϊνική επεξεργασία. Η 2A πρωτεΐνη παίζει επίσης ρόλο στην RNA σύνθεση και δρα στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης των κυττάρων του ξενιστή. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν, ότι το μόριο αυτό δρα και ως *trans*-ενεργοποιητής της μετάφρασης του ιικού mRNA. Η πρωτεΐνη 3D, εκτός της ενεργότητας της ικής RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, κατέχει επίσης δραστηριότητα ελικάσης, τελικής αδενολοτρανσφεράσης. Τέλος μπορεί να εμπλέκεται και στην ουριδινυλίωση της πρωτεΐνης Vpg (3B) κατά την έναρξη της RNA αντιγραφής. Αμφότερες οι πρωτεΐνες 2B και 2C, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην RNA σύνθεση. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη 2C προσδένει το RNA και έχει ενεργότητα ATPάσης και GTPάσης. Η πρωτεΐνη 3AB με

τη σειρά της έχει μια διττή λειτουργία στην αντιγραφή του πολιοϊικού γενώματος, δρώντας ως πρόδρομο μόριο για την παραγωγή της Vpg πρωτεΐνης, όπως επίσης και ως συμπαράγοντας της 3D^{pro}. Επιπλέον η πρωτεΐνη 3AB συνδέεται ισχυρά με τις νεοσυντιθέμενες κυτταροπλασματικές μεμβράνες, έτσι ώστε να επιτραπεί η χρήση της σαν λιπόφιλη άγκυρα για τη συναρμολόγηση του πολιοϊικού RNA αντιγραφικού συμπλόκου (Blondel et al., 1998).

Σε κύτταρα μολυσμένα από πολιοϊό, η πρώτη κυρίως τομή λαμβάνει χώρα μεταξύ των περιοχών P1 και P2 διαμεσολαμβάνεται από την 2A^{pro} πρωτεάση. Η θέση της cis τομής που πραγματοποιείται βρίσκεται μεταξύ ενός δεσμού τυροσίνης-γλυκίνης στο N-τελικό άκρο του, ώστε να απελευθερωθεί η καψιδική πρόδρομη P1 πρωτεΐνη. Η δομή της 2A^{pro} πρωτεάσης μοιάζει με αυτήν μιας μικρής βακτηριακής πρωτεΐνης όμοιας με χυμοτροψίνη, με τη διαφορά ότι το N-τελικό άκρο είναι ένα τετράκλωνο αντιπαράλληλο β-έλασμα. Η μεγαλύτερη C-τελική περιοχή περιέχει ένα εξάκλωνο αντιπαράλληλο β-βαρέλι. Η 2A^{pro} πρωτεάση κατέχει μια καταλυτική τριάδα αμινοξέων, η οποία περιλαμβάνει τα εξής: His-20, Asp-38 και μια ενεργή πυρηνόφιλη θέση του Cys-109. Τα αμινοξέα αυτά τοποθετούνται σε μια σχισμή μεταξύ των δύο δομών. Ένα τελευταίο ασυνήθιστο χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού είναι το ισχυρά προσδεμένο ιόν ψευδαργύρου, απαραίτητο για τη δομή του ενζύμου. Το ιόν αυτό βρίσκεται στην αρχή της C-τελικής δομής (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005).

Το δεύτερο μεγάλο βήμα τομής είναι η αποκοπή της P1 στις περαιτέρω δομικές πρωτεΐνες και η απελευθέρωση της P3 από τη θέση P2-P3. Επίσης στο σημείο αυτό υλοποιείται και η απόδοση των μη δομικών πρωτεϊνών από τα πρόδρομα αυτά πολυπεπίδια. Η περιοχή P2 αποφέρει τα πολυπεπίδια: 2A πρωτεάση, 2B και 2C ATPάση, ενώ η περιοχή P3 τα πολυπεπίδια: 3A, 3B Vpg, 3C πρωτεάση και 3D RNAπολυμεράση. Ενδιάμεσα μόρια της διαδικασίας τομής είναι τα πολυπεπίδια 2BC, 3AB και 3CD^{pro}, τα οποία επίσης κατέχουν σημαντικές λειτουργίες.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από την 3CD^{pro} πρωτεάση και ξεκινάει μέσω μιας κύριας cis-τομής, όπου παρομοίως τέμνει με αυτοκατάλυση καθώς απομακρύνεται από την πρωταρχική πρωτεΐνη. Έπειτα ακολουθούν trans-τομές, οι οποίες δίνουν τις τελικές δομικές πρωτεΐνες όπως προαναφέρονται, καθώς και τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3, οι οποίες τότε απελευθερώνονται από τα πρόδρομα μόριά τους. Η διαδικασία τομής από την 3CD^{pro} πρωτεάση ξεκινάει αφότου απελευθερώνεται η 2A^{pro} πρωτεάση. Δευτερεύουσες τομές των πρόδρομων P1 και P2 περιοχών πραγματοποιούνται από την 3C^{pro} πρωτεάση, αφού αυτή αποκόπτεται από την 3CD^{pro} πρωτεάση. Η 3C^{pro} πρωτεάση πραγματοποιεί μια πρωταρχική τομή μεταξύ των 2C και 3A περιοχών (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005, Pfister et al., 1999).

Η 3C^{pro} πρωτεάση τέμνει μόνο σε διπεπίδια γλουταμίνης-γλυκίνης. Παραταύτα, αποτελεσματική τομή του πολιοϊικού αυτού ζεύγους αμινοξέων απαιτεί μια αλανίνη στη θέση P4. Η 3C^{pro} πρωτεάση φέρει ομοιότητα με τις όμοιες με χυμοτροψίνη πρωτεάσες σερίνης. Η

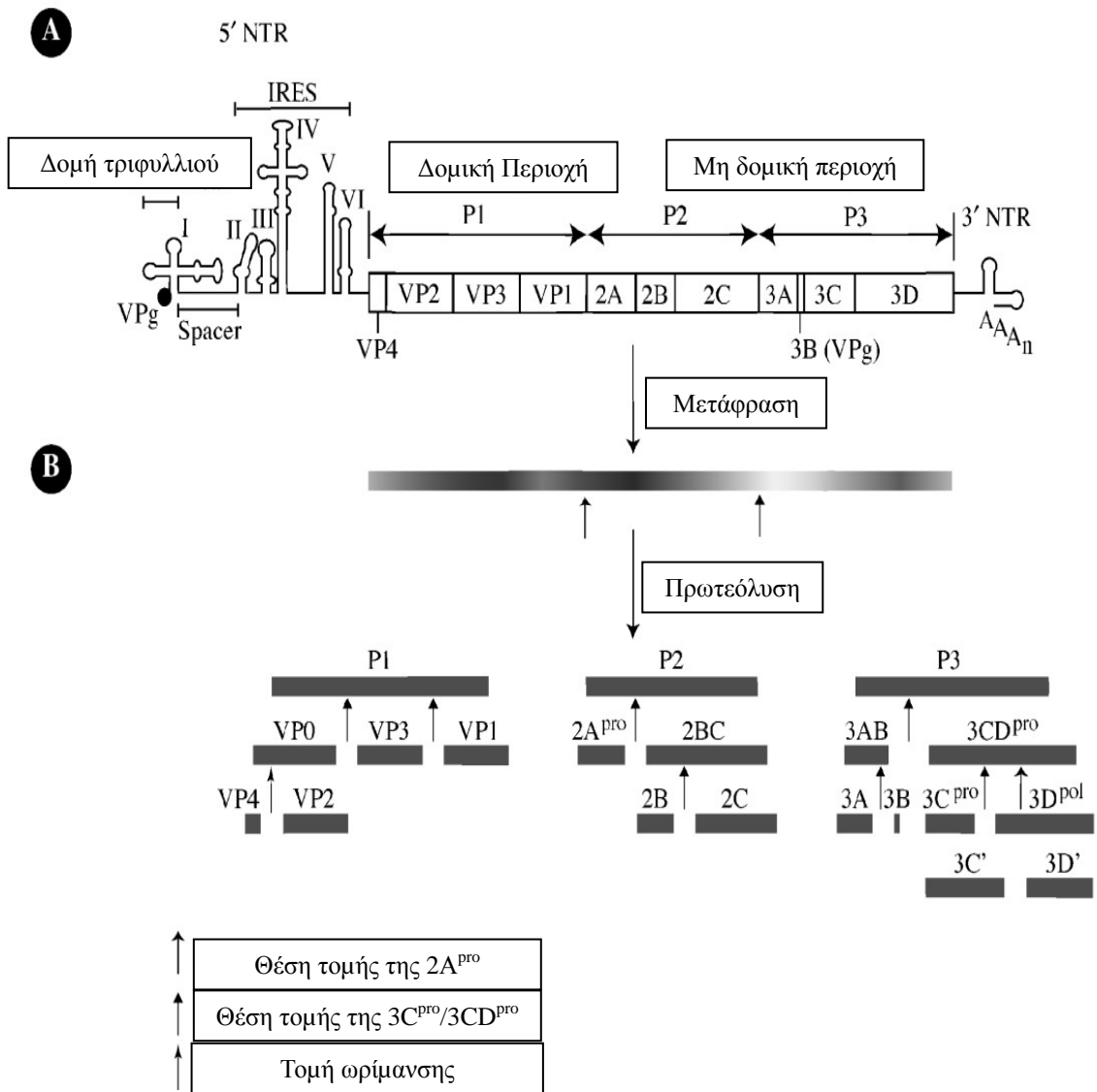
καταλυτική τριάδα της πρωτεάσης αυτής είναι η εξής: His-40, Glu-71 και Cys-147 ως το πυρηνόφιλο κατάλοιπο. Το ιικό ένζυμο αναδιπλώνεται ανάμεσα σε δύο ισοδύναμα β-βαρέλια, αλλά διαφέρει από τη χυμοτριψίνη σε κάποιες από τις θηλιές σύνδεσης. Το γλουταμινικό οξύ βρίσκεται μακριά από την ενεργό θέση της ιστιδίνης κι έτσι δεν βοηθάει στη διαδικασία της καταλυσης. Επίσης η 3C^{pro} περιέχει θέση πρόσδεσης και για ιικό RNA κατά τη διεργασία της γενωμικής αντιγραφής (Racaniello, 2007).

Παρότι οι πρωτεάσες 3C^{pro} και 3CD^{pro} τέμνουν το ίδιο αποδοτικά τις περιοχές P2 και P3, η 3CD^{pro} πρωτεάση πραγματοποιεί τις δευτερεύουσες τομές της περιοχής P1 πολύ πιο αποτελεσματικά από την 3C^{pro} πρωτεάση. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η 3D^{pol} αλληλουχία της 3CD^{pro} πρωτεάσης μπορεί να απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων της περιοχής P1, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την αποτελεσματική διαδικασία πέψης από το 3C^{pro} τμήμα του ενζύμου. Γενικότερα τα σήματα τομής για τις 3CD^{pro} και 3C^{pro} πρωτεάσες διαφέρουν μεταξύ τους σε αλληλουχίες άνω και κάτω του σημείου τομής, έχοντας ως αποτέλεσμα τη διαφορά της αποτελεσματικότητας κατά την τομή του από τα δύο ένζυμα. Αυτό οδηγεί σε δυσανάλογες συγκεντρώσεις κάποιων ικών πρωτεϊνών, καθώς και των προδρόμων μορίων τους.

Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι μέσω των πολύπλοκων σειριακών τομών, επιτρέπεται στον πολιοϊό σε μεγάλο βαθμό η ύπαρξη μετα-μεταφραστικού ελέγχου της έκφρασης των πρωτεϊνών σε επίπεδο ρυθμού και έκτασης της πρωτεολυτικής διεργασίας. Έτσι μπορούν να ρυθμίζονται τα ποσά των ικών πρωτεϊνών που παράγονται. Ακόμη εναλλακτικές θέσεις τομής, μπορούν επίσης να οδηγήσουν στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετική δραστηριότητα κι έτσι η κωδική ικανότητα του μικρού πολιοϊικού γενώματος μπορεί να αυξηθεί (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005).

Λόγω του ότι η πρωτεάση 3CD^{pro} δεν κατέχει δραστηριότητα RNA πολυμεράσης, κάποιο τμήμα της πρέπει να αποκοπεί ώστε να αποδοθεί η τελική 3D^{pol} και να επιτραπεί η αντιγραφή του ικού RNA. Η αντίδραση αυτή είναι πολύ αργή κι έτσι το μεγαλύτερο ποσό της 3D^{pol} είναι παρόν στην πρόδρομη μορφή 3CD^{pro} (Racaniello, 2007).

Το τρίτο και τελικό βήμα που πραγματοποιείται κατά την ωρίμανση των πρωτεϊνών και τη συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, είναι η τομή της VP0 προς το σχηματισμό των VP4 και VP2. Η διαδικασία αυτή γίνεται πιθανότατα μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού που εμπλέκει την καψιδίωση του RNA. Η τομή αυτή είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα του ιού, γι αυτό και αναφέρεται ως η τομή ωρίμανσης. Η πρωτεΐνη VP4 και τα πρόδρομα μόρια VP0 και P1 μυριστιλιώνονται στο N-τελικό άκρο τους (Mueller et al., 2005, Pfister et al., 1999).



Εικόνα 9. Απεικόνιση της πρωτεϊνόλυσης του πρωτεϊνικού προϊόντος του πολιοϊού. Τα βέλη φανερώνουν τα σημεία τομής των πρωτεασών (Jesus, 2007).

2.3.γ. Αντιγραφή του ιού RNA

Η αντιγραφή του ιικού RNA, πραγματοποιείται εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα και το ένζυμο που μεσολαβεί είναι η ικά εξειδικευμένη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Το πρώτο βήμα είναι η αντιγραφή του θετικής-πολικότητας RNA προς τον σχηματισμό του αρνητικής-πολικότητας RNA. Το αρνητικής-πολικότητας RNA χρησιμεύει ως ενδιάμεσο μόριο για την ακολουθούμενη παραγωγή των επιπρόσθετων θετικής-πολικότητας αλυσίδων που τελικά εισέρχονται στα νέα ικά σωματίδια. Σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊό το θετικής-πολικότητας γένωμα πολλαπλασιάζεται σε περίπου 50.000 αντίγραφα ανά κύτταρο, τα οποία χρησιμεύουν σε μετάφραση των ικών πρωτεϊνών. Τα αντίγραφα αυτά τελικά καψιδιώνονται στα συναρμολογούμενα ικά σωματίδια (Racaniello, 2007, Airaksinen, 2000).

Στο κύτταρο κατά τη διαδικασία της αντιγραφής εκτός από το μονόκλωνο θετικής-πολικότητας RNA, υφίσταται και το αντιγραφικό ενδιάμεσο RNA (RI), το οποίο είναι RNA πλήρους μεγέθους και όπου συνδέονται έξι με οκτώ αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Το αντιγραφικό ενδιάμεσο RNA είναι κυρίως αρνητικής-πολικότητας με θετικής-πολικότητας αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Ακόμα υπάρχει και το αντιγραφόμενης μορφής RNA (RF), το οποίο φέρει δίκλωνη δομή και περιέχει από μια πλήρη αλυσίδα αρνητικής και θετικής πολικότητας. Το δίκλωνο αυτό RNA φαίνεται να είναι σταθερό μέχρι τον επόμενο αντιγραφικό γύρο. Μόνο οι μορφές RF και RI περιλαμβάνουν αρνητικής πολικότητας αλυσίδες στα μολυσμένα κύτταρα. Η ική RNA σύνθεση είναι ασύμμετρη καθώς η σύνθεση της θετικής αλυσίδας είναι τριάντα με εβδομήντα φορές μεγαλύτερη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας. Έτσι λοιπόν η RNA αντιγραφική διαδικασία έχει τη μορφή του παρακάτω μονοπατιού.

$$\text{Εισερχόμενο (+)πολικότητας ικό RNA} \rightarrow \text{σύνθεση (-)πολικότητας RNA} \rightarrow \text{RF} \rightarrow$$
$$\text{σύνθεση (+)πολικότητας RNA} \rightarrow \text{RI} \rightarrow \text{(+)πολικότητας RNA}$$

(Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005, Pfister et al., 1999).

Έπειτα από την είσοδο του πολιοϊού στο κύτταρο, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi καταστρέφονται και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης, στην επιφάνεια των οποίων πραγματοποιείται η ική αντιγραφή. Μεμβρανική τοποθέτηση των ικών RNA αντιγραφικών πρωτεϊνών μπορεί να αποτελέσει σε αυξημένες συγκεντρώσεις αντιγραφικών συστατικών και έτσι να αυξήσει τον βαθμό ή την αποδοτικότητα των αντιδράσεων της αντιγραφής. Τα κυστίδια επάγονται από τις πρωτεΐνες 3A και 2BC (Racaniello, 2007, Blondel et al, 1998).

Μια επιπλέον ιδιότητα των μεμβρανών είναι ότι με την ιδιότητα της ικής RNA πολυμεράσης, η οποία μπορεί να επιλέγει την αντιγραφική μήτρα, οι μεμβράνες μπορούν να εξυπηρετούν στο να διαχωρίσουν τα ικά RNA από τα κυτταρικά κατά την αντιγραφή. Μια τελευταία ιδιότητά είναι ότι τα ικά παραγόμενα κυστίδια μπορούν επίσης να προστατεύσουν την

ική αντιγραφική μηχανή από το κυτταρικό περιβάλλον του ξενιστή (Pfister et al., 1999).

Η ική RNA πολυμεράση ($3D^{pol}$), είναι απαραίτητη για την RNA αντιγραφή και καταλύει τη σύνθεση των αρνητικής όπως και θετικής πολικότητας αλυσίδων, εξαρτώμενη από έναν εκκινητή και μια RNA μήτρα. Η πολυμεράση αυτή παράγεται έπειτα από την αυτοκατάλυση και αποκοπή της πρόδρομης πρωτεάσης $3CD^{pro}$ και σχετίζεται με ένα τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης. Το τμήμα αυτό της κυτταρικής μεμβράνης διαδοχικά φαίνεται να αποτελείται από λείες καταλυτικές μεμβράνες και ονομάζεται RNA αντιγραφικό σύμπλοκο. Οι διεργασίες αυτές πραγματοποιούνται λοιπόν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία παρακινούνται από πολλές ικές πρωτεΐνες, όπως οι 2BC, 2C, 3AB και $3C^{pro}$. Η $3D^{pol}$, έχει δύο ειδών καταλυτική ενεργότητα, αφού εκτός του ότι επιμηκύνει τις RNA αλυσίδες, επίσης ουριδυλιώνει την πρωτεΐνη VPg. Η επιμήκυνση της αλυσίδας οδηγεί στη σύνθεση του VPg πολύ-U τμήματος και διαδοχικά στο σχηματισμό του RF (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005, Pfister et al., 1999).

Για την έναρξη της αντιγραφής του ικού γενώματος απαραίτητη είναι η αναγνώριση ενός ολιγο-U εκκινητή από την ική RNA πολυμεράση. Εκτός της ενζυμικής της δραστηριότητας, η $3D^{pol}$ του πολιοϊού μπορεί επίσης να ξετυλίγει δίκλωνο RNA χωρίς την ανάγκη υδρόλυσης τριφωσφορικής αδενοσίνης. Επίσης διατηρεί το RNA μονόκλωνο με το να αποτρέπει το ζευγάρισμα βάσεων μεταξύ της μήτρας και του προϊόντος, έχοντας έτσι ως αποτέλεσμα το να επιτρέπει πολλαπλούς κύκλους RNA σύνθεσης (Racaniello, 2007, Wimmer et al., 1993).

Υπάρχουν και άλλες επιπλέον πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ικού γενώματος, μια εκ των οποίων είναι η $2A^{pro}$ πρωτεΐνη. Η $2A^{pro}$ πρωτεΐνη υποκινεί την έναρξη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας που απαιτείται ως ενδιάμεσο για την αντιγραφή. Προ της κωδικής περιοχής της $2A^{pro}$ πρωτεΐνης βρίσκεται ένα δεύτερο IRES στοιχείο, το οποίο επιδραστικά ρυθμίζει και μετριάζει την ανάγκη της δραστηριότητας του ενζύμου (Racaniello, 2007).

Μια δεύτερη πρωτεΐνη είναι η μικρή και σχετιζόμενη με την υδρόφοβη μεμβράνη 2B πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται σε ένα πρώιμο στάδιο της ικής RNA σύνθεσης. Η πρωτεΐνη 2B είναι μερικώς υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανικών κυστιδίων και τον έλεγχο της μορφολογίας τους στα μολυσμένα κύτταρα, όπου συμβαίνει η πραγματοποίηση της αντιγραφής. Επίσης υπάρχει η πρωτεΐνη 2C με διπλή λειτουργία: δρα ως NTPάση καθώς επίσης οδηγεί και τα αντιγραφικά σύμπλοκα στις κυτταρικές μεμβράνες. Η πρόδρομη πρωτεΐνη 2BC είναι επίσης απαραίτητη κατά την έναρξη της αντιγραφής και επιμήκυνσης του RNA, αυξάνει την διαπερατότητα της μεμβράνης και οδηγεί στο σχηματισμό κυστιδίων. Τέλος η $2C^{ATPάση}$ εμπλέκεται σε λειτουργίες κατά την RNA καψιδίωση και την RNA απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα από το ικό καψίδιο (Racaniello, 2007, Pfister et al., 1999).

Μια τελική ική πρωτεΐνη απαραίτητη για την αντιγραφή είναι η πρόδρομη 3AB, από την οποία προέρχονται οι 3A και η 3B. Οι 3AB και 3A συνδέονται με τη μεμβράνη, μέσω μιας

υδρόφοβης δομής, καθώς η γενωμική αντιγραφή πραγματοποιείται σ' ένα μεμβρανικό περιβάλλον. Έπειτα η 3AB αλληλεπιδρά με τις 3D^{pol}, ενισχύοντας τη δράση της και 3CD^{pro} στα μολυσμένα κύτταρα και το σύμπλοκο αυτό προσδένει το 3' τελικό άκρο του RNA του πολιοϊού. Έτσι η 3AB μπορεί να είναι ένας συμπαράγοντας κατά την ιική σύνθεση. Η πρωτεΐνη 3AB, αγκυροβολεί την πρωτεΐνη 3B, γνωστή και ως VPg στις μεμβράνες για το πρωταρχικό στάδιο της αντιγραφής, κατά το οποίο η VPg δρα ως πρωτεΐνη εκκινητής για την RNA σύνθεση. Η πρωτεΐνη 3AB άμεσα αποκόπτεται από την πρωτεάση 3CD^{pro} προς το σχηματισμό του VPg συνδεδεμένου RNA (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005, Pfister et al., 1999).

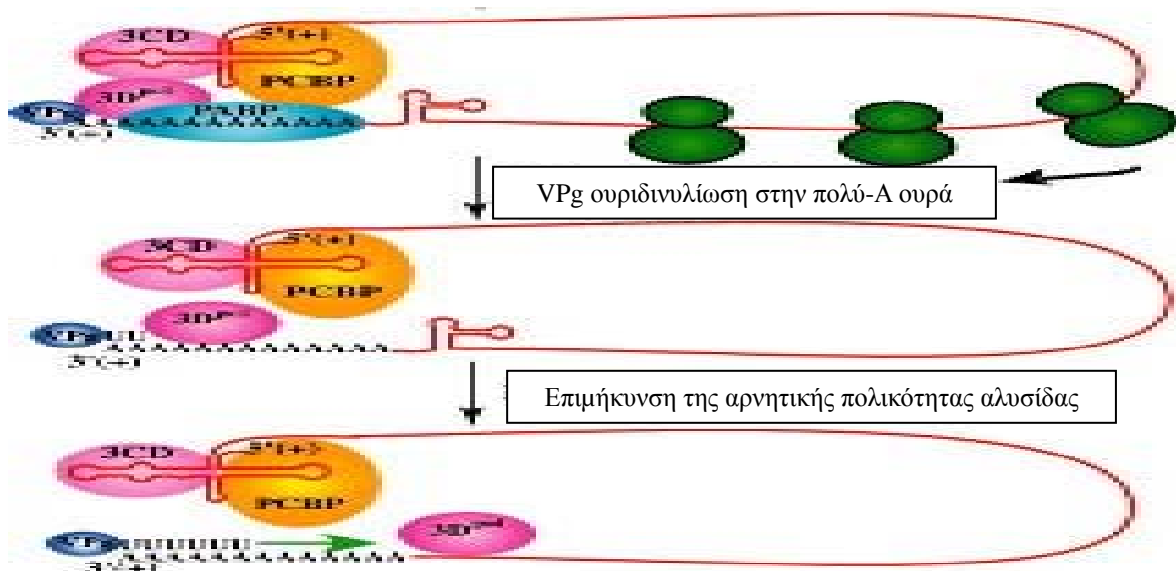
Στη θετικής-πολικότητας RNA σύνθεση, για τη μετατροπή της πρωτεΐνης VPg σε μόριο-εκκινητή θα πρέπει να προηγηθεί η ουριδινυλίωση της (VPg-pUpU) σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό γίνεται εφικτό έχοντας ως μήτρα μια εσωτερική RNA φουρκέτα, το cis-ενεργό αντιγραφικό στοιχείο cre, που τοποθετείται στην 2C κωδική περιοχή. Η περιοχή της θηλιάς της φουρκέτας cre αποτελεί την πρόιμη μήτρα για την VPg ουριδινυλίωση. Η αντίδραση αυτή πιθανότατα εξαρτάται από την 3CD^{pro}, καθώς παρέχει την αναγκαία εξειδίκευση. Η ουριδινυλίωση της VPg εκτείνεται προς το σχηματισμό πολύ(U), μια κατασκευή την οποία χρησιμοποιεί η 3D^{pol} για την έναρξη της RNA σύνθεσης (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005).

Έχει επίσης δειχθεί ότι μερικά διαλυτά κυτταρικά συστατικά απαιτούνται για την έναρξη της ιικής RNA αντιγραφής. Ένα από τα συστατικά αυτά είναι η κυτταρική πολύ r(C)-συνδεδεμένη πρωτεΐνη, η οποία προσδένεται σε μια δευτεροταγή δομή σε σχήμα τριφυλλίου του θετικής-πολικότητας RNA. Η πρόσδεση αυτή είναι καταλυτική για την στρατολόγηση της ιικής πρωτεΐνης 3CD^{pro} στην αντίθετη μεριά του τριφυλλίου και έτσι τελικά σχηματίζεται ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από το 5' τριφύλλι, 3CD^{pro} και την κυτταρική πρωτεΐνη και είναι απαραίτητο για την έναρξη της RNA σύνθεσης. Ένα ακόμα κυτταρικό συστατικό είναι η πολύ (A)-συνδεδεμένη πρωτεΐνη 1, η οποία αλληλεπιδρά με την πολύ r(C)-συνδεδεμένη πρωτεΐνη, την 3CD^{pro} και την 3' πολύ (A) ουρά του RNA του πολιοϊού κυκλοποιώντας το γένωμα. Η μορφοποίηση αυτού του κυκλικού ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου απαιτείται για τη σύνθεση του αρνητικής-πολικότητας RNA.

Η RNA-προδεμένη δομή της 3CD^{pro} περιέχεται μέσα στο 3C^{pro} τμήμα της πρωτεΐνης, στην αντίθετη πλευρά του μορίου από την πλευρά της θέσης που εμπλέκεται στην πρωτεόλυση, που λαμβάνει χώρα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι η 3CD^{pro} παίζει σημαντικό ρόλο στην ιική σύνθεση, συμμετέχοντας στο σχηματισμό του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου στο 5' άκρο του RNA θετικής πολικότητας, όπου βρίσκεται η δομή τριφυλλίου. Αναστολή της έναρξης της μετάφρασης απωθεί τα ριβοσώματα από το ιικό RNA, του οποίου το 3' πολύ-A άκρο αλληλεπιδρά με την VPg-pUpU και σχηματίζει το κυκλικό προεναρκτήριο RNA αντιγραφικό σύμπλοκο (Racaniello, 2007).

Οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μετάφρασης δεν μπορούν να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα στην ίδια RNA ική μήτρα. Έτσι όταν τα ριβοσώματα είναι προσδεμένα στο ικό RNA, τότε η αντιγραφή αναστέλλεται και όταν αυτά απελευθερώνονται από το RNA, τότε η διαδικασία της αντιγραφής αναπτύσσεται κανονικά. Έχει προταθεί ότι η δομή τριφυλλιού στην 5' μη κωδική περιοχή του θετικής πολικότητας RNA του πολιοϊού ρυθμίζει αν το RNA θα μεταφραστεί ή αν θα μεταγραφεί. Αρχικά κατά τη μόλυνση υφίσταται σύνδεση της πολύ r(C)-συνδεόμενης πρωτεΐνης στη δομή τριφυλλιού και έτσι έναρξη της μετάφρασης. Όταν η 3CD^{pro} παράγεται όμως και προσδέεται στη δομή τριφυλλιού, προάγοντας την κυκλοποίηση του γενώματος, τότε παρεμποδίζεται η προσέγγιση των ριβοσωμάτων στο RNA. Τελικά καταστέλλεται η μετάφραση και ενεργοποιείται η RNA σύνθεση. Ο μηχανισμός αυτός φανερώνει πως μόνο μήτρες πλήρους μεγέθους μπορούν να αντιγραφούν (Racaniello, 2007, Mueller et al., 2005).

Η επιλογή του ικού RNA έναντι του κυτταρικού mRNA ως μήτρα για την αντιγραφή γίνεται με ποικίλους τρόπους, που έχουν κυρίως σχέση με την αλληλεπίδραση των αντιγραφικών πρωτεϊνών με αλληλουχικά στοιχεία του ικού γενώματος. Ένας αρχικός τρόπος είναι η αναγνώριση από την 3D^{pol} του VPg-pUpU εκκινητικού μορίου, το οποίο προσδέεται σε ικά πολυαδενυλιωμένα RNA. Επίσης με τον ψευδόκομπο που σχηματίζεται στο 3' άκρο του ικού RNA και την αλληλεπίδραση της AB πρωτεΐνης με την 3D^{pol} στο άκρο αυτό, αυξάνεται η ειδικότητα της αντιγραφής του ικού γενώματος από την 3D^{pol}. Αυτή η εξειδίκευση λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια της αντιγραφής, όπου έχουμε λίγα μόρια πολυμερασών και χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγραφικών συστατικών.



Εικόνα 10. Η δομή του κυκλικού προεναρκτήριου ριβονουκλεοπρωτεϊνικού αντιγραφικού συμπλόκου. Κυκλοποίηση μέσω αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών 3AB/3CD^{pro}/PCBP2, στο 5' άκρο με δομή τριφυλλιού, και της πρωτεΐνης PABP σχετιζόμενης με την 3' πολυ-A ουρά (Flanegan, 2004, <http://biochem.med.ufl.edu/facultytemp.php?lastname=Flanegan&firstname=J.+Bert> , Mueller et al., 2005).

Τέλος στην εξειδίκευση της μήτρας παίζει ρόλο και η όμοια με τριφυλλιού δομή της 5' μη κωδικής περιοχής του θετικής πολικότητας RNA, στην οποία προσδένεται η 3CD^{pro} και η πολύ r(C)-συνδεόμενη πρωτεΐνη προς το σχηματισμό του ιικού αντιγραφικού συμπλόκου (Racaniello, 2007).

Η επανέναρξη της αντιγραφής δεν μπορεί να είναι δυνατή, ούτε και αποτελεσματική. Ακόμα τα γεγονότα που οδηγούν στην έναρξη της RNA σύνθεσης των θετικής και αρνητικής πολικότητας αλυσίδων μπορεί να διαφέρουν ή να πραγματοποιούνται με διαφορετική αποτελεσματικότητα. Για τους παραπάνω λόγους έχουμε το σχηματισμό των RI μορίων και την υπερσύνθεση των θετικών έναντι των αρνητικών κλώνων κατά τη γενωμική αντιγραφή (Pfister et al., 1999, Wimmer et al., 1993).

2.3.δ. Καψιδίωση των τελικών ιικών σωματιδίων

Η καψιδίωση των VPg-συνδεμένων θετικής πολικότητας RNA μορίων είναι η διαδικασία που αποτελεί τα τελικά βήματα στον κυτταρικό κύκλο ζωής του πολιοϊού. Η διαδικασία αυτή φαίνεται να είναι συνδεδεμένη με την RNA σύνθεση στο εσωτερικό των μεμβρανικών δομών των μολυσμένων κυττάρων και πιο συγκεκριμένα στην επιφάνεια των ιικά παραγόμενων μεμβρανικών κυστιδίων του κυτταροπλάσματος τους (Jesus, 2007, Blondel et al., 1998).

Αρχικά το πρόδρομο P1 πολυπεπτίδιο μυριστιλιώνεται και πέπτεται από την 3CD^{pro}. Η πέψη αυτή δίνει τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3, οι οποίες συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν ένα 5S πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή τότε συναθροίζονται παράγοντας ένα 14S πενταμερές. Δώδεκα πενταμερή τελικά συναρμολογούνται σχηματίζοντας το 75S προκαψίδιο. Το VPg-προσδεμένο θετικής πολικότητας ιικό RNA μπορεί να καψιδιώνεται είτε με συμπύκνωση των πενταμερών γύρω του, είτε με ενσωμάτωσή του στα προκαψίδια. Έτσι το προτελευταίο πρόδρομο σωματίδιο μπορεί να είναι ο 150S προϊός, ο οποίος περιέχει 60 αντίγραφα καθεμιάς από τις πρωτεΐνες VP0, VP3 και VP1, οι οποίες περικλείουν ένα αντίγραφο του γενωμικού RNA (Jesus, 2007, Wimmer et al., 1993).

Έπειτα ακολουθεί η αποκοπή της πρωτεΐνης VP0 στους απογόνους VP2 και VP4, η οποία ονομάζεται πέψη ωρίμανσης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με έναν αυτοκαταλυτικό μηχανισμό πιθανότατα σε σύνδεση με το RNA, όπως προαναφέρθηκε, και σηματοδοτεί το τέλος της ιικής συναρμολόγησης. Αυτό πετυχαίνεται με σταθεροποίηση του καψιδίου και μετασχηματισμό του προϊού σε ένα ώριμο, μολυσματικό, ιικό 160S σωματίδιο. Το τελικό βήμα για την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου ζωής είναι η απελευθέρωση των ώριμων, μολυσματικών πολιοϊών (Jesus, 2007, Mueller et al., 2005, Airaksinen et al., 2000).

Αφού συναρμολογηθούν τα ιικά σωματίδια, συγκεντρώνονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων με τη μορφή κρυσταλλικών μορίων, τα οποία τελικά απελευθερώνονται με

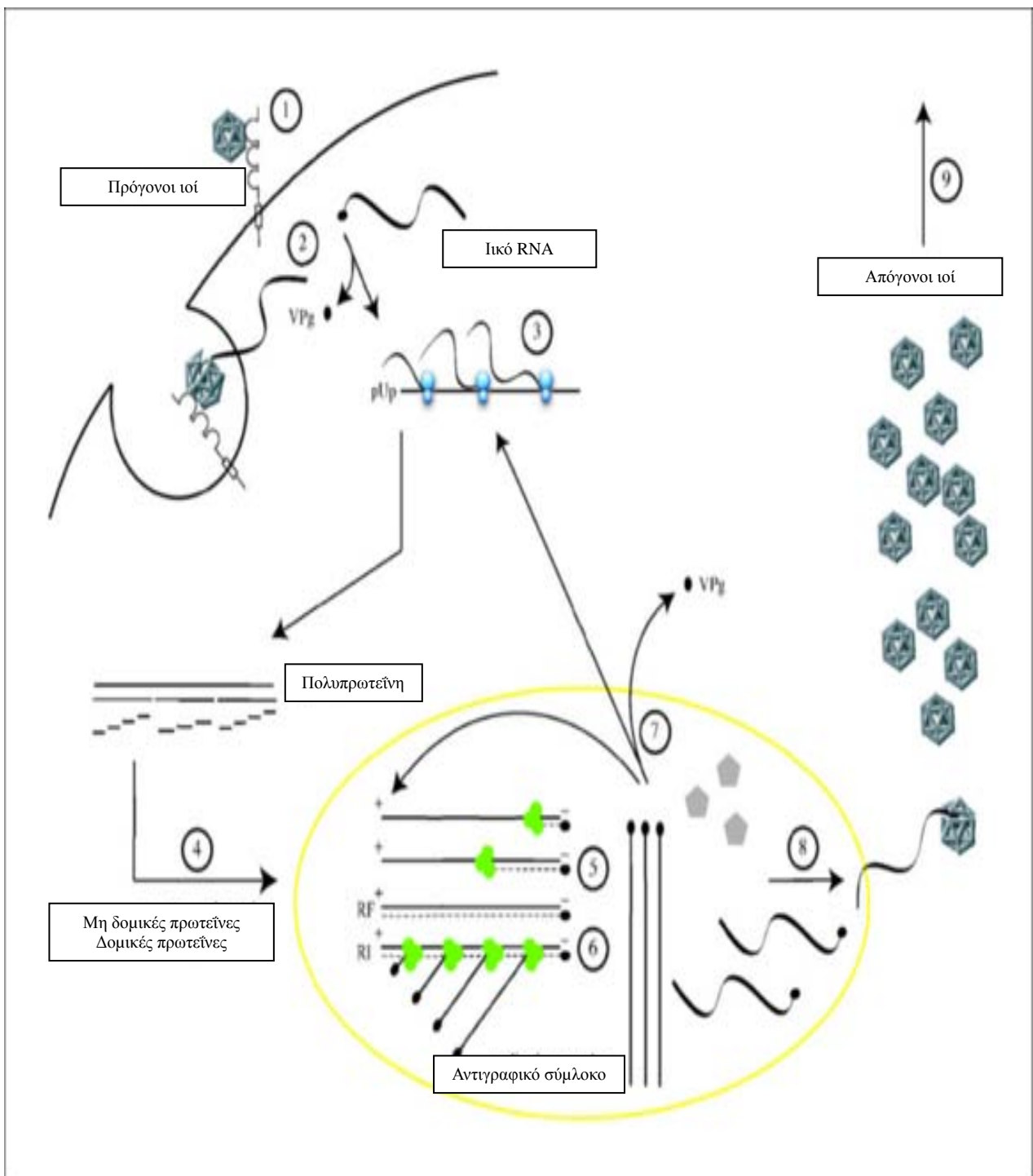
το σπάσιμο της κυτταρικής επιφάνειας ή με ενεργό απελευθέρωση (Blondel et al., 1998).

Ένα μολυσμένο κύτταρο μπορεί να παράγει 10^4 με 10^5 πολιοϊικά σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά απελευθερώνονται μέσω εναλλακτικών μονοπατιών, ένα εκ των οποίων είναι μέσω λύσης των μολυσμένων κυττάρων. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται έπειτα από την αυξημένη διαπερατότητα των μεμβρανών τους, η οποία προέρχεται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις των μη δομικών πρωτεϊνών 3A και 3AB, 2BC και 2B. Έχει προταθεί ότι η πολιοϊικά προκαλούμενη λύση μπορεί να πραγματοποιείται λόγω των αλληλεπιδράσεων ιού-υποδοχέα, οι οποίες παρατηρούνται κατά την έναρξη του ιικού κύκλου. Η απελευθέρωση στο βαθμό του 1% των πολιοϊικών σωματιδίων μπορεί διαδοχικά να εκκινήσει αποτελεσματικές μολύνσεις των κατάλληλων κυττάρων του ξενιστή (Jesus, 2007, Mueller et al., 2005, Airaksinen et al., 2000, Blondel et al., 1998).

Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής του πολιοϊού είναι εξαιρετικά γρήγορος, αποφέροντας τον θάνατο του κυττάρου ξενιστή σε περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. In vitro μελέτες έδειξαν ότι πολιοϊκές μολύνσεις μπορούν να προκαλέσουν και την απόπτωση των πολιοϊικά μολυσμένων κυττάρων. Η απόπτωση μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τα συμπτώματα που αυξάνονται λόγω των συνεχών μολύνσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο πιθανός ρόλος αυτής της ενεργής διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου είναι να περιορίσει την ιική εξάπλωση.

Οι 2A^{pro} και 3C^{pro} παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού προγράμματος στα μολυσμένα κύτταρα. Συγκεκριμένα η πολιοϊική 3C πρωτεΐνη προκαλεί απόπτωση με ένα μηχανισμό εξαρτώμενο από κασπάσες. Ο πολιοϊός μπορεί όμως και να αναστείλει την απόπτωση μέσω των πρωτεϊνών 2B/2BC, 2C^{ATPάση} και 3A. Έτσι οι προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές λειτουργίες συνυπάρχουν στα μολυσμένα από πολιοϊό κύτταρα. Μπορεί να θεωρηθεί ότι μια αλλαγή στην ισορροπία μπορεί να είναι διαφορετική σε κύτταρα διαφορετικών ιστών, έχοντας ως αποτέλεσμα την πιθανότητα η απόπτωση να παίζει σημαντικό ρόλο στην πολιοϊική παθογένεια (Mueller et al., 2005, Airaksinen et al., 2000).

Η καψιδίωση του πολιοϊικού RNA είναι εξειδικευμένη, καθώς τα ιικά σωματίδια περιέχουν μόνο θετικής πολικότητας ιικό RNA, αποκλείοντας όλους τους άλλους τύπους RNA που συνυπάρχουν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Το VPg συνδεδεμένο αρνητικής πολικότητας RNA παρ' όλα αυτά αποκλείεται από τα ιικά σωματίδια (Wimmer et al., 1993).



Εικόνα 11. Ο κύκλος ζωής του πολιοϊού. 1) Πρόσδεση του πολιοϊού στον υποδοχέα CD155 και απελευθέρωση του ιού RNA στο κυτταρόπλασμα, 2) αποκοπή της ικής πρωτεΐνης VPg μέσω μιας κυτταρικής φωσφοδιεστεράσης και μετάφραση του ιικού RNA, 3) Πρωτεολυτική διεργασία της ικής πολυπρωτεΐνης προς απόδοση των ώριμων δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών, 4) σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA, έχοντας ως μήτρα το θετικής πολικότητας και παράγοντας το δίκλωνο RF, 5) Έναρξη πολλών θετικής πολικότητας αλυσίδων από μια μονή αρνητικής πολικότητας αλυσίδα που παράγει το μονόκλωνο RI, 6) τα νεοσυντιθέμενα θετικής πολικότητας RNA υφίστανται μετάφραση ή 7) συνδέονται με καψιδικά πρόδρομα μόρια προς καψιδίωσή τους και πρόκληση της τομής ωρίμανσης της VP0, 8) παραγωγή των απογόνων ιών και 9) λύση των μολυσμένων κυττάρων και απελευθέρωση των μολυσματικών απογόνων ικών σωματιδίων (Jesus, 2007).

2.4. Κυτταρικές αποκρίσεις (CPE) στην πολιοϊκή μόλυνση

Τα μολυσμένα από πολιοϊό κύτταρα υποβάλλονται σε μεταβολικές και μορφολογικές μεταβολές, όπως απόσπασή τους από το υπόστρωμα (Blondel et al., 1998). Επίσης παρατηρείται μια ταχύτατη αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης τους. Περίπου 2 ώρες μετά τη μόλυνση, τα πολυριβωσώματα διαταράσσονται και η μετάφραση σχεδόν όλων των κυτταρικών mRNA σταματάει και αντικαθίσταται από τη μετάφραση των ιικών mRNA. Η αναστολή αυτή αποδίδεται κυρίως στην άμεση αποκοπή του παράγοντα eIF4GI και στην καθυστερημένη αποκοπή του παράγοντα eIF4GII από την 2A πολιοϊκή πρωτεάση.

Η πρωτεΐνη eIF4G (p220) είναι συστατικό του eIF4F και γενικότερα μέλος του συνδεδεμένου με την καλύπτρα συμπλόκου eIF-4, το οποίο αναγνωρίζει το συνδεδεμένο με καλύπτρα 5' άκρο των ευκαρυωτικών mRNA κατά την έναρξη της μετάφρασης. Ο eIF4G δεν αποκόπτεται σαν ξεχωριστό πολυπεπίδιο, αλλά μόνο σαν τμήμα του eIF4F συμπλόκου. Η πρόσδεση του eIF4E στον eIF4G μπορεί να του προκαλέσει αλλαγές, οι οποίες να τον μετατρέψουν σε ένα πιο αποδοτικό υπόστρωμα για την πρωτεάση (Prevoet et al., Racaniello, 2007, 2003, Pfister et al., 1999).

Με την πρωτεόλυση που πραγματοποιείται στον παράγοντα αυτό, απομονώνεται το N-τελικό άκρο και 1/3 της πρωτεΐνης όπου φυσιολογικά προσδένεται ο παράγοντας eIF4E, υπεύθυνος για τη μετάφραση των ευκαρυωτικών καλυμένων με 5' καλύπτρα mRNA. Έτσι αναστέλλεται ισχυρά η μετάφρασή τους ενώ ενισχύεται η μετάφραση των ιικών IRES-οδηγούμενων mRNA από τα C-τελικά 2/3 της πρωτεΐνης που παραμένουν και ονομάζονται p100, τα οποία άμεσα προσδένονται στα IRES στοιχεία (Prevoet et al., 2003)

Αναστολή παρατηρείται επίσης και στην κυτταρική RNA σύνθεση, η οποία καταλύεται και από τις τρεις τάξεις DNA-εξαρτώμενων RNA πολυμερασών I, II και III. Οι πολυμεράσες αυτές είναι ενζυματικά ενεργές, γεγονός που φανερώνει ότι στόχος της μεταγραφικής αναστολής είναι άλλες πρωτεΐνες συνεργοί (Racaniello, 2007).

Όπως η 2A^{pro} έτσι και η 3C^{pro} εμπλέκονται ενεργά και στην αναστολή λειτουργιών των κυττάρων του ξενιστή. Η 3C^{pro} με τη σειρά της, αναστέλλει το μεταγραφικό σύστημα της πολυμεράσης III και ειδικότερα απενεργοποιεί το μεταγραφικό της παράγοντα TFIIIC, συνδεδεμένο με το DNA. Στόχος της 3C^{pro} είναι μια υπομονάδα του TFIIIC, που αλληλεπιδρά με τον υποκινητή της πολυμεράσης III. Επίσης έχουμε απενεργοποίηση του παράγοντα της RNA πολυμεράσης, TFIIID, που είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η απενεργοποίηση αυτή μερικώς πραγματοποιείται με την αποκοπή από την 3C^{pro} μιας υπομονάδας του παράγοντα TFIIID, η οποία είναι η προσδεμένη σε TATA box πρωτεΐνη. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν και στην αναστολή της κυτταρικής μετάφρασης (Mueller et al., 2005, Racaniello, 2007, Pfister et al., 1999).

Στη συνέχεια παρατηρείται και αναστολή της μεταγραφής από την πολυμεράση τύπου I.

Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες SL-1 και UBF της πολυμεράσης I, αδρανοποιούνται στα μολυσμένα κύτταρα από την 3C^{pro}. Η αποκοπή των μεταγραφικών παραγόντων των τριών ειδών RNA πολυμερασών, απαιτεί την είσοδο της ιικής πρωτεάσης 3C^{pro} στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου. Από την 3C^{pro} όμως απουσιάζει ένα σήμα πυρηνικής εντόπισης, το NLS, το οποίο περιέχεται στην πρόδρομη 3CD^{pro} πρωτεΐνη. Έτσι η δεύτερη εισέρχεται στον πυρήνα με το NLS που περιέχει η πρωτεΐνη 3D^{pol}. Τότε ακολουθεί η αποκοπή μεταγραφικών παραγόντων του πυρήνα είτε από την 3CD^{pro} ή την 3C^{pro} πρωτεάση που απελευθερώνεται έπειτα από αυτοκατάλυση της πρώτης.

Ακόμα η μόλυνση των κυττάρων από πολιοϊό οδηγεί και στην κυτταροπλασματική συσσώρευση πυρηνικών πρωτεϊνών, όπως η La πρωτεΐνη. Επίσης στα κύτταρα αυτά παρατηρείται παρεμπόδιση της πυρηνικής εισόδου με διακοπή της σύνδεσης των συμπλόκων του πυρηνικού υποδοχέα εισόδου. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στην κυτταροπλασματική πλευρά του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου. Η έλλειψη που εμφανίζεται στην πυρηνική είσοδο είναι μια συνέπεια της πρωτεόλυσης των δύο πρωτεϊνικών συστατικών του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι Nup 153 και p62.

Στη συνέχεια στα μολυσμένα κύτταρα προκαλείται μεταβολή στο στάδιο φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών 4E-BP1 και 4E-BP2 και έτσι ενεργοποίησή τους. Οι πρωτεΐνες αυτές προσδέονται στον παράγοντα eIF4E και αναστέλλουν τη μετάφραση στο 5' εξαρτώμενο σάρωμα, αλλά όχι στην εσωτερική ριβοσωμική είσοδο. Άλλες τροποποιήσεις εναρκτήριων παραγόντων, όπως η φωσφορυλίωση του eIF2α, μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης (Racaniello, 2007, Blondel et al., 1998).

Σε αντίθεση με την πρωτεϊνοσύνθεση και την RNA σύνθεση, η σύνθεση των λιπιδίων ερεθίζεται από την πολιοϊική μόλυνση και πολλά εκ των νεοσυντιθέμενων λιπιδίων βρίσκονται στα μεμβρανικά κυστίδια. Επιπλέον οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ασβεστίου αυξάνονται σημαντικά και η πλασματική μεμβράνη εμφανίζει αυξημένη διαπερατότητα σε μονοσθενή κατιόντα και σε μεταφραστικούς αναστολείς (Blondel et al., 1998).

Επιπρόσθετες τροποποιήσεις περιλαμβάνουν το σχηματισμό κυστιδίων, τα οποία εκβλαστάνουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi και τα λυσοσώματα, έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του ενδοπλασματικού δικτύου και του συστήματος Golgi. Παρατηρείται παρεμπόδιση εκκριτικών και πλασματικών πρωτεϊνών από τα δύο αυτά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες 2B και 2BC μπλοκάρουν την πρωτεϊνική έκκριση από το σύστημα Golgi και η 3A πρωτεΐνη μπλοκάρει την κυστοειδή κυκλοφορία από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η 3A επίσης διαμορφώνει τις ενδογενείς και προσαρμόσιμες ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή και έτσι την έκβαση της μόλυνσης. (Pfister et al., 1999, Racaniello, 2007).

Τέλος μορφολογικές και κυτταροσκελετικές επαναδιευθετήσεις εμφανίζονται στα μολυσμένα κύτταρα. Μια χαρακτηριστική είναι η αποκοπή της συνδεδεμένης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης 4 (MAP-4) από την 3C πρωτεάση. Οι επαναδιευθετήσεις αυτές μπορεί να είναι σημαντικές για την ιική διασπορά, αυξάνοντας τη λύση του κυττάρου και έτσι την απελευθέρωσή του (Blondel et al., 1998).

2.5. Πολιοϊοί και πρόκληση παθογένειας

Πολλές απόψεις της εντεροϊκής παθολογίας, μεταφοράς και γενικά επιδημιολογίας σχετίζονται άμεσα στις βιοφυσικές ιδιότητες και τον κύκλο ζωής του πολιοϊού. Οι περισσότερες μολύνσεις εντεροϊών δεν προκαλούν σημαντική ασθένεια, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις μολύνσεων, μπορεί να έχουμε σοβαρή πάθηση. Τέτοιες περιπτώσεις είναι τα βρέφη και όσοι βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Οι εντεροϊοί εμπλέκονται τόσο σε χρόνιες, όσο και σε παροδικές νόσους (Pallansch et al., 2007).

Μια εκ των παλαιότερων οφειλόμενων σε εντεροϊούς παθήσεων είναι η πολιομυελίτιδα. Η ασθένεια αυτή θεωρείται ως μια πολύ παλιά ασθένεια και προκαλείται συγκεκριμένα από στελέχη πολιοϊών. Ο όρος πολιομυελίτιδα αναφέρεται στο γεγονός ότι η νόσος καταλήγει στην καταστροφή νευρώνων της ενδιάμεσης ουσίας του νωτιαίου μυελού (Pallansch et al., 2007, Blondel et al., 1998).

Η πρώτη κλινική περιγραφή της έγινε το 1.800 με αναφορές παράλυσης και πυρετού ως συμπτώματα της νόσου. Μια πιο πρόσφατη αναφορά περιγράφει στην κατάσταση της πολιομυελίτιδας ως παθολογικές μεταβολές στα πρόσθια κινητικά νεύρα του νωτιαίου μυελού. Το 1900 ξεκίνησε η κατανόηση της μολυσματικής φύσης της ασθένειας, καθώς η πολιομυελίτιδα τότε αναγνωρίστηκε ως μεταδοτικό νόσημα. Επίσης κατανοήθηκε η σημασία των ασυμπτωματικών μολυσμένων ατόμων, όπως και ο ρόλος της εντερικής μόλυνσης στην παθογένεια του ιού. Αργότερα αναγνωρίστηκε και ο ρόλος της στοματικής-γαστροεντερικής διόδου στην έναρξη και επέκταση της μόλυνσης από πολιοϊό. Επιπλέον το γεγονός ότι η ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος ακολουθούσε παρουσία ικών σωματιδίων στο αίμα, αύξησε τις ελπίδες για αποτελεσματική ανοσοποίηση (Pallansch et al., 2007).

Η πολιομυελίτιδα διακρίνεται από την επιλεκτική καταστροφή των κινητήριων νευρώνων, η οποία οδηγεί σε παράλυση. Σε ποιο σοβαρές καταστάσεις η καταστροφή των νευρώνων μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική παύση και σε θάνατο (Mueller et al., 2005).

Οι πολιοϊοί καταστρέφουν κύτταρα με μια εξειδικευμένη κυτταροπαθογόνο δράση. Η παθογένεια του πολιοϊού, εκτός από την πειραματική ασθένεια σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα θηλαστικά, μπορεί επίσης να μελετηθεί με παρατήρηση της φυσικής ασθένειας στους ανθρώπους όπως και με πειραματικά προκαλούμενη ασθένεια σε ποντίκια που φέρουν τον υποδοχέα CD155

σαν διαγονίδιο. Ενδοεγκεφαλικός εμβολιασμός των διαγονιδιακών ποντικών με κάποιον από τους τρεις οροτύπους του πολιοϊού οδηγεί σε κλινικοπαθολογικό σύνδρομο όμοιο με την ανθρώπινη παραλυτική πολιομυελίτιδα. Παραταύτα μεταξύ των ανθρώπων και των ποντικών υπάρχουν διαφορές στον χαρακτήρα και την ανάπτυξη της παραλυτικής ασθένειας, οι οποίες οφείλονται σε διαφορές στην οργάνωση του κεντρικού νευρικού συστήματος των δύο οργανισμών, όπου συμπεριλαμβάνονται και τα κινητικά μονοπάτια. Επίσης τα ποντίκια δεν είναι τόσο ευαίσθητα όσο οι άνθρωποι στην μόλυνση από πολιοϊό μέσω της στοματικής οδού και αποτυγχάνουν στην ανάπτυξη μιας πιο αποτελεσματικής γαστρεντερικής μόλυνσης ή αύξησης του ιικού τίτλου στα κόπρανα έπειτα από στοματική προσβολή (Pallansch et al., 2007).

Στο φυσικό τους ξενιστή οι πολιοϊοί μεταβιβάζονται μέσω της κοπρώδους-στοματικής διόδου (Jesus, 2007). Η πιο συχνή εκδήλωση της πολιοϊικής μόλυνσης στους ανθρώπους είναι η αντιγραφή στον γαστροεντερικό σωλήνα και η ακόλουθη απορροή του ιού στα κόπρανα. Κοπρώδης απορροή του ιού παρατηρείται για μακρά περίοδο, ορισμένες φορές μεγαλύτερη των έξι εβδομάδων. Η απορροή αυτή μπορεί να διακοπεί και επηρεάζεται από την ανοσολογική κατάσταση του ατόμου. Η ποσότητα και η διάρκεια της ιικής αποβολής μπορεί να ελαττωθεί σημαντικά ως αποτέλεσμα της ανοσίας από μια πρόωμη φυσική μόλυνση με άγριο στέλεχος πολιοϊού, από εμβολιακό στέλεχος ή από συναγωνιστικές εντερικές μολύνσεις (Mueller et al., 2005, Pallansch et al., 2007).

Η μεταφορά ρου ιού μέσω στοματικής διόδου φαίνεται ως ο πιο κοινός τρόπος εξάπλωσης στις ανεπτυγμένες χώρες. Ο πολιοϊός αρχικά μολύνει ευπαθή κύτταρα της στοματικής κοιλότητας, της μύτης και του λάρυγγα πολλαπλασιαζόμενος στους βλενώδεις ιστούς. Η αντιγραφή του στις περιοχές αυτές είναι εμφανής, στις πρώτες μια με τρεις μέρες. Η περίοδος επώασης του ιού είναι συνήθως 7 με 14 μέρες, μπορεί να κυμαίνεται όμως και από 2 μέχρι και 35 μέρες. Τότε πολλαπλασιάζεται στους λεμφοειδείς ιστούς του στοματοφάρυγγα και του εντέρου, οδηγώντας σε μια μικρή, παροδική και κλινικά σιωπηλή παρουσία των ικών σωματιδίων στο αίμα. Έπειτα ακολουθεί εισβολή του ιού στους συστηματικούς δικτυοενδοθηλιακούς ιστούς, περιλαμβανομένων των περιφερειακών λεμφικών κόμβων, του νωτιαίου μυελού, του ήπατος και της σπλήνας. Η διάδοση αυτή του ιού δεν εμφανίζει κλινικές εκδηλώσεις (Mueller et al., 2005, Pallansch et al., 2007, Blondel et al., 1998).

Ο ιός μπορεί να απομονωθεί από λαρυγγικές εκκρίσεις και πλύσεις κατά τη διάρκεια των πρώιμων οξέων φάσεων της μόλυνσης, αλλά η απορροή του ιού στο σάλιο παρατηρείται για μικρότερο χρονικό διάστημα από την κοπρώδη απορροή. Γενικότερα κατά την πρωταρχική αντιγραφή του, ο ιός μπορεί να απομονωθεί από λεμφικούς ιστούς της γαστρεντερικής διόδου, όπως: οι αμυγδαλές, οι πλάκες Peyer του ειλεού και οι μεσεντερικοί λεμφικοί κόμβοι.

Κατά τη μικρή παρουσία των ικών σωματιδίων στο αίμα, η οποία παρατηρείται στο 25%

των μολύνσεων, τα επίπεδα του ιού είναι πολύ χαμηλά και παροδικά. Το κεντρικό νευρικό σύστημα εισβάλλει στο στάδιο αυτό, αλλά η προσβολή του παρατηρείται μετά την ενίσχυση των συστηματικών δικτυοενδοθηκικών ιστών που ακολουθείται από μια διαδοχική μεγάλη παρουσία ιικών σωματιδίων στο αίμα. Η δεύτερη αυτή μεγάλη ιαιμία προκαλεί συμπτώματα «ελάχιστης ασθένειας». Τα περισσότερα άτομα ελέγχουν την μόλυνση από πολιοϊό πριν την μεγάλη παρουσία ιικών σωματιδίων στο αίμα, συνήθως έχοντας ως αποτέλεσμα μια ασυμπτωματική μόλυνση.

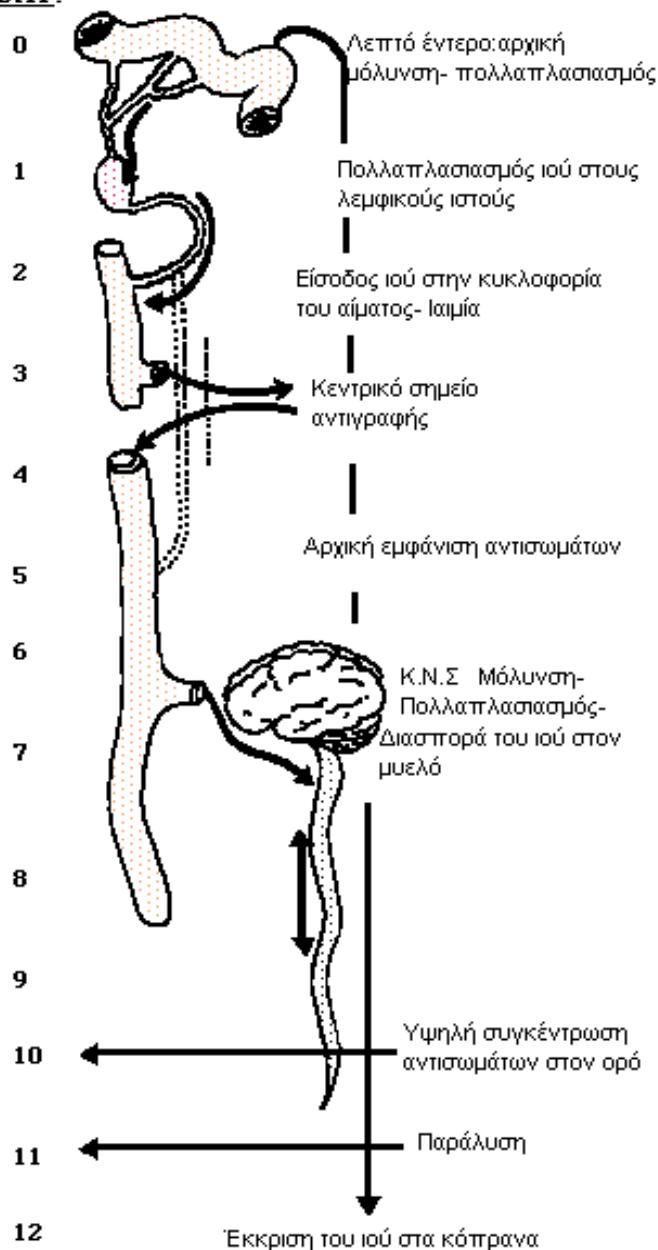
Επικρατούν τρεις θεωρίες για τη διάδοση του πολιοϊού στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Κατά την πρώτη ο ιός αποτελεσματικά μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό κι έτσι μέσω του αίματος να προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα, ανεξαρτήτως του υποδοχέα του. Βάση της δεύτερης θεωρίας μπορεί επίσης να έχουμε και προσβολή του μέσω περιφερειακών ή κρανιακών νεύρων, πιθανότατα με ανάδρομη αξονική ροή, προχωρώντας από τους μύες στο νωτιαίο μυελό και στον εγκέφαλο. Νευρολογικά συμπτώματα είναι σπάνιες επιλοκές της πολιοϊκής μόλυνσης και της πολιομυελίτιδας. Η τρίτη και τελευταία θεωρία είναι ο μηχανισμός του Δούρειου Ίππου, κατά τον οποίο ο ιός εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω μολυσμένων μακροφάγων. Το γεγονός αυτό στηρίζεται στο ότι η παραλυτική πολιομυελίτιδα ακολουθεί παρουσία ιικών σωματιδίων στο αίμα και ότι τα κυκλοφορούντα εξουδετερωτικά αντισώματα μπορούν να προλάβουν την πολιομυελίτιδα (Mueller et al., 2005, Pallansch et al., 2007, Jesus, 2007).

Η σημασία των περιφερειακών νεύρων ως δυναμική διόδου για την εισβολή στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχει αποδειχθεί στο περιστατικό του εμβολίου "Cutter". Κατά το περιστατικό Cutter ενδομυϊκές ενέσεις ατελώς αδρανοποιημένου εμβολιακού στελέχους πολιοϊών οδηγούν σε εστιακή παραλυτική ασθένεια, η οποία αρχικά τείνει να τοποθετείται στο άκρο που έχει πραγματοποιηθεί η ένεση. Η «παρακινούμενη» πολιομυελίτιδα φέρει αυξημένο ρίσκο της παραλυτικής ασθένειας σε άτομα που δέχονται την ενδομυϊκή ένεση κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης της φυσικής μόλυνσης από πολιοϊό. Κατά το φαινόμενο αυτό υπάρχει συσχέτιση μεταξύ μυϊκών τραυμάτων κατά τη διάρκεια της φάσης ιαιμίας της πολιοϊκής μόλυνσης και του αυξημένου ρίσκου πρόκλησης πολιομυελίτιδας (Mueller et al., 2005, Pallansch et al., 2007).

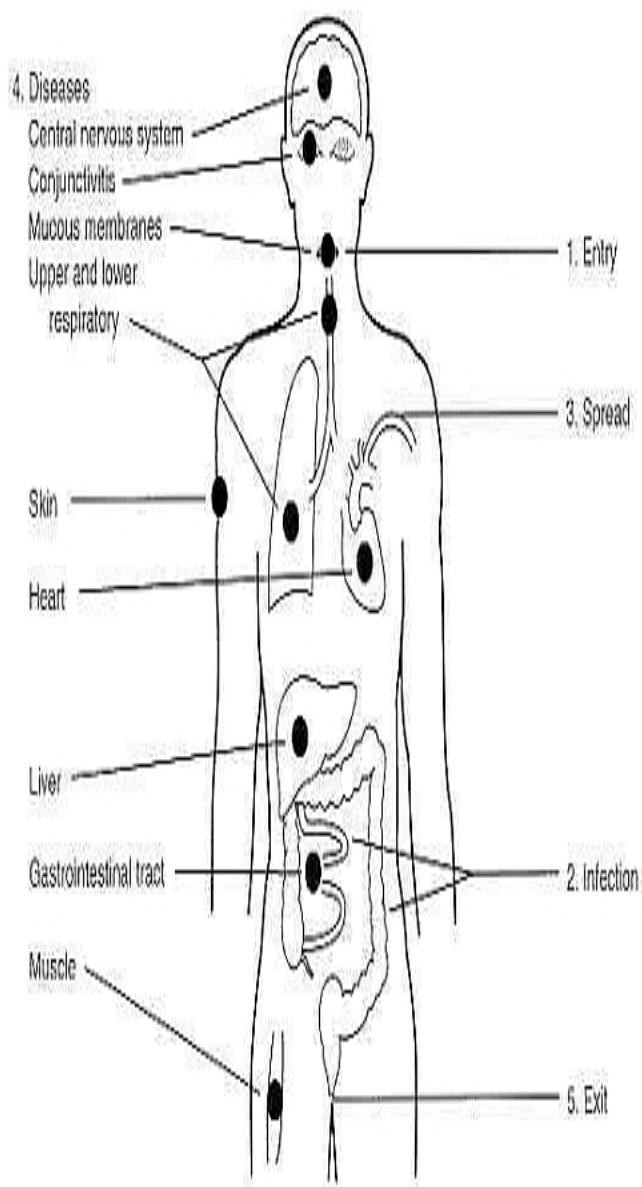
Από τα παραπάνω αποδείχτηκε ότι η ενδομυϊκή ένεση επιτρέπει στο εμβολιακό στέλεχος να εισέλθει στα άκρα των περιφερειακών νεύρων και έπειτα να επεκταθεί στο νωτιαίο μυελό μέσω ανάδρομης αξονικής ροής.

A

DAY:



B



Εικόνα 12. Α) Αναπαράσταση του μοντέλου παθογένειας του ιού από την αρχική μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό του στο έντερο έως και την έκκρισή του στα κόπρανα. **Β)** Απεικόνιση 1) της εισόδου του ιού μέσω της στοματικής διόδου, 2) της μόλυνσης της γαστρεντερικής διόδου, 3) της παρουσίας των ιών στο αίμα και κατ' επέκταση της ικής διασποράς στο νωτιαίο μυελό, στον εγκέφαλο, στα μηνίγγια, στην καρδιά, στο ήπαρ και στο δέρμα, 4) του πολλαπλασιασμού των πολιοϊών στο επιθήλιο του ρινοφάρυγγα και του περιφερειακού λεμφοειδούς ιστού, στη μεμβράνη των βλεφάρων, στα έντερα, στους μεσεντερικούς κόμβους και στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και τέλος 5) της έκκρισης του ιού στο περιβάλλον. (<http://cmbi.bjmu.edu.cn/www-learn/micro-ac-uk/335/Picornaviruses.html>, Yin-Murphy et al., 1996, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A2862&rendertype=figure&id=A2881>).

Οι βλάβες των νευρικών κυττάρων είναι το αποτέλεσμα της λυτικής ιικής αντιγραφής. Η θέση και η δριμύτητα των νευρολογικών αυτών βλαβών επηρεάζει την εντόπιση και το βαθμό της παράλυσης. (Blondel et al., 1998).

Κυτταρικοί ειδικοί παράγοντες που προσδένονται στη ρυθμιστική περιοχή IRES, όπως και η ίδια η περιοχή IRES μπορούν να επιδράσουν στον τροπισμό και στη μολυσματικότητα. Στη ρύθμιση του τροπισμού έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο και η απόκριση στην ιντερφερόνη, η οποία περιορίζει την ιική αντιγραφή στα εξωνευρικά όργανα. Η δύναμη της ανοσολογικής απόκρισης είναι βασική για το αποτέλεσμα των ικών μολύνσεων. (Pallansch et al., 2007).

2.6. Κλινικά συμπτώματα της πολιοϊκής μόλυνσης

Κατά τη μόλυνση από πολιοϊό έχουμε εμφάνιση της παραλυτικής πολιομυελίτιδας μόνο σε ένα από τα διακόσια άτομα που έχουν υποστεί μόλυνση από πολιοϊό. Η περίοδος επώασης από τη μόλυνση μέχρι την έναρξη της παράλυσης διαρκεί συνήθως τέσσερις με δέκα μέρες. Η παράλυση γενικά παρατηρείται δύο με πέντε μέρες μετά την παρατήρηση πονοκεφάλων και ένα πρόδρομο σύνδρομο γίνεται εμφανές με αισθητήριους μυϊκούς πόνους (Pallansch et al., 2007).

Στο 4-8% των μολυσμένων ατόμων που αναπτύσσουν την πρωτογενή ιαιμία, η δευτερογενής μεγάλη ιαιμία που εμφανίζουν σχετίζεται με μια μικρή, μη εξειδικευμένη ασθένεια που ακολουθεί.

Οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν:

- α) μόλυνση του ανώτατου αναπνευστικού, που χαρακτηρίζεται από φαρυγγίτιδα και πυρετό,
- β) γαστροεντερική νόσο, η οποία παρουσιάζεται με ναυτία, έμμετο, γαστρικές ενοχλήσεις και δυσκοιλιότητα ή σπάνια διάρροια και
- γ) μια πάθηση χαρακτηρισμένη από πονοκέφαλο, μυαλγία και γενικευμένη αδιαθεσία.

Ένα πολύ μικρό τμήμα των μολυσμένων ατόμων, τα οποία έχουν υποστεί τη μεγάλη ιαιμία, αναπτύσσουν συμπτώματα που προδίδουν την πολιοϊκή εισβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα συμπτώματα αυτά χαρακτηρίζονται από τη μη παραλυτική ασηπτική μηνιγγίτιδα ή την παραλυτική πολιομυελίτιδα. Η μη παραλυτική ασηπτική μηνιγγίτιδα παρατηρείται σε 1-2% της πολιοϊκής μόλυνσης και σχετίζεται με ακαμψία του αυχένα, της πλάτης και των νοτιότερων λέμφων (Jesus, 2007).

Η παραλυτική πολιομυελίτιδα παρατηρείται στο 0,1-1% όλων των πολιοϊκών μολύνσεων. Το ποσοστό εξαρτάται από τον ορότυπο που προσβάλλει το άτομο την εκάστοτε φορά. Η κλινική παραλυτική πολιομυελίτιδα μπορεί να χωριστεί σε τρεις τύπους ως: νωτιαία, βολβοειδής και εγκεφαλίτιδα. Η νωτιαία είναι η συχνότερη και χαρακτηρίζεται από πλαδαρή παράλυση των μυών που περιέχουν κινητήριους νευρώνες του νωτιαίου μυελού και επακόλουθη απονεύρωση των

σχετικών σκελετικών μυών. Η βολβοειδής πολιομυελίτιδα προκαλεί καταστροφή των νευρώνων του δικτυωτού σχηματισμού και των πυρήνων των κраниακών νευρώνων στο εγκεφαλικό στέλεχος, όπου κατά κύριο λόγο ελέγχεται η αναπνοή. Έτσι παρουσιάζει παράλυση των μυών του αναπνευστικού συστήματος. Τέλος η πολιομυελίτιδα της εγκεφαλίτιδας που εμπλέκει νευρώνες του εγκεφάλου είναι σπάνια.

Η νωτιαία και η βολβοειδής μπορούν να συνυπάρχουν και να είναι θανατηφόρες λόγω αναπνευστικής και καρδιακής ανεπάρκειας και επιδρούν τόσο στο εγκεφαλικό στέλεχος, όσο και στο νωτιαίο μυελό. Έτσι οι δύο αυτοί τύποι ανεπάρκειας οδηγούν στην καταστροφή νευρώνων του νωτιαίου μυελού, οι οποίοι εφοδιάζουν το διάφραγμα, τους πλευρικούς και γαστρικούς μύες και τους νευρώνες του αναπνευστικού και αγγειοκινητικού κέντρου του εγκεφάλου. Οι μη θανατηφόρες περιπτώσεις σχετίζονται με μεγάλης ποικιλίας μορφές υπολειμματικής πολιομυελίτιδας (Blondel et al., 1998, Jesus, 2007).

Η παθολογία της πολιομυελίτιδας είναι ο ερεθισμός και η καταστροφή της ενδιάμεσης ουσίας του κεντρικού νευρικού συστήματος και κυρίως του νωτιαίου μυελού. Η νωτιαία μορφή είναι συνήθως ασυμμετρική, οριοθετείται στα άκρα και τον κορμό και ποικίλει από ήπια αδυναμία μέχρι τετραπληγία. Η βολβοειδής μορφή εμφανίζεται περίπου στο 10-15% των περιπτώσεων πολιομυελίτιδας και εμπλέκει κινητήρια κраниακά νεύρα ή κάποια εγκεφαλικά κέντρα. Έτσι μπορεί να έχουμε παράλυση φαρυγγικών και λαρυγγικών μυών, με δυσκολία στην κατάποση και την ομιλία, αδυναμία του προσώπου και της γλώσσας και αναπνευστικά ή αγγειοκινητικά προβλήματα (Pallansch et al., 2007).

2.7. Εμβολιακά στελέχη κατά των πολιοϊών

Το 1900 ακολουθώντας τη βιομηχανική επανάσταση του 18^{ου} και 19^{ου} αιώνα, οι εφαρμογές βελτιστοποίησης των αποχετεύσεων οδήγησαν σε μια αύξηση της ηλικίας στην οποία τα παιδιά για πρώτη φορά ερχόντουσαν αντιμέτωπα με τον ιό. Αντιθέτως στο παρελθόν τα παιδιά προστατεύονταν από τα μητρικά αντισώματα. Έτσι άρχισαν να βγαίνουν στην επιφάνεια επιδημίες πολιομυελίτιδας (Jesus, 2007).

Ενδομυϊκό απενεργοποιημένο εμβόλιο του Salk (IPV)

Στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, προσπάθειες για την καταπολέμηση των αυξημένων επιδημιών πολιομυελίτιδας εστίασαν στην κατασκευή εμβολίων. Το πρώτο εμβόλιο που κατασκευάστηκε ήταν το ανενεργό πολιοϊκό εμβόλιο, IPV, από τον Jonas Salk, 12 Απριλίου 1955. Στο παραγόμενο IPV εμβόλιο και τα τρία στελέχη του πολιοϊού αναπτύσσονταν *in vitro* σε νεφρικά κύτταρα Αφρικανικού πράσινου πιθήκου. Έπειτα απενεργοποιούνταν με χρήση φορμαλδεΰδης. Έτσι το IPV φαινόταν να ανοσοποιεί αποδοτικά και να προστατεύει κατά της πολιομυελίτιδας (Jesus, 2007).

Παρ' όλα αυτά το εμβόλιο IPV επιφέρει φτωχή τοπική ανοσοποίηση. Αυτό συνεπάγεται ότι δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ένα αποδοτικό εργαλείο για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό (Blondel et al., 1998).

Η χρήση του IPV εμβολίου σε τροπικές αναπτυσσόμενες χώρες παρουσιάζει ιδιαίτερες προκλήσεις, διότι τα επίπεδα της συνηθισμένης ανοσοποίησης είναι συνήθως ανεπαρκή, η δύναμη του IPV είναι αμφίβολη και επιμένουν λογικές και οικονομικές προκλήσεις.

Έτσι στις αναπτυσσόμενες αυτές χώρες εντοπίζονταν ενδημικές εστίες μετά την είσοδο των πολιοϊκών εμβολίων IPV, γεγονός που επέβαλε τη χρήση του εμβολίου OPV σε άτομα των περιοχών αυτών (Pallansh et al., 2007).

Στοματικό εξασθενημένο εμβόλιο του Sabin (OPV)

Ένα δεύτερο εμβόλιο που περιγράφηκε ως ασφαλές και αποτελεσματικό παράλληλα ήταν το τρισθενές στοματικό πολιοϊκό εμβόλιο, OPV, κατασκευασμένο από τον Albert Sabin το 1963, για τον έλεγχο της πολιομυελίτιδας σε πολλές χώρες. Το εμβόλιο αυτό έχοντας τη μοναδική ικανότητα να παράγει ασυναγώνιστη γαστροεντερική ανοσία και έτσι να προλαμβάνει τη μόλυνση με άγριους τύπους ιών, γρήγορα έγινε το προτιμώμενο πολιοϊκό εμβόλιο. Το OPV συντίθεται από από εξασθενημένα στελέχη και των τριών πολιοϊκών οροτύπων, PV1, PV2 και PV3, οι οποίοι αναπτύσσονται *in vitro* σε κύτταρα Vero, με αναλογία 10:1:3 των τύπων 1:2:3 αντίστοιχα. Τα εξασθενημένα πολιοϊκά στελέχη αποκτήθηκαν με περάσματα αγρίου τύπου απομονωμένων δειγμάτων σε ιστό μαϊμούς *in vivo* και *in vitro* κάτω από μια ποικιλία συνθηκών που διαφέρει για καθέναν από τους τρεις ορότυπους (Jesus, 2007, Friedrich, 1996).

Τα εξασθενημένα στελέχη πολιοϊού παράγονται από σειριακά περάσματα του αγρίου τύπου στελεχών σε υψηλό βαθμό πολλαπλότητας της μόλυνσης (MOI) σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών του ξενιστή. Τέτοιες πηγές είναι οι όρχεις και το νεφρό του πράσινου Αφρικανικού πιθήκου.

Τα επιλεγόμενα χαρακτηριστικά ήταν:

- α) η ικανότητα του ιού να αντιγράφεται αποτελεσματικά στη γαστρεντερική οδό,
- β) η αδυναμία του ιού να εισβάλει ή να αντιγράφεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και
- γ) η γενετική σταθερότητα, ώστε να αντέχει τις πιέσεις της αντιγραφής στον ξενιστή χωρίς να αντιστρέφεται σε νευρομολυσματικό φαινότυπο.

Χρόνια αργότερα σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των εξασθενημένων Sabin στελεχών και των νευρομολυσματικών γονικών στελεχών, αποκάλυψε μια σειρά μεταλλάξεων. Κάποιες εκ των μεταλλάξεων αυτών έπειτα εμφανίστηκαν υπεύθυνες για τον φαινότυπο των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών (Jesus, 2007).

Το στέλεχος P1/ Sabin, προήλθε από ένα άγριο νευρομολυσματικό στέλεχος, το P1/Mahoney/41. Για το στέλεχος αυτό 7 μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή, 21 αμινοξικές μεταβολές στην κωδική περιοχή για τις πρωτεΐνες του καψιδίου και στην περιοχή κωδικοποίησης της 3D πολυμεράσης και τέλος 2 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στην 3' μη κωδική περιοχή σε σχέση με τις μεταλλάξεις του αγρίου τύπου νευρομολυσματικού στελέχους. Οι βασικότερες από τις μεταλλάξεις αυτές παρατίθενται στον ακόλουθο Πίνακα 1 (Friedrich, 1996, Jesus, 2007).

Θέση νουκλεοτιδίου	Μετάλλαξη	Θέση αμινοξέος	Αλλαγή αμινοξέως
480 της 5' NCR	A->G	-	-
189 της 5' NCR	C->U	-	-
21 της 5' NCR	U->C	-	-
6203 της κωδ. περ. της 3D πολυμεράσης	U->C	Tyr->His	73
935 της κωδ. περ. της VP4	G->U	Ala->Ser	65
2438 της κωδ. περ. της VP3	U->A	Leu->Met	225
2795 της κωδ. περ. της VP1	G->A	Ala->Thr	106
2879 της κωδ. περ. της VP1	C->U	Leu->Phe	134
7441 της 3' NCR	A->G	-	-

Πίνακας 1. Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται αναλυτικά οι μεταλλάξεις που προκαλούν την εξασθένιση του πολιοϊικού στελέχους PVI, καθώς και οι αμινοξικές αλλαγές που μερικές εκ των μεταλλάξεων φέρουν (Friedrich, 1996).

Το P2/Sabin στέλεχος προήλθε από το αγρίου τύπου στέλεχος P2/P712/56. Στην εξασθένηση του αγρίου στελέχους συμβάλλουν κυρίως η είσοδος μιας αδενίνης στη θέση 481 της 5' αμετάφραστης περιοχής, καθώς και η είσοδος μιας ιντερλευκίνης στο αμινοξύ 143 της καψιδικής πρωτεΐνης VP1. Μικρότερη επίδραση στην εξασθένηση του στελέχους μπορούν να έχουν και οι μεταλλάξεις στα νουκλεοτίδια 398, όπου οδηγεί σε μεταβολή του νουκλεοτιδίου σε ουρακίλη, όπως επίσης και αλλαγή του νουκλεοτιδίου 437. Οι δύο τελευταίες μεταλλάξεις εγκαθιδρύουν τον εξασθενημένο φαινότυπο σε πολύ μικρότερο βαθμό (Friedrich, 1996).

Το P3/Sabin στέλεχος προήλθε από το αγρίου τύπου στέλεχος P3/Leon/37. Τα δύο στελέχη διαφέρουν σε 2 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στην 5' αμετάφραστη περιοχή, 4 αμινοξικές μεταβολές στην κωδική περιοχή για την πολυπρωτεΐνη και τέλος 1 νουκλεοτιδική διαγραφή στην 3' μη κωδική περιοχή από του αγρίου τύπου νευρομολυσματικού στελέχους. Οι βασικότερες από τις μεταλλάξεις αυτές καταγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 2 (Friedrich, 1996, Jesus, 2007).

Θέση νουκλεοτιδίου	Μετάλλαξη	Θέση αμινοξέως	Αλλαγή αμινοξέως
472 της 5' NCR	C->U	-	-
2034 της κωδ. περ. της VP3	C->U	91	Ser->Phe
2493 της κωδ. περ. της VP1	U->C	6	Ile->Thr

Πίνακας 2. Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται αναλυτικά οι μεταλλάξεις που προκαλούν την εξασθένηση του πολιοϊκού στελέχους PV3, καθώς και οι αμινοξικές αλλαγές και μερικές εκ των μεταλλάξεων τις οποίες φέρουν (Friedrich, 1996).

Αναστροφή των παραπάνω μεταλλάξεων και για τα τρία εμβολιακά στελέχη, μπορεί να τα αντιστρέψει από εξασθενημένα σε νευρομολυσματικά ξανά. Αναστροφή μερικών από τις μεταλλάξεις αυτές ή και πραγματοποίηση μονού ή διπλού ανασυνδυασμού μεταξύ των εμβολιακών στελεχών μπορεί να αναστρέψει τη θερμοευαισθησία των γονικών Sabin στελεχών και να αυξήσει τη νευρομολυσματικότητά και αναπαραγωγή τους σε περισσότερους των 37°C. Τέτοιου είδους στελέχη εμφανίζουν συνήθως μεταβολές στην 5' μη κωδική και 3' μη κωδική περιοχή, καθώς επίσης και στο γονίδιο της 3D πολυμεράσης και σε περιοχές κωδικοποίησης καψιδικών πρωτεϊνών που καθορίζουν τις αντιγονικές θέσεις.

Οι μεταβολές αυτές στο γονιδίωμα των νέων στελεχών, εμφανίζουν μια θετική αναπαραγωγική ικανότητα σε θερμοκρασία πάνω από το φυσιολογικό όριο των 37°C (Ret⁺ φαινότυπος). Αν και οι περιοχές αυτές συμβάλλουν στην ευαισθησία του πολιοϊού στην

θερμοκρασία, δεν συμβάλλουν απαραίτητα και στην εξασθένηση του ιού, αποδεικνύοντας ότι οι καθοριστές της εξασθένησης και της ευαισθησίας στη θερμοκρασία μπορούν να είναι γενετικά διαχωρισμένοι (Christodoulou et al., 1990, Bouchard et al., 1995).

Εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP)

Σε ένα μικρό αριθμό περιπτώσεων, ο εμβολιασμός σχετίζεται με την παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP). Οι VAPP περιπτώσεις επηρεάζουν είτε άτομα προσφάτως εμβολιασμένα με τα OPV στελέχη, είτε μη εμβολιασμένα άτομα που διαβιώνουν σε άμεση επαφή με υγιή εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP πιθανότατα προκαλείται από γενετική μεταβλητότητα των Sabin στελεχών, λόγω των σημειακών μεταλλάξεων και των γενετικών ανασυνδυασμών. Τα VAPP περιστατικά σχετίζονται πιο συχνά με τα Sabin 3 στελέχη (71% των περιπτώσεων), ακολουθούμενα από τα Sabin 2 στελέχη (26% των περιπτώσεων) και μια μικρή αναλογία αντιστοιχεί στα Sabin 1 στελέχη (Blondel et al., 1998, Dedepsidis et al., 2008).

Ο παθογόνος χαρακτήρας των στελεχών αυτών γενικά σχετίζεται με μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι αναστροφές των γνωστών εξασθενημένων μεταλλάξεων προς σχηματισμό του γονοτύπου των αγρίων στελεχών. Επίσης ομο- ή ετερο- τυπικός ανασυνδυασμός στις θέσεις που ανταποκρίνονται στους καθοριστικούς παράγοντες εξασθένησης/μολυσματικότητας, μπορεί να επαναφέρει τη νευρομολυσματικότητα των εμβολιακών στελεχών (Blondel et al., Jesus, 2007).

Βασικές μεταλλάξεις για την πρόκληση της ασθένειας παρατηρούνται στην 5' αμετάφραστη περιοχή ή στην περιοχή που κωδικοποιεί για κάποιους ικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την περιοχή αυτή. Ακόμα μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή της πολυπρωτεΐνης, καθώς και βασικά βιοχημικά χαρακτηριστικά των παραγόντων των ξενιστών που αλληλεπιδρούν με την 5' αμετάφραστη περιοχή του ιικού RNA, επιδρούν στην πρόκληση της VAPP. Τέλος ανοσοανεπάρκεια του ατόμου ή ενδοκυτταρικές ενέσεις μέσα σε τριάντα μέρες από την έκθεση στο OPV, μέσω εμβολίου ή επαφή με εμβολιασμένο άτομο, μπορεί επίσης να θεωρηθεί παράγοντας πρόκλησης VAPP. Το γεγονός ότι τα τρία εξασθενημένα πολιοϊικά στελέχη χορηγούνται παράλληλα αυξάνει την πιθανότητα ανασυνδυασμού και πρόκλησης της εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Oliveira et al., 2000).

Εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (VDPV)

Εκτός της εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας, το δεύτερο μεγαλύτερο μειονέκτημα που ακολουθεί την χρήση του OPV εμβολίου είναι ότι οι απόγονοι των αντίστοιχων εξασθενημένων στελεχών του εμβολίου αυτού μπορούν να εξελιχθούν σε μεταβιβάσιμα παθογόνα

στελέχη (cVDPVs), προκαλώντας ξεσπάσματα παραλυτικής ασθένειας. Οι ανοσολογικά φυσιολογικοί OPV αποδέκτες συνήθως εκκρίνουν τον ιό για 3-4 εβδομάδες. Οι αντικαταστάσεις των βάσεων, που οδηγούν στην εξασθένηση του εμβολίου, αντιστρέφονται εύκολα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου της ιικής αντιγραφής στο ανθρώπινο έντερο. (Kew et al., 2004, Dowdle et al., 2003).

Ως VDPV αναφέρεται ένα εμβολιοσυνδεδεμένο στέλεχος αν αποκλίνει $\geq 1\%$ των νουκλεοτιδίων της πρωτεΐνης VP1 από τα αναφερόμενα OPV στελέχη. Το ποσοστό αυτό της αποκλισης συνεπάγεται ότι η αντιγραφή του εμβολιακού πολιοϊού πραγματοποιείται για περίπου ένα χρόνο (Kew et al., 2004).

Τα VDPV στελέχη διαχωρίζονται στα:

- α) iVDPVs (εμβολιοσυνδεδεμένοι πολιοϊοί συσχετιζόμενοι με ανοσοανεπάρκεια), που απομονώνονται από άτομα με βασική ανοσοανεπάρκεια των Β-λεμφοκυττάρων και τα οποία έχουν υποστεί παρατεταμένες VDPV μολύνσεις,
- β) cVDPVs (κυκλοφορούντες εμβολιοσυνδεδεμένοι πολιοϊοί), που εκθέτουν όμοιες ιδιότητες με τους αγρίου τύπου πολιοϊούς, συμπεριλαμβανόμενης της νευρομολυσματικότητας και αναδύονται σε κοινωνίες με ανεπαρκή επίπεδα OPV εμβολιασμών και τέλος
- γ) aVDPVs (αμφιλεγόμενοι εμβολιοσυνδεδεμένοι πολιοϊοί), που είναι κλινικά απομονωμένα στελέχη ατόμων χωρίς ανοσοανεπάρκεια και περιβαλλοντικά απομονωμένα στελέχη των οποίων η τελική πηγή δεν έχει χαρακτηριστεί (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5540a3.htm>, 2006, Jesus, 2007).

Όταν η χρήση των OPV εμβολίων συνεχίζεται, μπορεί να αυξηθεί η πιθανότητα διάδοσης των εμβολιοσυνδεδεμένων στελεχών των πολιοϊών από άνθρωπο σε άνθρωπο. Τα ξεσπάσματα αυτά επικρατούν σε περιοχές με κενά στους OPV εμβολιασμούς. Η έκταση της διάδοσης αυτών των στελεχών εξαρτάται από το μέγεθος του κενού ανοσοποίησης ενός δεδομένου πληθυσμού και την πολιοϊκή κυκλοφορία (Kew et al., 2004).

Τα εμβολιακά στελέχη μπορούν ακόμα να ενεργοποιήσουν το Guillain-Barre σύνδρομο (GBS), την εγκάρσια πολιομυελίτιδα (TM) και την παράλυση του προσώπου. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται πως η χορήγηση της τελευταίας εμβολιακής δόσης πραγματοποιήθηκε μήνες ή και χρόνια πριν την εγκαθίδρυση της ασθένειας, γεγονός που φανερώνει μια επίμονη μόλυνση ή μετάδοση των στελεχών αυτών στους ασθενείς. Οι συνέπειες αυτές των μεταβαλλόμενων εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών προς νευρομολυσματικά, οδήγησαν στη διακοπή της χρήσης των εμβολίων OPV για ανοσοποίηση και μετέπειτα χρήση του ενδομυϊκού απενεργοποιημένου εμβολίου πολιοϊών (IPV) (Friedrich, 1997).

Αμφότερα τα δύο εμβόλια οδήγησαν στην παραγωγή αντί-πολιοϊκών αντισωμάτων με σημαντική προστασία κατά της ασθένειας. Η ανοσοποίηση με τα εμβόλια OPV και IPV στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες πέτυχε την εξάλειψη της ενδογενούς κυκλοφορίας του ιού. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας έχει εγκαθιδρύσει έναν μελλοντικό στόχο διακοπής του εμβολιασμού όταν όλα τα στελέχη του ιού θα έχουν επαλειφθεί (Pallansch et al., 2007).

2.8. Επιδημιολογία

Τα δημογραφικά στοιχεία των μολύνσεων και της ασθένειας έχουν κάποια σταθερά χαρακτηριστικά. Η μεγαλύτερη ποσότητα και διάρκεια της ιικής αποβολής παρατηρείται στην πρώιμη μόλυνση με πολιοϊό. Λόγω του ότι η μόλυνση είναι τόσο κοινή, οι περισσότερες πρώιμες μολύνσεις παρατηρούνται κατά την παιδική ηλικία. Η μεγαλύτερη έκθεση των παιδιών στον ιό κατά τη μόλυνση μπορεί να οδηγήσει στο να εμφανίζουν σημαντικά κλινικά συμπτώματα.

Η επίδραση της πολιομυελίτιδας στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι σχετικά χαμηλή τους πρώτους μήνες ζωής, λόγω της συχνής παρουσίας των προστατευτικών μητρικών αντισωμάτων. Στη συνέχεια όμως, σε μεγαλύτερους μήνες μια αυξημένη επίδραση παραλυτικής πολιομυελίτιδας παρατηρείται, πιθανότατα σχετιζόμενη με μια πρώιμη έκθεση στον ιό ως αποτέλεσμα φτωχών συνθηκών υγιεινής.

Οι ικές μολύνσεις είναι περισσότερο διαδεδομένες σε άτομα χαμηλότερης κοινωνικοοικονομικής κατάστασης και σε άτομα που ζουν σε αστικές περιοχές. Η πολιομυελίτιδα τείνει να γίνει ασθένεια της ανάπτυξης. Βελτίωση της υγιεινής και των κοινωνικοοικονομικών συνθηκών μιας χώρας επιτυχώς ελαττώνει την εμφάνιση της παραλυτικής πολιομυελίτιδας και οδηγεί σε μια μεταβατική περίοδο. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι οι μολύνσεις και ασθένειες προκαλούμενες από πολιοϊό παρατηρούνται συχνότερα σε αρσενικά άτομα από τα θηλυκά, γεγονός που μπορεί να οφείλεται τόσο σε κοινωνικά όσο και σε βιολογικά αίτια. Κάποια από τα αίτια είναι η μεγαλύτερη διάρκεια έκκρισης ιού και ένας υψηλότερος τίτλος του στα κόπρανα των αρσενικών ατόμων. Επίσης πιθανή αιτία μπορεί να είναι η μεγαλύτερη έκθεση σε παθογόνα και επιπλέον το γεγονός ότι τα αρσενικά άτομα αναπτύσσουν ευκολότερα μια σοβαρή ασθένεια από μια μόλυνση από πολιοϊό συγκριτικά με τα θηλυκά άτομα.

Μελέτη της μοριακής απόκλισης των ικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων, μπορεί να συνεισφέρει σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες σε ικές ασθένειες. Τέτοιου είδους μελέτες συμβάλλουν στην κατανόηση των πολιοϊών παρέχοντας αναμφίβολη ταυτοποίηση στελεχών, επίγνωση στην ταξινόμηση τους, διευκρίνηση της πηγής των εξάρσεων και τέλος επιτρέπει την ταυτοποίηση των στελεχών που μεταβιβάζονται μεταξύ των ξεσπασμάτων. Μέσω της αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων, γίνεται σύγκριση αλλαγών που παρατηρούνται μεταξύ ικών

στελεχών, οι οποίες οδηγούν στον καθορισμό των γεωγραφικών και χρονικών πηγών προέλευσης του ιού.

Ο πολιοϊός εξαρτάται από μια σχεδόν συνεχόμενη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο για την επιβίωσή του, διότι δεν έχουν βρεθεί μη ανθρώπινοι οργανισμοί-ξενιστές για την ανάπτυξή του και λόγω της ιδιότητας του ιού να παραμένει για ένα σχετικά μικρό χρονικό διάστημα στο περιβάλλον (Pallansch et al., 2007).

2.9. Μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί των πολιοϊών

2.9.α. Μεταλλάξεις

Εκτιμάται ότι το γένωμα κάθε πολιοϊού έχει συντεθεί μετά από πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής σε ένα μολυσμένο κύτταρο και περιέχει δύο είδη χαρακτηριστικών μεταλλαγών, τις μεταλλάξεις και τους ανασυνδυασμούς. Κατά την αντιγραφή τους οι πολιοϊοί εμφανίζουν πολύ υψηλό βαθμό σφαλμάτων. Αυτό πραγματοποιείται λόγω λαθών στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας και λόγω έλλειψης διορθωτικής ικανότητας της RNA πολυμεράσης. Με συχνότητες λάθους μιας εσφαλμένης ενσωμάτωσης στα 10^3 με 10^4 νουκλεοτίδια, οι RNA ιικοί πληθυσμοί συνυπάρχουν σαν πλήθος ειδών ή μείγμα πολλών διαφορετικών γενωμικών αλληλουχιών (Racaniello, 2007).

Αυθόρμητες εισαγωγές, απαλείψεις ή νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις είναι τα είδη μεταλλάξεων που παρατηρούνται. Οι απαλείψεις μπορεί να εμπλέκουν διακοπή της επιμήκυνσης, παράληψη ενδιάμεσου σημείου και έπειτα συνέχιση της επιμήκυνσης. Εναλλακτικά οι διαγραφές μπορούν να πραγματοποιηθούν με ένα μηχανισμό επιλογής αντιγράφου, κατά τον οποίο η αναπτυσσόμενη αλυσίδα συνεχίζει την επιμήκυνση σε μια άλλη μήτρα, κατώτερα της θέσης της παύσης. Οι αντικαταστάσεις των βάσεων μεταβάλουν το γονότυπο του αντιγραφικού γενώματος και έτσι προκαλούνται μεταλλάξεις. Η επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στο φαινότυπο κυμαίνεται από καμία αλλαγή έως και θνησιμότητα (Wimmer et al., 1993).

Έχει προταθεί ότι οι RNA ιοί υπάρχουν στο όριο της καταστροφής από λάθη ώστε να αυξηθεί η ποικιλία και η προσαρμοστικότητα των ιών, χωρίς όμως να καταστραφεί ο πληθυσμός τους. Υψηλά επίπεδα λαθών σε RNA ιούς φαίνονται απαραίτητα για την επιβίωση του ιού κάτω από την επιλεκτική πίεση.

Ιοί που φέρουν RNA πολυμεράση με μικρότερη τάση για σφάλματα, βρίσκονται σε ανταγωνιστικό μειονέκτημα σε πολύπλοκα περιβάλλοντα, όπως ένα μολυσμένο ζώο. Οι υψηλής πιστότητας μεταλλαγμένοι ιοί είναι αδύνατον να ανταγωνιστούν τους χαμηλής πιστότητας μεταλλαγμένους ιούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι μεταλλάξεις ευεργετούν τους ιικούς

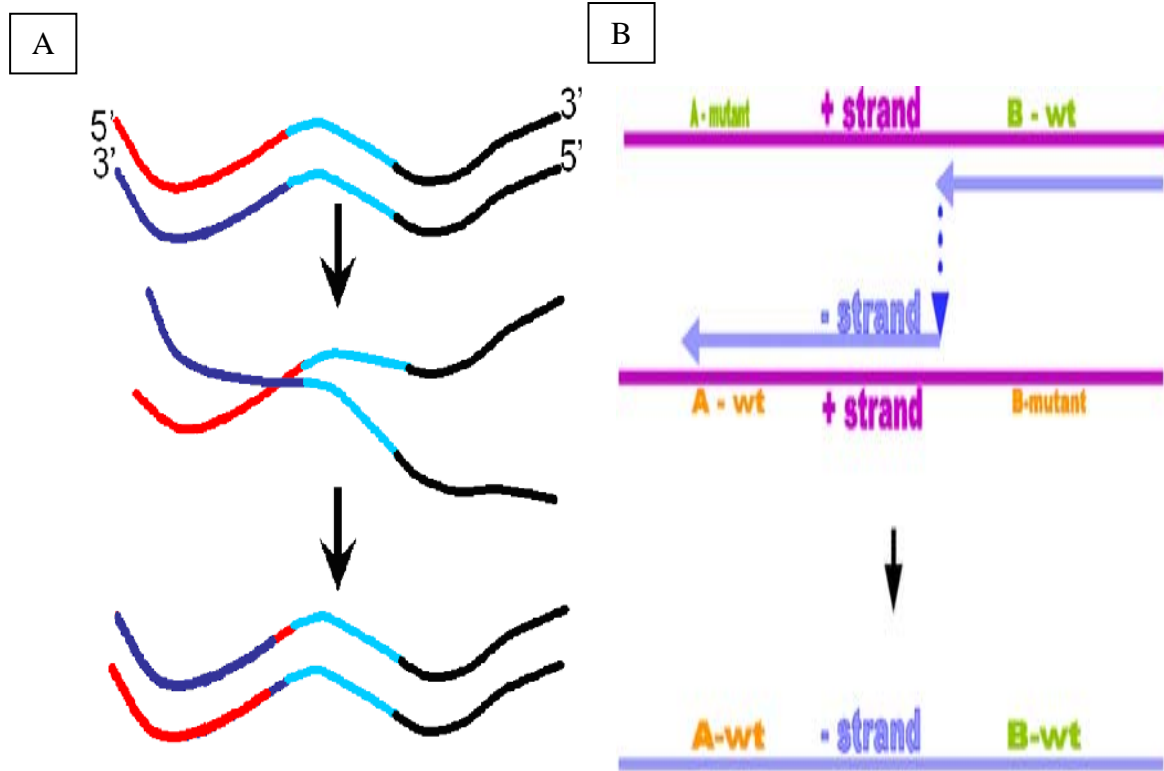
πληθυσμούς, ιδιαιτέρως σε ένα μολυσμένο ζώο (Racaniello, 2007).

2.9.β. Ανασυνδυασμοί

Ο ανασυνδυασμός, ως η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ανάμεσα σε διαφορετικά γενωμικά RNA μόρια, αρχικά ανακαλύφθηκε σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού μπορεί να είναι σχετικά υψηλή. Οι ενδοκυτταρικοί ανασυνδυασμοί πραγματοποιούνται ανάμεσα στους τρεις οροτύπους των Sabin πολιοϊικών εμβολιακών στελεχών και άμεσα μπορούν να απομονωθούν από τον εντερικό σωλήνα των εμβολιασμένων ατόμων. Κάποια ανασυνδυασμένα στελέχη μπορούν να φέρουν αλληλουχίες και από τους τρεις Sabin τύπους. Έχει προταθεί ότι τέτοια ανασυνδυασμένα στελέχη επιλέγονται για τη βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα σε αντίθεση με τους γονικούς ιούς.

Η πρόκληση ανασυνδυασμού μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Στον πρώτο τρόπο εμφανίζεται ο εξαρτώμενος από το ζευγάρι βάσεων πολιοϊικός ανασυνδυασμός. Ο ανασυνδυασμός αυτός κυρίως παρατηρείται ανάμεσα σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των δύο πατρικών γενωμικών RNA αλυσίδων, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό νουκλεοτιδικής ομοιότητας. Αυτό οδηγεί στην ρήξη των περιοχών αυτών και επανένωσή τους με τις αντίστοιχες του άλλου στελέχους. Στο δεύτερο τρόπο ανασυνδυασμού, παρατηρείται αλλαγή μήτρας κατά τη σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας, στην διαδικασία της γενωμικής RNA αντιγραφής. Η περιγραφή της περίπτωσης αυτής πρώτα έγινε σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊό. Η RNA πολυμεράση αρχικά αντιγράφει το 3' άκρο μιας γονικής θετικής αλυσίδας και έπειτα αλλάζει μήτρας και συνεχίζει τη σύνθεση στην αντίστοιχη θέση σε μια δεύτερη γονική θετικής πολικότητας αλυσίδα.

Η αλλαγή της μήτρας σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊό παρατηρείται επικρατέστερα κατά τη σύνθεση της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας. Ο τρόπος αυτός ανασυνδυασμού είναι γνωστός και ως αντιγραφική επιλογή. Στον μηχανισμό αυτό οι συχνότητες ανασυνδυασμού είναι χαμηλότερες μεταξύ διαφορετικών πολιοϊικών οροτύπων (Racaniello, 2007).



Εικόνα 13. **A)** Απεικόνιση του εξαρτώμενου από το ζευγάρι βάσεων μηχανισμού του πολιοϊικού ανασυνδυασμού ανάμεσα σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των δύο πατρικών γενωμικών RNA αλυσίδων. Αυτό οδηγεί στην ρήξη των περιοχών αυτών και επανένωσή τους με τις αντίστοιχες του άλλου στελέχους. **B)** Αναπαράσταση του μηχανισμού της αντιγραφικής επιλογής, κατά τον οποίο η RNA πολυμεράση αρχικά αντιγράφει το 3' άκρο μιας γονικής θετικής αλυσίδας και έπειτα αλλάζει μήτρες και συνεχίζει τη σύνθεση στην αντίστοιχη θέση σε μια δεύτερη γονική θετικής πολικότητας αλυσίδα (Makadiya, 2007, <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/genet.htm>, Hunt)

Η ικανότητα ανασυνδυασμού αντανακλά ένα μηχανισμό, που οι RNA ιοί έχουν αναπτύξει ως αντίμετρο έναντι των αυξημένων ρυθμών μεταλλάξεων, οι οποίοι με τη σειρά τους οφείλονται στην έλλειψη διορθωτικής δραστηριότητας της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης. Έτσι ο ανασυνδυασμός εξαλείφει επιβλαβείς μεταλλάξεις και συμβάλλει στη γενωμική διατήρηση. Ο ανασυνδυασμός μπορεί επίσης να συμβάλει και στο να δημιουργήσει διαφορετικούς ιούς καλύτερης διαλογής για την επιβίωσή τους. Τέλος παίζει σημαντικό ρόλο στην εξελικτική διαποίκιση των ιικών γενωμάτων επιταχύνοντάς την, μέσω ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών ομάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών (Agol, 1997, Wimmer et al., 1993).

Διαφορετικές μη δομικές πρωτεϊνικές κωδικές περιοχές του γενώματος μεταξύ πολιοϊών προδίδουν την προγενέστερη πραγματοποίηση ανασυνδυασμού. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση οροτύπων με επιλεκτικά πλεονεκτήματα, τα οποία επικρατούν. Η συχνότητα ανασυνδυασμού στη μη καψιδική περιοχή ενισχύει την πρόταση ότι ο ορότυπος καθορίζεται απ την καψιδική περιοχή και ότι περιορισμένη συσχέτιση υπάρχει μεταξύ του οροτύπου των απομονωμένων δειγμάτων και άλλων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που δεν

σχετίζονται με πρωτεΐνες του καψιδίου.

Οι ενδοοροτυπικοί ανασυνδυασμοί είναι σπάνιοι. Παρ' όλα αυτά φαίνεται να πραγματοποιείται τέτοιου είδους ανασυνδυασμός, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει και στην εμφάνιση ενός νέου στελέχους, από αντιγονικής άποψης.

2.10. Μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της ασθένειας

✚ Απομόνωση και ανίχνευση του ιικού στελέχους

Οι παραδοσιακές μέθοδοι για ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού βασίζονται στις χρονοβόρες και εργαστηριακά εντατικές διαδικασίες της ιικής απομόνωσης σε κυτταροκαλλιέργειες και της εξουδετέρωσης του ιού με αντιορούς. Η απομόνωση από τα δείγματα, χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες κυτταρικές σειρές in vitro απαιτεί βάσει του ιικού φορτίου 3 με 8 μέρες. Τα καλύτερα δείγματα για την ιική απομόνωση είναι τα κοπρώδη δείγματα ή πρωκτικά εκκρίματα, λαρυγγικά εκκρίματα ή πλύσεις και εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Είναι κοινή πρακτική η χρήση διαφόρων τύπων ανθρωπίνων κυτταρικών σειρών ώστε να αυξηθεί το φάσμα των ανιχνεύσιμων ιών. Η L20B κυτταρική σειρά, που περιέχει διαγονιδιακά κύτταρα τρωκτικού με έκφραση του CD155 υποδοχέα, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάπτυξη των πολιοϊών.

Στις διαγνωστικές δοκιμές οι ιοί που αναπτύσσονται στις κυτταροκαλλιέργειες ανιχνεύονται από την αντίστοιχη κυτταροπαθογόνο επίδραση και το απομονωμένο στέλεχος τυπικά επικυρώνεται από την εξουδετέρωση με αντιορό ειδικό για τον κάθε τύπο.

✚ Δοκιμές αντισωμάτων

Ορολογική διάγνωση της ιικής μόλυνσης μπορεί να γίνει με σύγκριση των τίτλων αντισωμάτων στην οξεία και καθυστερημένη φάση των δειγμάτων του. Η βασικότερη ορολογική δοκιμή είναι αυτή της εξουδετέρωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια. Ένας γνωστός ιός έχει αναμειχθεί με σειριακά διαλύματα του αντιορού από τον ασθενή. Μια τετραπλάσια ή και παραπάνω αύξηση του τίτλου τυποειδικών, εξουδετερωτικών αντισωμάτων θεωρείται ως διαγνωστικό στοιχείο για τη μόλυνση.

Πολλές ορολογικές δοκιμές βασίζονται στην ανίχνευση IgM αντισωμάτων, ως απόδειξη πρόσφατης ιικής μόλυνσης. Η ενζυμοσύνδετη, ανοσοαπορροφητική μέθοδος ELISA, για ειδικά ιικά IgM, εφαρμόζεται επιτυχώς τόσο σε επιδημιολογικές έρευνες, όσο και για διαγνωστική χρήση.

Παραταύτα οι δοκιμές αυτές ανιχνεύουν ετεροτυπικά αντισώματα, που προέρχονται από άλλες εντεροϊκές μολύνσεις και έτσι δεν μπορούν να θεωρηθούν αυστηρά οροτυπικά ειδικές. Ένα

θετικό αποτέλεσμα του ουδετεροποιητικού τέστ και της IgM ELISA υποδηλώνει μια πρόσφατη ιική μόλυνση. Ο ορότυπος που βρίσκεται μέσω της IgM μεθόδου όμως μπορεί να μην είναι ο ίδιος που καθορίζεται από την ουδετεροποιητική δοκιμή.

Μοριακή ανίχνευση

Η εφαρμογή μοριακών βιολογικών τεχνικών στην κλινική ιολογία έχει αλλάξει σημαντικά την προσέγγιση στις διαγνωστικές μεθόδους. Λόγω των αυστηρών πλεονεκτημάτων κυρίως σε επίπεδο ταχύτητας, πολλές εκ των διαδικασιών αυτών έχουν ήδη αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και χαρακτηρισμού που προαναφέρθηκαν. Η συνεχής ανάπτυξή τους θα οδηγήσει σε μεγαλύτερη εφαρμογή των μεθοδολογιών αυτών, σε ένα ευρύτερο φάσμα εφαρμογών ιικών διαγνωστικών προβλημάτων και τελικά στη χρήση ρουτίνας.

Η πρώτη ομάδα δοκιμών βασίζεται στην PCR, που χρησιμοποιείται αρχικά για την ανίχνευση εντεροϊκού γενώματος στις κυτταροκαλλιέργειες, τα κλινικά δείγματα και τους ιστούς βιοψίας. Η δεύτερη ομάδα βασιζόμενη σε ανιχνευτές υβριδοποίησης νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιείται επίσης για την ανίχνευση, αλλά και τον χαρακτηρισμό των στελεχών αν και φέρει συνήθως μικρότερη ευαισθησία από την PCR. Η τρίτη και νεότερη ομάδα αξιοποιεί τη γενωμική αλληλουχία για το χαρακτηρισμό των πολιοϊών, στα υψηλότερα επίπεδα εξειδίκευσης. Όλες οι μέθοδοι που μπορούν να ανιχνεύουν πολιοϊούς έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Η κυριότερη ιδιότητα τους είναι ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στοχεύουν στην ενίσχυση της 5' αμετάφραστης περιοχής του ιικού γενώματος.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου PCR, της πρώτης ομάδας δοκιμών, είναι η ικανότητα ταχύτατης ανίχνευσης ενός στελεχούς, ακόμη και σε πολύ μικρή ποσότητα κλινικού δείγματος, όπως το νωτιαίο υγρό. Είναι επίσης πιθανή η ανίχνευση εντεροϊών που δεν αναπτύσσονται εύκολα σε κυτταροκαλλιέργειες.

Λόγω της θέσης της αντιγονικής ιδιότητας, που χαρακτηρίζει έναν ορότυπο, στις ιικές καψιδικές πρωτεΐνες, συγκεκριμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες αυτές διατηρούν την αντιγονική ιδιότητα στην καψιδική κωδική περιοχή του ιού. Εκτεταμένες έρευνες της καψιδικής περιοχής των στελεχών οδήγησαν στην κατασκευή εκκινητών που μπορούν επιλεκτικά να ενισχύσουν απομονωμένα τμήματα ενός μόνο οροτύπου. Αυτό πραγματοποιείται παρά τον υψηλό βαθμό συνώνυμων νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων με τη χρήση της ινοσίνης στη σύνθεση των εκκινητών. Έτσι παρέχονται εργαλεία για τον ταχύτατο οροτυπικό χαρακτηρισμό των εντεροϊών, χωρίς την απαίτηση για κυτταροκαλλιέργειες.

Εξαιτίας των παραπάνω πλεονεκτημάτων της η PCR αντικατέστησε και τους νουκλεοτιδικούς ανιχνευτές της δεύτερης ομάδας δοκιμών, την πρώτη εφαρμογή μοριακών

τεχνικών για την ανίχνευση εντεροϊκών γενωμάτων. Οι ανιχνευτές αυτοί κατασκευάζονται μέσω σύνθεσης cDNA, το οποίο κλωνοποιούταν σε βακτήρια, ενισχυόταν και σημειούνταν ραδιοχημικά για να παρέχει αντιδραστήριο προς ανίχνευση των εντεροϊκών γενωμάτων μέσω νουκλεοτιδικού υβριδισμού. Η τεχνική όμως δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των εντεροϊκών οροτύπων σε ένα δείγμα, λόγω της πρόσδεσης των ανιχνευτών σε συγγενικούς οροτύπους. Η τεχνική αυτή έχει επίσης εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί στο πρόγραμμα πολιοϊκής εξάλειψης, σαν βασική τεχνική για τον καθορισμό του αν ένα στέλεχος είναι εμβολιοσυνδεόμενο ή αγρίου τύπου.

Μια επίτευξη στην ιική ταυτοποίηση είναι η γνώση της αλληλουχίας του ιικού γενώματος της τρίτης ομάδας δοκιμών. Καθοριστικά στοιχεία για όλες τις βιολογικές ιδιότητες, που δίνονται σε έναν ιό, προέρχονται από την κωδικοποίηση της αλληλουχίας του γενώματός τους. Έτσι η πληροφορία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός ιού αντιπροσωπεύει τον απόλυτο χαρακτηρισμό του. Είναι πιθανό να χρησιμοποιείται η αλληλουχική πληροφορία για τον προσδιορισμό ενός συγκεκριμένου οροτύπου.

Το μοριακό σύστημα βασίζεται στην RT-PCR και στη νουκλεοτιδική αλληλούχηση του 3' μισού ή ολόκληρης της γενωμικής περιοχής που κωδικοποιεί την καψιδική πρωτεΐνη VP1. Ο ορότυπος ενός αγνώστου στελέχους μπορεί να καθοριστεί μέσω σύγκρισης της μερικής VP1 αλληλουχίας με τη βάση δεδομένων που περιέχει τις VP1 αλληλουχίες για τα πρότυπα και διάφορα άλλα στελέχη και των 92 ανθρωπίνων εντεροϊκών οροτύπων (Pallansch et al., 2007).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η συσχέτιση μεταλλάξεων και γενετικών ανασυνδυασμών με την κινητική ανάπτυξης και τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας είναι τα εξής:

- Θρεπτικό υλικό MEM της εταιρίας Biosera, το οποίο περιέχει:
 - w/Άλατα Earle
 - w/L-Γλουταμίνη και
 - w/25mM Hepes

- Αντιβιοτικό-Αντιμυκητικό της εταιρίας Biosera, 100x, από το οποίο προστίθενται 5ml στα 500ml θρεπτικού υλικού MEM

- Τρυψίνη-EDTA της εταιρίας Biosera, 10X, το οποίο αραιώνεται 1/10 με διάλυμα εξισορροπημένων αλάτων Hank (Na Bicarbonate) της εταιρίας Biosera

- Βόειος ορός.

3.2. Μέθοδοι

Κλινικά δείγματα

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 και Sabin 3 που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες κατά την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών, ελήφθησαν από το NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom).

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 8 δείγματα.

Δείγμα	Ορότυπος	Κλινικές Εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδιασμού/ Σημείο ανασυνδιασμού
742	Polio 1	-/(Λύματα-Αττική)	2A S1/S3 3461-3465 2C S3/S2 4511-4527
II	Polio 1	Λευχαμία	-
EPA	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605
EPB	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605
LK3	Polio 3	-/(Λύματα-Κύπρος)	2C S3/S2 4766-4791 2C S2/S1 4942-4958
LK6	Polio 3	-/(Λύματα-Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4942-4958
LK10	Polio 3	-/(Λύματα-Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4942-4958
729	Polio 3	Υγής	-

Πίνακας 3. Στον παραπάνω πίνακα παρατίθενται τα δείγματα, ο γενότυπος τους, η πηγή απομόνωσής τους, καθώς επίσης και ο τύπος και το σημείο του ανασυνδιασμού που πραγματοποιείται.

Κυτταροκαλλιέργειες

Για την απομόνωση των πολιοϊικών στελεχών χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά Her-2 (Human epidermoid carcinoma). Όλες οι διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας πραγματοποιούνται κάτω από άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο βιολογικής προστασίας επιπέδου 2. Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό MEM με περιεκτικότητα σε βόειο ορό συνήθως 10%, σχετικά υψηλή ώστε να επάγει την γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων. Από την άλλη για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό MEM με περιεκτικότητα σε βόειο ορό περίπου 2% και προστίθεται για τη διατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών σε στάσιμη κατάσταση.

Η ανάπτυξη των Her-2 κυττάρων πραγματοποιείται στους 37°C σε ειδικό κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών. Τα Her-2 κύτταρα αναπτύσσονται προσκολλώμενα στην εσωτερική επιφάνεια ειδικών πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιέργειας (φλάσκες 25 cm²), επιφανείας 25 cm².

Όταν η πλαστική φιάλη καλλιέργειας γεμίσει, τότε πραγματοποιείται αναδιπλασιασμός της. Για τον αναδιπλασιασμό των κυττάρων αρχικά πραγματοποιούνται δύο διαδοχικές επώσεις διάρκειας 30 δευτερολέπτων με διάλυμα τρυψίνης-EDTA και στη συνέχεια επώαση 2 λεπτών στον κλίβανο των 37°C. Αφού διαπιστωθεί, μέσω του ανάστροφου μικροσκοπίου, η αποκόλληση των κυττάρων από την πλαστική φιάλη προστίθενται 21 ml θρεπτικού υλικού MEM περιεκτικότητας 10% σε βόειο. Έπειτα ακολουθεί ισόποσα το μοίρασμα των κυττάρων σε 3 πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες εισάγονται για ανάπτυξη στον κλίβανο των 37°C. Αυτό συμβαίνει όταν η φιάλη είναι πλήρως γεμάτη. Όταν η φιάλη είναι μερικώς γεμάτη, τότε προστίθενται 14 ml θρεπτικού υλικού MEM περιεκτικότητας 10% σε βόειο και το μοίρασμα πραγματοποιείται σε δύο νέες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας. Η προστιθέμενη τρυψίνη για την αποκόλληση των κυττάρων από γυάλινα ή πλαστικά υποστρώματα είναι πρωτεολυτικό ένζυμο. Επίσης για την αποκόλληση κυττάρων χρησιμοποιείται το EDTA, το οποίο αποτελεί παράγοντα δέσμευσης ιόντων (chelating agent).

Προκειμένου να διατηρηθούν κύτταρα για μελλοντική τους χρήση, μπορούν να καταψυχθούν. Για την κατάψυξη των κυττάρων αυτών, τα κύτταρα από δύο πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας αποκολλώνται με τη διαδικασία της τρυψινοποίησης που προαναφέρθηκε και περιέχονται σε 1 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (μέσο καλλιέργειας για διατήρηση κυττάρων χωρίς ορό) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% DMSO και 20% βόειο ορό. Το αιώρημα κυττάρων μεταφέρεται σε ειδική αμπούλα η οποία τοποθετείται σε συσκευή ισοπροπανόλης στους -80°C. Έτσι με τον τρόπο αυτό, επιτρέπεται η σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας, ώστε να μην έχουμε καταστροφή των κυττάρων. Μετά από 4 ώρες η αμπούλα απομακρύνεται από τη συσκευή ισοπροπανόλης και φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -80°C, έως ότου είναι ξανά αναγκαία στο μέλλον η χρήση των κυττάρων αυτών.

Όταν απαιτούνται κύτταρα προς καλλιέργεια για εργαστηριακή τους χρήση, τότε εξάγονται από την κατάψυξη όπου φυλάσσονται. Για την απόψυξη των κυττάρων, μια αμπούλα κυττάρων μεταφέρεται από τους -80°C σε υδατόλουτρο με αποσταγμένο νερό στους 36°C , έως ότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν. Ακολουθεί προσεκτικό άνοιγμα κάθε αμπούλας όπου το περιεχόμενο (κύτταρα και θρεπτικό υλικό καλλιέργειας) μεταφέρεται σε πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού MEM με περιεκτικότητα σε βόειο ορό 10% για τον σχηματισμό κυτταρικής μονοστιβάδας (αν η αμπούλα περιέχει 4×10^6 κύτταρα/ml, τότε 1 ml αραιωμένων κυττάρων επαρκεί για την παραγωγή 1-2 πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιέργειας). Έπειτα οι πλαστικές φιάλες επωάζονται για 2 ώρες περίπου σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για την προσκόλληση των κυττάρων και τελικά γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού της φιάλης των κυττάρων με 10 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού MEM περιεκτικότητας 10% σε βόειο ορό και η φιάλη επανατοποθετείται στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

Ενοφθαλμισμός πολιοϊών σε κυτταροκαλλιέργειες

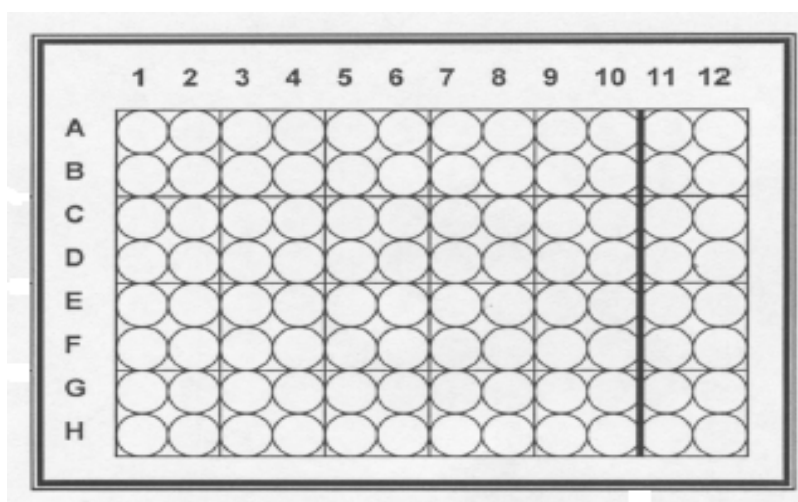
Περίπου 200 μl είτε από το υπερκείμενο που προέκυψε κατά την επεξεργασία των κοπράνων, είτε από τη συλλογή κατά την επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων, ενοφθαλμίζονται σε πλαστικές φιάλες Hep-2 κυττάρων (25 cm^2) οι οποίες περιέχουν 5 ml θρεπτικού υλικού MEM περιεκτικότητας 2% σε βόειο. Οι πλαστικές φιάλες εισάγονται σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C όπου παραμένουν για 2-3 μέρες. Οι πλαστικές φιάλες εξετάζονται καθημερινά, μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου, για την εύρεση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Όταν παρατηρείται πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση, με πλήρη καταστροφή και αποκόλληση των κατεστραμμένων κυττάρων, οι πλαστικές φιάλες αποθηκεύονται στους -20°C . Στη θερμοκρασία αυτή έχουμε καταστροφή και πλήρη αποκόλληση πιθανών προσκολλημένων κυττάρων που μπορεί να έχουν επιβιώσει από την προηγούμενη διεργασία. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα πρότυπα στελέχη Sabin 1 και Sabin 3.

Για ενίσχυση του ιϊκού τίτλου, η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές και από τις φιάλες της τελικής ανακαλλιέργειας, λαμβάνεται το υλικό για περαιτέρω επεξεργασία.

Σειριακές αραιώσεις πολιοϊκών στελεχών

Μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες ενδεχομένως να υπάρχουν μίγματα διαφορετικών ιικών γονότυπων. Προκείμενου να διαχωριστούν τα εν λόγω μίγματα και να απομονωθεί το στέλεχος που βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση μέσα στα μίγματα, ακολουθείται η διαδικασία των σειριακών αραιώσεων.

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 14) προστίθεται 100 μl αιώρημα κυττάρων σε θρεπτικό υλικό MEM με 1% ορό (περίπου 10.000 κύτταρα) σε κάθε θέση. Για κάθε δείγμα, σε 9 πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (erpendorf) τοποθετούνται 900μl θρεπτικού υλικού MEM. Στη συνέχεια, 100 μl από κάθε ιικό δείγμα ενοφθαλμίζονται στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10^{-1} αραιώση του ιικού δείγματος. Έπειτα 100 μl από την 10^{-1} αραιώση ενοφθαλμίζονται στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10^{-2} αραιώση του ιικού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να δημιουργηθεί η 10^{-10} αραιώση του ιικού δείγματος. Ακολούθως, 100 μl από τους πλαστικούς σωλήνες που αντιπροσωπεύουν τις αραιώσεις από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} τοποθετούνται στις θέσεις A1 με A10 αντίστοιχα. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης πραγματοποιούνται οι αραιώσεις των τεσσάρων στελεχών εις διπλούν. Οι στήλες 11 και 12 αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι πλάκες τοποθετούνται στον κλίβανο των 37°C για επώαση. Η μεγαλύτερη αραιώση κάθε δείγματος στην οποία παρατηρείται κυτταροπαθογόνος δράση ενοφθαλμίζεται σε πλαστική φιάλη κυττάρων Hep-2. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το απόθεμα (stock) για το κάθε ιικό στέλεχος.



Εικόνα 14. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η πλάκα μικροτιτλοποίησης με τις θέσεις ενοφθαλμισμού.

Υπολογισμός του τίτλου των πολιοϊικών στελεχών

Ο τίτλος του ιού ορίζεται ως ο αριθμός των ιϊκών σωματιδίων που περιέχονται σε 100 μl του ιϊκού δείγματος. Ο ιϊκός τίτλος υπολογίζεται για όλα τα ιικά στελέχη που απομονώνονται από τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και για τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 και Sabin 3.

Αρχικά για την εφαρμογή της διαδικασίας της τιτλοποίησης του ιού, σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστίθενται 100 μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στις πλάκες, για κάθε ιϊκό δείγμα πραγματοποιούνται σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10^{-6} . Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπολογίζεται ο τίτλος 2 διαφορετικών ιϊκών στελεχών. Συγκεκριμένα, για κάθε ιϊκό στέλεχος, σε έξι πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (τύπου erpendorf) τοποθετούνται 900 μl θρεπτικού υλικού MEM. Στη συνέχεια, 100 μl από το απόθεμα κάθε ιϊκού στελεχούς ενοφθαλμίζονται στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10^{-1} αραιώση του ιϊκού δείγματος. Έπειτα 100 μl από την 10^{-1} αραιώση ενοφθαλμίζονται στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10^{-2} αραιώση του ιϊκού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι να αποκομισθεί η επιθυμητή αραιώση. Στη συνέχεια, 400 μl της 10^{-1} αραιώσης του πρώτου ιϊκού στελεχούς ενοφθαλμίζονται στις θέσεις B2-B5 (100 μl/θέση), ενώ 400 μl της 10^{-1} αραιώσης του δεύτερου ιϊκού στελεχούς ενοφθαλμίζονται στις θέσεις B6-B9 (100 μl/θέση). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι και τον ενοφθαλμισμό της τελευταίας αραιώσης στην πλάκα. Στις στήλες 10 και 11 δεν προστίθεται ιϊκό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες και τοποθετείται σκέτο θρεπτικό υλικό MEM. Ακολούθως η πλάκα τοποθετείται για επώαση στον κλίβανο των 37°C και από την επόμενη μέρα παρακολουθείται καθημερινά για την εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης για τις επόμενες πέντε ημέρες.

Την τελευταία μέρα, ελέγχεται η κυτταροπαθογόνος δράση του κάθε ιού στελεχούς και καταγράφεται η αραιώση στην οποία εμφανίζεται πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση και στις τέσσερις θέσεις της αραιώσης. Όταν εμφανίζεται πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση και σε κάποιες από τις θέσεις της επόμενης αραιώσης, εισάγεται στον τύπο υπολογισμού του ιϊκού τίτλου ο αριθμός των θέσεων αυτών. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίζεται ο ιϊκός τίτλος είναι: $\log\text{TCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$, όπου L είναι η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίζεται πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση και στις τέσσερις θέσεις, όπου d είναι η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων και όπου S είναι το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση στην επόμενη αραιώση.

Έλεγχος της θερμοευαισθησίας των πολιοϊών (RCT test)

Η RCT δοκιμή (Reproductive Capacity at different Temperatures) αξιολογεί την ικανότητα αναπαραγωγής των πολιοϊκών στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Έπειτα από επώαση πέντε ημερών, η τιμή RCT ορίζεται ως η διαφορά ανάμεσα στο λογάριθμο του ιϊκού τίτλου στην ευνοϊκή (37°C) και στη μη ευνοϊκή (40°C) θερμοκρασία για την ιϊκή αναπαραγωγή. Ο προσδιορισμός του ιϊκού τίτλου, ο οποίος εκφράζεται σε TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) ανά ml, πραγματοποιείται σε Hep-2 κύτταρα, σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Συνολικά προσδιορίζεται η θερμοευαισθησία οκτώ εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊκών στελεχών, τα έξι εκ των οποίων φέρουν διπλό ανασυνδυασμό και τα δύο δεν φέρουν κανέναν ανασυνδυασμό. Επιπλέον ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται τα θερμοευαίσθητα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 και Sabin 3.

Η δοκιμή RCT ξεκινάει με τη μεταφορά 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση στην πλάκα μικροτιτλοποίησης. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στις πλάκες, για κάθε ιϊκό δείγμα γίνονται σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10⁻⁶. Κατόπιν 100μl από κάθε αραιώση μεταφέρονται σε τέσσερις θέσεις σε κάθε μια από δυο πλάκες μικροτιτλοποίησης που αντιστοιχούν στους 37°C και στους 40°C. Οι στήλες 10 και 11 αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες κι έτσι προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό MEM. Η μια πλάκα επωάζεται στους 37°C και η δεύτερη στους 40°C. Μετά από επώαση 5 ημερών προσδιορίζεται ο τίτλος για κάθε ιϊκό δείγμα εκφραζόμενος σε log₁₀ 50% TCID₅₀ ανά ml. Τα ιϊκά στελέχη θεωρούνται θερμοευαίσθητα (temperature sensitive, ts) όταν η τιμή RCT (διαφορά ανάμεσα στους 37°C και 40°C) είναι μεγαλύτερη ή ίση με 2.00 και θερμοανθεκτικά (non ts) όταν η τιμή RCT είναι μικρότερη του 2.00.

Κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου (one step growth curve)

Οι καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου πραγματοποιούνται σε κύτταρα Hep-2 στους 37°C και στους 40°C, έπειτα από μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) κάθε ιϊκού δείγματος το οποίο αντιστοιχεί σε 10 TCID₅₀ ανά κύτταρο. Συνολικά κατασκευάζονται καμπύλες ανάπτυξης για οκτώ εμβολιοσυνδεόμενα πολιοϊκά στελέχη, εκ των οποίων έξι φέρουν διπλό ανασυνδυασμό και δύο δεν φέρουν ανασυνδυασμό. Η καμπύλη ανάπτυξης του κάθε εμβολιοσυνδεόμενου πολιοϊού συγκρίνεται με την καμπύλη ανάπτυξης του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 ή Sabin 3 του ίδιου γενοτύπου στην 5'-NCR περιοχή. Πραγματοποιείται λοιπόν ένα πείραμα, στο οποίο μελετάται η κινητική ανάπτυξης των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με διπλούς ανασυνδυασμούς. Τα δυο ιϊκά στελέχη τα οποία δεν φέρουν ανασυνδυασμούς χρησιμοποιούνται προκειμένου να συγκριθεί η

κινητική ανάπτυξή τους με τη κινητική ανάπτυξης των διπλά ανασυνδυασμένων πολιοϊών.

Περίληπτικά, πραγματοποιείται καταμέτρηση κυττάρων Her-2 με τη βοήθεια της πλάκας Newbauer και 100 μl κυττάρων ενοφθαλμίζονται ανά θέση σε 14 πλάκες μικροτιτλοποίησης (96 θέσεων). Την επομένη μέρα αφού έχει ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων στις πλάκες το κάθε ιικό δείγμα (10 MOI) προστίθεται σε πέντε θέσεις σε κάθε μία από τις 14 πλάκες μικροτιτλοποίησης. Αφού οι πλάκες, οι οποίες συνολικά περιέχουν τα οκτώ πολιοϊκά δείγματα και τα τρία πρότυπα στελέχη, ανακινηθούν για δυο ώρες στους 37°C έχουμε την επίτευξη της εισόδου του ιού στα κύτταρα. Έπειτα τα κύτταρα ξεπλένονται προσεκτικά δύο φορές, καθενιά με 300 μl θρεπτικού υλικού (Eagle MEM) ώστε να απομακρυνθούν τα ιικά σωματίδια που δεν εισήχθησαν στα κύτταρα. Στη συνέχεια σε κάθε θέση προστίθενται 100 μl Eagle MEM και οι πλάκες επωάζονται οι μισές στους 37°C και οι υπόλοιπες στους 40°C για 0, 2, 4, 6, 8, 10 και 12 ώρες. Τελικά έπειτα από την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής, πραγματοποιούνται τρεις συνεχείς κύκλοι ψύξης-απόψυξης ώστε να διασπαστούν οι κυτταρικές μεμβράνες και να απελευθερωθούν τελικά τα ιικά σωματίδια. Έτσι ο ιικός τίτλος του υπερκείμενου προσδιορίζεται με τη μέθοδο που περιγράφεται προηγουμένως σε Her-2 κύτταρα σε κλίβανο των 37°C για κάθε μια από τις διαφορετικές ώρες μετά τη μόλυνση, ώστε να κατασκευαστούν οι τελικές καμπύλες.

Οι καμπύλες αυτές φέρουν στον άξονα x τις ώρες επώασης, για το κάθε υπό μελέτη πολιοϊκό δείγμα και το αντίστοιχο εμβολιακό του πρότυπο, στους 37°C και στους 40°C και στον άξονα y τον λογάριθμο του TCID₅₀ /0,1ml. Έτσι μπορεί να υπάρξει σύγκριση μεταξύ του εμβολιακού πολιοϊκού στελέχους και του αντίστοιχου προτύπου Sabin του ίδιου γενοτύπου στην 5'-NCR περιοχή και να συλλεχθούν ορατά αποτελέσματα για την απώλεια ή όχι της θερμοευαισθησίας στους 40°C.

Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Στα πολιοϊκά δείγματά μας έχει προηγηθεί αλληλούχιση του γενετικού τους υλικού. Μετά την απόκτηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης τους χρησιμοποιείται μια σειρά από προγράμματα βιοπληροφορικής για την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών τους αλληλουχιών. Αρχικά χρησιμοποιείται το πρόγραμμα **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool). Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού αναζητείται η κοντινότερη ή όμοια αλληλουχία και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank). Το BLAST διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Ο αλγόριθμος BLAST αναζητά στη GenBank κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές

στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται με μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειούμενης βαθμολογίας συσχέτισης, κι επομένως ομολογίας μεταξύ των εξεταζόμενων γενωμάτων.

Στη συνέχεια έχουμε χρήση του προγράμματος **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), με το οποίο πραγματοποιούνται οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των πολιοϊκών στελεχών που μελετώνται, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1 και Sabin 3. Μέσω των στοιχίσεων αυτών ανιχνεύονται οι διάφορες νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί στα υπό μελέτη ιϊκά στελέχη. Επίσης, πραγματοποιούνται και στοιχίσεις μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των ιϊκών στελεχών που μελετώνται και των προτύπων στελεχών, με αποτέλεσμα την ανίχνευση αμινοξικών μεταλλάξεων. Τέλος με τη χρήση του προγράμματος **GeneRunner V. 3.05** ανακτώνται οι αμινοξικές αλληλουχίες των ιϊκών στελεχών.

4. Αποτελέσματα

4.1. Αποτελέσματα BLAST-ClustalW

Έπειτα από την χρήση των προγραμμάτων BLAST και ClustalW, βρέθηκε η τοποθεσία των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων στην 5'-NCR και στην VP1 κωδική περιοχή των πολιοϊκών στελεχών.

Παρατηρούμε από τον παρακάτω πίνακα αποτελεσμάτων ότι όσον αφορά την 5'-NCR, στα δείγματα Sabin 1 έχουμε μια κοινή νουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 583 και στα δείγματα Sabin 3 δυο κοινές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στις θέσεις 472 και 586 και δύο μόνο μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10 στις θέσεις 438 και 439. Για την κωδική περιοχή της πρωτεΐνης VP1, στα δείγματα Sabin 1 έχουμε μια κοινή νουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 2776 και στα δείγματα Sabin 3 μια κοινή νουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 2493. Επίσης μόνο μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10, υπάρχουν τέσσερις κοινές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στις θέσεις 2637, 2790, 2855 και 2857.

Πρότυπα	Περιοχή	Δείγμα	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin	Δείγμα	Αμινοξική θέση	Sabin	Δείγμα
Sabin 1	5'-NCR	742	480	G	A			
			583	C	G			
		II	525	U	C			
			583	C	G			
Sabin 3		EPA	472	U	C			
			586	C	G			
		EPB	472	U	C			
			586	C	G			
		LK3	438	C	U			
			439	A	G			
			472	U	C			
			586	C	G			
		LK6	438	C	U			
			439	A	G			
			472	U	C			
			586	C	G			
		LK10	438	C	U			
			439	A	G			
			472	U	C			
			586	C	G			
		729	248	G	A			
			472	U	C			
			586	C	G			
Sabin 1	VP1	742	2502	G	A	8	Ser	Asn
			2776	G	U	99	Lys	Asn
			2833	A	G	-		
			2904	U	G	142	Phe	Cys
		II	2605	G	A	-		
			2765	G	A	96	Ala	Thr
			2776	G	U	99	Lys	Asn
			2795	A	G	106	Thr	Ala
			2917	C	U	-		
			2982	A	G	168	Glu	Gly
			3138	A	G	220	Gln	Arg
Sabin 3		EPA	2493	C	U	6	Thr	Ile
			EPB	2493	C	U	6	Thr
		LK3	2493	C	U	6	Thr	Ile
			2637	C	U	54	Ala	Val
			2790	U	C	105	Met	Thr
			2855	C	A	-		
			2857	U	A	-		
		LK6	2493	C	U	6	Thr	Ile
			2637	C	U	54	Ala	Val
			2790	U	C	105	Met	Thr
			2855	C	A	-		
			2857	U	A	-		
		LK10	2493	C	U	6	Thr	Ile
			2637	C	U	54	Ala	Val
			2790	U	C	105	Met	Thr
			2855	C	A	-		
			2857	U	A	-		
		729	2493	C	U	6	Thr	Ile
			2659	G	A	-		
			2716	A	G	-		

Πίνακας 4. Στον παραπάνω πίνακα παρατίθενται οι θέσεις των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων καθώς και των αμινοξικών μεταβολών στην 5'-NCR και στην κωδική περιοχή της VP1. Οι μεταλλάξεις, οι οποίες αναγνωρίζονται σε περισσότερα του ενός στελέχη, είναι υπογεγραμμένες.

Επίσης με τη χρήση των προγραμμάτων BLAST και ClustalW, βρέθηκε η τοποθεσία των μεταλλάξεων στην 2C-3D γενωμική περιοχή των πολιοϊικών στελεχών 742, EPA, EPB, LK3, LK6 και LK10 σε σχέση με τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια και τις αντίστοιχες αμινοξικές θέσεις στα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin.

Πρότυπα	Περιοχή	Δείγμα	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin	Δείγμα	Αμινοξική θέση	Sabin	Δείγμα		
S3/S2	2C	742	4929/S2 5029/S2	C A	U G	- 303	Ile	Val		
S3/S2 S3/S2		EPA EPB	- 4167/S3 4171/S3	- U A	- G G	- 18 -	Leu	Trp		
S3/S2/S1		LK3	4171/S3 4213/S3 4332/S3 4907/S2 5032/S1	A A A U U	G G U G C	- - 73 262 -	Gln Met	Leu Arg		
S3/S2/S1		LK6	-	-	-	-				
S3/S2/S1		LK10	4316/S3 4800/S2	C G	U U	68 -	Pro	Ser		
S2	3A	742	-	-	-	-				
S2 S2 S1		EPA EPB LK3	<u>5214</u> <u>5214</u> <u>5269</u>	U U A	C C G	- - -	Arg	Gly		
S1		LK6	5270 5272	A G	G A	- 54				
S1 S1 S2		LK10 742	- <u>5269</u> -	- A -	- G -	- - -				
S2	3B	742	-	-	-	-				
S2 S2 S1 S1 S1 S2		EPA EPB LK3 LK6 LK10 742	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -				
S2 S2		EPA EPB	5781 5784 -	C U -	U C -	- - -				
S1		LK3	<u>5641</u> <u>5769</u>	C A	U U	- 111	Asn	Ile		
S1		LK6	<u>5641</u> <u>5769</u> 5911	C A C	U U U	- 111 -	Asn	Ile		
S1 S2 S2/S3 S2/S3	3D	LK10 742 EPA EPB	<u>5641</u> 6114 6071/S2 -	C U C -	U A U -	- - 29 -	Ala	Val		
S1		LK3	<u>6019</u> <u>6151</u> <u>6203</u> <u>6732</u> 6784	A G C U C	G A U C U	- - 73 249 -	His Leu	Tyr Pro		
S1		LK6	<u>6947</u> <u>6019</u> <u>6151</u> <u>6203</u> 6492 6493 6495 6496 6741 6779	C A G C A G U A	U G A U G A G U	- - 73 169 - 170 - 252 265	His Glu	Tyr Gly		
S1		LK10	6496 5991 <u>6019</u> <u>6151</u> <u>6203</u> 6499 6607 <u>6732</u> 6733 <u>6947</u> 7051	A A G C G U U A C U	A G A U A G A A C U C	- - - - 73 - - - 249 - - -	Gln Val Ile Glu	Pro Gly Phe Gly		
							His	Tyr		
							Leu	His		

Πίνακας 5. Στον παραπάνω πίνακα παρατίθενται οι θέσεις των μεταλλάξεων καθώς και των αμινοξικών μεταβολών στην 2C-3D γενομική περιοχή. Οι μεταλλάξεις, οι οποίες αναγνωρίζονται σε περισσότερα του ενός στελέχη, είναι υπογεγραμμένες.

Παρατηρούμε από τον παραπάνω πίνακα αποτελεσμάτων ότι όσον αφορά την 2C περιοχή, στα δείγματα EPB και LK3 έχουμε μια κοινή νουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 4171. Στην 3A περιοχή, έχουμε μια κοινή νουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 5214 μεταξύ των δειγμάτων EPA και EPB και μια στη θέση 5269 μεταξύ των δειγμάτων LK3 και LK10. Στη συνέχεια στην 3C περιοχή, έχουμε μια κοινή νουκλεοτιδική μετάλλαξη στη θέση 5641 μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10 και μια στη θέση 5769 μεταξύ των δειγμάτων LK3 και LK6. Τέλος στην 3D περιοχή, έχουμε τρεις κοινές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στις θέσεις 6019, 6151 και 6203 μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10 και δύο στις θέσεις 6732 και 6947 μεταξύ των δειγμάτων LK3 και LK10.

4.2. Αποτελέσματα της RCT δοκιμής

Με την εξέταση των 8 δειγμάτων και των 2 προτύπων Sabin 1 και Sabin 3 στους 37°C και στους 40°C, παρατηρείται η διαφορά στον τίτλο μεταξύ των δύο θερμοκρασιών για το κάθε δείγμα. Ανάλογα με την διαφορά λοιπόν, γίνεται φανερή η αντιγραφική ικανότητα των πολιοϊικών OPV στελεχών και των Sabin εμβολιακών στελεχών στις δυο διαφορετικές θερμοκρασίες.

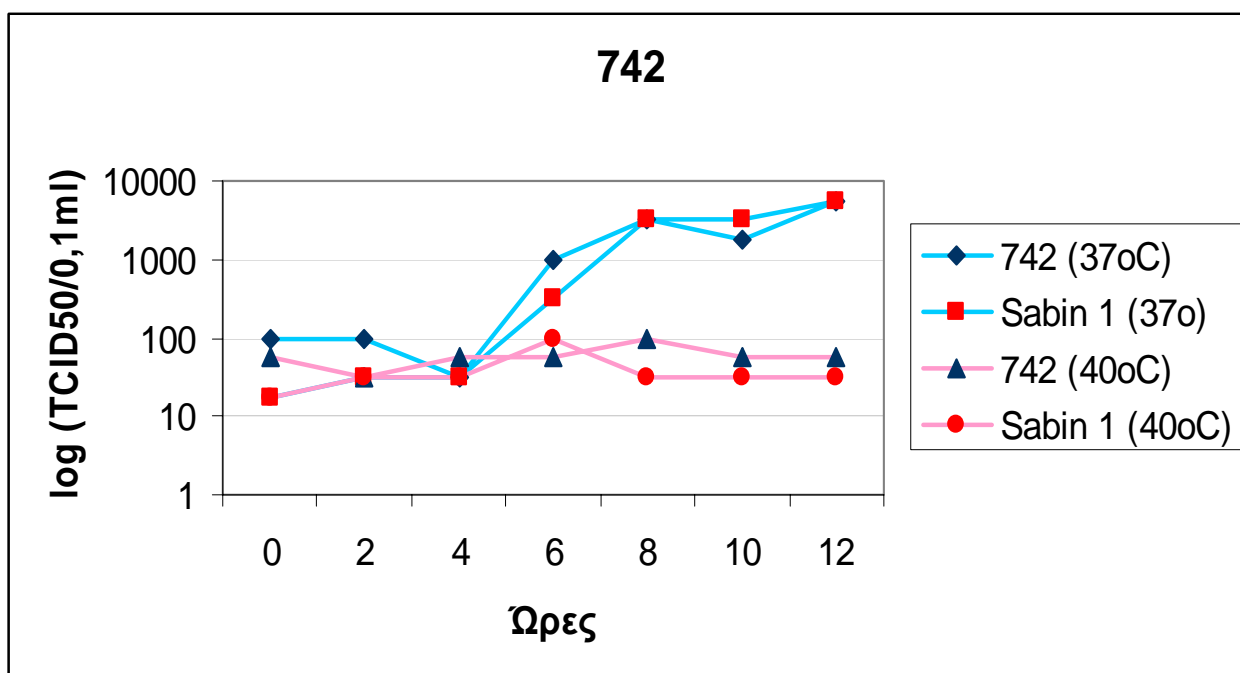
Από τον πίνακα αποτελεσμάτων, παρατηρείται πως τα δείγματα EPA, EPB και 729 με τιμή πάνω του 2, είναι θερμοευαίσθητα, τα δείγματα 742 και II με τιμή ίση με το 2 έχουν χάσει μερικώς τη θερμοευαισθησία τους και τέλος τα δείγματα LK3, LK6 και LK10 με τιμή κάτω του 2 έχουν χάσει ολοκληρωτικά τη θερμοευαισθησία τους.

Δείγμα	Τίτλος (log TCID ₅₀ /0.1ml)		Rct (Δ log TCID ₅₀ /0.1ml)
	37°C	40°C	
742	4.75	2.75	2.0
II	3.5	1.5	2.0
EPA	7.0	3.5	3.5
EPB	6.75	3.25	3.5
LK3	6.25	6.25	0
LK6	6.25	6.25	0
LK10	4.75	4.0	0.75
729	5.0	1.5	3.5
Sabin 1	6.0	2.5	3.5
Sabin 3	6.0	2.5	3.5

Πίνακας 6. Ο πίνακας αυτός περιέχει τη διαφορά στον τίτλο μεταξύ των δύο θερμοκρασιών για το κάθε δείγμα.

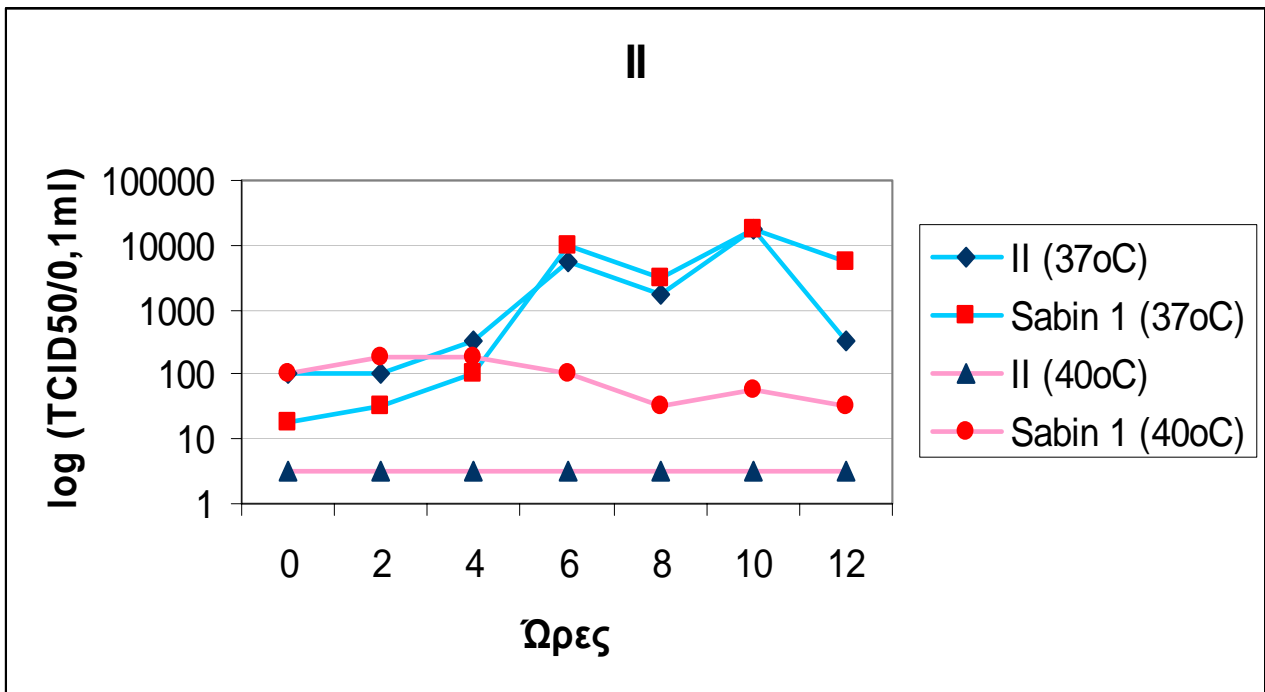
4.3. Οι καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου

Στο τελευταίο κομμάτι της εργασίας ακολουθούν οι καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου για κάθε ένα από τα πολιοϊικά στελέχη. Τα στελέχη 742 και II προέρχονται από τον κοινό πρόγονο Sabin 1, με τον οποίο φέρουν κοινή 5'-NCR και συγκρίνονται με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 1. Τα Hep2 κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, μολύνθηκαν με 10MOI και επωάστηκαν στους 37°C και στους 40°C. Στα παρακάτω διαγράμματα, φαίνεται η συνολική ιική παραγωγή στις 0-12 ώρες.



Διάγραμμα 1. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους 742 σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 1, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

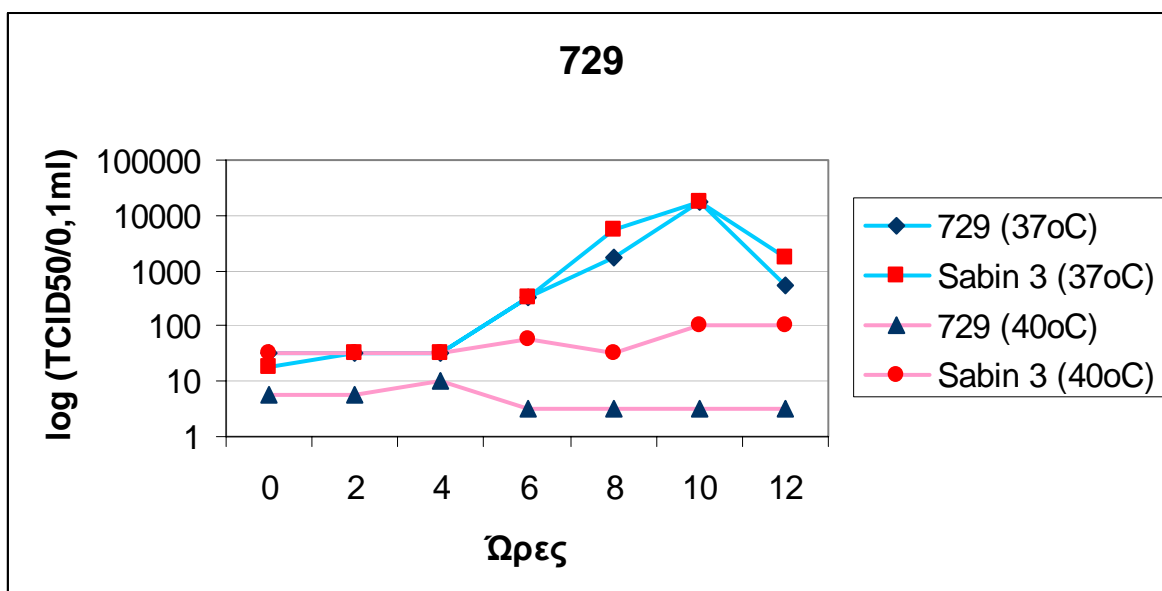
Παρατηρώντας το Διάγραμμα 1, βλέπουμε μια αύξηση του τίτλου του ιού αμφότερα για το δείγμα 742 και για το πρότυπο Sabin 1 μετά την τέταρτη ώρα στους 37°C, ενώ στους 40°C δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική μεταβολή του ικού τίτλου για κανένα από τα δύο δείγματα. Τα δύο ικά στελέχη εμφανίζουν παρόμοια κινητική ανάπτυξης και στις δύο θερμοκρασίες.



Διάγραμμα 2. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους II σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 1, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

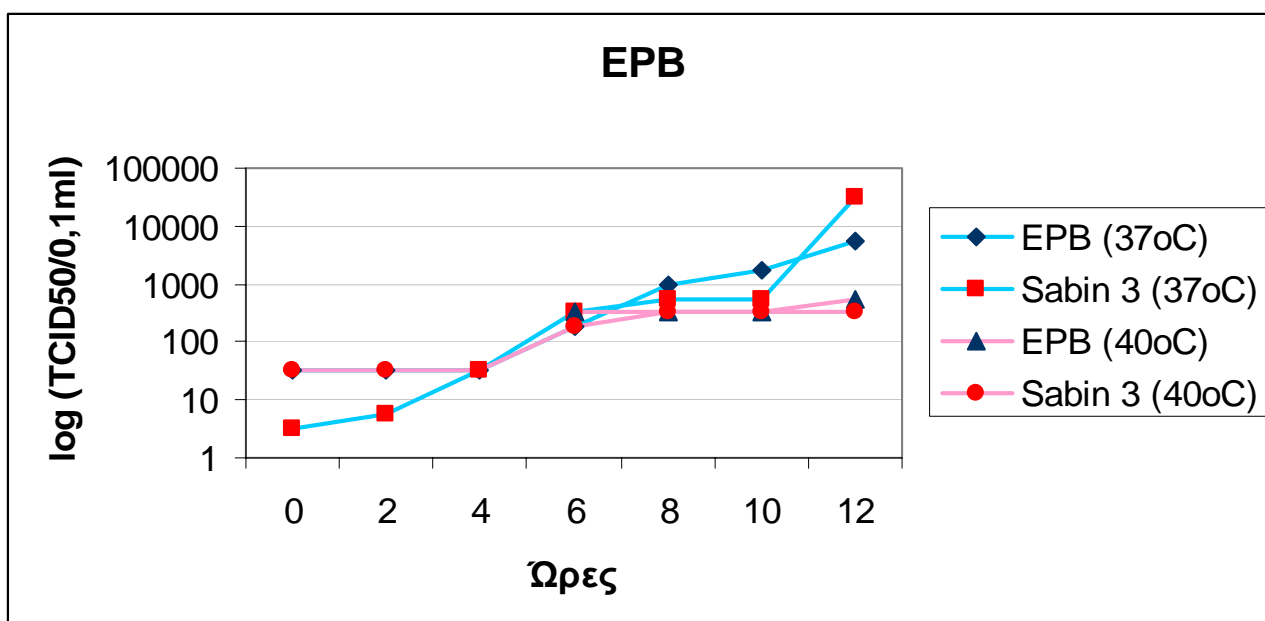
Στο Διάγραμμα 2, αντιλαμβανόμαστε διαρκείς αυξομειώσεις του τίτλου του ιού αμφότερα για το δείγμα II και για το πρότυπο Sabin 1 μετά τη δεύτερη ώρα στους 37°C, ενώ στους 40°C δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική μεταβολή του τίτλου. Τα δύο ικά στελέχη εμφανίζουν παρόμοια κινητική ανάπτυξης τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C.

Παρακάτω καταγράφονται και οι υπόλοιπες καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου για τα πολιοϊικά στελέχη 729, EPB, EPA, LK3, LK6 και LK10. Τα στελέχη αυτά προέρχονται από τον κοινό πρόγονο Sabin 3, με τον οποίο φέρουν κοινή 5'-NCR και συγκρίνονται με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3. Τα Hep2 κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, μολύνθηκαν με 10MOI και επώαστηκαν στους 37°C και στους 40°C. Στα παρακάτω διαγράμματα, φαίνεται η συνολική ική παραγωγή στις 0-12 ώρες.



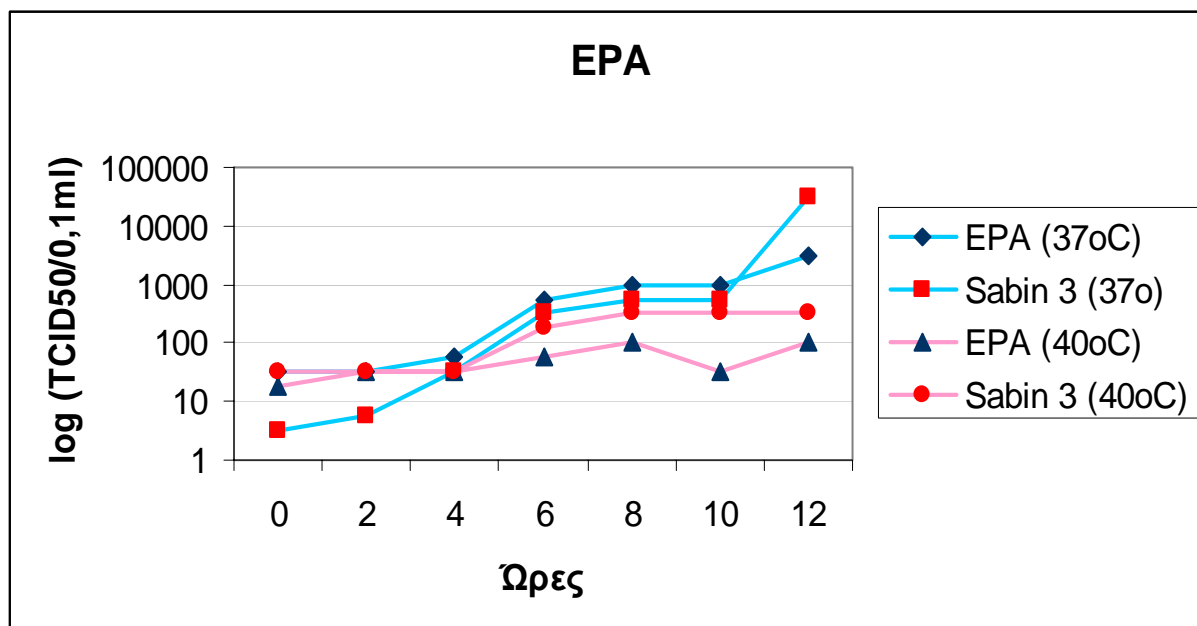
Διάγραμμα 3. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους 729 σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

Στο Διάγραμμα 3, είναι εμφανής μια αύξηση του τίτλου του ιού αμφότερα για το δείγμα 729 και για το πρότυπο Sabin 3 μετά την τέταρτη ώρα στους 37°C. Αντιθέτως στους 40°C δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική μεταβολή του τίτλου. Τα δύο ικά στελέχη εμφανίζουν παρόμοια κινητική ανάπτυξης τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C.



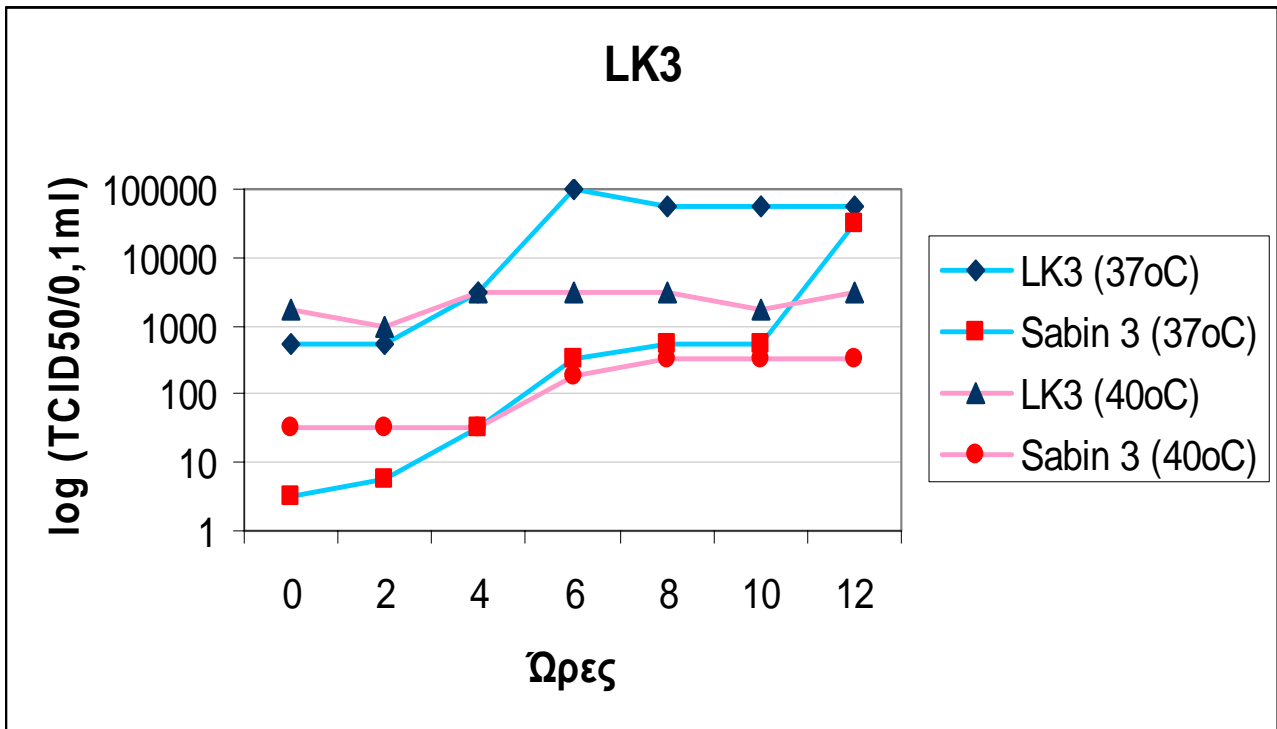
Διάγραμμα 4. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους EPB σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρουσιάζεται μια συνεχής αύξηση του τίτλου του ιού αμφότερα για το δείγμα EPB και για το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του μολυσματικού κύκλου στους 37°C. Επίσης στους 40°C είναι ορατή μια σημαντική αύξηση του τίτλου για το δείγμα EPB κατά τη διάρκεια της τέταρτης με έκτης ώρας και μια σταδιακή αύξησή του για το πρότυπο Sabin 3 μετά την τέταρτη ώρα. Τα δύο στελέχη εμφανίζουν παρόμοια κινητική ανάπτυξης τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C.



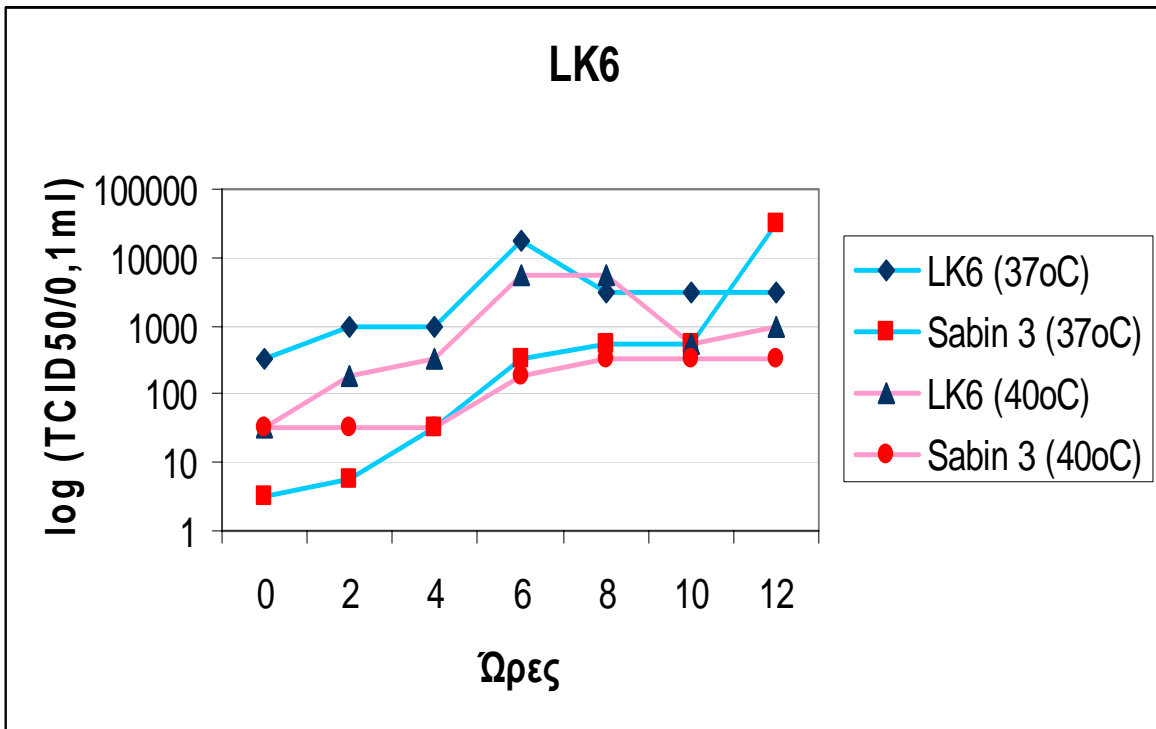
Διάγραμμα 5. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους EPA σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

Στο Διάγραμμα 5, είναι εμφανής μια συνεχής αύξηση του τίτλου του ιού αμφότερα για το δείγμα EPA και για το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του χρονικού μολυσματικού κύκλου στους 37°C. Στους 40°C είναι ορατή μια ελάχιστη αύξηση του τίτλου για το δείγμα EPA μετά τη δέκατη ώρα και μια αύξησή του για το πρότυπο Sabin 3 μετά την τέταρτη ώρα. Τα δύο στελέχη εμφανίζουν παρόμοια κινητική ανάπτυξης τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C, με ελαφρώς μεγαλύτερο τίτλο του δείγματος EPA στους 37°C.



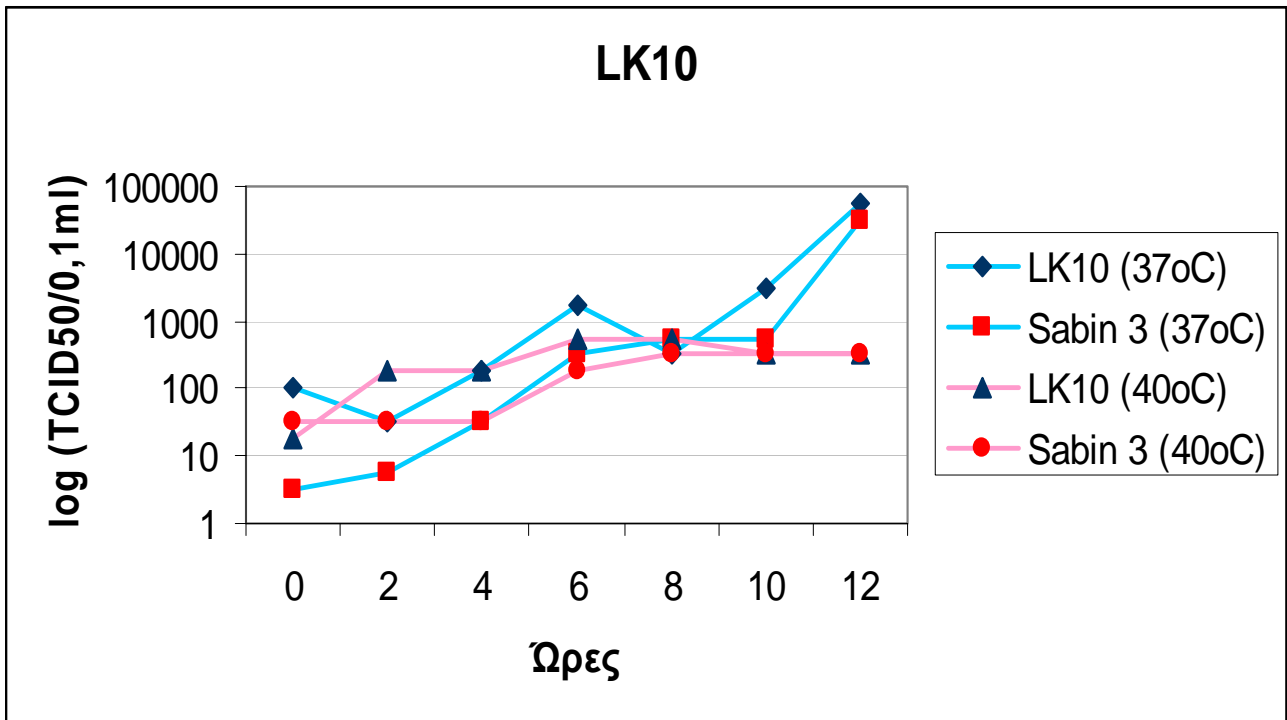
Διάγραμμα 6. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους LK3 σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

Στο έκτο διάγραμμα, παρουσιάζεται μια απότομη αύξηση του τίτλου του ιού για το δείγμα LK3 μεταξύ της δεύτερης και έκτης ώρας και μια συνεχής αύξηση για το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του μολυσματικού κύκλου στους 37°C. Στους 40°C δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική αύξηση του τίτλου για το δείγμα LK3, ενώ για το πρότυπο Sabin 3 παρατηρείται μια αύξησή του μετά την τέταρτη ώρα. Ο τίτλος του δείγματος LK3 είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν του προτύπου και για τις δύο θερμοκρασίες παρομοίως.



Διάγραμμα 7. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους LK6 σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

Στο παραπάνω διάγραμμα, εμφανίζεται μια αυξομείωση του τίτλου του ιού για το δείγμα LK6 μεταξύ της τέταρτης και όγδοης ώρας και μια συνεχής αύξηση για το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του μολυσματικού κύκλου στους 37°C. Στους 40°C παρατηρείται επίσης μια αυξομείωση του τίτλου του ιού για το δείγμα LK6 μεταξύ της τέταρτης και δέκατης ώρας και μια συνεχής αύξηση για το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του μολυσματικού κύκλου στους 40°C. Ο τίτλος του δείγματος LK6 είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν του προτύπου και για τις δύο θερμοκρασίες παρομοίως.



Διάγραμμα 8. Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους LK10 σε σύγκριση με το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3, στους 37°C και στους 40°C για 0-12 ώρες.

Στο δέκατο και τελευταίο διάγραμμα, παρατηρούνται συνεχώς αυξομειώσεις του τίτλου του ιού για το δείγμα LK10 και μια συνεχής αύξηση για το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του μολυσματικού κύκλου στους 37°C. Στους 40°C είναι ορατή μια αλλεπάλληλη αύξηση του τίτλου του ιού αμφότερα για το δείγμα LK10 και το πρότυπο Sabin 3 καθ' όλη την διάρκεια του μολυσματικού κύκλου στους 40°C. Ο τίτλος του δείγματος LK6 είναι μεγαλύτερος από αυτόν του προτύπου και για τις δύο θερμοκρασίες παρομοίως.

5. Συζήτηση

Βάσει των αποτελεσμάτων της χρήσης των προγραμμάτων BLAST και ClustalW, της RCT δοκιμής και των καμπυλών ανάπτυξης ενός σταδίου, μπορούμε να συσχετίσουμε τις διάφορες μεταλλάξεις και τους διπλούς ανασυνδυασμούς των ικών στελεχών με την αντιγραφική τους ικανότητα και τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο τους.

Για τα δείγματα 742 και II, τα οποία είναι γενοτύπου Sabin 1, παρατηρούνται δύο κοινές μεταλλάξεις στις θέσεις 583 της 5'-NCR και 2776 της κωδικής περιοχής της VP1 πρωτεΐνης. Ακόμα στο δείγμα 742 έχουμε και ένα διπλό ανασυνδυασμό που εμφανίζεται στην περιοχή 2A μεταξύ των προτύπων Sabin 1 και Sabin 3 στη θέση 3461-3465 και μεταξύ των προτύπων Sabin 3 και Sabin 2 στη θέση 4511-4527. Στα δύο στελέχη παρατηρείται μερική απώλεια θερμοευαισθησίας βάσει της RCT δοκιμής και μια ελάχιστη αύξηση του τίτλου του δείγματος 742 στους 40°C βάσει των καμπυλών ανάπτυξης ενός σταδίου. Επομένως οι μεταλλάξεις στις θέσεις αυτές των δύο στελεχών, οδηγούν στη μερική απώλεια της θερμοευαισθησίας των στελεχών και κυρίως του εμβολιοσυνδεόμενου πολιοϊού 742 στον οποίο εμφανίζεται και ο διπλός ανασυνδυασμός.

Για τα εμβολιοσυνδεόμενα δείγματα Sabin 3 γενοτύπου, παρατηρούμε κοινές μεταλλάξεις στην 5'-NCR στις θέσεις 472 και 586 για όλα τα δείγματα και στις θέσεις 438 και 439 μόνο μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10. Κοινές μεταλλάξεις εμφανίζονται και στην περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης VP1 στη θέση 2493 για όλα τα δείγματα και στις θέσεις 2637, 2790, 2855 και 2857 μόνο μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10. Επίσης στην περιοχή 3A εμφανίζεται μια κοινή μετάλλαξη στη θέση 5269 μεταξύ των δειγμάτων LK3 και LK10 και στην περιοχή 3C μια κοινή μεταβολή στη θέση 5641 μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10 και μια στη θέση 5769 μόνο μεταξύ των δειγμάτων LK3 και LK6. Τέλος στην περιοχή 3D παρουσιάζονται κοινές μεταλλάξεις στις θέσεις 6019, 6151 και 6203 μεταξύ των δειγμάτων LK3, LK6 και LK10 και μόνο μεταξύ των δειγμάτων LK3 και LK10 μεταβολές στις θέσεις 6732 και 6947. Οι μεταλλάξεις στη θέση 472 στην 5' αμετάφραστη περιοχή, στη θέση 2493 της περιοχής κωδικοποίησης της πρωτεΐνης VP1 και στη θέση 6203 της περιοχής κωδικοποίησης της πρωτεΐνης 3D, είναι από τις βασικότερες μεταλλάξεις αναστροφής της εξασθένησης των εμβολιακών στελεχών (Friedrich, 1996).

Ακόμα στα δείγματα EPA και EPB έχουμε διπλό ανασυνδυασμό στις θέσεις 4643-4656 της περιοχής 2C μεταξύ των δειγμάτων Sabin 3 και Sabin 2 και 6598-6605 της περιοχής 3D μεταξύ των δειγμάτων Sabin 2 και Sabin 3. Τέλος στο δείγμα LK3, έχουμε έναν διπλό ανασυνδυασμό στις θέσεις 4766-4791 της περιοχής 2C μεταξύ των δειγμάτων Sabin 3 και Sabin 2 και 4942-4958 της περιοχής 2C μεταξύ των δειγμάτων Sabin 2 και Sabin 1 και στα δείγματα LK6 και LK10 στις θέσεις 4793-4803 της περιοχής 2C μεταξύ των δειγμάτων Sabin 3 και Sabin 2 και 4942-4958 της

περιοχής 2C μεταξύ των δειγμάτων Sabin 2 και Sabin 1.

Δεν παρατηρείται απώλεια θερμοευαισθησίας βάσει της RCT δοκιμής στα δείγματα EPB και EPA, ενώ παρατηρείται μια μικρή αύξηση του τίτλου των δειγμάτων αυτών στους 40°C βάσει των καμπυλών ανάπτυξης ενός σταδίου, όμως ο τίτλος δεν ξεπερνάει αυτόν του προτύπου Sabin 3. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν πως οι παραπάνω μεταλλάξεις και ο διπλός ανασυνδυασμός δεν προκαλούν απώλεια της θερμοευαισθησίας για τα δείγματα EPB και EPA ούτε και κάποια ιδιαίτερη αύξηση της αντιγραφικής τους ικανότητας στους 40°C.

Τέλος όσον αφορά τα δείγματα LK3, LK6 και LK10 παρατηρείται απώλεια της θερμοευαισθησίας τους βάσει της RCT δοκιμής και μια αύξηση του τίτλου των δειγμάτων αυτών στους 40°C βάσει των καμπυλών ανάπτυξης ενός σταδίου καθώς και ο τίτλος των δειγμάτων αυτών στους 40°C είναι πολύ μεγαλύτερος του προτύπου Sabin 3. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων αντιλαμβανόμαστε ότι οι παραπάνω κοινές μεταλλάξεις των δύο στελεχών καθώς και οι διπλοί ανασυνδυασμοί, οδηγούν στην απώλεια της θερμοευαισθησίας τους και στην αύξηση της κινητικής του ανάπτυξης στους 40°C.

Το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 είναι σταθερότερο γενετικά από τα Sabin 2 and Sabin 3, λόγω των περισσότερων καθοριστών εξασθένησης και θερμοευαισθησίας που φέρει. Έτσι τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη που προέρχονται από τα πρότυπα Sabin 2 και Sabin3 απομονώνονται συχνότερα από τις περιπτώσεις VAPP από ότι από αυτά που προέρχονται από το πρότυπο Sabin 1. Η κύρια πηγή μολύνσεων από πολιοϊούς, έπειτα από τον συνεχόμενο πολυετή εμβολιασμό, είναι τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών. Έτσι μετά τον εμβολιασμό εμφανίζονται μεταλλάξεις σε κωδικές αλληλουχίες ή σημαντικά ρυθμιστικά στοιχεία στις μη κωδικές περιοχές, οι οποίες αποτελούν αναστροφή των μεταλλάξεων που αρχικά προκάλεσαν την εξασθένηση των πολιοϊών των OPV. Τέλος ο ανασυνδυασμός συμβάλει στην αποτελεσματική αποβολή των καθοριστών εξασθένησης των Sabin εμβολιακών στελεχών, αυξάνοντας έτσι την ιική νευρομολυσματικότητα (Bouchard et al., 1995, Kew et al., 2004, Georgescu et al., 1995).

6. Βιβλιογραφία

- Antero Airaksinen. The VP1 intracapsid hook and uncoating of enteroviruses. *University of Helsinki Faculty of Science Department of Biosciences Division of Biochemistry*, p.8-29, 2000.
- Bruno Blondel, Gillian Duncan, Therese Couderc, Francis Delpeyroux, Nicole Pavio and Florence Colbere-Garapin. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *Journal of NeuroVirology*, Vol.4, p.1-26, 1998.
- C. Christodoulou, F. Colbere-Garapin, A. Macadam, L. F. Taffs, S. Marsden, P. Minor and F. Horaud. Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *Journal of Virology*, p. 4922-4929, 1990.
- Cecile E. Manlou, Andreas Werner, Andrew M. Borman, Eric Westhof and Katherine M. Kean. Effects of vaccine strain mutations in domain V of the internal ribosome entry segment compared in the wild type poliovirus type 1 context. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.279.11, p. 10261-10269, 2004.
- Deborah Prevot, Ditier Decimo, Cecile H. Herbreteau, Florence Roux, Jerome Garin, Jean-Luc Darlix and Theophile Ohlmann. Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal*, Vol.22.8, p.1909-1921, 2003.
- Doryen Bubeck, David J Filman and James M Hogle. Cryo-electron microscopy reconstruction of a poliovirus-receptor-membrane complex. *Nat Struct Mol Biol*. Vol. 12. p.615–618, 2005
- Eckard Wimmer, Christopher U.T. Hellen and Xuemei Cao. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* Vol. 27, p.353-436, 1993.
- Evaggelos Dedepsidis, Vaia Pliaka, Zaharoula Kyriakopoulou, Christos Brakoulias, Stamatina Levidiotou-Stefanou, Anastassia Pratti, Zissis Mamuris and Panayotis Markoulatos. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *Immunology and medical microbiology*, Vol. 52.3, p. 343-351, 2008.
- F. Friedrich. Genomic modification in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccines. *Acta Virologica*, Vol.40, p. 157-170, 1996.
- F. Friedrich. Rare adverse events associated with oral poliovirus vaccine in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol.30.6, p. 695-703, 1997.

- He, Y., V. D. Bowman, S Mueller, C. M. Bator, J. Bella, X. Peng, T. S. Baker, E. Wimmer, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol.97, p.79-84, 2000.
- Kerstin Ochs, Lanja Saleh, Gergis Bassili, Volker H. Sonntag, Amandus Zeller and Michael Niepmann. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *Journal of Virology*, Vol.76.5, p.2113-2122, 2002.
- Li Xing, Karin Tjarnlund, Birgitta Lindqvist, Gerardo G. Kaplan, Dino Feigelstock, R. Holland Cheng and José M. Casasnovas. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *The EMBO Journal*, Vol.19, p.1207 – 1216, 2000.
- Licia Helena de Oliveira and Claudio Josi Struchiner. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Brazil, 1989-1995. *SciElo Public Health*, Vol.7.4, 2000.
- Marguerite Yin-Murphy and Jeffrey W. Almond. Picornaviruses. *Medical Microbiology 4th Edition*, 1996.
- Maria-Magnalena Georgescu, Maryse Tardy-Panit, Sophie Guillot, Radu Crainic and Francis Delpeyroux. Mapping of mutations contributing to the temperature sensitivity of the sabin 1 vaccine strain of poliovirus, *Journal of Virology* Vol.69,p.5278-5286, 1995.
- Mark Pallansch and Raymond Roos. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields Virology, 5th Edition*, p.839-894, 2007.
- Michael J. Bouchard, Du-Hung Lam and Vincent R. Racaniello. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *Journal of Virology*, p.4972-4978, 1995.
- Neeraj Makadiya. Consequences of genetic variation and selection in viruses. *Student Perspectives on Contemporary Virology*, Vol.1, 2007.
- Nidia H De Jesus. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Journal of Virology* Vol. 4.70, p. 1186-1743. 2007.
- Olen M. Kew, Peter F. Wright, Vadim I. Agol, Francis Delpeyroux, Hiroyuki Shimizu, Neal Nathanson and Mark A. Pallansch. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bulletin of the World Health Organization*, Vol.82.1, p. 16-23, 2004.
- Oreda Boussadia, Michael Niepmann, Laurent Creancier, Anne-Catherine Prats, Francois Dautry and Helene Jacquemin-Sablon. Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *Journal of Virology*, Vol.77.6, p. 3353-3359, 2002.
- Steffen Mueller, Eckard Wimmer and Jeronimo Cello. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of

- guts, brains, and an accidental event. *Virus Research*, Vol.111, p.175-193, 2005.
- T. Herremans, J. H. J. Reimerink, T. G. Kimman, H. G. A. M. Van Der Avoort and M. P. G. Koopmans. Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with oral live attenuated or inactivated poliovirus vaccine and after natural exposure. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, p.40-44. 2000.
 - Thomas Pfister, Caroline Mirzayan and Eckard Wimmer. Molecular Biology. *Academic Press Encyclopedia of Virology 2e*, Vol.3, p.1-22, 1999.
 - Vadim I. Agol. Recombination and other genomic rearrangements in picornaviruses, *Seminars in Virology*, Vol.8, p. 77-84, 1997.
 - Vincent R. Racaniello. Picornaviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*, 5th Edition, p.795-831, 2007.
 - Vincent Racaniello. Hantavirus protein replaces eIF4F. *Virology blog*, 2009.
 - Walter R. Dowdle, Esther De Gourville, Olen M. Kew, Mark A. Pallansch and David J. Wood. Polio eradication: the OPV paradox. *Reviews in Medical Virology*, Vol. 13, p. 277-291, 2003.
 - Xiaoyu Li, Hui-Hua Lu, Steffen Mueller and Eckard Wimmer. The C-terminal residues of poliovirus proteinase 2A^{PTO} are critical for viral RNA replication but not for cis- or trans-proteolytic cleavage. *Journal of General Virology*, Vol. 82, p.397-408, 2001.
 - <http://www.biol.vt.edu/faculty/lederman/biol4664/text/text78.html>
 - http://expasy.org/viralzone/all_by_species/97.html
 - <http://cmbi.bjmu.edu.cn/www-learn/micro-ac-uk/335/Picornaviruses.html>
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A2862&rendertype=figure&id=A2881>
 - <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5540a3.htm>. Vaccine-derived polioviruses. *Weekly Epidemiological Record*, Vol.55.40, p. 1903-1907, 2006.
 - <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/genet.htm>. Dr. Margaret Hunt. Virology chapter five. Viral genetics. *Microbiology and Immunology on line*.