

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΤΣΑΧΟΥΡΙΔΟΥ ΟΥΡΑΝΙΑ

«In vitro κατασκευή
ανασυνδυασμένων ιών μεταξύτων
εμβολιακών στελεχών S1, S2, S3 και
Εντεροϊών της ομάδας B.

ΛΑΡΙΣΑ 2016

«In vitro κατασκευή ανασυνδυασμένων ιών
μεταξύτων εμβολιακών στελεχών S1, S2, S3 και
Εντεροϊών της ομάδας B»

«In vitro construction of recombinant viruses between
S1, S2, S3 vaccine strains and Enteroviruses B group»

Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ. ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
& ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ.
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ
ΓΕΝΩΜΙΚΗ. ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Περίληψη

Οι ανθρώπινοι Εντεροϊοί είναι μέλη του γένους των Εντεροϊών που ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae. Το γονιδίωμά τους είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA που αποτελείται από ένα εξαιρετικά διατηρημένο 5'-UTR, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), ένα 3'-UTR και μια πολυ (A) - ουρά. Τα μέλη αυτού του γένους διαθέτουν ένα μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο που αποτελείται από τουλάχιστον 60 αντίγραφα τεσσάρων πολυπεπτιδίων VP1, VP2, VP3 και VP4.

Οι Picorna ιοί είναι υπεύθυνοι για μία ευρεία ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων. Μολύνουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, το μυοκάρδιο, τους σκελετικούς μύες, το πάγκρεας, το δέρμα και τους βλεννογόνους. Οι περισσότερες μολύνσεις από εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, αλλά ορισμένες από αυτές μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά από διακριτά κλινικά σύνδρομα που οδηγούν σε ασθένειες. Το γονιδίωμα των Εντεροϊών εξελίσσεται ραγδαία λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων και γεγονότων ανασυνδυασμού.

Τα τρία εξασθενημένα στελέχη Sabin χρησιμοποιούνται ως από του στόματος εμβόλια για την ανοσοποίηση έναντι της πολιομυελίτιδας σε πολλές χώρες. Η χαμηλή κάλυψη του εμβολίου επιτρέπει σε αυτά τα στελέχη να κυκλοφορούν μεταξύ των μη-ανοσοποιημένων ανθρώπων, τη συσσώρευση γενετικών τροποποιήσεων μέσω νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων, αλλά και τον ανασυνδυασμό με άλλους εντεροϊούς που δεν προκαλούν πολιομυελίτιδα. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να προκαλέσουν απώλεια της εξασθένησης των εμβολιακών στελεχών, και να οδηγήσουν στην ανάδειξη παθογόνων προερχόμενων από τα εμβόλια ιών της πολιομυελίτιδας, υπεύθυνων για κρούσματα πολιομυελίτιδας.

Σε μελέτες καλλιέργειας κυττάρων, χιμαιρικοί ιοί που περιέχουν τόσο Sabín όσο και άλλες ακολουθίες που δε σχετίζονται με την πολιομυελίτιδα, αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για την κατανόηση των περιορισμών που οδηγούν και περιορίζουν τα γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ των στελεχών Sabín και εντεροϊών της ομάδας Β και να κατανοήσουν τις συνέπειες για τις ιογενείς φαινοτυπικές ιδιότητες των γεγονότων ανασυνδυασμού.

Στην παρούσα μελέτη, έγινε μια προσπάθεια για την κατασκευή in vitro ανασυνδυασμών μεταξύ στελεχών του εμβολίου S1, S2, S3 και εντεροϊών της ομάδας Β. Η πειραματική διαδικασία συνίστατο στη μόλυνση των κυττάρων Rd με τα στελέχη του εμβολίου S1 ή S2 ή S3 και με Echo19 (εντεροϊό ομάδας Β). Πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός ειδικών εκκινητικών μορίων για S1, S2, S3 και για Echo19, και εφαρμογή των τεχνικών PCR, κλωνοποίησης και αλληλούχισης με σκοπό τον εντοπισμό των υποθετικών περιοχών ανασυνδυασμού.

Abstract

Human Enteroviruses are members of the Enteroviruses genus belonging to the Picornaviridae family. Their genome is a positive sense single-strand RNA which consists of a highly conserved 5'-UTR, an Open Reading Frame (ORF), a 3'-UTR and a poly(A)-tract. The members of this genus are characterized by their non-enveloped icosahedral capsid, which is made up to 60 copies of pentameric intermediates of 4 proteins: VP1, VP2, VP3 and VP4.

Picornaviridae are responsible for a wide variety of clinical symptoms infecting the central nervous system, myocardium, skeletal muscles, pancreas, skin and mucous membranes. Most enterovirus infections are asymptomatic, but some of them can cause a range of distinct clinical syndromes leading to diseases. Enteroviral genome evolves rapidly due to the accumulation of mutations and recombination events.

The three attenuated strains Sabin are used as oral vaccine to immunize against poliomyelitis in many countries. Low vaccine coverage allows these strains to circulate among non-immunized people, accumulating genetic modifications through nucleotide substitutions and recombination with non-polio enteroviruses. These modifications can induce a loss of attenuation, promoting the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses responsible for poliomyelitis outbreaks.

In cell culture studies chimeric viruses containing both Sabin and non-polio sequences constitute a powerful tool for understanding the constraints that drive and limit the recombination events between the Sabin strains and enteroviruses of group B, and to understand the consequences on the viral phenotypic properties of recombination events.

In the present study, an attempt was made to construct in vitro recombinants between vaccine strains S1, S2, S3 and Enteroviruses of group B. The experimental procedure consisted of the coinfection of Rd cells with the vaccine strains S1 or S2 or S3 with Echo19 (Enterovirus group B). Also, design of sequence specific primers for S1, S2, S3 and Echo19 respectively, and application of PCR techniques, cloning and sequencing in order to detect putative recombination sites.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 PICORNAVIRIDAE	8
1.1.1 Ταξινόμηση.....	8
1.1.2 Enteroviruses	9
1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	12
1.2.1 Δομή καψιδίου	12
1.2.2 Δομή του γονιδιώματος	14
1.2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF).....	17
1.2.5 3' Αμετάφραστη Περιοχή (3'UTR)	19
1.2.6 Η VPg πρωτεΐνη	20
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	21
1.3.1 Υποδοχείς πολιοϊών	22
1.3.2 Υποδοχείς Echo ιών	24
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	26
1.4.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.	28
1.4.2 Μετάφραση του ιικού RNA-πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης	30
1.4.3 Αντιγραφή του ιικού RNA.....	34
1.4.4 Συναρμολόγηση, ωρίμανση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματίων.	37
2.ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	40
2.1 ΕΚΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΛΟΙΜΩΣΗΣ.....	40
2.1.1 Μετάδοση	40
2.1.2 Συμπτώματα.....	42
2.1.3 Διάγνωση	45
2.2 ΠΡΟΛΗΨΗ	46
2.2.1 Παθητική ανοσοποίηση	46
2.2.2 Εμβόλιο	46
2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	49
3. ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	53
3.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	53
3.2 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	55
3.2.1 Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (ή αντιγραφικός μηχανισμός).....	56
3.2.2 Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (ή μη αντιγραφικός μηχανισμός)	58
4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	59
5. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	63
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	64
6.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	64
6.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ	64
6.2.1 Ενοφθαλμισμός δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες	64
6.2.2 Σειριακές αραιώσεις.....	65
6.2.3 Εκχύλιση ιικού RNA.....	66
6.2.4 Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων	66
6.2.5 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT).....	68
6.2.6 DOP-PCR.....	68

6.2.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	69
6.2.8 Auto-nested PCR.....	71
6.2.9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR	71
6.2.10 Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης	73
6.2.11 Μοριακή κλωνοποίηση	73
6.2.12 Αλληλούχιση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	75
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
7.1 Αποτελέσματα PCR	76
7.2 Αποτελέσματα αλληλούχισης	80
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 PICORNAVIRIDAE

1.1.1 Ταξινόμηση

Η οικογένεια Picornaviridae ανήκει στην τάξη των Picornavirales και σήμερα αποτελείται από 50 είδη που ομαδοποιούνται σε 29 γένη (Πίνακας 1). Η οικογένεια αυτή απαρτίζεται από μία μεγάλη ομάδα μικρών, μη-ελυτροφόρων, μονόκλωνων RNA – ιών θετικής πολικότητας μεγέθους 7100-7500bp. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη αναφορά της Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses-ICTV) οι Εντεροϊοί (Enteroviruses) αποτελούν ένα από τα εικοσιεννέα γένη της οικογένειας αυτής. Τα γένη αυτά είναι:

1. <i>Aphthovirus</i>	7. <i>Dicpivirus</i>	13. <i>Kobuvirus</i>	19. <i>Parechovirus</i>	25. <i>Sapelovirus</i>
2. <i>Aquamavirus</i>	8. <i>Enterovirus</i>	14. <i>Kunzavirus</i>	20. <i>Poliovirus</i>	26. <i>Senecavirus</i>
3. <i>Avihepatovirus</i>	9. <i>Erbivirus</i>	15. <i>Megavirus</i>	21. <i>Parvovirus</i>	27. <i>Sicivirus</i>
4. <i>Astrovirus</i>	10. <i>Gallivirus</i>	16. <i>Misavirus</i>	22. <i>Rosavirus</i>	28. <i>Tesovirus</i>
5. <i>Cardiovirus</i>	11. <i>Hepatitis virus</i>	17. <i>Mosavirus</i>	23. <i>Sakobuvirus</i>	29. <i>Tremovirus</i>
6. <i>Cosavirus</i>	12. <i>Hunnivirus</i>	18. <i>Oscivirus</i>	24. <i>Salivirus</i>	

Πίνακας 1: Ταξινόμηση Picornaviridae (Adams, et al. 2015).

Οι picorna ιοί είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Παρά το μικρό μέγεθός τους, η εξέλιξή τους οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού εύκολα διακριτών μελών, επωνομαζόμενων αντιγονικών οροτύπων. Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη που διακρίνονται με βάσει ομοιότητες στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, της γενωμικής αλληλουχίας, της οργάνωσης του γονιδιώματος αλλά και σε λοιπά στοιχεία όπως η ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και η επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός τους.

1.1.2 Enteroviruses

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί αποτελούνται από περισσότερους από 100 αντιγονικά διακριτούς ορότυπους, οι οποίοι με βάση τις ασθένειες που προκαλούν στους ανθρώπους αλλά και την παθογένειά τους στα πειραματόζωα κατηγοριοποιούνται σε 12 είδη. Από αυτά τα 3 είδη Rhinoviruses (A,B,C) και 4 από τους Enteroviruses παρουσιάζουν παθογένεια στον άνθρωπο (Πίνακας 2). Αυτοί είναι: οι Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), οι Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), οι Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και οι Echo ιοί (E, ορότυποι 1-33) (Knipe and Howley, et.al 2007). Υπάρχουν και άλλοι εντεροϊοί που δεν έχουν ταξινομηθεί σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισής τους (εντεροϊοί 68-71). Η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς τροποποιείται λόγω της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων.

Η κωδικοποιημένη από τους εντεροϊούς RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση δεν διαθέτει ικανότητα σωστής ανάγνωσης (proof-reading) επιτρέποντας έτσι τον υψηλό ρυθμό μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής των εντεροϊών (Knowles, et.al 2012). Επιπλέον, τα γονιδιώματα των Picornaviruses υπόκεινται σε συχνά γεγονότα ανασυνδυασμού (Mirand, et.al 2007, Oberste, et.al 2004), επιτρέποντας έτσι την ταχεία προσαρμογή σε θεραπευτικές ή/και ανοσολογικές επεμβάσεις. Οι περισσότερες λοιμώξεις από Εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, ωστόσο μερικές φορές μπορούν να προκαλέσουν ήπια έως σοβαρή νόσο όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα, μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα και πολιομυελίτιδα (Sawyer M, et.al 1999).

Enterovirus Species	Type
Human enterovirus A	Human coxsackievirus A2-8, 10, 12, 14, 16. Human enterovirus 71, 76, 89-92, 114, 119-121.
Human enterovirus B	Human coxsackievirus A-9, B1-6. Human echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33. Human enterovirus 69, 73-75, 77-88, 93, 97-101, 106, 107, 110-113.
Human enterovirus C	Human coxsackievirus A1, 11, 13, 17, 19-22, 24. Human poliovirus 1-3. Human enterovirus 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 116-118.
Human enterovirus D	Human enterovirus 68, 70, 94, 111, 120.
Rhinovirus A	Human rhinovirus A1, 2, 7-13, 15, 16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43, 45-47, 49-51, 53-68, 71, 73-76, 80-82, 85, 88-90, 94, 96, 100-109.
Rhinovirus B	Human rhinovirus B3-6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91-93, 97, 99, 100-106.
Rhinovirus C	Human rhinovirus C1-55.

Πίνακας 2: Ταξινόμηση ανθρώπινων Εντεροϊών και οι ορότυποί τους (ICTV-2015).

1.1.2.1 Polioviruses



Εικόνα 1: Poliovirus 1 (Hogle, et.al 2002).

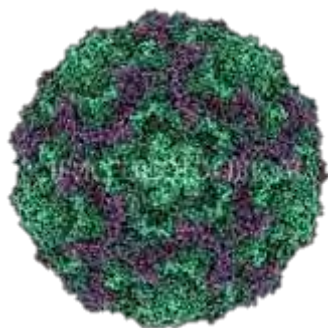
Οι πολιοϊοί (Εικόνα 1), δηλαδή ο αιτιολογικός παράγοντας της πολιομυελίτιδας (κοινώς γνωστοί ως polio), είναι RNA ιοί που κατατάσσονται στους ανθρώπινους εντεροϊούς της ομάδας C, και αποτελούν μέλη της οικογένειας Picornaviridae (Ryan, et.al 2004). Το γονιδίωμά τους είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας περίπου 7500 νουκλεοτιδίων (Hogle, et.al 2002). Λόγω του μικρού τους γονιδιώματος και της απλής σύνθεσής του (RNA γονιδίωμα που περιβάλλεται από ένα μη ελυτροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο), θεωρούνται ευρέως ως οι πιο απλοί αλλά και σημαντικοί ιοί (Goodsell DS, 1998).

Ο ιός της πολιομυελίτιδας απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1909 από τον Karl Landsteiner και τον Erwin Popper (Paul JR, 1971). Το 1981, το γονιδίωμα του ιού της πολιομυελίτιδας δόθηκε στη δημοσιότητα από δύο διαφορετικές ομάδες ερευνητών, από τους Vincent Racaniello και David Baltimore (Racaniello, Baltimore, 1981) και από τους Naomi Kitamura και Eckard Wimmer (Kitamura, Wimmer, 1981). Οι πολιοϊοί είναι από τους πιο καλά χαρακτηριζόμενους ιούς, και έχουν αποτελέσει ένα χρήσιμο πρότυπο σύστημα για την κατανόηση της βιολογίας των RNA ιών.

Οι πολιοϊοί είναι δομικά παρόμοιοι με άλλους ανθρώπινους εντεροϊούς (coxsackieviruses, echoviruses, rhinoviruses) και εμφανίζουν σχετικά υψηλό ρυθμό μετάλλαξης. Διαθέτουν τρεις ορότυπους, PV1, PV2, και PV3, καθένας με μια ελαφρώς διαφορετική πρωτεΐνη καψιδίου. Οι καψιδιακές πρωτεΐνες καθορίζουν την κυτταρική εξειδίκευση του υποδοχέα στον οποίο θα συνδεθεί ο ιός στο κύτταρο ξενιστή και την αντιγονικότητα του ιού. Η PV1 είναι η πιο κοινή μορφή που συναντάται στη φύση, ωστόσο και οι τρεις μορφές είναι εξαιρετικά μεταδοτικές.

Από το Νοέμβριο του 2015, το στέλεχος PV1 άγριου τύπου εντοπίζεται ιδιαίτερα σε περιοχές στο Πακιστάν και το Αφγανιστάν. Το στέλεχος άγριου τύπου PV2 κηρύχθηκε εξαλειφθέν το Σεπτέμβριο του 2015 μετά την τελευταία του εμφάνιση τον Οκτώβριο του 1999 στην Ινδία .

1.1.2.2 Echoviruses



Εικόνα 2: Echovirus 7
(sciencephoto.com)

Οι Echo ιοί (εντερικοί κυτταροπαθογόνοι ανθρώπινοι «ορφανοί» ιοί), είναι ένας τύπος RNA ιών που ανήκει στο είδος Εντεροϊών Β της οικογένειας Picornaviridae (Ryan, et.al 2004) και εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σωλήνα (ως εκ τούτου, αποτελούν μέρος του γένους των εντεροϊών) (Εικόνα 2). Ο όρος «ορφανοί ιοί» αναφέρεται σε ιούς που δε σχετίζονται με κάποια γνωστή ασθένεια. Παρ' όλο που έκτοτε οι Echo ιοι έχουν ταυτιστεί με ποικίλες ασθένειες, το αρχικό όνομα εξακολουθεί να χρησιμοποιείται (Yip-Murphy M, et.al 1996).

Η πλειοψηφία από τους 30 ορότυπους των Echo ιών απομονώθηκε τη δεκαετία του 1950 και 1960 από ένα φάσμα κλινικά προσβεβλημένων και ασυμπτωματικών ατόμων. Έκθεση στον ιό προκαλεί ευκαιριακές λοιμώξεις και ασθένειες, από ελαφριά εμπύρετη νόσο έως και σοβαρές, δυνητικά θανατηφόρες καταστάσεις (π.χ., άσηπτη μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, παράλυση, μυοκαρδίτιδα) (Khetsuriani, et.al 2005). Αυτό το φάσμα των παθογόνων εκδηλώσεων της ομάδας αντανακλά μια σειρά από τροπισμούς των ιστών που φαίνεται να διαμεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει, από χρησιμοποίηση μιας σειράς κυτταρικών υποδοχέων για την προσάρτηση του ιού και την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή.

Ο Echo 19 απομονώθηκε για πρώτη φορά από δείγμα κοπράνων ενός παιδιού που έπασχε από διάρροια το 1955 (Ramos-Alvarez M, et.al 1958) και αργότερα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) ενός άνδρα με άσηπτη μηνιγγίτιδα το 1959 (Faulkener, et.al 1960). Ωστόσο η εμφάνιση επιδημίας από τον Echo 19 μεταξύ βρεφών και παιδιών, παρατηρήθηκε στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του 1974 και 1975 (Bacon, et.al 1976).

1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.2.1 Δομή καψιδίου

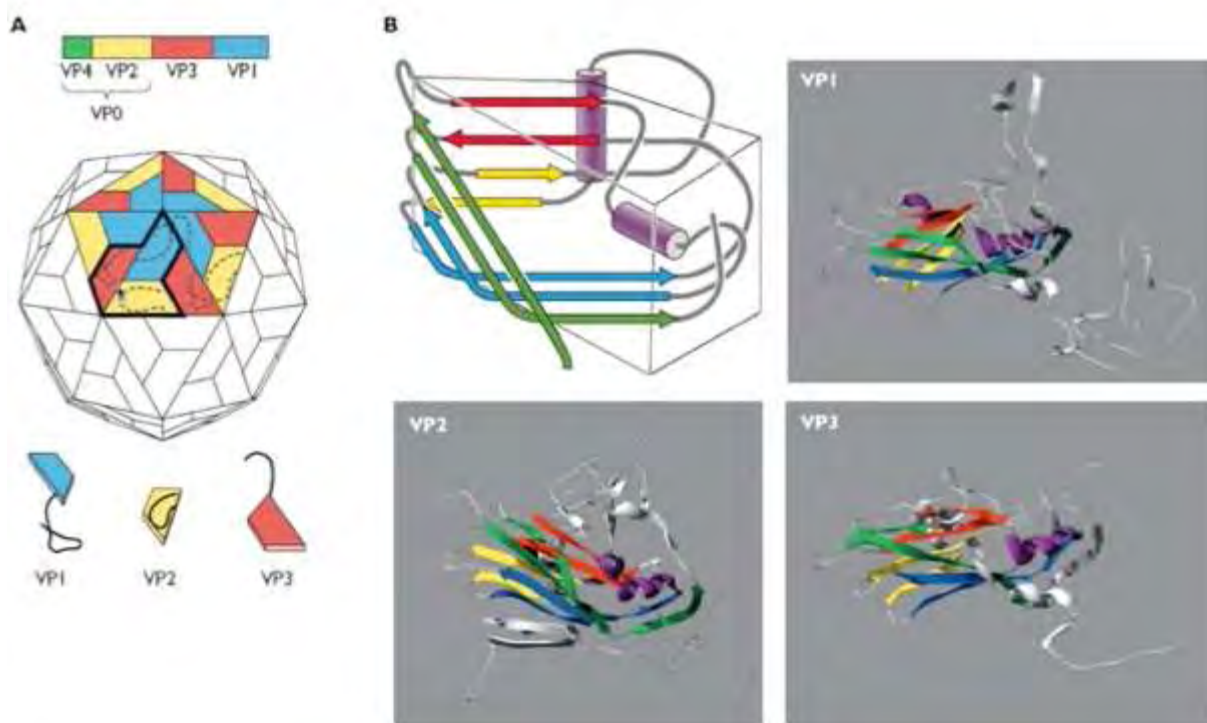
Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιβάλλεται από ένα σχετικά μικρό (30nm), μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο που αποτελείται από τουλάχιστον 60 αντίγραφα τεσσάρων πολυπεπτιδίων VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες προκύπτουν από πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Rueckert R.R., 1985). Η συγκρότηση του ώριμου καψιδίου γίνεται μέσω των ονομαζόμενων πρωτομερών, τα οποία απαρτίζονται από αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης, της VP0 στην οποία οι VP4 και VP2 είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες και αποτελούν τη βασική μονάδα του καψιδίου (Rossman, et.al 1989). Τα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και από την συσσωμάτωση των πρωτομερών τους σχηματίζονται τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)]₅. Τα πρωτομερή συνδυάζονται μεταξύ τους γύρω από τον πενταμερή (5X) άξονα συμμετρίας και δημιουργούν τα πενταμερή, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας (Pfister, et al. 1999). Δώδεκα από αυτά τα πενταμερή συναρμολογούνται για να σχηματίσουν το «προκαψίδιο» [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂.

Οι VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία αλληλουχική ομολογία, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Η περιοχή αυτή είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα (Hogle GM, 1985) (Wimmer, 1999). Η δομή αυτή διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο επαφών πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Το δίκτυο αυτό, που σχηματίζεται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4, είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου.

Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA «πακετάρεται» στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης». Η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 αποτελεί

το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του γενετικού υλικού στο καψίδιο και της σταθεροποίησης του ώριμου πλέον ιού. Οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 που είναι η μικρότερη από τις καψιδιακές πρωτεΐνες, βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (Racaniello, et.al 2007) (Εικόνα 3).

Το ώριμο ιικό σωματίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα και ανθεκτικότητα σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS, σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε όξινο pH (~3) (Pfister, et. al 1999). Το καψίδιο είναι απαραίτητο για τον ιό τόσο για την προστασία του RNA του, όσο και για την μεταφορά του από κύτταρο σε κύτταρο (Racaniello, et.al 2007).



Εικόνα 3: Ατομικό μοντέλο της δομής του ώριμου καψιδίου των εντεροϊών. α) Οι πρωτεΐνες VP1(μπλε), VP2(κίτρινο), VP3(κόκκινο), και VP4(πράσινο) που βρίσκεται εσωτερικά του καψιδίου, αποτελούν τα πρωτομερή που συνδυάζονται (5X) για να σχηματίσουν τα πενταμερή, που συνδυάζονται (12X) για να αποτελέσουν το καψίδιο. β) Τρισδιάστατα μοντέλα των 3 πολυπρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και σχηματισμός της δομής β-βαρελίου (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 3 page 96).

Ανάλυση των δομών των πολιοϊών έδειξε ότι η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλακώσεις (Rossman, et.al 2002). Μια προεξοχή (plateau), βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας ο οποίος περιβάλλεται από μια βαθιά «αυλάκωση» (canyon) που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας. Στα πλάγια της αυλάκωσης βρίσκονται τμήματα των VP1, VP2 και VP3 που εμπλέκονται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς των κυττάρων – ξενιστών. Το μέγεθος αυτής της αυλάκωσης είναι αρκετά μικρό ώστε να αποφεύγεται η προσκόλληση των ογκώδων αντισωμάτων. Στο εσωτερικό της «αυλάκωσης» υπάρχουν κατάλληλες περιοχές που μπορούν να ενωθούν με μικρά, συγκεκριμένα τμήματα που προεξέχουν από τους κυτταρικούς υποδοχείς, επιτρέποντας την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο – ξενιστή (Colston & Racaniello 1994). Επιπλέον, οι περιοχές αυτές λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς, διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών, από την άλλη όμως καθίστανται ευπαθείς στα αντισώματα. Ωστόσο, προστατεύονται από την άμυνα του ξενιστή, λόγω της θέσης τους στο εσωτερικό της αύλακας (Stanway G., 1990).

Αντίθετα, περιοχές του ιικού καψιδίου που έχουν μικρή λειτουργική σημασία για τον ιό, παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της αύλακας και λειτουργούν ως επίτοποι. Αν και οι επίτοποι αυτοί βρίσκονται σε σημεία ευπρόσιτα για τα αντισώματα, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί εξαιτίας της ευμεταβλητότητας των περιοχών αυτών, με αποτέλεσμα την εξέλιξη νέων οροτύπων.

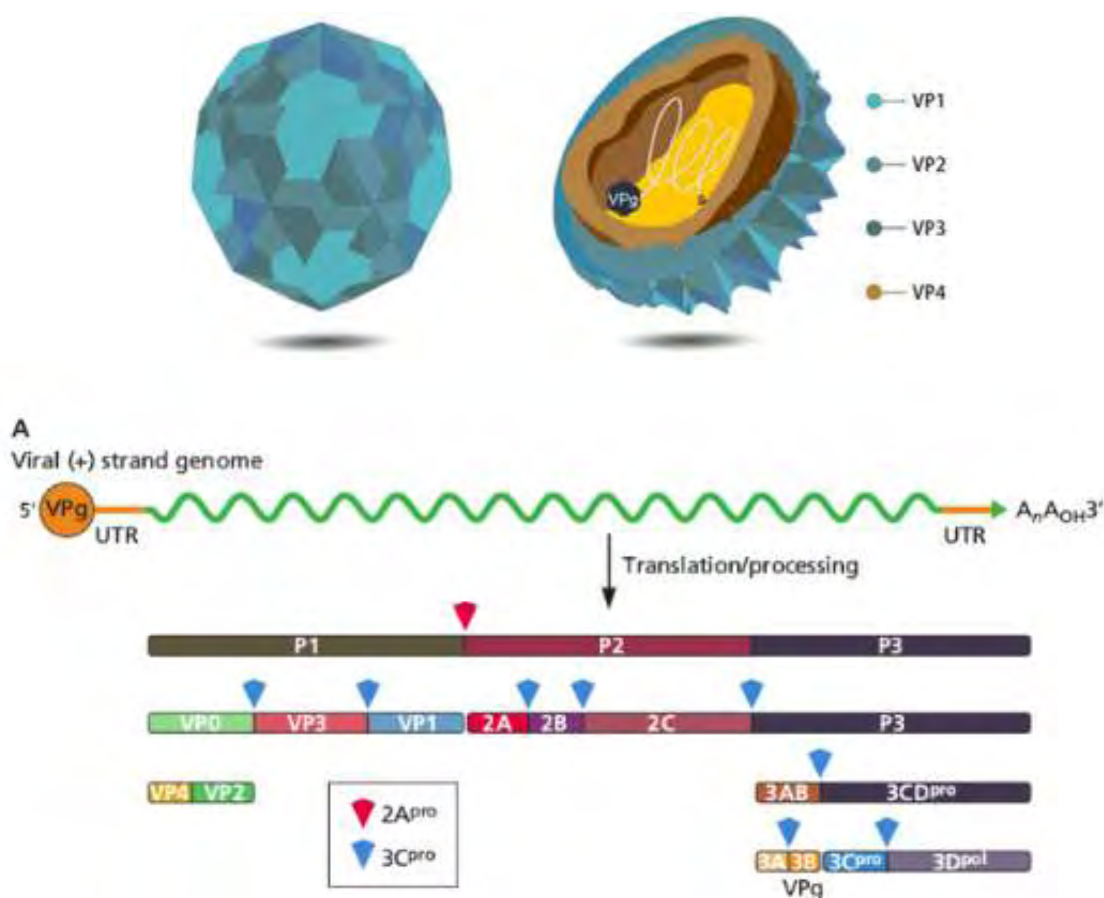
1.2.2 Δομή του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA περίπου 7400 νουκλεοτιδίων που εσωκλείεται μέσα στο καψίδιο. Το ιικό RNA είναι μολυσματικό καθώς μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο με σκοπό να παράγει όλες τις ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το ιικό γονιδίωμα περιέχει 5'- και 3'-αμετάφραστες περιοχές (UTRs) οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού RNA και το μεγάλο ενιαίο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί μια

πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa. Αυτή η πολυπρωτεΐνη υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από ικές πρωτεάσες για την παραγωγή δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών (Εικόνα 4).

Η 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR) που είναι πλούσια σε G+C έχει υψηλά διατηρημένες δομές σημαντικές για την έναρξη της αντιγραφής και της μετάφρασης, ενώ η 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) συνοδεύεται από την πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)-tract) 60 νουκλεοτιδίων η οποία διαδραματίζει έναν ρόλο στη σταθερότητα του RNA και την μολυσματικότητα του ιού (Stanway, et.al 1984).

Σήμερα, η αλληλουχία του γονιδιώματος όλων των Εντεροϊών είναι γνωστή και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο από τις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (Obestre, et.al 2004).



Εικόνα 4: Οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στο 5' άκρο της 5' UTR είναι προσδεσμένη η VPg πρωτεΐνη, κωδικοποιημένη από τον ίδιο τον ιό, και στο 3' άκρο της 3' UTR βρίσκεται η πολυ(Α) ουρά. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (Principles of Virology Vol I 2015 Chapter 11 page 365).

1.2.3 5'-Αμετάφραστη περιοχή (5'UTR)

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκάλυψε ότι οι 5'UTR είναι μακριές και υψηλά δομημένες περιοχές περίπου 750 νουκλεοτιδίων (8-12% του γενώματος). Αυτές οι μη-κωδικές περιοχές διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο καθώς περιέχουν αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του ιικού γενώματος, γεγονός που φαίνεται από την υψηλά διατηρημένη δομή τους, μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των Εντεροϊών.

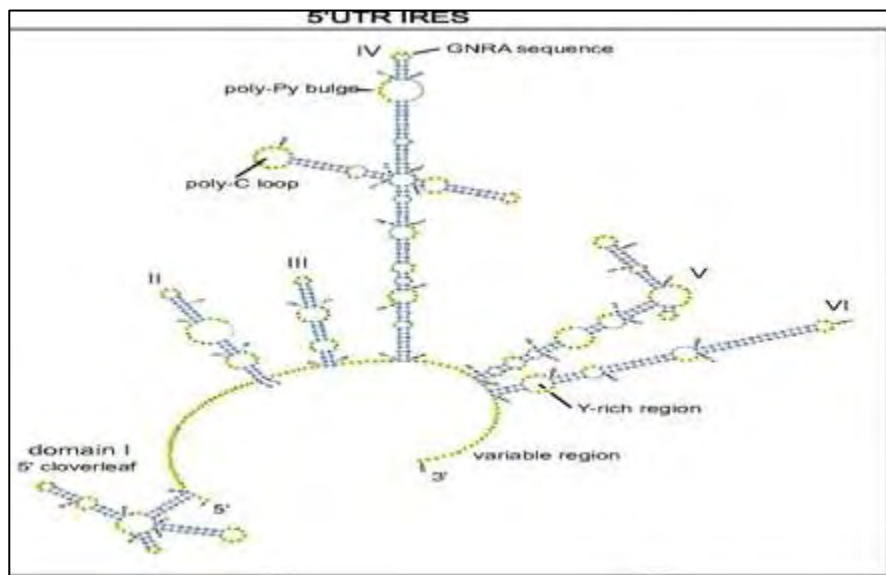
Μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών η 5'UTR παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων, καθώς περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων που διατηρούνται πλήρως ή μερικώς από είδος σε είδος (Stanway, et.al 1984). Το συγκεκριμένο γεγονός υποδηλώνει ότι η 5'UTR επηρεάζει την παθογένεια του ιού, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων αυτής της περιοχής. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες της 5'UTR εμπλέκονται στον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της 5'UTR των εντεροϊών είναι ότι έχει, σε κάποιο βαθμό, διαφορετική σύσταση νουκλεοτιδίων από το υπόλοιπο γένωμα. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια G-C, συγκριτικά με το υπόλοιπο γονιδίωμα, υποδηλώνει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής που φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα του RNA (Stanway, et.al 1984).

Επιπλέον η 5' μη-κωδική περιοχή περιλαμβάνει 7 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VII) και χωρίζεται σε 3 περιοχές: στο cloverleaf (I), στην εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου IRES (Internal ribosome entry site) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI και κατευθύνει τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα (Racaniello V, 2007) και σε μια λιγότερο διατηρημένη αλληλουχία 154 νουκλεοτιδίων η οποία βρίσκεται μεταξύ της δομής IRES και του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Wimmer et al., 1993) (Εικόνα 5).

Η περιοχή cloverleaf αποτελεί μια δομή σχήματος τριφυλλιού η οποία είναι σημαντική για τη σταθερότητα του RNA και για την έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου (Melchers, et.al 2006). Το στοιχείο IRES είναι υπεύθυνο για τη μετάφραση και τη μολυσματικότητα του ιού (Kauder and Racaniello, 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες της μετάφρασης, αρχικά προσδένονται στο εσωτερικό του IRES και

στη συνέχεια μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης.



Εικόνα 5: Δευτεροταγής δομή της 5'UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES (Yozwiak, et.al 2010).

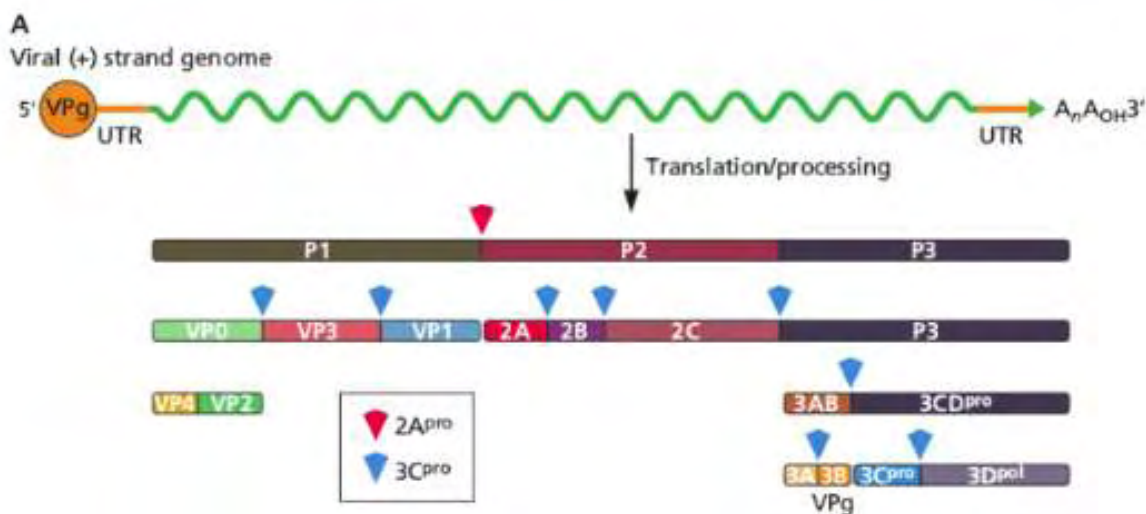
1.2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Βιοχημικές μελέτες σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (Summers DF, Maizel JV, 1968). Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF (Kitamura, et.al 1981, Racaniello, et.al 1981).

Το μονοκιστρονικό ιικό RNA, μετά την είσοδό του στο κύτταρο, υφίσταται μετάφραση και κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa, η οποία αποτελείται από 2 περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από το ιικό γένωμα για να αποδώσουν στο τέλος 11 με 12 τελικά προϊόντα.

Μετά από την πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) και οι λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και ενδιάμεσες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Racaniello 2007) (Εικόνα 6). Οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$, $3CD^{pro}$) και την αντιγραφή του γενώματος (2B, 2C, 3AB, $3B^{VPg}$, $3CD^{pro}$, $3D^{pol}$), κωδικοποιούνται από τις P2 και P3 μη δομικές περιοχές του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, ενώ η P1 περιοχή κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου.

Συγκριτικές μελέτες μεταξύ μη δομικών πρωτεϊνών από διάφορους *Picornia* ιούς έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες, αντικατοπτρίζοντας την έλλειψη εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών που προσβάλλονται από εντεροϊούς, προς τις πρωτεΐνες αυτές.



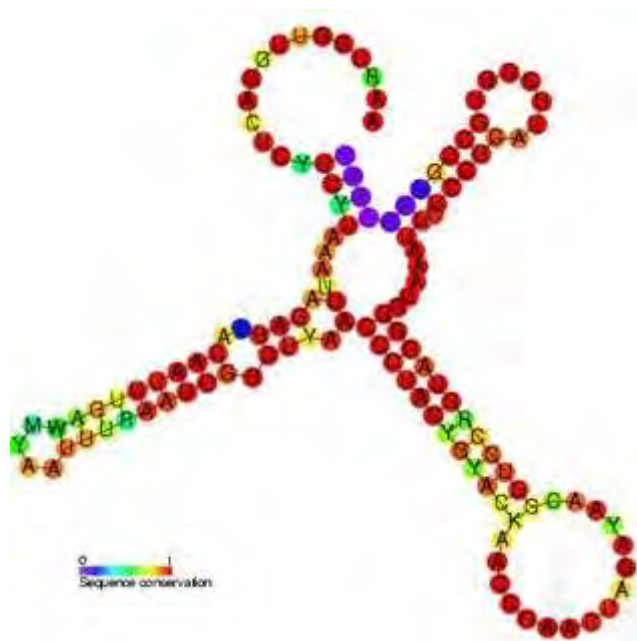
Εικόνα 6: Πρωτεόλυση της ικής πολυπρωτεΐνης. Η πρωτεάση $2A^{pro}$ κόβει και διαχωρίζει το P1 από το P2. Από το P1 παράγονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες VP0-VP4. Η πρωτεάση $3C^{pro}$ κόβει και διαχωρίζει τα προϊόντα της παραπάνω πρωτεόλυσης, τις λειτουργικές πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C, αλλά και το P3. Επιπλέον η $3C^{pro}$ διαχωρίζει το 3AB και $3CD^{pro}$ από όπου προκύπτουν η VPg και η $3D^{pol}$ (RNA πολυμεράση). Ποιά πρωτεάση οδηγεί στον τεμαχισμό της VP0 και σε παραγωγή των VP4 και VP2 παραμένει ακόμα άγνωστο (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 11 page 365).

1.2.5 3' Αμετάφραστη Περιοχή (3'UTR)

Η 3'UTR, που βρίσκεται στο 3' άκρο του γενώματος των *Picornia* ιών, είναι μικρή σε μέγεθος (~ 70 νουκλεοτίδια) μεταξύ των διαφορετικών εκπροσώπων της οικογένειας αυτής και φέρει μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA (Jacobson SJ, et.al 1993) (Εικόνα 7). Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων (Brown DM, et.al 2005).

Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste, et.al 2006). Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(A) ουρά του θετικού κλώνου (Yogo, et.al 1974). Το ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό (Spector DH, Baltimore D. 1974).

Η 3' UTR πέρα από το ρόλο της στην αντιγραφή του ιού, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη σταθερότητα του ιικού RNA, και τη μολυσματικότητά του (Rohll, et.al 1995). Επιπλέον η αλληλεπίδραση της 3' UTR με το IRES διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιικής μετάφρασης (Todd, et.al 1995).

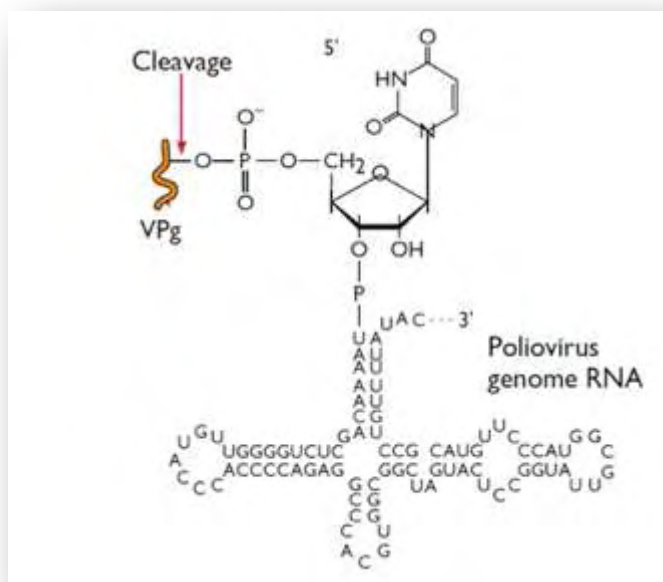


Εικόνα 7: Η δευτεροταγής δομή της 3'UTR, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA και η διατήρηση της αλληλουχίας της (Wang,et.al 1999).

1.2.6 Η VPg πρωτεΐνη

Η VPg πρωτεΐνη διαφορετικών picorna ιών ποικίλλει σε μέγεθος από 22-24 κατάλοιπα αμινοξέων και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιϊκό γονίδιο. Είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιϊκού RNA με δεσμό O_4 -(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης και πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο, ενώ δεν είναι απαραίτητη για την μόλυνση κυττάρων από τους εντεροϊούς (Εικόνα 8). Το mRNA των εντεροϊών διαφέρει από το ιϊκό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Τα ιϊκά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα δεν φέρουν τη VPg πρωτεΐνη, αλλά περιέχουν μόνο ουριδινο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους (Nomoto A., et.al 1977, Pettersson RF, et.al 1977).

Η αφαίρεση της VPg από το ιϊκό RNA καταλύεται από μια πρωτεΐνη του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού (Ambros V, et.al 1978). Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, γεγονός που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg χρησιμεύει σαν εκκινητικό μόριο κατά την ιϊκή αντιγραφή (Paul, et.al 1998) και λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου.



Εικόνα 8: Ομοιοπολική σύνδεση της VPg στο 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιϊκού RNA με φωσφοδιεστερικό δεσμό O_4 -(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 6 page 166).

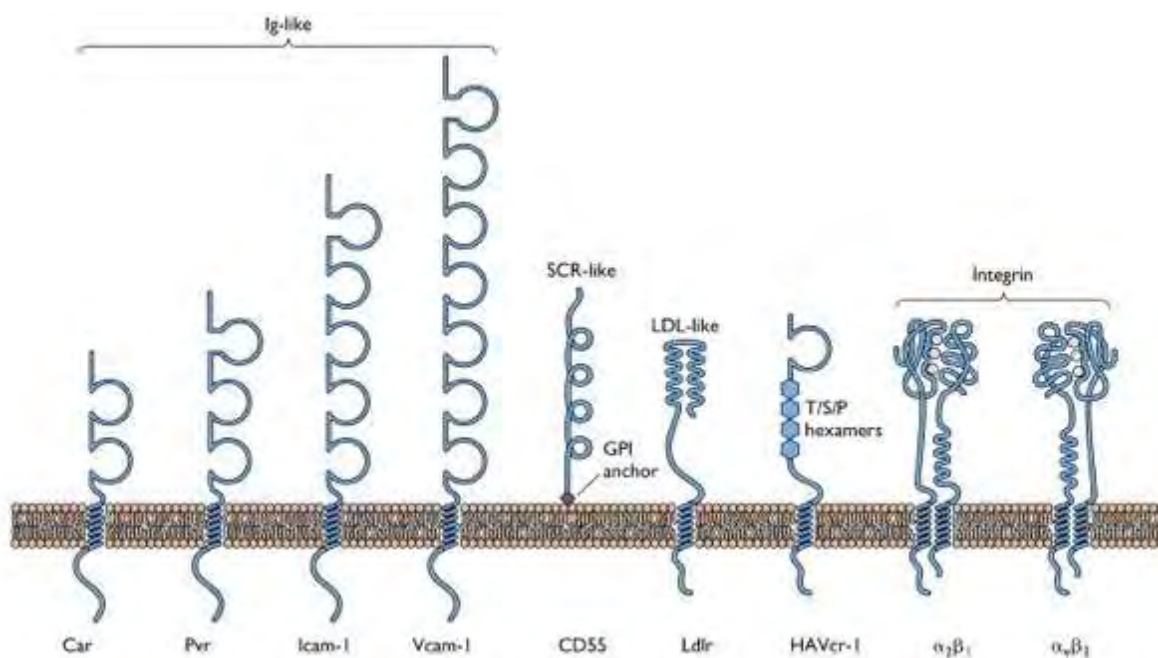
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων μέσω της προσκόλλησής τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Η είσοδος ενός ιού σε έναν οργανισμό αρχίζει με την προσκόλληση του ιού σε έναν ή περισσότερους εξειδικευμένους υποδοχείς. Οι υποδοχείς είναι μακριά μόρια που προεξέχουν από την εξωκυτταρική επιφάνεια και συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Οι ιοί έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά για να χρησιμοποιούν τους υποδοχείς του κυττάρου, ως σημεία εισόδου στο κυτταρικό περιβάλλον (Racaniello, et.al 2007). Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) (Mendelsohn CL, et.al 1989). Έτσι οι υποδοχείς αποτελούν τους σημαντικότερους και πιο καθοριστικούς παράγοντες της έναρξης της μόλυνσης από κάποιον ιό.

Πολλοί τύποι μορίων κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους *picorna* ιούς, και μερικοί μοιράζονται μεταξύ μελών άλλων οικογενειών (Εικόνα 9). Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει εν μέρει την παθογόνο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Με τις μεθόδους της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, της κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και της μοριακής βιολογίας έχουν ξεδιπλωθεί μερικοί από τους μηχανισμούς εισόδου των Εντεροϊών στο κύτταρο ξενιστή (Tuthill, et.al 2010).

Οι Εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου (Rossman, et.al 2002). Ωστόσο, υπάρχουν και υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται εξωτερικά της «αυλάκωσης» και δεν αποσταθεροποιούν το ιικό καψίδιο.

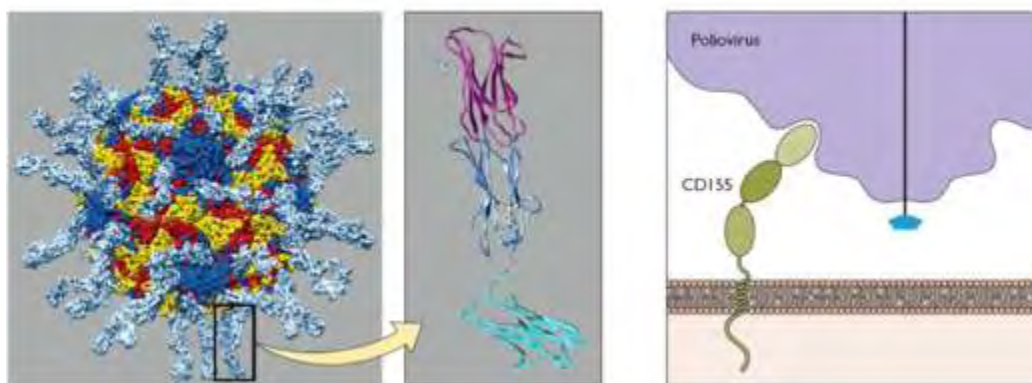
Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για τη είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα). Για παράδειγμα, πολλοί *echoviruses* χρησιμοποιούν ως συνυποδοχέα τους την μικροσφαιρίνη για την πιο γρήγορη είσοδό τους εντός του κυττάρου ενώ μερικοί από τους *Coxsackieviruses B* τις ιντεγκρίνες.



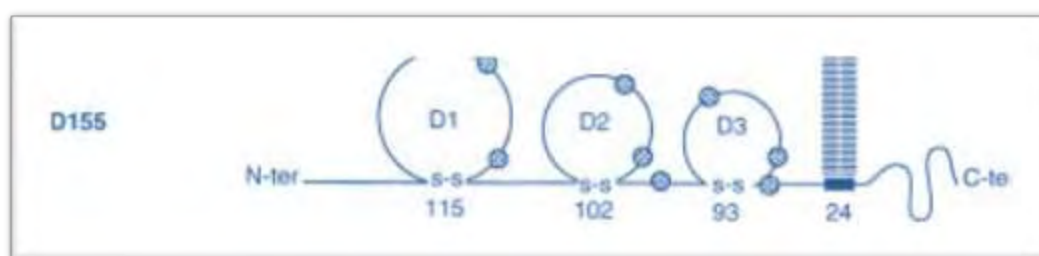
Εικόνα 9: Τύποι υποδοχών για τους ριcovη ιούς. Από τους πρώτους που ανακαλύφθηκαν ήταν ο PVR για τους πολιοϊούς και ο Icam-1 για τους ρινοϊούς που φέρουν εξωκυτταρικές επικράτειες ανοσοσφαιρίνης (Ig-like). Υποδοχείς που αγκυροβολούνται από μία GPI (γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινωσιτόλη) αλλά και διμερή όπως η ιντεγρίνη που λειτουργεί ως υποδοχέας (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 5 page 127).

1.3.1 Υποδοχείς πολιοϊών

Οι πολιοϊοί προσδένονται στον υποδοχέα CD155 (cluster of differentiation 155), ευρέως γνωστός ως PVR (υποδοχέας πολιοϊών), που είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Koike S, et.al 1990) (Εικόνα 10). Η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει 3 εξωκυτταρικές επικράτειες ανοσοσφαιρίνης (Ig-like) D1-D3 (Koike S, et.al 1991), (Racaniello V. 1992). Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή (D1), είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών (Εικόνα 11) (Zhang P, et.al 2008). Μοντέλα των συμπλόκων πολιοϊών-PVR που παρήχθησαν από δεδομένα κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι η πρώτη περιοχή έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ιού.



Εικόνα 10: Σύνδεση του υποδοχέα PVR (CD155) στην αύλακα (canyon) του πολιοϊού. Με ροζ απεικονίζεται το N-τελικό άκρο που προσδένεται στον πολιοϊό και με γαλάζιο το C-τελικό άκρο που συνδέεται στη μεμβράνη του κυττάρου. Με πράσινο απεικονίζονται οι D1, D2, D3 Ig-like περιοχές, με την D1 να φέρει τη θέση σύνδεσης με τον πολιοϊό (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 5 page 127).



Εικόνα 11: Δομή του υποδοχέα PVR (CD155) (Shaukat Kahn , et.al 2007)

Η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία του CD155 είναι η δημιουργία διακυτταρικών συνδέσμων μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων. Ο ρόλος του CD155 στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ασαφής , αν και μπορεί να συμμετέχει στις ανοσολογικές αποκρίσεις (Maier MK, et.al 2007). Αξίζει να σημειωθεί, πως αν και η κυτταρική λειτουργία του PVR είναι ακόμα άγνωστη, πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους.

Η δομή του εξωκυττάριου, τριών περιοχών υποδοχέα (CD155) του πολιοϊού, σε σύμπλοκο με τον ιό της πολιομυελίτιδας (ορότυπος 1) έχει καθοριστεί σε 22-Å με τη βοήθεια κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και τεχνικών ανασυγκρότησης τρισδιάστατης εικόνας.

Οι αύλακες στο καψίδιο των πολιοϊών είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι αύλακες αυτές είναι πάρα πολύ βαθιές ώστε να μην επιτρέψουν τη διείσδυση αντισωμάτων (Rossman MG, 1989). Αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστεύεται ότι κρύβει αμινοξέα, κρίσιμα για τη δέσμευση από το ανοσοποιητικό σύστημα του υποδοχέα. Μεταλλάξεις στα αμινοξέα που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς (Liao S, Racaniello V, 1997).

Ο CD155 προσδένεται στην αύλακα (canyon) του πολιοϊού αφήνοντας ένα αποτύπωμα παρόμοιο με εκείνο του μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης-1 που αποτελεί υποδοχέα των ανθρώπινων ρινοϊών (*Εικόνα 11*). Ωστόσο, ο προσανατολισμός του μακρού, και λεπτού μορίου CD155 σε σχέση με την επιφάνεια του πολιοϊού είναι αρκετά διαφορετικός από τον προσανατολισμό του μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης-1 επί των ρινοϊών. Επιπλέον, τα υποστρώματα που παρέχουν εξειδίκευση στην αναγνώριση διαφέρουν για τους δύο υποδοχείς. Το κύριο χαρακτηριστικό της κοινής δέσμευσης σε αυτούς τους δύο υποδοχείς *ricorna* ιών, είναι η περιοχή στην αύλακα (canyon) στην οποία συμβαίνει η πρόσδεση (Yongning He, et.al 2000).

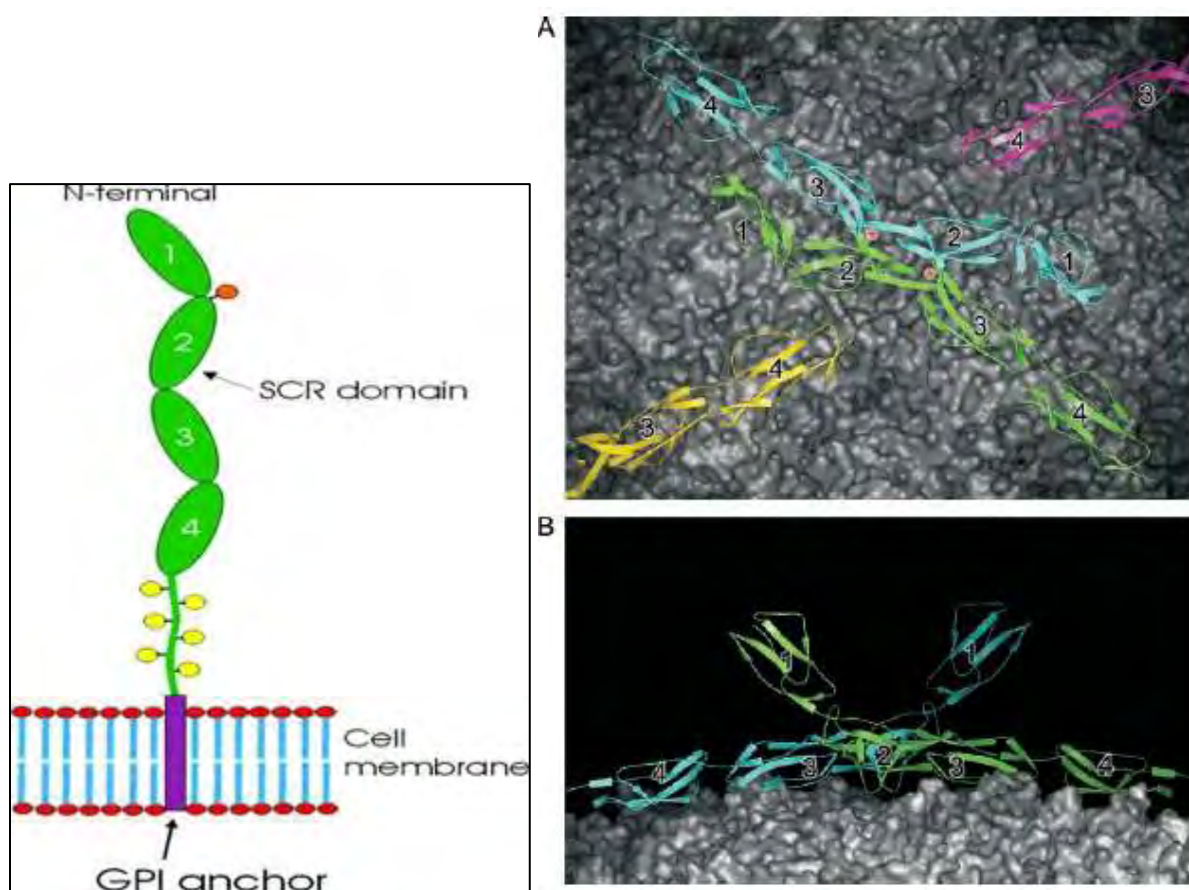
1.3.2 Υποδοχείς Echo ιών

Οι Echo ιοί 6,7,13,21,29 και 33 φαίνεται να προσδένονται στον CD55 παράγοντα επιτάχυνσης αποσύνθεσης (DAF) που είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης και βρίσκεται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων. Ρόλος του DAF είναι να προστατεύει τα κύτταρα του οργανισμού από επίθεση από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Bergelson, et.al 1994).

Η DAF είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος με την πρόσδεση και την επιτάχυνση της αποικοδόμησης των κονβερτασών, των κεντρικών ενζύμων ενίσχυσης του καταρράκτη του συμπληρώματος (Lublin & Atkinson, 1989). Η λειτουργική, εξωκυτταρική περιοχή της DAF αποτελείται από τέσσερις μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeats, SCR1, -2, -3, και -4), 60aa η κάθε μια, ακολουθούμενες από μια περιοχή 97aa O-γλυκοσυλιωμένη, πλούσια σε σερίνη και

θρεονίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη στην πλασματική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλιωμένης φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (Kuttner-Kondo, et.al 1996) (Εικόνα 12). Οι υπόλοιποι Echo ιοί παραμένουν μη χαρακτηρισμένοι σε σχέση με την ταυτότητα του κυτταρικού τους υποδοχέα.

Ανάλογα με τον ιό, τους υποδοχείς και το κύτταρο-ξενιστή, η αρχική σύνδεση στους υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση κινασών τυροσίνης ή άλλων κινασών, οι οποίες με τη σειρά τους, θα εκκινήσουν καταρράκτες αποκρίσεων στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Tagawa A, et.al 2005).



Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής της DAF (αριστερά). Με πράσινο δηλώνονται οι περιοχές SCR. Οι κίτρινες σφαίρες είναι Ο-συνδεόμενα και οι πορτοκαλί σφαίρες είναι Ν-συνδεόμενα τμήματα υδατανθράκων. Το GPI είναι η γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (Yongning, et.al 2002).

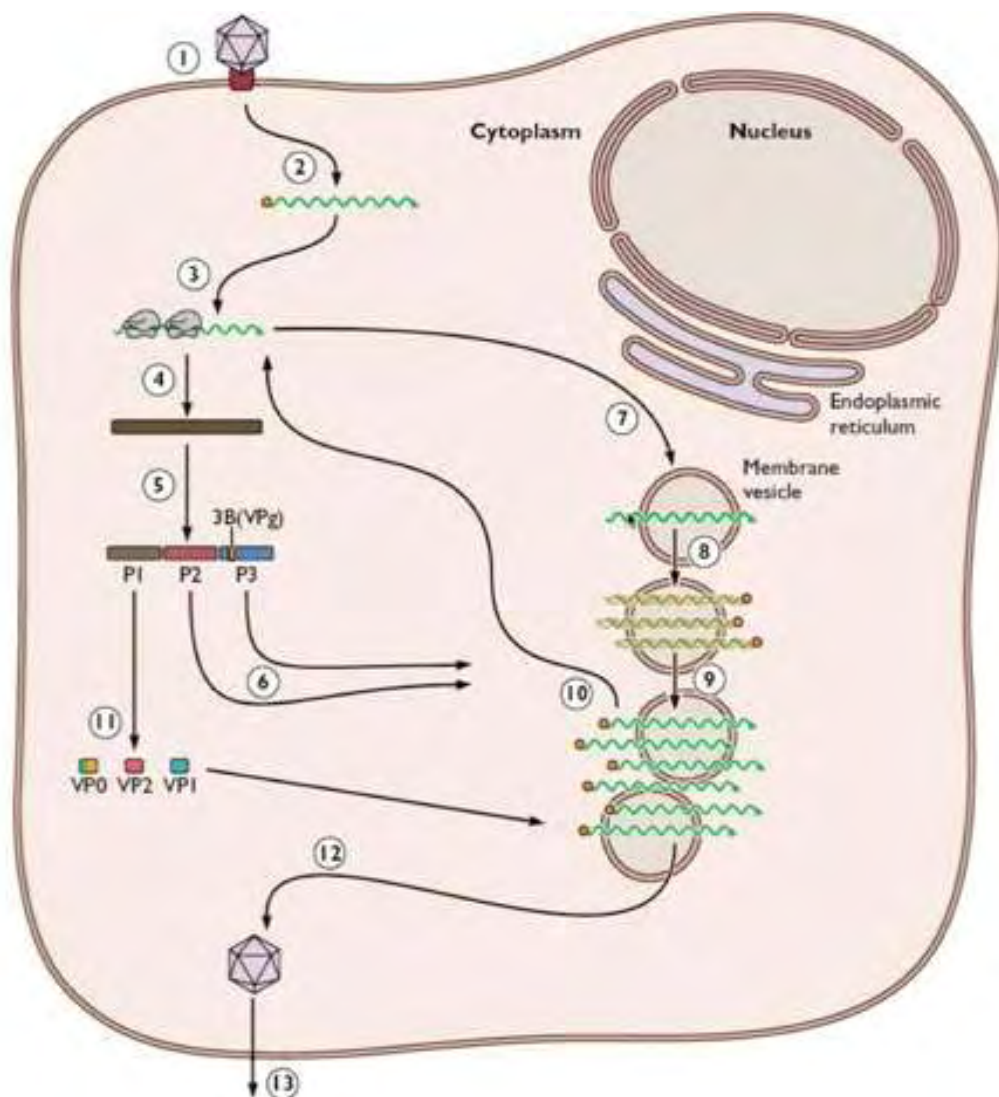
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής όλων των Εντεροϊών μπορεί να διακριθεί σε 13 στάδια (*Εικόνα 13*). Το πρώτο στάδιο είναι η προσκόλληση του ιού σε έναν κυτταρικό υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Οι υποδοχείς συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, και η συγκέντρωση αυτή οδηγεί στην πύκωση της κυτταρικής μεμβράνης γύρω από τον προσκολλημένο ιό και την είσοδό του μέσω ενδοκυττάρωσης στο εσωτερικό του ξενιστή.

Στη συνέχεια το RNA απεκδύεται, μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο, και το θετικής πολικότητας ιικό RNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Ακολούθως, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν οι ιικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γενώματος και για την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ιικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της κυρίως από δύο ιικές πρωτεΐνες: την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro}. Μεταξύ των πρωτεϊνών που συντίθενται είναι η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και βοηθητικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του γενώματος και τη σύνθεση του mRNA.

Το πρώτο βήμα της αντιγραφής του γενώματος είναι η αντιγραφή του θετικού RNA κλώνου κατά την οποία η ιική πολυμεράση συνθέτει αρχικά ένα συμπληρωματικό αρνητικής πολικότητας RNA κλώνο. Το βήμα αυτό ακολουθείται από την παραγωγή επιπρόσθετων θετικών κλώνων, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το νέο-συντιθέμενο RNA αρνητικής πολικότητας. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από αρκετές ιικές πρωτεΐνες. Όταν πλέον ο αριθμός των πρωτεϊνών του καψιδίου είναι αρκετός, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράγει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή, σχηματίζοντας τελικά το εικοσαεδρικό καψίδιο. Τα νέο-συντιθέμενα, θετικής πολικότητας RNA εισέρχονται στα καψίδια με τα πενταμερή και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό.

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες, κάτι που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστή και την πολυπλοκότητα της μόλυνσης (Racaniello V, et.al 2007).



Εικόνα 13: Κύκλος ζωής των Εντεροϊών σε 13 βήματα.

1. Σύνδεση του ιού στον κατάλληλο υποδοχέα του κυττάρου.
2. Απέκδυση και απελευθέρωση του ιικού RNA θετικής πολικότητας στο κυτταρόπλασμα.
3. Το ιικό RNA συνδέεται στο ριβόσωμα και μεταφράζεται.
- 4.,5. Παραγωγή της ιικής πολυπρωτεΐνης και πρωτεόλυσή της.
6. Οι λειτουργικές πρωτεΐνες που παράγονται οδηγούν σε έναρξη της αντιγραφής.
- 7.,8. Το RNA θετικής πολικότητας πακετάρεται σε μεμβρανικά κυστίδια, αντιγράφεται και συνθέτει ένα συμπληρωματικό αρνητικής πολικότητας RNA κλώνο.
9. Ακολουθεί παραγωγή επιπρόσθετων θετικών κλώνων, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το νέο-συντιθέμενο RNA αρνητικής πολικότητας.
10. Κάποιοι από τους νέο-συντιθέμενους κλώνους επαναλαμβάνουν την ίδια πορεία μετά το βήμα 3.
11. Κατά την πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης (βήμα 5) παράγονται και οι καψιδιακές πρωτεΐνες (VP0,VP1,VP2), που οδηγούν σε σχηματισμό του καψιδίου.
12. Τα νέο-συντιθέμενα, θετικής πολικότητας RNA εισέρχονται στα καψίδια και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό.
13. Ο ιός εξέρχεται από το κύτταρο, προκαλώντας λύση του κυττάρου (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 2 page 26).

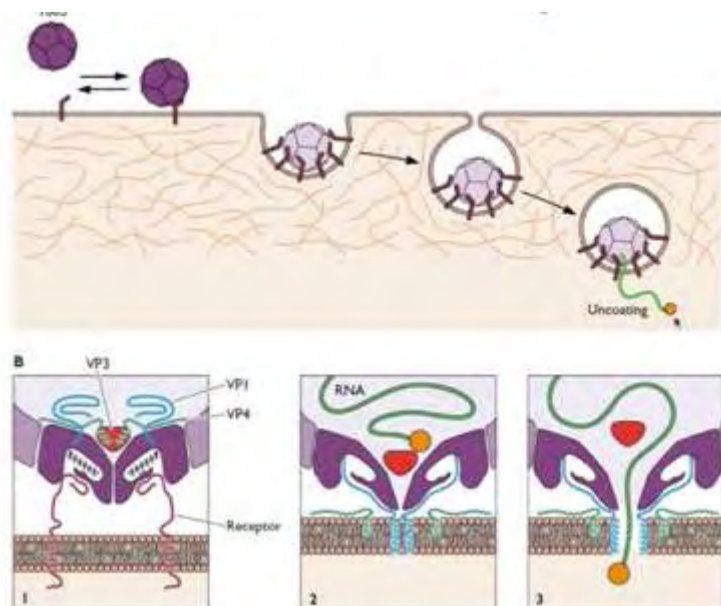
1.4.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων μέσω της προσκόλλησής τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή (Εικόνα 14). Χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Ωστόσο η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για τη είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα). Οι ιοί έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά για να χρησιμοποιούν τους υποδοχείς του κυττάρου, ως σημεία εισόδου στο κυτταρικό περιβάλλον. Συνήθως, στους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» (Rossmann, et.al 2002) . Οι ιοί που μόλις έχουν προσκολληθεί αρχικά είναι κατανεμημένοι σχετικά ομοιόμορφα στην κυτταρική επιφάνεια, έπειτα συγκεντρώνονται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες είναι επενδυμένες στην εσωτερική τους περιοχή με κλαθρίνη. Η συγκέντρωση αυτή των υποδοχέων στις συγκεκριμένες περιοχές, οδηγεί στην πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης γύρω από τον προσκολλημένο ιό και την είσοδό του μέσω ενδοκυττάρωσης στο εσωτερικό του ξενιστή, εντός αυτών των επενδυμένων με κλαθρίνη κυστιδίων.

Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του οδηγεί σε μείζονες δομικές αλλαγές του ιού. Τα επακόλουθα σωματίδια που ονομάζονται *altered* ή *σωμάτια Α*, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική πρωτεΐνη του καψιδίου VP4. Επιπροσθέτως, το N-άκρο της VP1, που συνήθως βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται πλέον στην επιφάνεια του σωματίου Α (Fricks CE, Hogle JM 1990). Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματίδια Α έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (με ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του πολιοϊού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση του πολιοϊού που οδηγούν στην απέκδυσή του επάγονται από τον PVR (Racaniello V, 2007).

Δεν είναι γνωστό εάν η VP4 που απελευθερώνεται από το ιικό καψίδιο εγκαταλείπει το κύτταρο ή συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου. Είναι όμως ξεκάθαρο ότι η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται στα αρχικά στάδια της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ένας ιός που φέρει μετάλλαξη στο 28^ο αμινοξύ της VP4 μπορεί να συνδεθεί σε κύτταρα και να μετατραπεί σε σωματίο A, αλλά μπλοκάρεται σε επακόλουθο στάδιο κατά την είσοδο του ιού (Moscufo N, et.al 1993).

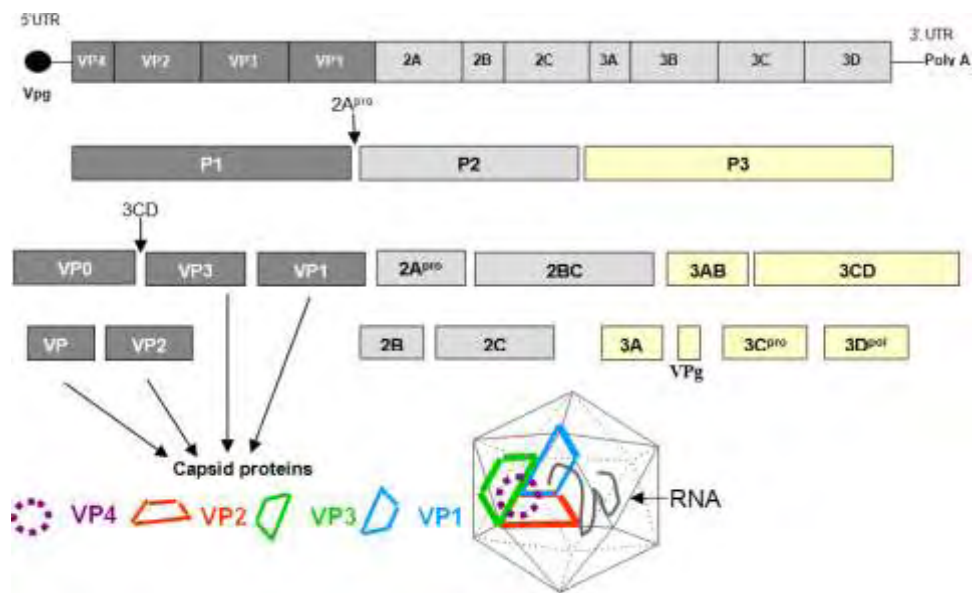
Αξίζει να σημειωθεί, πως πολλοί από τους ιούς χρησιμοποιούν συστήματα σηματοδότησης του κυττάρου-ξενιστή για την ενεργοποίηση σε συνυποδοχείς, την επαγωγή ενδοκυτταρικών αποκρίσεων αλλά και την επαγωγή ενδοκυτταρικών συνθηκών, ευνοϊκών για την μόλυνση. Η σηματοδότηση που ξεκινά στην κυτταρική μεμβράνη πιθανότατα μπορεί να συνεχίσει σε κυτταροπλασματικά οργανίδια (πχ ενδοσώματα) (Kew O, et.al 1993). Ανάλογα με τον ιό, τους υποδοχείς και το κύτταρο-ξενιστή, η αρχική σύνδεση στους υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση κινάσων τυροσίνης ή άλλων κινάσων, οι οποίες με τη σειρά τους, θα εκκινήσουν καταρράκτες αποκρίσεων στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Tagawa A, et.al 2005). Η επαγόμενη από τον ιό σηματοδότηση εξαρτάται από δεύτερους αγγελιοφόρους (φωσφατιδυλ-ινοσιτίδια, διακυλογλυκερίδια, και ασβέστιο), και άλλους ρυθμιστές της μεταφοράς διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 14: 1. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα 2. Αποσταθεροποίηση του καψιδίου και απομάκρυνση της σφιγγοσίνης (με μαυρο) που εντοπίζεται στη βάση της αύλακας, μέσα σε υδρόφοβα "πακέτα" (Racaniello V, 1996). 3. Οι υδρόφοβες VP1 και VP4 δημιουργούν πόρους στη μεμβράνη και έτσι απελευθερώνεται το RNA θετικής πολικότητας στο κυτταρόπλασμα (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 5 page 146).

1.4.2 Μετάφραση του ιικού RNA-πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης.

Κατά την είσοδο του ιού στο κυτταρόπλασμα, το θετικής πολικότητας RNA δρα ως mRNA, και καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση επειδή ο ιός δε μεταφέρει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο, είναι απαραίτητη η μετάφρασή του από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Η μετάφρασή του οδηγεί σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$), ώστε να παραχθούν οι δομικές και λειτουργικές ικές πρωτεΐνες (Εικόνα 15). Το θετικής πολικότητας RNA δε φέρει στο 5'- άκρο καλύπτρα και επομένως δεν αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα κατά τον ίδιο τρόπο, αλλά τροποποιείται με την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο (Baltimore D, 1980).

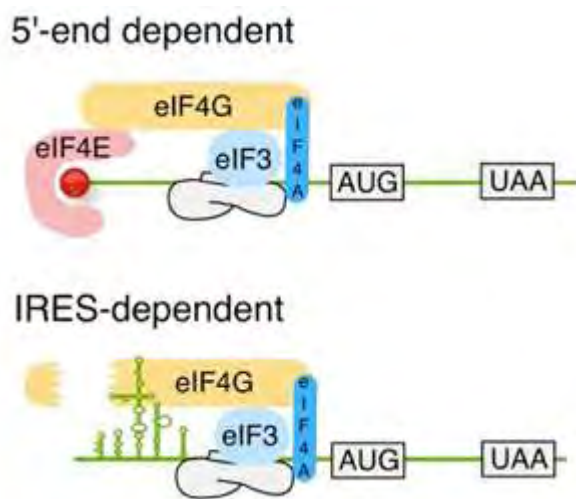


Εικόνα 15: Μετάφραση του RNA θετικής πολικότητας που οδηγεί σε μία πολυπρωτεΐνη. Απεικονίζονται και οι πρωτεάσες που συμμετέχουν, αλλά και τα σημεία όπου τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη (Hober, et.al 2010).

Η αλληλούχηση του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο που περιέχει επτά AUG κωδικόνια (Racaniello V, 1981), κάτι που αργότερα βρέθηκε και σε άλλους picornaviruses, δείχνοντας την ύπαρξη υψηλά

δομημένων RNA-δομών. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία.

Συγκεκριμένα τα ριβοσώματα χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμευσης στο 5'-άκρο (Internal Ribosome Entry Site – IRES), όπου προσδένεται η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος. IRES ανιχνεύει το κωδικόνιο έναρξης και ξεκινά η μετάφραση. Η 40S υπομονάδα μπορεί να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, ή στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με μεταφραστικές πρωτεΐνες έναρξης. Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από το IRES ενώ η διαδικασία της πρωτεόλυσης από εξειδικευμένες αμινοξικές αλληλουχίες που είναι δίπλα στα σημεία διάσπασης. Στην έναρξη της μετάφρασης των εντεροϊών εμπλέκονται οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης (eIFs) (Ochs, et.al 2002) (Εικόνα 16). Έτσι η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με τον eIF3 συνδεδεμένο στην C- τελική περιοχή του eIF4G, που συνδέεται απευθείας στο IRES. Εκτός από τους παράγοντες eIFs, στο στοιχείο IRES των εντεροϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν τη μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: (πάνω) Σχηματισμός συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης παρουσία καλύπτρας στο 5' άκρο (με κόκκινο). Ο παράγοντας eIF4E προσδένεται στην καλύπτρα στο 5' άκρο, σε αυτόν προσδένεται ο eIF4G και με τη σειρά του σε αυτόν προσδένεται ο eIF3. Το σύμπλοκο αυτό οδηγεί στη σύνδεση της 40S υπομονάδας του ριβοσώματος στο mRNA και ξεκινάει η μετάφραση. (κάτω) Απουσία καλύπτρας στο 5' άκρο και παρουσία του IRES ο παράγοντας eIF4G συνδέεται απευθείας στο IRES, ο eIF3 συνδέεται σε αυτόν και ομοίως ξεκινάει η μετάφραση (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 11 page 353).

Οι πρωτεΐνες των εντεροϊών που συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα, οδηγούν σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$), που κωδικοποιούνται από τον ιό έτσι ώστε να παραχθούν οι δομικές και λειτουργικές ικές πρωτεΐνες. Αυτό επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για τρεις πρωτεάσες: την L^{pro} , την $2A^{pro}$ και την $3C^{pro}$ ή $3CD^{pro}$ (Εικόνα 17).



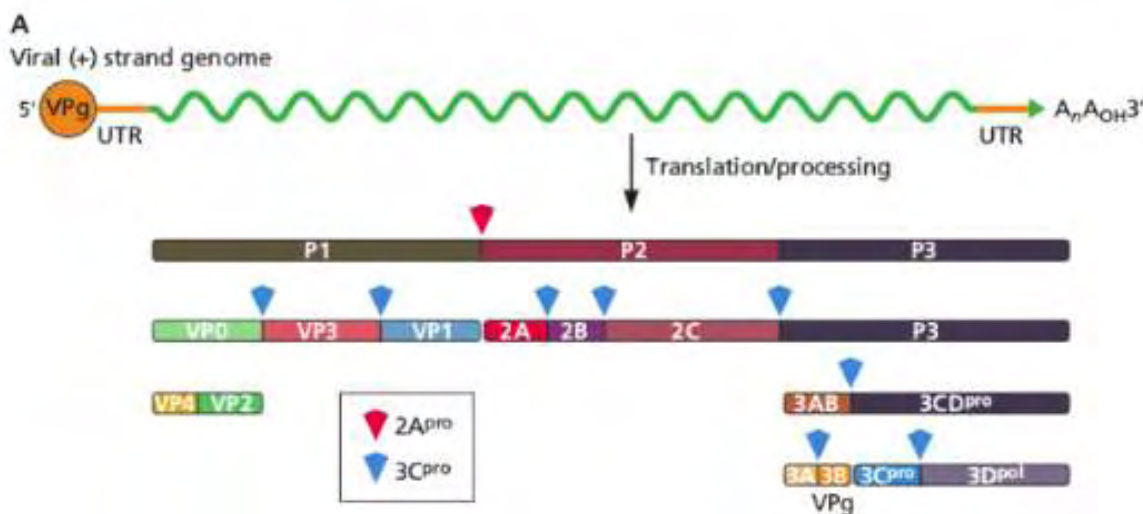
Εικόνα 17: 3D δομές των 3 ικών πρωτεασών (Pathak H, et.al 2007).

Ο αρχικός τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης μεταξύ P1 και P2 γίνεται από την $2A^{pro}$ (Εικόνα 18). Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες πρωτεολύονται από την $2A^{pro}$, όπως οι eIF4GI, eIF4GII και PABP. Στην πρόδρομη πρωτεΐνη των εντεροϊών, η θέση τεμαχισμού για την $2A^{pro}$ είναι μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Η $3C^{pro}$ είναι η πρωτεϊνάση που τεμαχίζει την περιοχή μεταξύ 2C και 3A. Σε αντίθεση με την $2A^{pro}$, η $3C^{pro}$ τεμαχίζει και σε δεύτερο στάδιο τα P1 και P2 πρόδρομα μόρια. Η $3C^{pro}$ των εντεροϊών τεμαχίζει μόνο διπεπτίδια Gln-Gly.

Τόσο η $3C^{pro}$ όσο και η $2A^{pro}$ είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με αυτό-τεμαχισμό. Αφού απελευθερωθούν οι πρωτεϊνάσες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Ο αρχικός τεμαχισμός στον καταρράκτη επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης ξεκινάει με την απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της $2A^{pro}$. Στη συνέχεια η $3CD^{pro}$ απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Η πρωτεϊνάση αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ικής RNA πολυμεράσης, κάνει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια

γλουταμινικού-γλυκίνης στον τύπου 1 πολιοϊό πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3C^{pro}. Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 3CD^{pro} επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα.

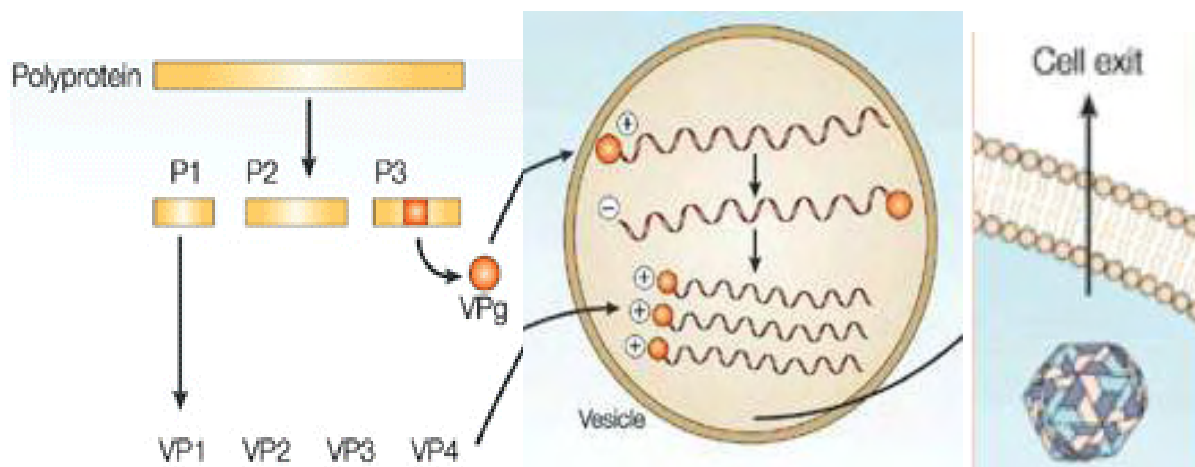
Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης in-trans από την 3CD^{pro}, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3D^{pol} αλληλουχία μέσα στην 3CD^{pro} απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστηκή επεξεργασία από το 3C^{pro} μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Η παρουσία πολλαπλών δράσεων σε μια μοναδική πρωτεΐνη δεν υπάρχει στις ευκαρυωτικές πρωτεϊνάσες και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ιικών γενωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί (Racaniello V. (2007)).



Εικόνα 18: Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης. Η πρωτεάση 2A^{pro} κόβει και διαχωρίζει το P1 από το P2. Από το P1 παράγονται οι καψιδιακές πρωτεΐνες VP0-VP4. Η πρωτεάση 3C^{pro} κόβει και διαχωρίζει τα προϊόντα της παραπάνω πρωτεόλυσης, τις λειτουργικές πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C, αλλά και το P3. Επιπλέον η 3C^{pro} διαχωρίζει το 3AB και 3CD^{pro} από όπου προκύπτουν η VPg και η 3D^{pol} (RNA πολυμεράση). Ποιά πρωτεάση οδηγεί στον τεμαχισμό της VP0 και σε παραγωγή των VP4 και VP2 παραμένει ακόμα άγνωστο (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 11 page 365).

1.4.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

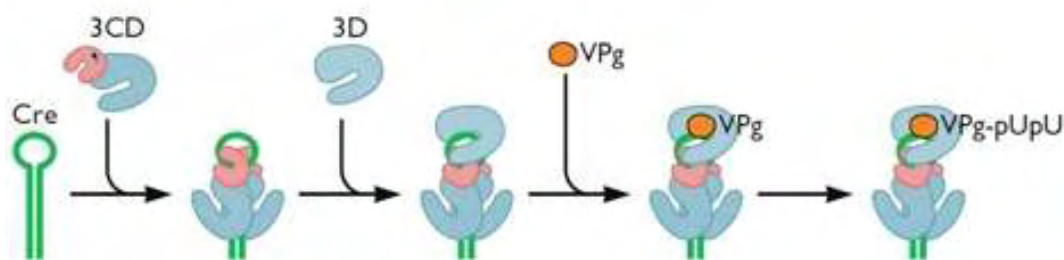
Μία μόλυνση με εντεροϊό οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών των μολυσμένων κυττάρων, έτσι το ΕΔ και το σύμπλεγμα Golgi καταστρέφονται και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης (Schlegel A, et.al 1996). Η σύνθεση του ιικού RNA γίνεται στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών και η αντιγραφή του μέσα στα μεμβρανικά αυτά κυστίδια, ο σχηματισμός των οποίων προάγεται από τις 2BC και 3C ιικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το RNA (+) θετικής πολικότητας, για την παραγωγή του RNA (-) αρνητικής πολικότητας (*Εικόνα 19*). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη και η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών. Η έναρξη της σύνθεσης του RNA από την 3D^{pol} απαιτεί την ουριδυλιωμένη VPg ιική πρωτεΐνη ως εκκινητή. Έτσι παράγεται ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF). Από τον αρνητικής πολικότητας κλώνο, συντήκονται πολλοί κλώνοι θετικής πολικότητας (Murray K. E and Barton D.J., 2003).



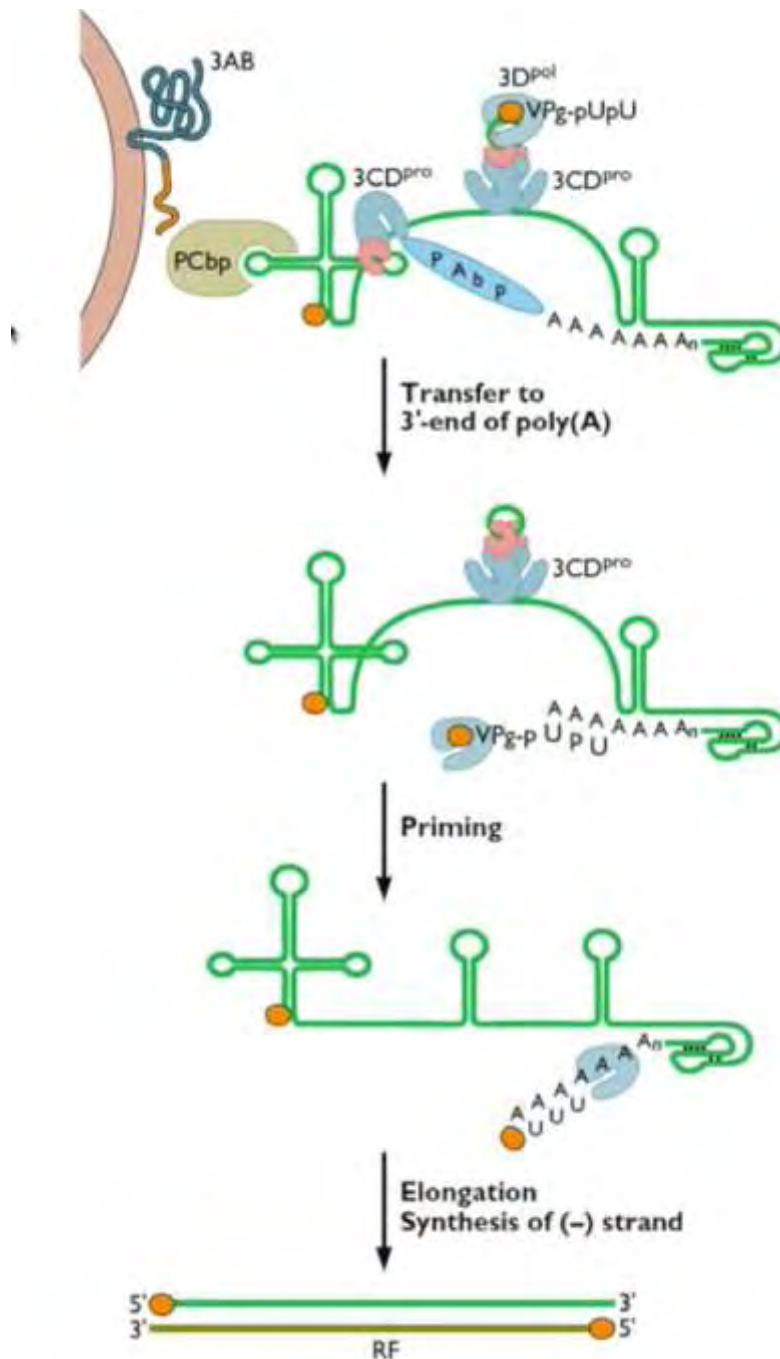
Εικόνα 19: Πρωτεόλυση της ιικής πρωτεΐνης, παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών (αριστερά). Αντιγραφή ιικού RNA μέσα σε μεμβρανικά κυστίδια, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το RNA (+) θετικής πολικότητας, για την παραγωγή του RNA (-) αρνητικής πολικότητας και παραγωγή νέο-συντιθέμενων RNA θετικής πολικότητας που θα αποτελέσουν τον μολυσματικό ιό (Minor,2004).

Η αντιγραφή του ιικού RNA οδηγεί στη σύνθεση του αρνητικού κλώνου και απαιτεί την κυκλοποίηση του γενώματος μέσω της δημιουργίας ενός συμπλόκου αντιγραφής στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3Dpol, 3CDpro, PCbp (Poly(A) Cellular Protein), PABp (Poly(A) Binding Protein) καθώς και οι δομές 5' cloverleaf και 3' UTR του ιικού γενώματος. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού (3D^{pol}) η οποία παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης 3CD^{pro}, που είναι άκρως δραστική ως πρωτεϊνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης.

Η 3D^{pol} είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η 3D^{pol} δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά και στο 5'-άκρο τον νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών (Rieder E, et.al 2000) (Εικόνα 20). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών (Barton DJ, 2003).



Εικόνα 20: Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg (Cre) και κατάλυση της έναρξης της αντιγραφής από τις 3CD, 3Dpol και VPg πρωτεΐνες (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 6 page 166).



Εικόνα 21: Διαδικασία αντιγραφής. Η VPg (με πορτοκαλί) είναι συνδεδεμένη με τη μεμβράνη των κυστιδίων (πάνω αριστερά) και αγκυροβολεί όλο το σύμπλοκο έναρξης της αντιγραφής. Η VPg ουριδιλώνεται από το Cre και ταυτόχρονα το ιικό RNA κυκλοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης της PAbp με την πολυ(A) ουρά στο 3' άκρο και το cloverleaf στο 5' άκρο. Η PCbp είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της PAbp με το 5' άκρο. Στη συνέχεια η VPg υβριδοποιείται στο 3' άκρο του κυκλικού RNA και λειτουργεί ως εκκινητής για την έναρξη της αντιγραφής. Τέλος παράγεται ένας κλώνος αρνητικής πολικότητας και από αυτόν πολλαπλοί κλώνοι θετικής πολικότητας (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 6 page 167).

Τουλάχιστον δύο ιικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA και δεσμεύει την 3D^{pol} και την 3CD^{pro}, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής (Echeverri AC, et.al 1995).

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή και των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει, τότε το RNA αντιγράφεται και τότε μεταφράζεται. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PCbp-βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) στην δομή αυτή επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CDpro συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει την μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA (Εικόνα 21). Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα (Andino R, 1998).

1.4.4 Συναρμολόγηση, ωρίμανση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματίων.

Στους εντεροϊούς η συναρμολόγηση των ιικών καψιδίων και ο εγκλεισμός του RNA (+) θετικής πολικότητας στο καψίδιο γίνεται στο κυτταρόπλασμα και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αντιγραφή του ιικού RNA (Gromeier, et.al 1996). Το στοιχείο IRES φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του RNA στο καψίδιο και η όλη διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η VPg πρωτεΐνη.

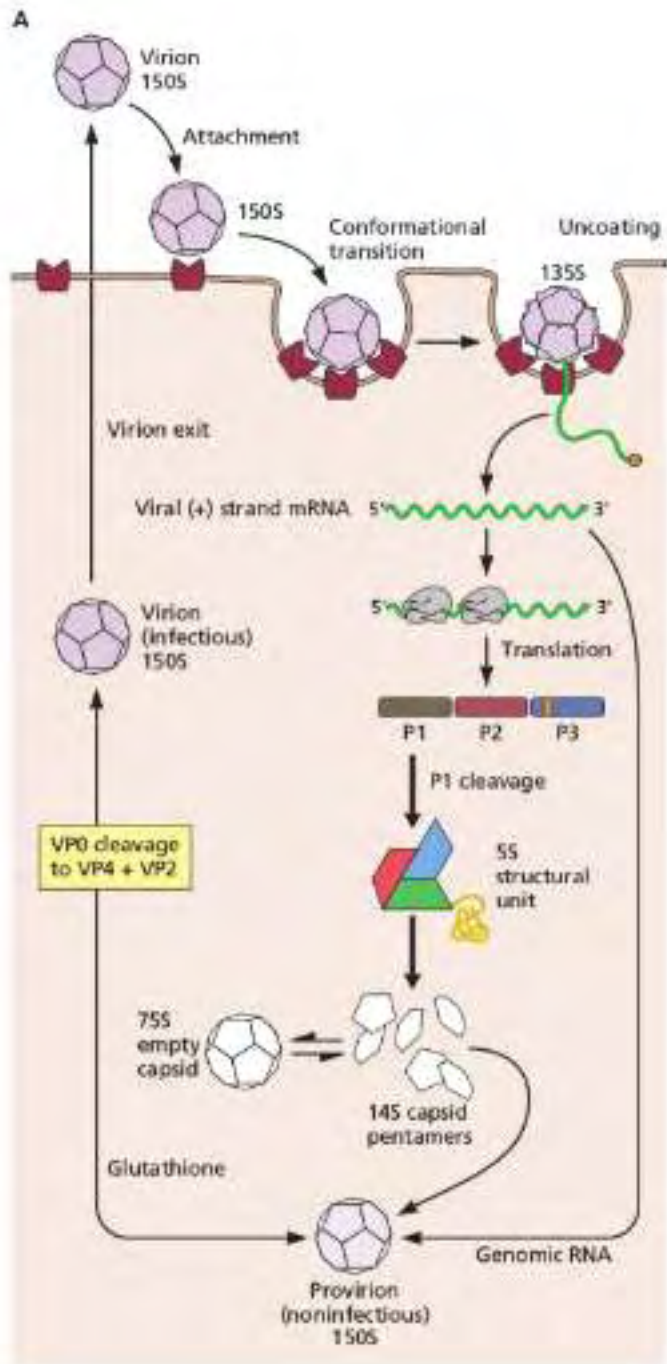
Το πρώτο στάδιο της συναρμολόγησης του ιικού καψιδίου περιλαμβάνει την απελευθέρωση της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης από την 2A πρωτεΐνη, διάσπασή της από την 3CDpro και τη δημιουργία ενός πρωτομερούς αποτελούμενο από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές

πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα πρωτομερή συναρμολογούνται σε πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)₅], που είναι απαραίτητα για την καψιδίωση του RNA των εντεροϊών. Δώδεκα πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)₅]₁₂ απαιτούνται για την κατασκευή ενός εικοσαεδρικού «προκαψιδίου» (Pfister, et.al 1999) (Εικόνα 22). Η διαδικασία καψιδίωσης του εντεροϊού είναι ειδική, καταλήγοντας στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι των ιικών mRNA, αρνητικών ιικών RNA ή οποιοδήποτε κυτταρικό RNA (Kirkegaard K, 1991). Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι η καψιδίωση του ιικού γονιδιώματος συνδέεται με τη σύνθεση του RNA, και θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί μόνο τα RNA που περιέχουν την VPg πρωτεΐνη καψιδιώνονται.

Την καψιδίωση του RNA ακολουθεί η αντίδραση ωρίμανσης του καψιδίου η οποία συμβαίνει με την αυτοκαταλυτική διάσπαση της πρωτεΐνης VP0 σε VP2 και VP4 και έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή του προ-ιού σε ένα ώριμο μολυσματικό ιικό σωματίο. Τέλος, τα νέα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται για να μολύνουν νέα κύτταρα (De Jesus NH, 2007)(Εικόνα 22).

Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με εντεροϊό, τα κύτταρα αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές, γνωστές και ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανώδων κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και τη σταδιακή αποικοδόμηση ολόκληρου του κυττάρου. Ακόμη, η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης των κυττάρων εμποδίζεται από την πρωτεάση 2A, η οποία προκαλεί ρήγμα σε έναν από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης του γενετικού υλικού (Hellen, et.al 1991) και συνεπώς, λόγω της αναστολής των διαδικασιών της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου – ξενιστή και λόγω του μεγάλου αριθμού των ιών που παράγονται ανά κύτταρο, ο ξενιστής τελικά καταστρέφεται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των ιών.

Σε πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των εντεροϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης (Tucker S.P, et.al 1993). Η αιτία των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων είναι άγνωστη. Μία υπόθεση είναι ότι η διαρροή των λυσοσωματικών περιεχομένων είναι εν μέρει υπεύθυνη (Guskey LE, et.al 1970).

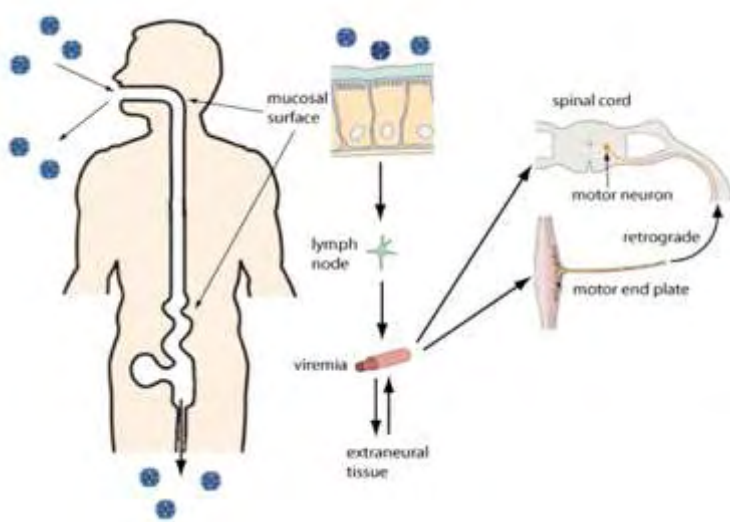


Εικόνα 22: Συναρμολόγηση νέων καψιδίων. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται σε VP0,VP3 και VP1 πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν το πρωτομερές 5S. Τα πρωτομερή αυτά σχηματίζουν τα πενταμερή 14S και αυτά με τη σειρά τους τα άδεια ιικά καψίδια 75S. Τέλος, το νεο-συντιθέμενο RNA θετικής πολικότητας εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2 και VP4 (άγνωστο πως) σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 150S ιοσωμάτιο το οποίο εξέρχεται από το κύτταρο μέσω λύσης άγνωστο (Principles of Virology Vol I, 2015 Chapter 13 page 426).

2.ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

2.1 ΕΚΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Σύμφωνα με το CDC (κέντρα ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων) η πολιομυελίτιδα, συχνά ονομαζόμενη και παιδική παράλυση, είναι μία οξεία ιογενής μολυσματική ασθένεια, δυνητικά θανατηφόρα που προκαλείται από τον ιό της πολιομυελίτιδας (poliovirus). Ο ιός μεταδίδεται από άτομο σε άτομο κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων και μπορεί να εισβάλει στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό ενός μολυσμένου ατόμου, προκαλώντας παράλυση (αδυναμία κίνησης διαφόρων περιοχών του σώματος) (Atkinson W, 2009) (Εικόνα 23). Ο όρος προέρχεται από τα ελληνικά «πολιός» που σημαίνει «γκρίζος», και μυελός, αναφερόμενος στο «νωτιαίο μυελό» και την κατάληξη «-ίτις» η οποία υποδηλώνει φλεγμονή.



Εικόνα 23: Είσοδος του πολιοϊού στον οργανισμό διαμέσου της στοματοφαρυγγικής και της εντερικής οδού. Εξάπλωσή του μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (viremia) και προσέγγιση των οργάνων στόχων (μύες, εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός) (Racaniello, 2005).

2.1.1 Μετάδοση

Η πολιομυελίτιδα είναι ιδιαίτερα μεταδοτική μέσω της στοματοφαρυγγικής και της εντερικής οδού. Είναι εποχιακή στα εύκρατα κλίματα, με τη μέγιστη μετάδοση να εμφανίζεται το καλοκαίρι και το φθινόπωρο (Kew O, et.al 2005). Αυτές οι εποχιακές διαφορές είναι πολύ λιγότερο έντονες σε τροπικές περιοχές (Parker SP, 1998). Ο χρόνος μεταξύ της πρώτης έκθεσης και των πρώτων συμπτωμάτων, γνωστός ως περίοδος επώασης, είναι συνήθως 6 έως 20

ημέρες, με μέγιστο εύρος 3 έως 35 ημέρες (Racaniello V, 2006). Τα ιικά μόρια εκκρίνονται στα κόπρανα για αρκετές εβδομάδες μετά από την αρχική μόλυνση. Ο ιός ζει στο λαιμό και τα έντερα ενός μολυσμένου ατόμου. Εισέρχεται στο σώμα από το στόμα και εξαπλώνεται μέσω της επαφής με τα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου και, αν και λιγότερο συχνά, μέσω σταγονιδίων από φτέρνισμα ή βήχα (Atkinson W, 2009). Η νόσος μεταδίδεται κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων, από την κατάποση μολυσμένων τροφίμων και ύδατος. Διαβιβάζεται περιστασιακά μέσω της στοματικής οδού, ένας τρόπος ιδιαίτερα ορατός στις περιοχές με καλές συνθήκες υγιεινής. Η πολιομυελίτιδα είναι πιο μολυσματική μεταξύ 7-10 ημέρες πριν και 7-10 ημέρες μετά από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, αλλά η μετάδοση είναι δυνατή εφ' όσον παραμένει ο ιός στο σάλιο ή τα περιττώματα (Ohri L, et.al 1999). Επίσης, μόλυνση από τον ιό μπορεί να προκληθεί μετά από επαφή του στόματος με αντικείμενα όπως τα παιχνίδια που έχουν μολυνθεί από κόπρανα.

Ένα μολυσμένο άτομο μπορεί να μεταδώσει τον ιό σε άλλους αμέσως πριν και περίπου 1-2 εβδομάδες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Ο ιός μπορεί να ζήσει στα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου για πολλές εβδομάδες και μπορεί να μολύνει τα τρόφιμα και το νερό κάτω από ανθυγιεινές συνθήκες (Kew O, et.al 2005).. Άνθρωποι που δεν έχουν συμπτώματα μπορούν επίσης να μεταδώσουν τον ιό σε άλλους, οι οποίοι και θα νοσήσουν.

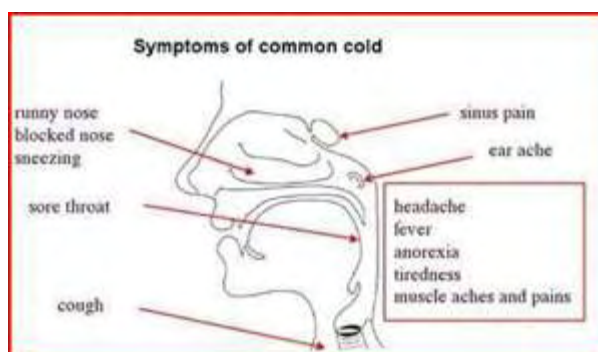
Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης με τον ιό της πολιομυελίτιδας ή επηρεάζουν τη σοβαρότητα της ασθένειας περιλαμβάνουν:

- ανοσοανεπάρκεια (Davis L, 1977)
- υποσιτισμό (Chandra R, 1975)
- αμυγδαλεκτομή
- σωματική δραστηριότητα αμέσως μετά από την έναρξη της παράλυσης (Horstmann D, 1950)
- τραυματισμό σκελετικών μυών λόγω έγχυσης των εμβολίων ή των θεραπευτικών παραγόντων (Wimmer E, 1998)
- εγκυμοσύνη (Evans C, 1960)

2.1.2 Συμπτώματα

Οι περισσότεροι άνθρωποι που μολύνονται από τον ιό της πολιομυελίτιδας (περίπου 72 στους 100) δεν θα έχουν ορατά συμπτώματα (Atkinson W, 2009). Τα προσβληθέντα άτομα μπορεί να παρουσιάσουν μια σειρά συμπτωμάτων, εάν ο ιός εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Περίπου 1 στους 4 ανθρώπους με λοίμωξη από τον ιό θα εμφανίσει γριπώδη συμπτώματα που μπορεί να περιλαμβάνουν:

- Πονόλαιμο
- Πυρετό
- Κόπωση
- Ναυτία
- Πονοκέφαλο
- Πόνο στο στομάχι



Εικόνα 24: Συμπτώματα γρίπης μετά από μόλυνση από τον ιό της πολιομυελίτιδας.

Αυτά τα συμπτώματα συνήθως διαρκούν 2-5 ημέρες και στη συνέχεια υποχωρούν από μόνα τους (Chamberlin SL, et.al 2005).

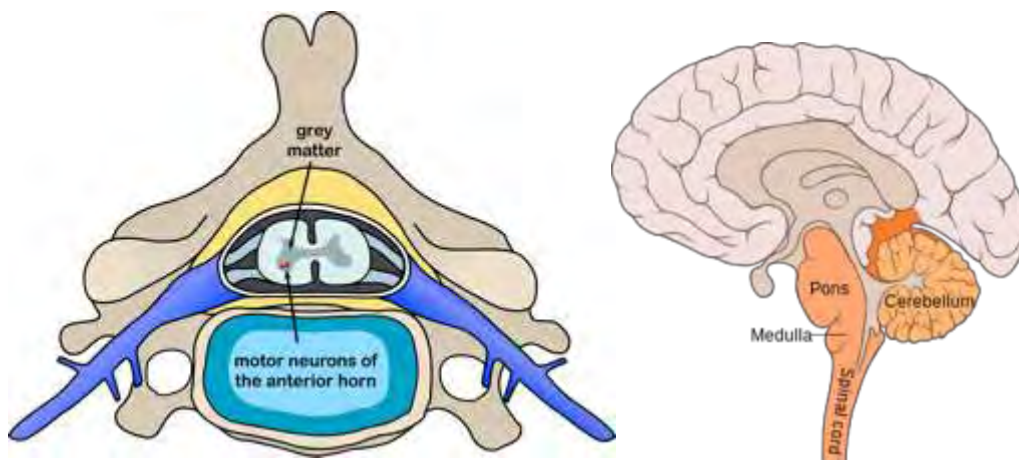
Σε περίπου 1% των περιπτώσεων ο ιός εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου μολύνει και καταστρέφει τους κινητικούς νευρώνες, οδηγώντας στην μυϊκή αδυναμία και την οξεία χαλαρή παράλυση. Ένα μικρότερο ποσοστό ατόμων με λοίμωξη από τον ιό θα αναπτύξει άλλα περισσότερο σοβαρά συμπτώματα που επηρεάζουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό όπως (Διάγραμμα 1):

- Παισιοθήσεις(αίσθηση ότι έχει καρφίτσες και βελόνες στα πόδια).
- Μηνιγγίτιδα (λοίμωξη του καλύμματος του νωτιαίου μυελού ή / και του εγκεφάλου). Εμφανίζεται σε περίπου 1/25 άτομα με λοίμωξη από τον ιό της πολιομυελίτιδας .
- Παράλυση (αδυναμία κίνησης διαφόρων περιοχών του σώματος) ή αδυναμία στα χέρια, τα πόδια, ή και τα δύο. Εμφανίζεται σε περίπου 1 στα 200 άτομα με λοίμωξη από τον ιό (Wood, et.al 2005).

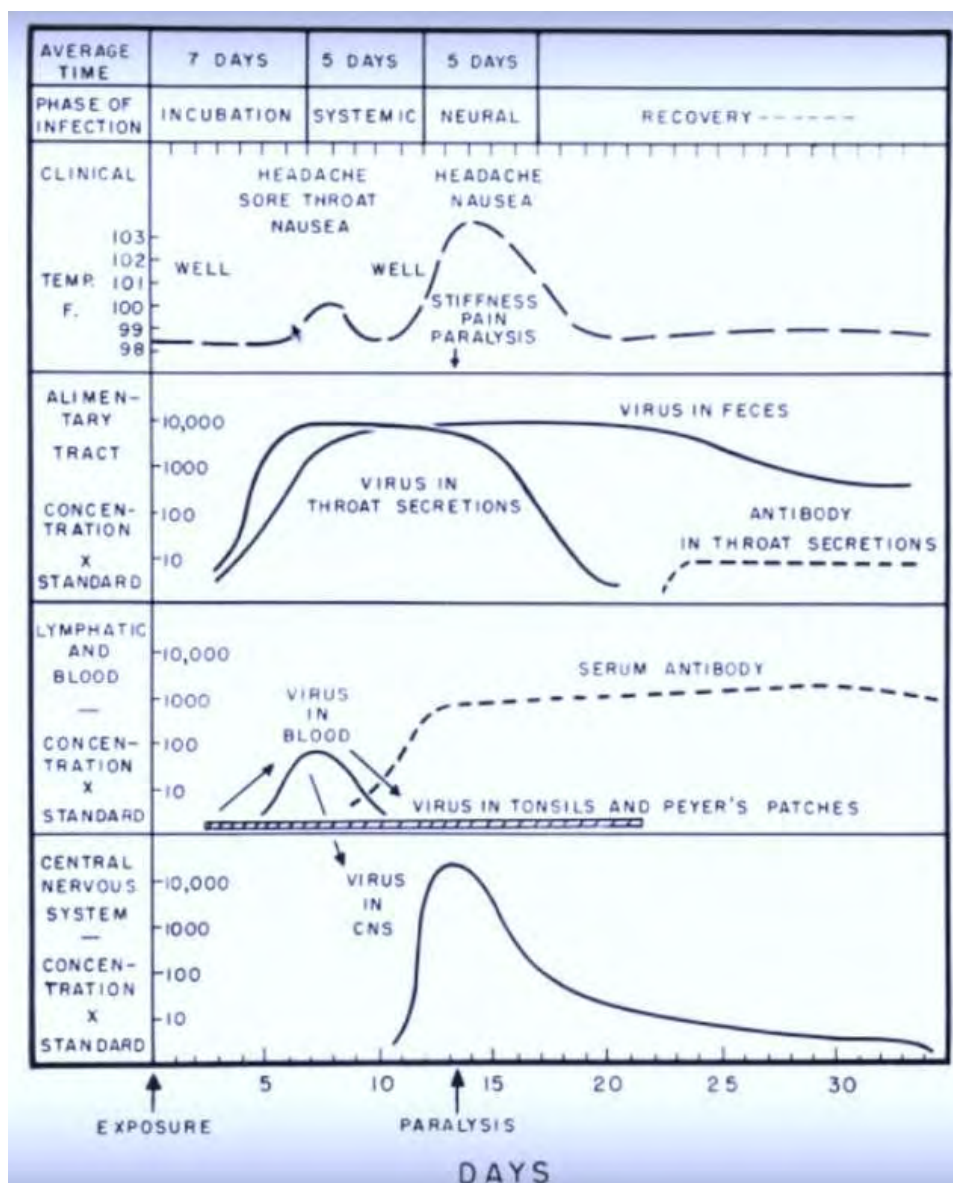
Η παράλυση είναι το πιο σοβαρό από τα συμπτώματα που συνδέονται με την πολιομυελίτιδα, επειδή μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη αναπηρία και στο θάνατο (Falconer M, 2000). Σε 100 ανθρώπους που έχουν παράλυση οφειλόμενη στη μόλυνση από τον ιό της πολιομυελίτιδας, οι 2-10 πεθαίνουν, επειδή ο ιός επηρεάζει τους μυς που τους βοηθούν να αναπνέουν (Atkinson W, 2009).

Διαφορετικοί τύποι παράλυσης μπορούν να εμφανιστούν, ανάλογα με τα νεύρα που εμπλέκονται (Εικόνα 25). Η νωτιαία πολιομυελίτιδα είναι η πιο κοινή μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από την ασύμμετρη παράλυση που συχνότερα περιλαμβάνει τα πόδια. Η προμηκική πολιομυελίτιδα οδηγεί σε αδυναμία των μυών που νευρώνονται από τα κρανιακά νεύρα. Η νωτιαιο-προμηκική πολιομυελίτιδα είναι ένας συνδυασμός προμηκικής και νωτιαίας παράλυσης.

Ακόμα και παιδιά που φαίνεται να έχουν αναρρώσει πλήρως, μπορεί να εμφανίσουν νέο μυϊκό πόνο, αδυναμία, ή και παράλυση ως ενήλικες, 15-40 χρόνια αργότερα. Αυτό ονομάζεται σύνδρομο μετα-πολιομυελίτιδας. Σημειώνεται ότι ως πολιομυελίτιδα ορίζεται η παραλυτική ασθένεια. Έτσι, μόνο οι άνθρωποι με την παραλυτική λοίμωξη θεωρείται ότι πάσχουν από τη νόσο.



Εικόνα 25:Νωτιαία (αριστερά) και προμηκική (δεξιά) πολιομυελίτιδα (Leoboef, 1992).



Διάγραμμα 1: Πορεία του πολιοιού τις πρώτες μέρες μετά την μόλυνση του οργανισμού. Η 1^η εβδομάδα είναι η περίοδος επώασης του ιού, όπου ο ιός βρίσκεται στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα. Πρώτη εμφάνιση συμπτωμάτων είναι μία αύξηση της θερμοκρασίας, πονοκέφαλος και ναυτία. Τις επόμενες 5 μέρες όπου ο ιός έχει εισέλθει στην κυκλοφορία, η θερμοκρασία πέφτει και στο 99% των περιπτώσεων έχουμε το τέλος της λοίμωξης. Στο υπόλοιπο 1% τα αρχικά συμπτώματα επιμένουν και στις επόμενες 5 ημέρες εμφανίζεται πυρετός και εν τέλει παράλυση. Στο στάδιο αυτό ο ιός έχει φτάσει στα όργανα στόχους (νωτιαίο μυελό) (Rivers, et.al 1959).

2.1.3 Διάγνωση

Την παραλυτική πολιομυελίτιδα μπορεί κάποιος να την υποπτευτεί κλινικά σε άτομα τα οποία είχαν αιφνίδια έναρξη χαλαρής παράλυσης σε ένα ή περισσότερα άκρα, με μειωμένα ή απόντα τενόντια, αντανακλαστικά στα επηρεασμένα άκρα, τα οποία δεν μπορούν να αποδοθούν σε κανένα άλλο εμφανή λόγο και χωρίς αισθητική ή αντιληπτική απώλεια.

Μία εργαστηριακή διάγνωση συνήθως γίνεται βασισμένη στην ανακάλυψη του ιού της πολιομυελίτιδας σε δείγμα κοπράνων ή φαρυγγικό επίχρισμα. Αντισώματα για τον ιό της πολιομυελίτιδας μπορεί να είναι διαγνωστικά και κατά κανόνα ανιχνεύονται στο αίμα των πάσχοντων ασθενών νωρίς στην πορεία της ασθένειας (Atkinson W, 2009). Ανάλυση του ENY των ασθενών, το οποίο συλλέγεται με οσφυονωτιαία παρακέντηση αποκαλύπτει μία αύξηση στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και ειδικά των λεμφοκυττάρων και μέτρια αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών. Ανίχνευση του ιού στο ENY είναι διαγνωστική για την παραλυτική πολιομυελίτιδα αλλά είναι σπάνια (Atkinson W, 2009). Αν ο ιός απομονωθεί από ασθενή ο οποίος πάσχει από οξεία χαλαρή παράλυση, εξετάζεται περαιτέρω μέσω ολιγονουκλεοτιδικής χαρτογράφησης μέσω ενίσχυσης PCR, για να διευκρινιστεί αν είναι ο «άγριος τύπος» που συναντάται στη φύση ή ο «εμβολιακός τύπος» που προέρχεται από στέλεχος του ιού που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του εμβολίου (Chezzi C, 1996). Είναι σημαντικό να καθοριστεί ο τύπος του ιού γιατί για κάθε περίπτωση που αναφέρθηκε για τον άγριο τύπο υπολογίζεται πως υπάρχουν άλλοι 200 με 3000 ασυμπτωματικοί φορείς (Gawande A, 2004).

2.2 ΠΡΟΛΗΨΗ

2.2.1 Παθητική ανοσοποίηση

Το 1950 ο Γουίλιαμ Χάμον στο πανεπιστήμιο του Πίτσμπουργκ απομόνωσε κεκαθαρμένη γ-σφαιρίνη από το αίμα ασθενών με πολιομυελίτιδα που επιβίωσαν (Hammon W, 1955). Ο Χάμον πρότεινε ότι η γάμμα σφαιρίνη, που περιέχει αντισώματα έναντι του ιού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σταματήσει την λοίμωξη από τον ιό, να αποτρέψει ασθένειες και να μειώσει τη δριμύτητα σε ασθενείς που είχαν συσταλτική πολιομυελίτιδα. Τα αποτελέσματα από μία μεγάλη κλινική δοκιμή ήταν ενθαρρυντικά και έδειξαν ότι η γάμμα σφαιρίνη μείωνε κατά 80% την πιθανότητα εμφάνισης παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Ακόμη φαίνεται να μειώνει τη δριμύτητα της ασθένειας σε ασθενείς που ανέπτυξαν πολιομυελίτιδα. Ωστόσο αργότερα αυτή η τεχνική κρίθηκε μη πρακτική για διαδεδομένη χρήση λόγω της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων αίματος και έτσι η ιατρική κοινότητα έστρεψε το βλέμμα της στην ανάπτυξη του εμβολίου για την πολιομυελίτιδα (Rinaldo C, 2005).

2.2.2 Εμβόλιο

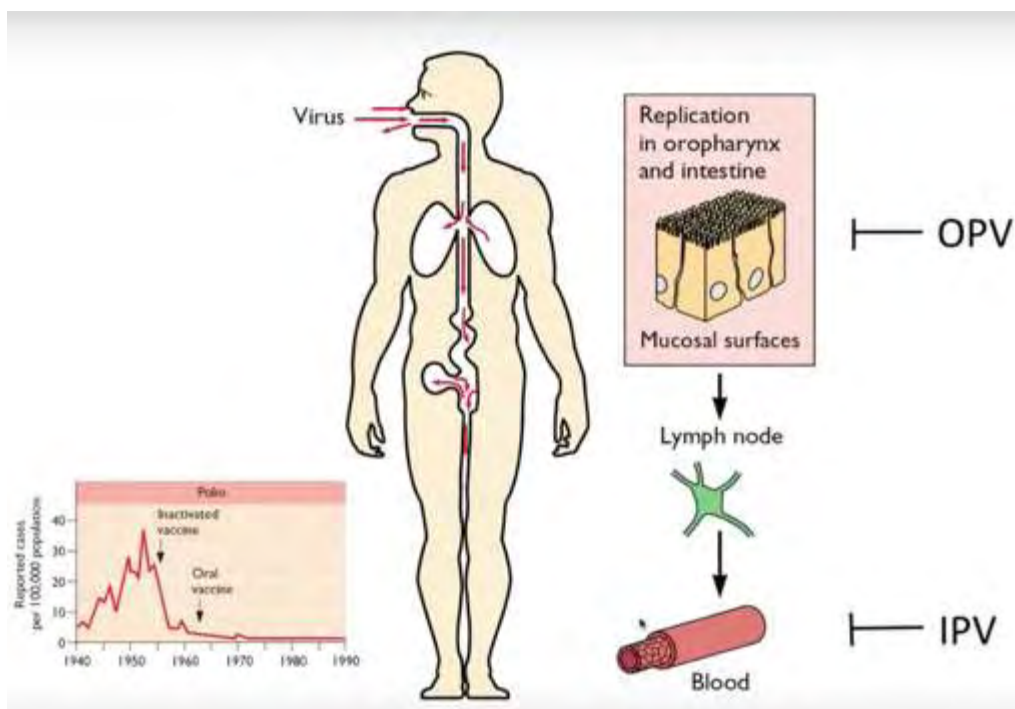
Δύο τύποι εμβολίων χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο για να καταπολεμήσουν τον ιό. και οι δύο τύποι προάγουν την ανοσία στον ιό μπλοκάροντας αποτελεσματικά τη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, προστατεύοντας έτσι όχι μόνο τους εμβολιασθέντες αλλά και την ευρύτερη κοινότητα (Fine P, 1999).

Το πρώτο υποψήφιο εμβόλιο βασισμένο σε έναν ορότυπο ενός ζωντανού αλλά εξασθενημένου ιού (IPV) αναπτύχθηκε από την ιολόγο Hilary Koprowski (Εικόνα 26) . Το πρωτότυπο εμβόλιο είχε δοθεί σε ένα οχτάχρονο αγόρι στις 27 Φεβρουαρίου 1950 (Koprowski H, 2010). Η Koprowski συνέχιζε να δουλεύει πάνω στο εμβόλιο όλο το 1950 και οδήγησε σε μεγάλης κλίμακας δοκιμές στο τότε Βελγικό Κογκό και στον εμβολιασμό εφτά εκατομμυρίων παιδιών στην Πολωνία ενάντια στους ορότυπους 1 και 2 μεταξύ του 1958 και του 1960 (Sanofi Pasteur Inc 2009).

Το δεύτερο ανενεργό εμβόλιο ιού αναπτύχθηκε το 1952 από τον Jonas Salk στο πανεπιστήμιο του Πίτσμπουργκ και ανακοινώθηκε στον κόσμο στις 2 Απριλίου το 1955. Το εμβόλιο Salk ή εμβόλιο ανενεργού ιού της πολιομυελίτιδας το οποίο βασίστηκε σε ιο που μεγαλώνει στα κύτταρα από νεφρό ενός τύπου πιθήκου (νερο κυτταρική σειρά), το οποίο απενεργοποιείται χημικά με φορμαλδεΰδη (Kew O, 2005). Μετά από 2 δόσεις αυτού του εμβολίου πάνω από 90 % των ατόμων ανέπτυξαν προστατευτικά αντισώματα και στους 3 ορότυπους του ιού και το 99% από αυτούς ήταν άνοσο στους ιούς μετά από 3 δόσεις (Atkinson W, 2009).

Ακολούθως, ο Albert Sabin ανέπτυξε ένα άλλο ζωντανό λαμβανόμενο από το στόμα εμβόλιο (OPV) (Εικόνα 26). Πάρθηκε από το πέρασμα του ιού μέσα από μη ανθρώπινα κύτταρα κάτω από μειωμένες θερμοκρασίες (Sabin AB, et.al 1960). Ο εξασθενημένος ιός που περιείχε αναπαραγόταν πολύ αποτελεσματικά στο έντερο, τον κύριο τόπο μόλυνσης και αναπαραγωγής του ιού της πολιομυελίτιδας, αλλά το στέλεχος του ιού δεν μπορούσε να αναπαραχθεί στο νευρικό ιστό αποτελεσματικά (Sabin A, et.al 1960). Μία μόνο δόση αυτού του εμβολίου Sabin από το στόμα προκαλεί ανοσία και στους 3 ορότυπους του ιού σε 50 % των δεκτών, ενώ 3 δόσεις προκαλούν ανοσία στο 95 % των δεκτών. Οι ανθρώπινες δοκιμές για αυτό το εμβόλιο ξεκίνησαν το 1957 και το 1958 επιλέχθηκε σε διαγωνισμό ανάμεσα στα ζωντανά εμβόλια της Korrowsky και άλλα εμβόλια από το αμερικάνικο ινστιτούτο υγείας (Sanofi Pasteur Inc 2007). Αδειοδοτήθηκε το 1960 και γρήγορα έγινε το μόνο εμβόλιο για τον ιο της πολιομυελίτιδας που χρησιμοποιείται στον κόσμο.

Επειδή το εμβόλιο αυτό που λαμβάνεται από το στόμα είναι φθινό, εύκολο για να το χορηγήσεις και προκαλεί εξαιρετική ανοσία στο λεπτό έντερο (το οποίο βοηθά στην πρόληψη της λοίμωξης από ιο άγριου τύπου σε χώρες όπου υπάρχει επιδημία), έγινε το εμβόλιο επιλογής για να ελεγχθεί ο ιός σε πολλές χώρες . Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις (1 στις 750000) ο εξασθενημένος ιός μετατρέπεται σε μορφή που μπορεί να προκαλέσει παράλυση (Racaniello V, 2006) . Έτσι οι περισσότερες βιομηχανικές χώρες στράφηκαν στο τύπου salk εμβόλιο το οποίο δεν μπορεί να αναστραφεί, ως το μόνο εμβόλιο κατά της πολιομυελίτιδας ή σε συνδυασμό με το στοματικό.



Εικόνα 26: Τα 2 αυτά εμβόλια (OPV, IPV) λειτουργούν διαφορετικά. Το OPV προσφέρει ανοσία στο αίμα ή χυμική ανοσία. Το IPV που χορηγείται ενέσιμο στον μυ, οδηγεί σε παραγωγή αντισωμάτων στο αίμα. Στο διάγραμμα κάτω αριστερά παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των 2 αυτών εμβολίων μέχρι το 1990 στις Η.Π.Α.

2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Παρά την ευρέως διαδεδομένη φύση των λοιμώξεων από εντεροϊούς και την μεγάλη ποικιλία των κλινικών τους συμπτωμάτων, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού (Knipe and Howley, 2007). Οι εντεροϊοί μεταδίδονται σε συνθήκες φτωχής υγιεινής και μπορούν να επιζήσουν ακόμα και σε συνθήκες εξαιρετικά χαμηλών εξωτερικών θερμοκρασιών το χειμώνα. Σε τροπικά κλίματα προσβάλλουν ανθρώπους ενεργά όλες τις εποχές του χρόνου, αλλά σε ψυχρότερα κλίματα οι εξάρσεις των ασθενειών συμβαίνουν συχνότερα το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

Μετά την ευρεία χρήση του εμβολίου της πολιομυελίτιδας στα μέσα της δεκαετίας του 1950, τα επεισόδια πολιομυελίτιδας μειώθηκαν δραματικά σε πολλές βιομηχανικές χώρες (Πίνακας 3). Μια παγκόσμια προσπάθεια για την εξάλειψη της πολιομυελίτιδας άρχισε το 1988, με επικεφαλής τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τη UNICEF και κάποια άλλα ιδρύματα (Vaught, 2015). Αυτές οι προσπάθειες έχουν μειώσει τον αριθμό των ετήσιων διαγνωσμένων κρουσμάτων κατά 99,9%, από περίπου 350.000 περιπτώσεις το 1988, έπεσε στις 483 το 2001, και έπειτα παρέμεινε σε επίπεδο περίπου 1.000 - 2000 περιπτώσεις ετησίως επί σειρά ετών (CDC, 2008). Το 2015, οι περιπτώσεις μειώθηκαν σε 98 (WHO, 2016). Η πολιομυελίτιδα είναι μία από τις μόλις δύο ασθένειες σήμερα, που αποτελεί αντικείμενο ενός συνολικού προγράμματος εκρίζωσης της, η άλλη είναι η νόσος του σκουληκιού της Γουινέα (Akst, 2015).

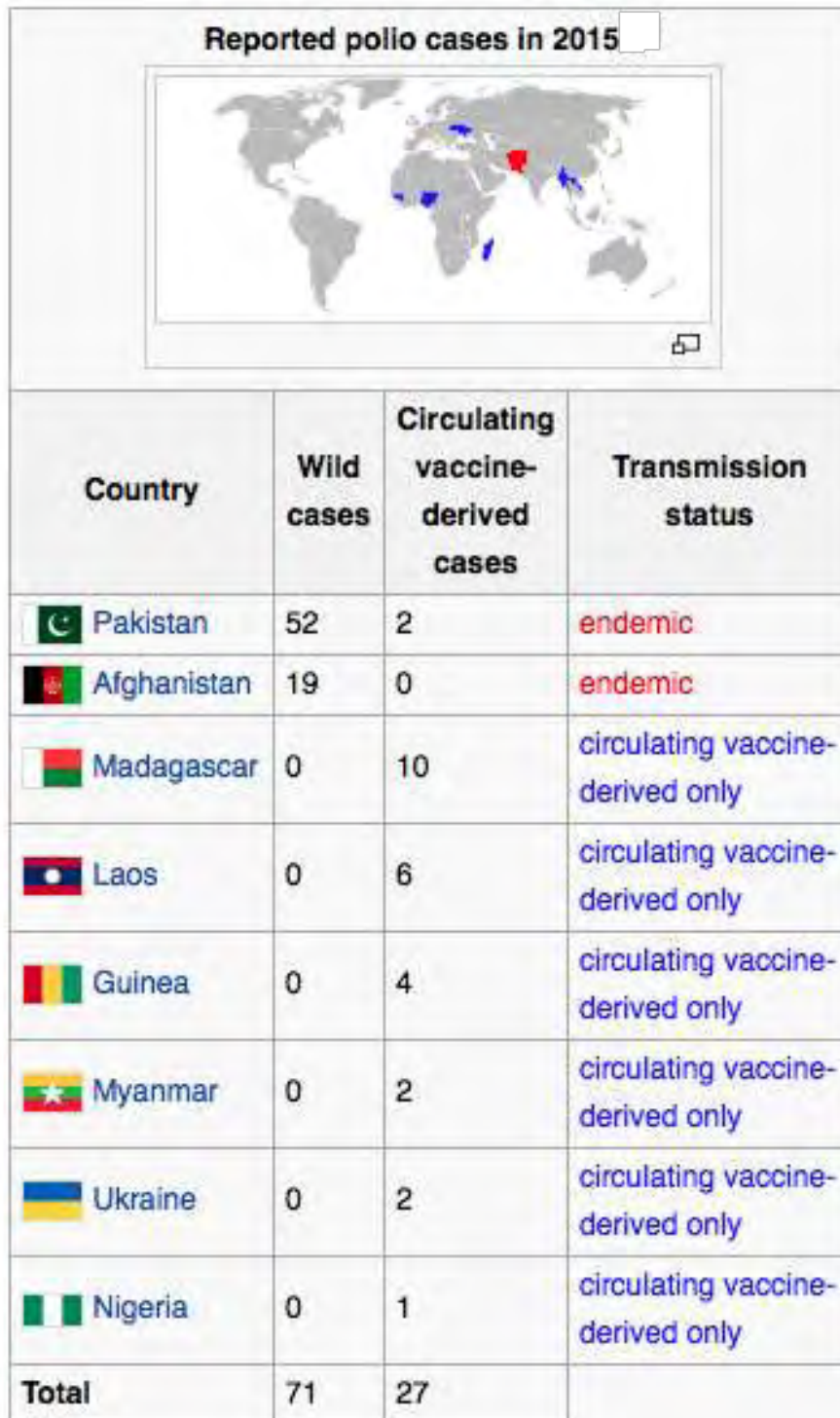
Μέχρι στιγμής, οι μόνες ασθένειες που έχουν εξαλειφθεί πλήρως από την ανθρωπότητα είναι η ευλογιά, όπως καταγράφηκε το 1980, (WHO, 2008) και η πανώλη των βοοειδών το 2011 (ΟΙΕ, 2011). Μια σειρά από ορόσημα εξάλειψης έχουν ήδη επιτευχθεί, και αρκετές περιοχές του κόσμου έχουν πιστοποιηθεί ελεύθερες από την πολιομυελίτιδα. Η Αμερική ανακηρύχθηκε απαλλαγμένη από την πολιομυελίτιδα το 1994. Από το 2000, η πολιομυελίτιδα έχει εξαλειφθεί επίσημα σε 36 δυτικές χώρες του Ειρηνικού, συμπεριλαμβανομένης της Κίνας και της Αυστραλίας. Η Ευρώπη ανακηρύχθηκε απαλλαγμένη από την πολιομυελίτιδα το 2002. Από το 2006, η πολιομυελίτιδα παραμένει ενδημική σε τέσσερις μόνο χώρες: τη Νιγηρία, την Ινδία (ειδικά το Uttar Pradesh και το Bihar), το Πακιστάν και το Αφγανιστάν, αν και

εξακολουθεί να προκαλεί επιδημίες και σε άλλες κοντινές χώρες, λόγω “κρυμμένης” ή ξαναεγκαθιδρυμένης μετάδοσης.

Μια ανησυχία προκύπτει από την παρουσία κυκλοφορούντων εμβολίων που προέρχονται από ιούς πολιομυελίτιδας (cVDPV). Το OPV εμβόλιο δεν είναι τέλειο, παρ’όλο που τα γενετικά χαρακτηριστικά είναι προσεκτικά ισορροπημένα για να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα, είναι όμως δυνατόν το OPV να μεταλλαχθεί. Ως αποτέλεσμα, άτομα που έχουν εμβολιαστεί με το OPV μπορεί να αποκτήσουν οξείες ή χρόνιες λοιμώξεις, ή μπορεί να μεταδώσουν (ανακυκλοφορήσουν) το μεταλλαγμένο OPV σε άλλους ανθρώπους. Είναι πιθανό οι περιπτώσεις cVDPV να υπερβούν τις περιπτώσεις άγριου τύπου στο εγγύς μέλλον, γεγονός που καθιστά σκόπιμη τη διακοπή της χρήσης του OPV το συντομότερο δυνατόν (Olen M, et.al 2003).

Δήλωση Έκτακτης Ανάγκης

Τον Απρίλιο του 2012, η Παγκόσμια Συνέλευση Υγείας κήρυξε την ολοκλήρωση της εξάλειψης της πολιομυελίτιδας ως ένα πρόγραμμα έκτακτης ανάγκης για την παγκόσμια δημόσια υγεία (WHA, 2012).



Πίνακας 3: Καταγραφή περιστατικών πολιομυελίτιδας για το 2015(WHO, 2016).

Μελέτες της μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων, προσφέρουν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες και έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς:

- ✓ παρέχουν την ευκαιρία για αναμφισβήτητη ταυτοποίηση του στελέχους
- ✓ παρέχουν γνώσεις σχετικά με την κατάταξη των εντεροϊών και την ταξινόμησή τους
- ✓ διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων.

Για τους εντεροϊούς, η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής είναι η αλληλούχιση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μόνο μεταξύ στενών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των απομονώσεων εντεροϊών άγριου τύπου, από διαφορετικά μέρη του κόσμου, έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη μοριακών μελετών (Rico-Hesse R, et.al 1987).

Η τεχνολογία της αλληλούχισης έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PV, και έχει αποδειχθεί πολύτιμη για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης του πολιοϊού (Kew OM, et.al 1995). Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστούν:

- εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου
- ομοιότητες μεταξύ των απομονώσεων σε μια επιδημία
- διαφορές μεταξύ των προϊόντων απομόνωσης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση ενός ιού (Lipskaya G, et.al 1995).

3. ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

3.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Όπως όλοι οι RNA ιοί, έτσι και οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από την συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων που συμβαίνουν λόγω του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσης λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών αυτών (μηχανισμός proof-reading). Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων ($4,5 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής, δηλαδή 1 λάθος νουκλεοτίδιο ανά 2222 βάσεις) είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στους εντεροϊούς το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των λυτικών RNA ιών (Wimmer, et.al 1993). Η απουσία ενός μηχανισμού ελέγχου της RNA πολυμεράσης για την πιστότητα της αντιγραφής του ιικού RNA, συμβάλει στην εξέλιξη των Εντεροϊών.

Η μεγάλη συχνότητα λαθών της RNA πολυμεράσης οδηγεί και στη δημιουργία ετερογενών πληθυσμών. Ο όρος quasi-species (σχεδόν είδος) έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων, που έχουν γενικά μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες περιοχές (Domingo, et.al 1985). Αυτή η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους Εντεροϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον. Υπάρχουν 2 κύριοι μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Garvilin, et.al 2000).

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες (Figlerowicz M, et.al 2003).

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των Εντεροϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών τους. Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών

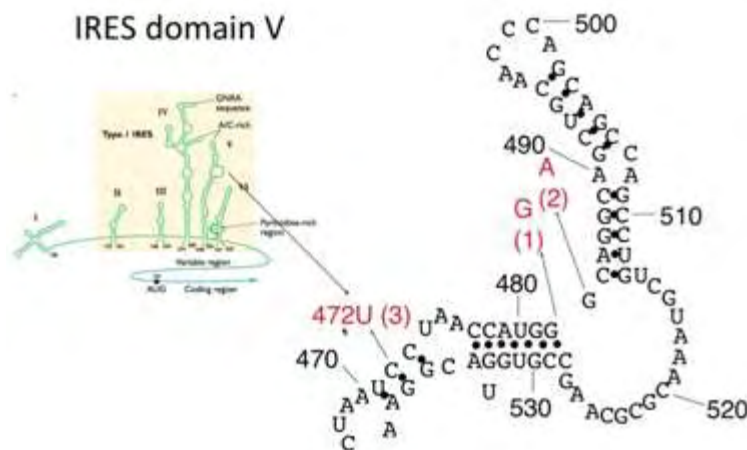
πρωτεϊνών (π. χ στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων). Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι δεν είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης.

Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται στις περιοχές στο εξωτερικό του ιικού καψιδίου, καθώς εξελίσσονται πιο γρήγορα λόγω της ισχυρής εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Muir, et.al 1998). Από αυτές τις δομικές πρωτεΐνες η VP1 συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις (*Πίνακας 4*).

Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι επίσης η 5' UTR περιοχή (*Εικόνα 27*) με εξαίρεση τα cis δραστικά γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, το cloverleaf και CRE, και στην ιική μετάφραση (Nathan LY, 2010). Γι' αυτό το λόγο, οι καψιδιακές πρωτεΐνες θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες της εξέλιξης των εντεροϊών, σε σύγκριση με την 5' UTR, η οποία παρουσιάζει τους χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης.

Virus	Mutation (location/nucleotide position)
P1/Sabin	5'-UTR nt 480 VP1 aa 1106 VP1 aa 1134 VP3 aa 3225 VP4 aa 4065
P2/Sabin	5'-UTR nt 481 VP1 aa 1143
P3/Sabin	5'-UTR nt 472 VP3 aa 3091

Πίνακας 4: Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, με τη VP1 να συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις. Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι επίσης η 5' UTR περιοχή. Οι μεταλλάξεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες εξασθένισης των πολιοϊών S1, S2, S3.



Εικόνα 27: Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι και η 5' UTR περιοχή και συγκεκριμένα στα εμβολιακά στελέχη S1,S2,S3 οι πιο σημαντικές μεταλλάξεις έχουν εμφανιστεί στο IRES στο βρόγχο V. Με 1, 2, 3 φαίνονται οι μεταλλάξεις που αντιστοιχούν στα S1, S2, S3 που οδηγούν στην εξασθένησή τους (Racaniello, 2005).

3.2 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

Με τον όρο ανασυνδυασμό αναφερόμαστε στον σχηματισμό νέων, ομοιοπολικά συνδεδεμένων συνδυασμών γενετικού υλικού προερχόμενα, είτε από δύο διαφορετικά πατρικά γενώματα, είτε από διαφορετικές πλευρές του ίδιου γενώματος. Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό γενετικής ποικιλομορφίας, που συμβάλλει σε πολύ σημαντικές και κρίσιμες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες των κυττάρων. Γενετικός ανασυνδυασμός έχει βρεθεί τόσο στους DNA όσο και στους RNA ιούς (Domingo E, 2006).

Οι ανασυνδυασμοί μαζί με τις μεταλλάξεις κατευθύνουν την εξέλιξη των ιών. Ο γενετικός ανασυνδυασμός, δηλαδή η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA, παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό (Hirst G, 1962), αλλά γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών (Lukashev A, 2005). Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον βαθμό ομολογίας των πατρικών κλώνων RNA (Knipe and Howley, 2007).

Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στην διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου. Ακόμη συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος,

επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) (Kyriakopoulou, et.al 2011).

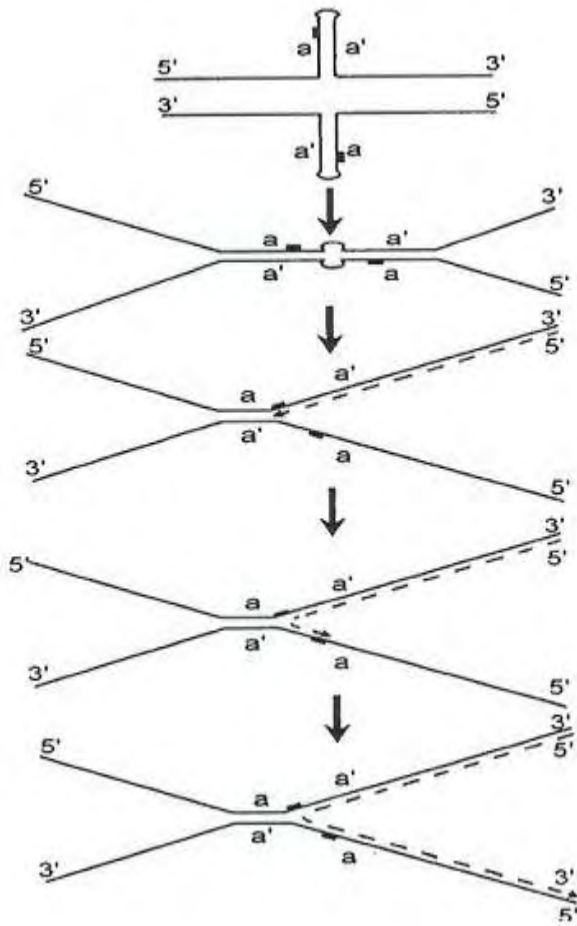
Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον γενετικό ανασυνδυασμό, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard and Baltimore, 1986) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl, et.al 1999).

3.2.1 Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (ή αντιγραφικός μηχανισμός)

Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό, το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA και ξαφνικά σταματά και ξανασυνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch). Όταν η μετάβαση από το ένα στο άλλο εκμαγείο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος.

Συγκεκριμένα κατά την ιική αντιγραφή, η ιική πολυμεράση 3D χρησιμοποιεί σαν καλούπι για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας, τον κλώνο θετικής πολικότητας του ιού επάγοντας τη δημιουργία με αυτόν τον τρόπο ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστού ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου η ιική πολυμεράση μπορεί να συναντήσει κάποιο «εμπόδιο», με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της ίδιας, καθώς και του νεοσυντιθέμενου RNA κλώνου αρνητικής πολικότητας, από τον θετικής πολικότητας κλώνο που χρησιμοποιείται σαν καλούπι (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Έχει προταθεί ότι το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια σταθερή δευτεροταγής RNA δομή (Romanova, et.al 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο (Pilipenko, et.al 1995). Η αποδέσμευση της ιικής πολυμεράσης σε σύμπλοκο με τον νεοσυντιθέμενο αρνητικό κλώνο οδηγεί στην δέσμευση της ιικής πολυμεράσης, καθώς και του ημιτελούς αρνητικού κλώνου, σε περιοχή υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού κλώνου θετικής πολικότητας που θα λειτουργήσει τώρα σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Αν η μετάβαση από τον ένα κλώνο στον άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος αν όμως δεν είναι ακριβής είναι μη ομόλογος και έχει αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των νέων στελεχών (Kirkegaard and Baltimore

1986). Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού (Εικόνα 27), (Romanova, et.al 1986, King, et.al 1988).

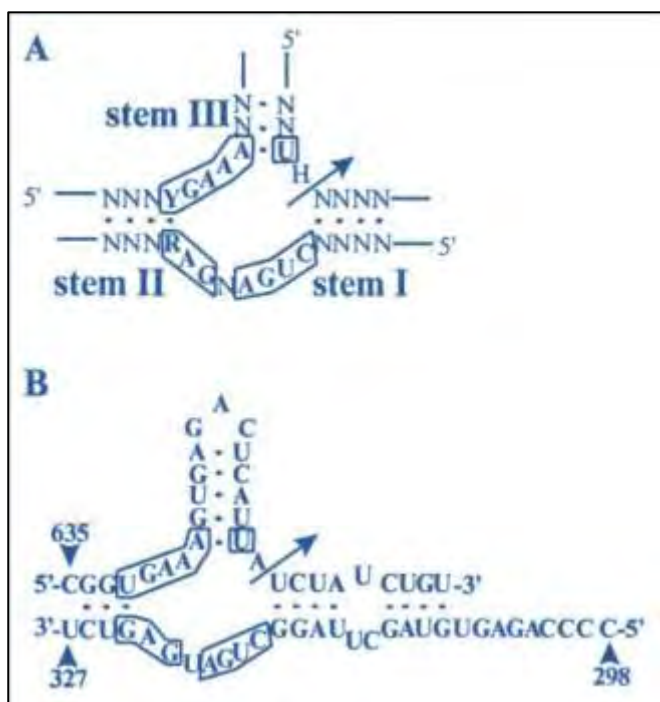


Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αλλαγής μήτρας κατά τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA. Οι μαύρες γραμμές αναπαριστούν τα δύο μόρια RNA. Οι δύο ανάστροφες επαναλήψεις παριστάνονται ως α και α'. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA (Agol, et.al 1997).

3.2.2 Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (ή μη αντιγραφικός μηχανισμός)

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, τα μόρια του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτεθειμένα 5' άκρα τους ενώνονται. Με άλλα λόγια, ένα ανασυνδυασμένο γονιδίωμα προκύπτει από τη σύνδεση τμημάτων RNA που προέρχονται από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων (Domingo E, et.al 2006). Υπάρχουν 2 προτεινόμενοι μηχανισμοί:

- Σύμφωνα με τον πρώτο, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των 2 διαφορετικών μορίων δέχονται επίθεση από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο νερού με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Έπειτα τα άκρα αυτά από τα διαφορετικά RNA ενώνονται μεταξύ τους μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας.
- Στον δεύτερο χημικό μηχανισμό, ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός σε κάθε ανασυνδυασμένο μόριο δέχεται επίθεση από το παρακείμενο 2'OH, το οποίο παίζει ρόλο του εσωτερικού νουκλεόφιλου, με αποτέλεσμα σε κάθε μόριο την παραγωγή ενός άκρου που περιέχει ένα κυκλικό 2',3' φωσφορικό ενδιάμεσο και ενός 5' άκρου που φέρει OH. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω αντίδρασης τρανς-εστεροποίησης (Εικόνα 28) (Gmyl et al., 1999).



Εικόνα 28: Μηχανισμός ανασυνδυασμού μέσω ρήξης και επανένωσης, που περιλαμβάνει τη συμμετοχή μιας hammerhead-like ριβοενζυμικής δραστηριότητας. Τα περιγεγραμμένα νουκλεοτίδια αποτελούν συντηρημένες θέσεις. Η θέση τομής φαίνεται με βέλος.

4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία, είτε λόγω περιορισμών των διαγνωστικών μεθόδων είτε λόγω των βιολογικών και επιδημιολογικών χαρακτηριστικών των εντεροϊών. Η δυσκολία οφείλεται στο γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να βρίσκονται στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα τόσο υγιών όσο και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα καθώς οι μολύνσεις είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη όχι μόνο διάγνωσης αλλά και ταυτοποίησής τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τόσο παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού, η οροταυτοποίηση και η ανίχνευση αντισωμάτων, όσο και μοριακές τεχνικές (Pallansch and Roos, 2007, Muir, et.al 1998, Siafakas, et.al 2001).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης με ειδικούς αντι-ορούς.

Τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του ιού, περιλαμβάνουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), φαρυγγικά επιχρίσματα και δείγματα που προέρχονται από το πεπτικό σύστημα όπως πρωκτικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων, τα οποία αποτελούν το πιο αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών. Η ιική καλλιέργεια από ENY αποτελεί συνηθισμένη μέθοδο σε περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας (Minor, et.al 2000). Η απομόνωση των εντεροϊών από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστημικής μόλυνσης (Schulman et al, 1997). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν δάκρυα (Yin-Murphy, et .al 1985), ή εκκρίματα του επιπεφυκότος χιτώννα (Yin-Murphy, et.al 1984), σε περιπτώσεις οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας. Σε περιπτώσεις θανάτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα αυτοψίας εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την απομόνωση εντεροϊών, είναι η χρήση κυτταρικών σειρών. Η ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών όμως, δεν μπορεί να γίνει στον ίδιο τύπο κυττάρων. Κατά συνέπεια, η χρήση πολλαπλών κυτταρικών σειρών αυξάνει την

παραγωγή και ενισχύει την πιθανότητα και ταχύτητα της ιικής απομόνωσης (Chonmaitree, et.al 1988, Korecka, 1999). Κάτω από ιδανικές συνθήκες η απομόνωση μπορεί να είναι εμφανής μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως (CPE) μέσα σε λίγες μέρες. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συρρικνώνονται πριν αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Παρ'όλα αυτά οι Εντεροϊοί δεν μπορούν να διακριθούν με την ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες καθώς προκαλούν όμοια κυτταροπαθογόνο δράση (Minor, et.al 2000).

Μετά την απομόνωση του Εντεροϊού ακολουθεί η ταυτοποίηση του οροτύπου μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντι-ορό για κάθε ορότυπο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων Εντεροϊών. Συγκεκριμένα το προς ανάλυση δείγμα επωάζεται με κάθε διαφορετικό δείγμα αντιορού και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και αξιολογούνται τα αποτελέσματα (Melnik, et.al 1973).

Για την ταυτοποίηση ορισμένων τύπων εντεροϊών χρησιμοποιούνται και άλλες λιγότερο χρονοβόρες μέθοδοι όπως ανοσοενζυμικές μέθοδοι με αντιορό ειδικό για κάθε ορότυπο, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με πολυδύναμο και ειδικό για κάθε ορότυπο αντιορό και ανίχνευση αντιγόνων των εντεροϊών στην κυτταροκαλλιέργεια είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ανοσοενζυμική μέθοδο.

Μέσω της ορολογικής διάγνωσης, μπορούμε να έχουμε ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊό, αφού τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού (Melnick J.L., 1996). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα αντιδρά στη λοίμωξη από εντεροϊό με την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία ενεργούν έναντι ειδικών και κοινών επιτόπων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες και έχει μεγάλη ευαισθησία στη διάγνωση λοίμωξης από εντεροϊούς, όμως δεν μπορεί να διακρίνει τους διάφορους οροτύπους (Bell, et.al 1986, Magnius, et.al 1988).

Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην κλινική βιολογία, έχει αλλάξει σημαντικά και τις μεθόδους διάγνωσης. Λόγω του πλεονεκτήματος της ταχύτητας, πολλές μοριακές μέθοδοι έχουν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών (Pallansch and Roos, 2007).

Η πρώτη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *in situ* υβριδοποίηση με την χρήση cDNA ανιχνευτών. Η μέθοδος αυτή παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανομή της λοίμωξης από εντεροϊούς στα διάφορα κύτταρα, όμως δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για την διάγνωση εντεροϊών από κλινικά δείγματα κοπράνων, εγκεφαλονωτιαίου και περικαρδικού υγρού, ούτε για την ταυτοποίηση διαφορετικών οροτύπων καθώς οι cDNA ανιχνευτές μπορούν να ανιχνεύουν το γενετικό υλικό μιας ευρείας ομάδας εντεροϊών.

Η ανάπτυξη της τεχνικής RT – PCR (Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση ιικού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Kessler, et.al 1997). Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων που στοχεύουν στις διατηρημένες περιοχές του ιικού γενώματος (Romero J.R., 1999), όπως η 5'UTR, είναι δυνατή η ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η ανάπτυξη τους σε κυτταροκαλλιέργεια (Siafakas, et.al 2003). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων και γι' αυτό το λόγο αποτελεί σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία ταυτοποίησης του οροτύπου του εντεροϊού. Συνεπώς, για την ταυτοποίηση του ιού απαιτείται κάποια μέθοδος συμπληρωματική της RT-PCR. Αυτή μπορεί να είναι η ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLP) (Siafakas, et.al 2003).

Εκτός από την διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορετικών στελεχών με την χρήση ειδικών ζευγών εκκινητικών μορίων που το καθένα αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Έχουν βρεθεί οι αλληλουχίες που προσδιορίζουν τις αντιγονικές ιδιότητες των ιών και έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια που στοχεύουν σε αυτές (Melnick J.L., 1996).

Η RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών, ακολουθούμενη από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιικού γενώματος. Συγκεκριμένα, ενισχύεται το γονιδίου της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης, η οποία είναι η πλέον εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος και φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε στελέχους. Με σκοπό την ενίσχυση όλων των διαφορετικών οροτύπων των εντεροϊών, χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένοι εκφυλισμένοι εκκινητές (Oberste, et.al 2003). Ακολουθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου και η σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες προτύπων και αγρίων στελεχών με σκοπό την ταυτοποίηση του ιικού στελέχους που μας ενδιαφέρει. Η ανάλυση της αλληλουχίας της VP1 αποτελεί έναν σύγχρονο, ακριβή τρόπο μοριακής ταυτοποίησης των εντεροϊών (Bolanaki, et.al 2006, Kottaridi, et.al 2006).

5. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η κατασκευή *in vitro* ανασυνδυασμένων ιών μεταξύ των εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3 και εντεροϊών της ομάδας B (Echo19).

Η πειραματική διαδικασία συνίστατο στη μόλυνση κυττάρων Rd με τα στελέχη του εμβολίου S1 ή S2 ή S3 και με Echo19 (εντεροϊό ομάδας B) αλλά και διερεύνηση της καταλληλότητας ήδη σχεδιασμένων εκκινητών με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής ClustalW, με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων ζευγών. Έπειτα ακολούθησε εφαρμογή των τεχνικών PCR, κλωνοποίησης και αλληλούχισης με σκοπό τον εντοπισμό των υποθετικών περιοχών ανασυνδυασμού.

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin1, Sabin2, Sabin3 (Enterovirus group C) και το πρότυπο στέλεχος Echo19 (Enterovirus group B).

6.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ

6.2.1 Ενοφθαλμισμός δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες

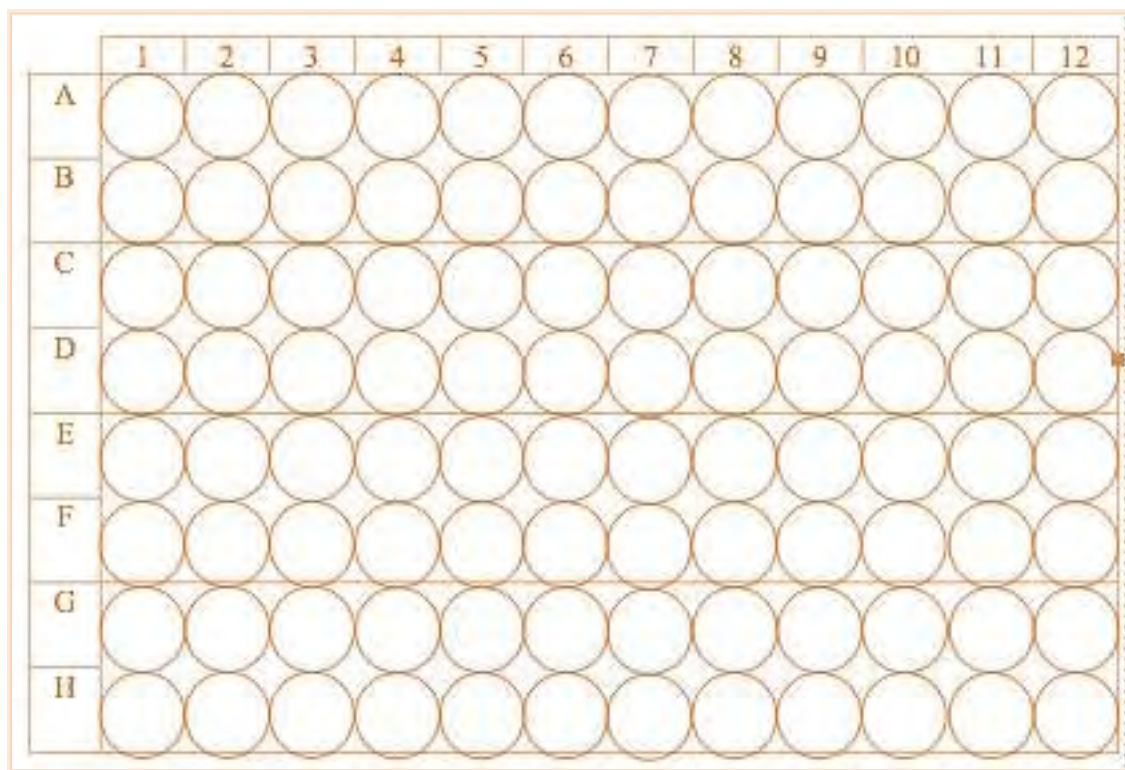
Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των εντεροϊών ήταν RD (κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας 2 και με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών.

Για την επιτυχημένη μόλυνση των κυττάρων ενοφθαλμίσαμε τα δείγματα στα κύτταρα εις διπλούν για κάθε δείγμα (σωλήνες A και σωλήνες B), σύμφωνα με την εξής μεθοδολογία: Σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας μεταφέρθηκαν 0,5 ml επεξεργασμένων δειγμάτων σε 2 ml θρεπτικού υλικού D-MEM χωρίς ορό (για την κυτταρική σειρά RD). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 h. Στη συνέχεια ανανεώθηκε το θρεπτικό υλικό στους σωλήνες A και B και όλοι οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37°C, όπου τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Οι σωλήνες εξετάζονταν καθημερινά, μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου, για την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Όταν παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση, οι σωλήνες ψύχθηκαν στους -20°C. Μετά την αρχική μόλυνση των κυττάρων ακολούθησαν τέσσερις ανακαλλιέργειες για την αύξηση του ιικού τίτλου

6.2.2 Σειριακές αραιώσεις

Για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υπάρχουν μείγματα εντεροϊών μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες, έγιναν σειριακές αραιώσεις. Με τη διαδικασία αυτή, απομονώνεται ένα στέλεχος από ένα μείγμα ιών, το οποίο βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση.

Αρχικά έγιναν αραιώσεις του κάθε δείγματος σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (erpendorf), που κυμάνθηκαν από 10^{-1} έως 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (Εικόνα 29) μεταφέροντας 100 μl από τους πλαστικούς σωλήνες που αντιπροσωπεύουν τις αραιώσεις από 10^{-1} έως 10^{-10} για κάθε δείγμα. Οι στήλες 11 και 12 αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι πλάκες επωάστηκαν στους 37°C . Η μικρότερη συγκέντρωση του ιού στην οποία παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση (CPE), ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικούς σωλήνες κυττάρων RD, δημιουργώντας έτσι, ένα απόθεμα (stock) ιικών στελεχών.



Εικόνα 29: Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Οι στήλες 11 και 12 αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες.

6.2.3 Εκχύλιση ιικού RNA

Όλα τα ιικά στελέχη υπήρχαν διαθέσιμα σε κυτταροκαλλιέργειες. Η απομόνωση και η οροταυτοποίηση όλων των κλινικών στελεχών προηγήθηκαν της παρούσας μελέτης (Kottaridi, et.al 2004). Η εκχύλιση του RNA των κυτταροκαλλιεργειών έγινε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas, et.al 1995). Συγκεκριμένα, σε eppendorf των 2 ml αναμείχθηκαν 10 μl γλυκογόνου (100 mg/ml), 100 μl από κάθε δείγμα και 300 μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και να απελευθερωθεί το ιικό RNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και τα eppendorf τοποθετήθηκαν για 20 min στους -20°C. Ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου νουκλεασών. Το RNA των δειγμάτων αποθηκεύθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Διαλύματα: Διάλυμα Θειοκυανιούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiotreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

6.2.4 Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών γίνεται σύμφωνα με τις σταθερές περιοχές του στόχου. Επιπλέον οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature, T_m).

Το ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) είναι ένα πρόγραμμα που πραγματοποιεί στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με εξαιρετική ακρίβεια και ταχύτητα. Χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό νέων ειδικών εκκινητικών μορίων τόσο για τον Echo19 όσο

και για τα εμβολιακά στελέχη S1, S2, S3, με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων, από ένα σύνολο εκκινητικών μορίων, αλλά και για εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί για εντεροϊούς, σε προηγούμενες εργασίες (Πίνακας 5).

Έγινε στοίχιση των αλληλουχιών όλων των εκκινητικών μορίων με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Echo19, αλλά και των εμβολιακών στελεχών S1, S2, S3 που έχουν κατατεθεί στην GeneBank. Επιλέχθηκαν εκκινητικά ζεύγη τα οποία υβριδοποιούνται επιλεκτικά μόνο στα εμβολιακά στελέχη και μόνο στον Echo19 αντίστοιχα. Η επιλογή έγινε με κριτήρια την ταύτιση της αλληλουχίας μόνο στον Echo19 ή μόνο στα εμβολιακά στελέχη, την θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm) και την περιοχή υβριδισμού κάθε μορίου, έτσι ώστε να επιλεχθούν τα καταλληλότερα ζεύγη και να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος.

Έτσι σε πιθανά ανασυνδυασμένα στελέχη θα αναμενόταν να υπάρχει ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του μορίου με όλα τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που θα δοκιμάζονταν, τόσο με εκκινητές ειδικούς για τα εμβολιακά στελέχη, όσο και με εκκινητές ειδικούς για τους Εντεροϊούς της ομάδας B .

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Πολικότητα	Περιοχή	Προϊόν(bp)	Tm
SAB222S	ATCCGTTACCCGCTTGTGTA	Sence	5'UTR	1800	58.4
SAB2031A1	GGAGAGAGTGACAGGCAGAG	Antisense	VP3	1800	62.5
SAB2549A2	GAAGTCGGGGGAACCAAT	Antisense	VP1	2300	56.1
SAB2541A3	TGTTGCTTCGGGAGTGAC	Antisense	VP1	2300	56.1
UG1	TTTGTGTCAGCGTGTAAATG	Sence	VP3	470	56
UC1	GAATTCCATGTCAAATCTAGA	Antisense	VP1	470	72
SAB4007S	GAAGACACCACAACAGTGCTC	Sence	2B	1400	61.3
SAB5404A	GGGCACATTGGGTCTTTT	Antisense	3B	1400	53.9
UG23	AAGGGATTGGAGTGGGTGTC	Sence	2B	800	47
UC15	CATCTCTTGAAGTTTGCTGG	Antisense	2C	800	54
CHR1	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	Sence	2C	800	65
CHR2	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	Antisense	3A	800	64
SAB5150S	ACGAGTCCCCCTCCTGAAT	Sence	3A	1300	59.5
SAB6448A	CAGTGGGAGGTTGATTCCAT	Antisense	3D	1300	58.4
HEV-B (481)	ACCCTACYGYAYTAACCGAAC	Sence	3'UTR	40	58
HEV-B(424)	CCGCACCGAAYGCGGAACAATTTAC	Antisense	3'UTR	40	58

Πίνακας 5 : Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν.

6.2.5 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι θετικής πολικότητας RNA, θα πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA, ώστε να ακολουθήσει η ενίσχυση με PCR συγκεκριμένων περιοχών του γενώματος του ιού.

Σε eppendorf των 500 μ l προστέθηκαν 5 μ l RNA (από κάθε δείγμα) και 7 μ l από το μείγμα (M1), το οποίο περιείχε τυχαίους εκκινητές HEPTAN (N7) (Metabion) (100 pmol), 10mM από κάθε dNTP και 5 μ l ddH₂O. Στη συνέχεια τα δείγματα (eppendorf) φυγοκεντρήθηκαν και επώαστηκαν στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή. Αμέσως μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκε το δεύτερο μείγμα (M2). Το M2 περιείχε 4 μ l 5x first strand buffer, 2 μ l 0,1M DTT, 1 μ l ddH₂O, 0,5 μ l RNase out (20 u/ μ l) καθώς και 100 u ένζυμο RT M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση αρχικά στους 25°C για 10 min, μετά στους 37°C για 50 min και τέλος στους 70°C για 15 min.

6.2.6 DOP-PCR

Μια έκδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), που ονομάζεται PCR εκφυλισμένων ολιγονουκλεοτιδίων (DOP-PCR), έχει αναπτυχθεί για μελέτες χαρτογράφησης του γονιδιώματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτίδια μερικώς εκφυλισμένης αλληλουχίας. Αυτός ο εκφυλισμός, μαζί με ένα πρωτόκολλο PCR που χρησιμοποιεί μία χαμηλή αρχική θερμοκρασία υβριδοποίησης, εξασφαλίζει την υβριδοποίηση των εκφυλισμένων ολιγονουκλεοτιδίων από πολλαπλές ομοιόμορφα κατανεμημένες θέσεις εντός ενός δεδομένου γονιδιώματος. Επιπλέον, καθώς έχει επιτευχθεί αποτελεσματική ενίσχυση των γονιδιωμάτων όλων των ειδών που εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή, η μέθοδος φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το είδος του γονιδιώματος που εξετάζεται. Έτσι, για τη γενική ενίσχυση του DNA στόχου, η DOP-PCR εμφανίζει πλεονεκτήματα σε αντίθεση με την PCR σε διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IRS-PCR), η οποία βασίζεται στην κατάλληλη τοποθέτηση των επαναλαμβανόμενων στοιχείων ειδικών για κάθε είδος. Σε συνδυασμό με τη διαλογή ροής

χρωμοσωμάτων, η DOP-PCR έχει εφαρμοσθεί για τον χαρακτηρισμό των ανώμαλων χρωμοσωμάτων και επίσης για την κλωνοποίηση νέων γενετικών δεικτών για συγκεκριμένες περιοχές του χρωμοσώματος. Ως εκ τούτου, η DOP-PCR αντιπροσωπεύει μια ταχεία, αποτελεσματική, αρκετά πιο ευαίσθητη και ανεξάρτητη από το είδος του οργανισμού τεχνική για τη γενική ενίσχυση του DNA.

Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε DOP-PCR για την ανίχνευση του ιού σε βιολογικά υλικά που περιέχουν μίγματα κυττάρων και ιών και για το διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων των ιών από αυτά των κυττάρων. Έτσι πραγματοποιείται μία μη-ειδική ενίσχυση του ιού. Με το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της DOP-PCR όπου στο gel αγαρόζης εμφανίζονται πολλές έντονες ζώνες από τις οποίες επιλέγουμε αυτές που μας ενδιαφέρουν(δηλαδή που αντιστοιχούν στο μέγεθος του προϊόντος του ιού) και πραγματοποιούμε σε αυτές nested-PCR.

Ένα πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την DOP-PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια.

1. Ένα αρχικό στάδιο στους 94°C για 5min.
2. Αποδιάταξη στους 94°C για 5min.
3. Ένα στάδιο με ποικίλες θερμοκρασίες και χρόνους υβριδοποίησης ειδικό για κάθε εκκινητή που χρησιμοποιείται ανάλογα με το Tm του καθενός. Εδώ εφαρμόστηκαν θερμοκρασίες από 25°C-55°C (25°C, 30°C, 37°C, 42°C, 55°C) για 5min/4min/3min/2min/1min αντίστοιχα.
4. Ακολουθεί ένα στάδιο 0,1°C/sec εως 30°C, 37°C, 42°C και 55°C.
5. Και τέλος το στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 2min. Το τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται για 35 κύκλους.
6. Ακολουθεί ένα στάδιο στους 72°C για 10min και συντήρηση στους 4°C.

6.2.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε eppendorf των 200 μl. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα αποτελείται από 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 50 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική

συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράση (Καρα Taq Polymerase), 3 μl cDNA από κάθε δείγμα και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε στάδια-φάσεις και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου.

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές. Το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων ισούται με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA-στόχου που επεκτείνεται. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης και πολυμερισμού-επιμήκυνσης, οι οποίες είναι ξεχωριστές για κάθε ζεύγος εκκινητών (Πίνακας 6). Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτατες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40°C να λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό.

Η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου.

Ζεύγος Εκκινητών	Συνθήκες	Μέγεθος Προϊόντος	Αριθμός Κύκλων
SAB222S / SAB20131A1	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 2min	1800	30
SAB222S / SAB2549A2	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 53°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 2min 30sec	2300	30
SAB222S / SAB2541A3	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 5°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 2min	2300	30
UG1 / UC1	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 43°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 1min	470	30
SAB4007S / SAB5404A	Αποδιάταξη: 95°C για 15sec Υβριδισμός: 53°C για 15sec Επιμήκυνση: 68°C για 1min 30sec	1400	40
UG23 / UC15	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 1min	800	30
CHR1/ CHR2	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec	800	30

	Υβριδισμός: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 1min		
SAB5150S/ SAB6448A	Αποδιάταξη: 95°C για 15 sec Υβριδισμός: 53°C για 15sec Επιμήκυνση: 68°C για 1min 30sec	1300	40
HEV-B(481)/HEV-B (424)	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 42°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 15sec	64	30

Πίνακας 6: Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για κάθε ζευγάρι εκκινητών

6.2.8 Auto-nested PCR

Για την ανίχνευση πιθανών ανασυνδυασμών, έγιναν επίσης και αντιδράσεις auto-nested PCR σε 2 στάδια. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 25 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράση (Kapa Taq Polymerase), και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Σε κάθε αντίδραση auto-nested PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθούν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με συνθήκες για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών και για 25 κύκλους. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις είναι μια επώαση για 5 min στους 72°C.

Στο δεύτερο στάδιο το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται για τη δεύτερη. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 25 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Paq DNA πολυμεράση (Kapa Taq Polymerase) και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Ακολουθούν τα 3 στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με συνθήκες για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών όμως για 50 κύκλους. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις είναι μια επώαση για 5 min στους 72°C.

6.2.9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR

Η εξέταση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση 1,5-3%, ανάλογα με το μέγεθος (σε kb) του επιθυμητού προϊόντος. Συγκεκριμένα, στην πιο συχνή περίπτωση όπου το επιθυμητό προϊόν κυμαίνεται από περίπου 200-900bp φτιάχνουμε μία πηκτή αγαρόζης 2% χρησιμοποιώντας: 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen Ultra-Pure Gel Agarose) τα οποία αναμιγνύουμε με 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστίθεται ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 μl από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής.

Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι 100 bp και 1kb DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30 min. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφείται. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζουμε ποιοτικά εάν ενισχύθηκε η περιοχή του DNA που μας ενδιαφέρει και εξακριβώνουμε ότι δεν πολλαπλασιάστηκαν, παράλληλα, μη ειδικά τμήματα DNA.

Διαλύματα:

5X TBE: 5,4% Tris Base, 2,75% H₃BO₃ (Merck, Germany) και 10μM EDTA διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό

Κυανό της βρωμοφαινόλης: 1mM EDTA, 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), 40% σουκρόζη.

6.2.10 Απομόνωση των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης

Αφού ελεγχθεί και φωτογραφηθεί το πήκτωμα, ακολουθεί η απομόνωση των προϊόντων της PCR. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπτονται από το πήκτωμα και τοποθετούνται σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος όλα τα προϊόντα του καθαρισμού υποβάλλονται σε μοριακή κλωνοποίηση.

6.2.11 Μοριακή κλωνοποίηση

Πριν την αλληλούχιση τμημάτων DNA είναι απαραίτητο να έχει προηγηθεί μια διαδικασία απομόνωσης των ιικών στελεχών για την αποφυγή ύπαρξης μειγμάτων, τα οποία δυσχεραίνουν τη διαδικασία της αλληλούχισης και την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής: α) η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, β) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και γ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI.

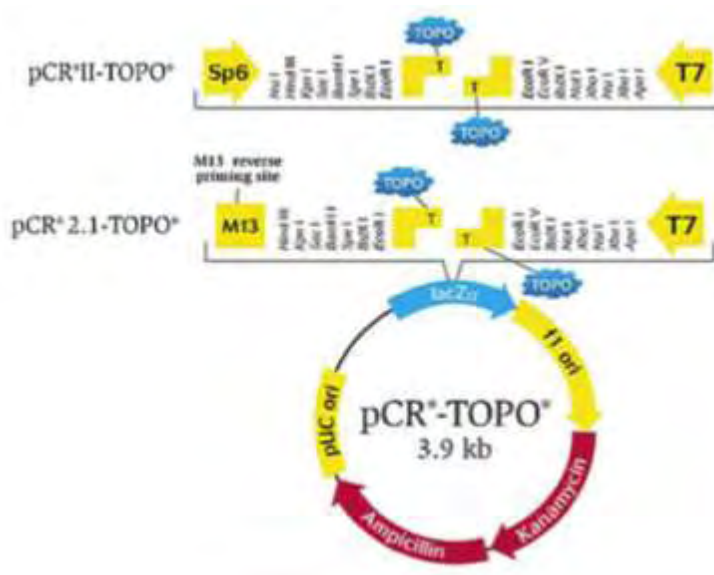
α) Αντίδραση τοποϊσομεράσης

Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.1- TOPO (Life Technologies, USA) (Εικόνα 30), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl pCR 2.1-TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH₂O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της Nested PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε πλαστικούς σωλήνες των 500μl. Στη συνέχεια προσθέτουμε ολόκληρη την ποσότητα (6μl) του προϊόντος της αντίδρασης της τοποϊσομεράσης και

ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 οC, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 2 min. Ακολουθεί η μεταφορά 200μl μετασχηματισμένων κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα με 800μl LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές/min στους 37 οC για 1 h. Έπειτα επιστρώνουμε 300μl κάθε καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Αφού προστεθούν 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA), ακολουθεί ολονύχτια επώση των τρυβλίων στους 37 οC. Την επόμενη μέρα συλλέγονται 2 – 3 λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρονται σε 2ml LB Broth με 100μl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται ολονύχτια στους 37 οC στις 210 στροφές/min. Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1-TOPO (Life Technologies, USA) και των θέσεων κοπής του ενζύμου EcoRI.

γ) Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI

Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, πραγματοποιούμε πέψη (RLFP) με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl πλασμιδιακού DNA, 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Shiga, Japan) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Ακολουθεί επώαση για 2 h στους 37 °C και μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer, για να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται τα 20μl της αντίδρασης σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2%. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts για περίπου 1 h. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI) και φωτογραφίζεται με ψηφιακή μηχανή.

6.2.12 Αλληλούχιση και επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen (Amsterdam, the Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι προαγωγείς T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε έλεγχος κάθε χρωματογραφήματος για την ποιότητά του και μελετήθηκαν οι κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως προς την ειδικότητά τους μέσω ομοπαράθεσης με τις πρότυπες αλληλουχίες (BLAST).

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Αποτελέσματα PCR

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εννέα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών σε αντιδράσεις PCR με σκοπό την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών και την ανίχνευση πιθανών ανασυνδυασμών μεταξύ των S1/Echo19 (δείγματα B4a-B8), S2/Echo19 (δείγματα D4a-D7b) και S3/Echo19 (δείγματα F4a-F7b). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους *Πίνακες 7, 8 και 9* αντίστοιχα.

Πιο αναλυτικά στον *Πίνακα 7* παρατηρούμε ότι τα δείγματα B6a και B8 έδωσαν ζώνες με όλους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο με τους ειδικούς για τα εμβολιακά στελέχη όσο και με τους εκκινητές για το πρότυπο στέλεχος Echo19. Τα δείγματα B5b, B6b, B7a και B7b έδωσαν ζώνες με σχεδόν όλους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από τα ζεύγη SAB222S/SAB2549A2 και SAB222S/SAB2541A3 τα οποία ήταν ειδικά για την ενίσχυση των εμβολιακών στελεχών S2 και S3 αντίστοιχα.

Στον *Πίνακα 8* παρατηρούμε ότι τα δείγματα D4b και D6a έδωσαν ζώνες έντονες για το D6a και λιγότερο έντονες για τα D4b με όλους τους εκκινητές, εκτός από ένα ζευγάρι εκκινητών το κάθε ένα. Το δείγμα D4b δεν έδωσε ζώνη με τους εκκινητές SAB4007S/ SAB5404A και το D6a με τους CHR1/CHR2. Τα δείγματα D4a, D5a και D7b έδωσαν εξίσου καλές ζώνες αλλά σε μικρότερο αριθμό εκκινητών.

Στον *Πίνακα 9* παρατηρούμε ότι το δείγμα F6a έδωσε ζώνες με όλους τους εκκινητές αλλά και τα δείγματα F4a, F4b, F5a, F6b, F7b έδωσαν ζώνες για λιγότερα ζεύγη εκκινητών.

Συνολικά τα δείγματα που έδωσαν ζώνες τόσο με εκκινητές ειδικούς για τα εμβολιακά στελέχη όσο και με το CHR1/CHR2 που είναι ζεύγος ειδικό για τον Echo19 επιλέχθηκαν προς αλληλούχιση.

Τα στελέχη μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση με PCR ήταν οι ιοί Sabin1, 2, 3 σε κάθε περίπτωση και ο Echo19 ως θετικοί μάρτυρες και RD ως αρνητικός μάρτυρας.

PRIMERS	ΠΕΡΙΟΧΗ	SABIN 1	ECHO19	B4a	B4b	B5a	B5b	B6a	B6b	B7a	B7b	B8	Rd(-)
SAB222S/SAB20131A1	5'UTR- VP3	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+πιο αχνή	-
SAB222S/SAB2549A2	5'UTR- VP1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+πιο αχνή	-
SAB222S/SAB2541A3	5'UTR- VP1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+πιο αχνή	-
UG1/ UC1	VP3-VP1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
SAB4007S/ SAB5404A	2B-3B	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
UG23/UC15	2B-2C	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CHR1/ CHR2	2C-3A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+πιο αχνή	-
SAB5150S/ SAB6448A	3A-3D	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+πιο αχνή	-
HEV-B(481)/HEV-B (424)	3'UTR	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

Πίνακας 7: Αποτελέσματα PCR σε δείγματα S1/Echo19.

PRIMERS	ΠΕΡΙΟΧΗ	SABIN 2	ECHO19	D4a	D4b	D5a	D5b	D6a	D6b	D7a	D7b	Rd(-)
SAB222S/SAB20131A1	5'UTR-VP3	+	-	+πιο αχνή	+πιο αχνή	+πιο αχνή	-	+	-	-	-	-
SAB222S/SAB2549A2	5'UTR-VP1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
SAB222S/SAB2541A3	5'UTR-VP1	+	-	+πιο αχνή	+πιο αχνή	+πιο αχνή	-	+	-	-	-	-
UG1/ UC1	VP3-VP1	+	-	+πολύ αχνή	+πολύ αχνή	+	-	+	-	+	+	-
SAB4007S/ SAB5404A	2B-3B	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
UG23/UC15	2B-2C	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+πολύ αχνή	-
CHR1/ CHR2	2C-3A	-	+	-	+πολύ αχνή	-	-	-	+	+ πολύ αχνή	-	-
SAB5150S/ SAB6448A	3A-3D	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
HEV-B(481)/HEV-B (424)	3'UTR	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Πίνακας 8: Αποτελέσματα PCR σε δείγματα S2/Echo

PRIMERS	ΠΕΡΙΟΧΗ	SABIN 3	ECHO19	F4a	F4b	F5a	F5b	F6a	F6b	F7a	F7b	Rd(-)
SAB222S/SAB20131A1	5'UTR-VP3	+	-	+πιο αχνή	-	-	-	+	-	-	-	-
SAB222S/SAB2549A2	5'UTR-VP1	+	-	+πιο αχνή	+πιο αχνή	-	-	+	-	-	-	-
SAB222S/SAB2541A3	5'UTR-VP1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
UG1/ UC1	VP3-VP1	+	-	+πολύ αχνή	+πολύ αχνή	+	-	+	-	+	+	-
SAB4007S/ SAB5404A	2B-3B	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
UG23/UC15	2B-2C	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+πολύ αχνή	-
CHR1/ CHR2	2C-3A	-	+	-	+πολύ αχνή	-	-	+	+	+ πολύ αχνή	-	-
SAB5150S/ SAB6448A	3A-3D	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
HEV-B(481)/HEV-B (424)	3'UTR	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Πίνακας 9: Αποτελέσματα PCR σε δείγματα S3/Echo19.

7.2 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Για τα δείγματα που έδωσαν ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση τόσο με εκκινητές ειδικούς για τα εμβολιακά στελέχη, όσο και με εκκινητές ειδικούς για τον Echo19, υπήρξε μία υπόνοια ότι μπορεί να πρόκειται περί ανασυνδυασμού και αλληλουχίσθηκαν. Ενώ για τα δείγματα που έδιναν ζώνες με εκκινητές ειδικούς μόνο για τα εμβολιακά στελέχη και μόνο για τον Echo19, δεν πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης όπως φαίνονται και στις παρακάτω εικόνες από το blast.ncbi.nlm.nih.gov, έδειξαν ότι δεν πραγματοποιήθηκε ανασυνδυασμός τόσο μεταξύ S1/Echo19 (Εικόνες 31,32), όσο και μεταξύ S2/Echo19 (Εικόνα 33) και S3/Echo19 (Εικόνα 34). Τα δείγματα που άφηναν υποψίες για ενδεχόμενο ανασυνδυασμό τελικά δεν ανασυνδυάστηκαν, αλλά παρέμειναν οι ιοί S1, S2, S3 και Echo19 αντίστοιχα.

Human poliovirus 1 strain NIE1018355, complete genome

Sequence ID: [gb|KJ170530.1](#) Length: 7388 Number of Matches: 1

Range 1: 4139 to 4936 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1456 bits(788)	0.0	795/798(99%)	1/798(0%)	Plus/Minus
Query 68	CATCTC-TGAAGTTTGCTGGTGGTGACAGTTCTTACACATTTTCAGTAGCCATGGCCATG	126		
Sbjct 4936	CATCTCTTAAAGTTTGCTGGTGGTGACAGTTCTTACACATTTTCAGTAGCCATGGCCATG	4877		
Query 127	TTCAATTTCCCATCTCTAGAATACTCATTTCATGACCTGAATGTCCATGTCGAACGCAAAG	186		
Sbjct 4876	TTCAATTTCCCATCTCTAGAATACTCATTTCATGACCTGAATGTCCATGTCGAACGCAAAG	4817		
Query 187	CGCCTGGCTAATGCATCACTGTGTGCCACAGTgggggggAAATTCTGCTTGAGTTCGTG	246		
Sbjct 4816	CGCCTGGCTAATGCATCACTGTGTGCCACAGTGGGGGGGAAATTCTGCTTGAGTTCGTG	4757		
Query 247	GATGCTAGAACGTAATTTGAAGTAAACAGGATTCCTTTCTCCTCCAGGGATGCCATGGGT	306		
Sbjct 4756	GATGCTAGAACGTAATTTGAAGTAAACAGGATTCCTTTCTCCTCCAGGGATGCCATGGGT	4697		
Query 307	GGTATAAACTCCACTGTTGATACCATCTGACAGAACAGCTTCATGTCCGCACCATCTGGG	366		
Sbjct 4696	GGTATAAACTCCACTGTTGATACCATCTGACAGAACAGCTTCATGTCCGCACCATCTGGG	4637		
Query 367	TTTTGATTTCAGGTCGTCCATAATCACCACCTCCCTGTTGTTGTATCCGTCGAAGTGTGAT	426		
Sbjct 4636	TTTTGATTTCAGGTCGTCCATAATCACCACCTCCCTGTTGTTGTATCCGTCGAAGTGTGAT	4577		
Query 427	GGATCCGGGGGTAGCGAGTACGTGGACGTGTTTCTCTTTTCAGCTATGGCTCTAGCAATC	486		
Sbjct 4576	GGATCCGGGGGTAGCGAGTACGTGGACGTGTTTCTCTTTTCAGCTATGGCTCTAGCAATC	4517		
Query 487	AGGTTGGTTGCTACAGATTTACCTGTTCCGGGGCTGCCATGTACTAGCAAACATACTGGT	546		
Sbjct 4516	AGGTTGGTTGCTACAGATTTACCTGTTCCGGGGCTGCCATGTACTAGCAAACATACTGGT	4457		
Query 547	TCAATACGGTGTGTTGCTCTTGAAGTGTATGTAGTTGTTAATGGTATGCTCTAGTTTCTGT	606		
Sbjct 4456	TCAATACGGTGTGTTGCTCTTGAAGTGTATGTAGTTGTTAATGGTATGCTCTAGTTTCTGT	4397		
Query 607	ATTCTTTTGGCTTCCACTGCGTAAAGAGGGGCAAACCTCTTAGACTGGATGGATAACCAT	666		
Sbjct 4396	ATTCTTTTGGCTTCCACTGCGTAAAGAGGGGCAAACCTCTTAGACTGGATGGATAACCAT	4337		
Query 667	CTGACATTATTGAATAGAATTTCTGCTGTTCTGACTAGGGCATGATTGGTGTATAGTT	726		
Sbjct 4336	CTGACATTATTGAATAGAATTTCTGCTGTTCTGACTAGGGCATGATTGGTGTATAGTT	4277		
Query 727	GAGATTTGGTTTTTCCAGCATTCTAGTTGTCTAAGTTTTGTTACAAATTCCAACTTATCT	786		
Sbjct 4276	GAGATTTGGTTTTTCCAGCATTCTAGTTGTCTAAGTTTTGTTACAAATTCCAACTTATCT	4217		
Query 787	CTAGCTTGTGGGATAATTTCTCCTTGAGCCAATCAATGAATTTTGAGATTTGTTTGAC	846		
Sbjct 4216	CTAGCTTGTGGGATAATTTCTCCTTGAGCCAATCAATGAATTTTGAGATTTGTTTGAC	4157		
Query 847	ACCCACTCCAATCCCTTA 864			
Sbjct 4156	ACCCACTCCAGTCCCTTA 4139			

Εικόνα 31: Αποτέλεσμα στοίχισης από το blast.ncbi.nlm.nih.gov στελεχών S1/Echo19.

Human echovirus 19 strain Burke complete genome

Sequence ID: [gb|AY302544.1|](#) Length: 7433 Number of Matches: 1

Range 1: 4278 to 5081 GenBank Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1424 bits(771)	0.0	794/805(99%)	1/805(0%)	Plus/Minus
Query 64	CCCTTGTA	CTACTGGTGGTCCCTTGAAGAGTGCCTCAAGGGTGGCCCCCTACTGTGCCTA	123	
Sbjct 5081	CCC-TGTATACTGGTGGACCTGAAACAGTGCCTCAAGGGTGGCCCCCTACTGTGCCTA	5023		
Query 124	TGGTTGTATTCCCTGAACATCTCAGTTACCAGCATGTCGAGGGAATATCTGACTTGAGTT	183		
Sbjct 5022	TGGTTGTATTCCCTGAACATCTCAGTTACCAGCATGTCGAGGGAATATCTGACTTGAGTT	4963		
Query 184	CTTCTGTCTATAAATTGGATGGCCTTTCCACACACTAACGGGCAACATTTCTTGAAGTTG	243		
Sbjct 4962	CTTCTGTCTATAAATTGGATGGCCTTTCCACACACTAACGGGCAACATTTCTTGAAGTTG	4903		
Query 244	ACAGGGCAACACTCTTCATCACACGCTCTTCACTGACATTGGCATGTTTATTTTGGCGTTT	303		
Sbjct 4902	ACAGGGCAACACTCTTCATCACACGCTCTTCACTGACATTGGCATGTTTATTTTGGCGTTT	4843		
Query 304	TGACTGTACATGGAAATGACTTCAATATTCATGTCAAAGTGGAACCTCCTTGCTAAGGCT	363		
Sbjct 4842	TGACTGTACATGGAAATGACTTCAATATTCATGTCAAAGTGGAACCTCCTTGCTAAGGCT	4783		
Query 364	CTACTGTCTGATACAGTTGGAGCATTGATGGACCCTGCATTGGTTGATGCCAAAACAAAC	423		
Sbjct 4782	CTACTGTCTGATACAGTTGGAGCATTGATGGACCCTGCATTGGTTGATGCCAAAACAAAC	4723		
Query 424	GGTGAGGTGAACAAGATGCCTTTTCTTCCAAAGCAGCCATAGGCGGTACAAAGCTTACA	483		
Sbjct 4722	GGTGAGGTGAACAAGATGCCTTTTCTTCCAAAGCAGCCATAGGCGGTACAAAGCTTACA	4663		
Query 484	CTGGAGACCATTGACAGAATAAGGAAACATCCTTTCCGTCAGGGTTCTGGCATAGATCG	543		
Sbjct 4662	CTGGAGACCATTGACAGAATAAGGAAACATCCTTTCCGTCAGGGTTCTGGCATAGATCG	4603		
Query 544	TCCATGATCACCACGGCCTGTTGTTGTAGCCGTCAAAGTGATCTGGGTCCGGTGGTAGT	603		
Sbjct 4602	TCCATGATCACCACGGCCTGTTGTTGTAGCCGTCAAAGTGATCTGGGTCCGGTGGTAGT	4543		
Query 604	GAGTAAACTGAGCTGTTTAGCTTCTCGGCAAGTGACCTTCCAATAAGGTTTGTGTCACC	663		
Sbjct 4542	GAGTAAACTGAGCTGTTTAGCTTCTCGGCAAGTGACCTTCCAATAAGGTTTGTGTCACC	4483		
Query 664	GACTTGCCGGCACCAGGGCTCCCGTGTAGGAGTAAACATACAGGTTCAATACGGCATTTG	723		
Sbjct 4482	GACTTGCCGGCACCAGGGCTCCCGTGTAGGAGTAAACATACAGGTTCAATACGGCATTTG	4423		
Query 724	GACTTGAACTGTATGTAATTGCTCATTTTCTTCTCGAGGGAGAACACCCTCTTCGCTTCC	783		
Sbjct 4422	GACTTGAACTGTATGTAATTGCTCATTTTCTTCTCGAGGGAGAACACCCTCTTCGCTTCC	4363		
Query 784	GCTGCATACAGGGGGGCATACTTCTTACAATAGTGAGCGAAGTATTGGATATTAGAAAAC	843		
Sbjct 4362	GCTGCATACAGGGGGGCATACTTCTTACAATAGTGAGCGAAGTATTGGATATTAGAAAAC	4303		
Query 844	AGCTGCTCCTGGTCACTTTGGGACG	868		
Sbjct 4302	AAATGCTCCTGATCACTTTGAGACG	4278		

Εικόνα 32: Αποτέλεσμα στοίχισης από το blast.ncbi.nlm.nih.gov στελεχών S1/Echo19.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Human poliovirus 2 strain NIE0918442, complete genome

Sequence ID: [gb|KJ170573.1|](#) Length: 7387 Number of Matches: 1

Range 1: 4141 to 4935 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1447 bits(783)	0.0	791/795(99%)	0/795(0%)	Plus/Plus
Query 71	GGGATTGGAGTGGGTGTCCAATAAGATATCCAAATTCATTAGTTGGTTGCAGGATAAAAT	130		
Sbjct 4141	GGGACTGGAGTGGGTGTCCAATAAGATATCCAAATTCATTAGTTGGTTGCAGGATAAAAT	4200		
Query 131	CATCCACAGGCGAGAGACAAATTAGAGTTTGTCTACTAACTAAAGCAATTAGAAATGCT	190		
Sbjct 4201	CATCCACAAGCGAGAGACAAATTAGAGTTTGTCTACTAACTAAAGCAATTAGAAATGCT	4260		
Query 191	TGAAAATCAGATTTCACCATACACCAATCTTGTCCTCAAGTCAAGAACATCAGGAGATCTT	250		
Sbjct 4261	TGAAAATCAGATTTCACCATACACCAATCTTGTCCTCAAGTCAAGAACATCAGGAGATCTT	4320		
Query 251	ATTCAACAATGTGCGGTGGCTATCTGTCCAGTCCAAGAGGTTGCACCACTATATGCACA	310		
Sbjct 4321	ATTCAACAATGTGCGGTGGCTATCTATCCAGTCCAAGAGGTTGCACCACTATATGCACA	4380		
Query 311	TGAAGCTAAAAGGATTCAAAAGCTGGAGCATACCATAAATAATTACGTACAGTTCAAGAG	370		
Sbjct 4381	TGAAGCTAAAAGGATTCAAAAGCTGGAGCATACCATAAATAATTACGTACAGTTCAAGAG	4440		
Query 371	CAAGCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGGCAGTCCAGGGACAGGAAAATC	430		
Sbjct 4441	CAAGCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGGCAGTCCAGGGACAGGAAAATC	4500		
Query 431	AGTTGCAACCAATCTAATTGCTAGAGCAATAGCCGAGAAAGAGAACACCTCCACATACTC	490		
Sbjct 4501	AGTTGCAACCAATCTAATTGCTAGAGCAATAGCCGAGAAAGAGAACACCTCCACATACTC	4560		
Query 491	ACTGCCACCTGATCCGTCTCACTTTGATGGCTACAAGCAACAGGGTGTGGTTATTATGGA	550		
Sbjct 4561	ACTGCCACCTGATCCGTCTCACTTTGATGGCTACAAGCAACAGGGTGTGGTTATTATGGA	4620		
Query 551	TGACCTAAACCAAAATCCAGACGGAGCAGACATGAAACTTTTTTGTCAAATGGTGTCCAC	610		
Sbjct 4621	TGACCTAAACCAAAATCCAGACGGAGCAGACATGAAACTTTTTTGTCAAATGGTGTCCAC	4680		
Query 611	TGTGGAGTTTATTCCACCGATGGCCTCGCTAGAAGAGAAAGGCATTTTGTTCACATCTAA	670		
Sbjct 4681	TGTGGAGTTTATTCCACCGATGGCCTCGCTAGAAGAGAAAGGCATTTTGTTCACATCTAA	4740		
Query 671	TTACGTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCGGATCACACCACCCACGGTGGCTCACAGTGA	730		
Sbjct 4741	TTACGTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCGGATCACACCACCCACGGTGGCTCACAGTGA	4800		
Query 731	TGCGCTGGCCAGGAGATTGCGATTTGACGTGGACATACAAGTCATGAGCGAGTACTCCAG	790		
Sbjct 4801	TGCGCTGGCCAGGAGATTGCGATTTGACGTGGACATACAAGTCATGAGCGAGTACTCCAG	4860		
Query 791	AGACGGAAAGCTCAACATGGCAATGGCTACTGAAATGTGCAAAAAGTGTCAATCAACCAGC	850		
Sbjct 4861	AGACGGAAAGCTCAACATGGCAATGGCTACTGAAATGTGCAAAAAGTGTCAATCAACCAGC	4920		
Query 851	AAACTTCAAGAGATG	865		
Sbjct 4921	AAACTTCAAAAGATG	4935		

Εικόνα 33: Αποτέλεσμα στοίχισης από το blast.ncbi.nlm.nih.gov στελεχών S2/Echo19.

Download GenBank Graphics				
Human poliovirus 3 isolate P3/Jinan/1/09, complete genome				
Sequence ID: gb GU256222.1 Length: 7432 Number of Matches: 1				
Range 1: 4162 to 4956 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1447 bits(783)	0.0	791/795(99%)	0/795(0%)	Plus/Plus
Query 71	GGGATTGGAGTGGGTGTCCAATAAGATATCCAAATTCATTAGTTGGTTGCAGGATAAAAT	130		
Sbjct 4162	GGGACTGGAGTGGGTGTCCAATAAGATATCCAAATTCATTAGTTGGTTGCAGGATAAAAT	4221		
Query 131	CATCCACAGGCGAGAGACAAATTAGAGTTTGTCACTAAACTAAAGCAATTAGAAATGCT	190		
Sbjct 4222	CATCCACAAGCGAGAGACAAATTAGAGTTTGTCACTAAACTAAAGCAATTAGAAATGCT	4281		
Query 191	TGAAATCAGATTTCCACCATACACCAATCTGTCCAAGTCAAGAACATCAGGAGATCTT	250		
Sbjct 4282	TGAAATCAGATTTCCACCATACACCAATCTGTCCAAGTCAAGAACATCAGGAGATCTT	4341		
Query 251	ATTCAACAATGTGCGGTGGCTATCTGTCCAGTCCAAGAGGTTTGCACCACTATATGCACA	310		
Sbjct 4342	ATTCAACAATGTGCGGTGGCTATCTATCCAGTCCAAGAGGTTTGCACCACTATATGCACA	4401		
Query 311	TGAAGCTAAAAGGATTCAAAGCTGGAGCATACCATAAATAATTACGTACAGTTCAAGAG	370		
Sbjct 4402	TGAAGCTAAAAGGATTCAAAGCTGGAGCATACCATAAATAATTACGTACAGTTCAAGAG	4461		
Query 371	CAAGCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGGCAGTCCAGGGACAGGAAAATC	430		
Sbjct 4462	CAAGCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGGCAGTCCAGGGACAGGAAAATC	4521		
Query 431	AGTTGCAACCAATCTAATTGCTAGAGCAATAGCCGAGAAAGAGAACACCTCCACATACTC	490		
Sbjct 4522	AGTTGCAACCAATCTAATTGCTAGAGCAATAGCCGAGAAAGAGAACACCTCCACATACTC	4581		
Query 491	ACTGCCACCTGATCCGTCTCACTTTGATGGCTACAAGCAACAGGGTGTGGTTATTATGGA	550		
Sbjct 4582	ACTGCCACCTGATCCGTCTCACTTTGATGGCTACAAGCAACAGGGTGTGGTTATTATGGA	4641		
Query 551	TGACCTAAACCAAAATCCAGACGGAGCAGACATGAAACTTTTTTGTCAAATGGTGTCCAC	610		
Sbjct 4642	TGACCTAAACCAAAATCCAGACGGAGCAGACATGAAACTTTTTTGTCAAATGGTGTCCAC	4701		
Query 611	TGTGGAGTTTATTCCACCGATGGCCTCGCTAGAAGAGAAAGGCATTTTGTTCACATCTAA	670		
Sbjct 4702	TGTGGAGTTTATTCCACCGATGGCCTCGCTAGAAGAGAAAGGCATTTTGTTCACATCTAA	4761		
Query 671	TTACGTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCGGATCACACCACCCACGGTGGCTCACAGTGA	730		
Sbjct 4762	TTACGTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCGGATCACACCACCCACGGTGGCTCACAGTGA	4821		
Query 731	TGCGCTGGCCAGGAGATTGCGATTTGACGTGGACATACAAGTCATGAGCGAGTACTCCAG	790		
Sbjct 4822	TGCGCTGGCCAGGAGATTGCGATTTGACGTGGACATACAAGTCATGAGCGAGTACTCCAG	4881		
Query 791	AGACGGAAAGCTCAACATGGCAATGGCTACTGAAATGTGCAAAAAGTGTATCAACCAGC	850		
Sbjct 4882	AGACGGAAAGCTCAACATGGCAATGGCTACTGAAATGTGCAAAAAGTGTATCAACCAGC	4941		
Query 851	AAACTTCAAGAGATG	865		
Sbjct 4942	AAACTTCAAAAGATG	4956		

Εικόνα 34: Αποτέλεσμα στοίχισης από το blast.ncbi.nlm.nih.gov στελεχών S3/Echo19.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολιοϊοί, ο αιτιολογικός παράγοντας της πολιομυελίτιδας (κοινώς γνωστοί ως polio), είναι RNA ιοί που κατατάσσονται στους ανθρώπινους εντεροϊούς της ομάδας C της οικογένειας Picornaviridae (Ryan, et.al 2004). Είναι δομικά παρόμοιοι με άλλους ανθρώπινους εντεροϊούς (coxsackieviruses, echoviruses, rhinoviruses) και εμφανίζουν σχετικά υψηλό ρυθμό μετάλλαξης.

Οι Echo ιοί είναι ένας τύπος RNA ιών που ανήκει στο είδος Εντεροϊών B της οικογένειας Picornaviridae (Ryan, et.al 2004) και προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις και ασθένειες, από ελαφριά εμπύρετη νόσο έως και σοβαρές, δυνητικά θανατηφόρες καταστάσεις (π.χ., άσηπτη μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, παράλυση, μυοκαρδίτιδα) (Khetsuriani, et.al 2005).

Όπως όλοι οι RNA ιοί, έτσι και οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από την συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων που συμβαίνουν λόγω του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσης λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών αυτών (μηχανισμός proof-reading) (Wimmer, et.al 1993). Η απουσία ενός μηχανισμού ελέγχου της RNA πολυμεράσης για την πιστότητα της αντιγραφής του ιικού RNA, έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των Εντεροϊών, ώστε να έχουν μικρό γένωμα, γεγονός που οδηγεί σε ρυθμούς μεταλλάξεων πολύ μεγαλύτερους από αυτούς που παρατηρούνται κατά την αντιγραφή του DNA από τις αντίστοιχες DNA πολυμεράσες (Domingo, et.al 1985).

Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται στις περιοχές στο εξωτερικό του ιικού καψιδίου, καθώς εξελίσσονται πιο γρήγορα λόγω της ισχυρής εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Muir, et.al 1998). Από αυτές τις δομικές πρωτεΐνες η VP1 συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις. Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι επίσης η 5'UTR περιοχή, με εξαίρεση τα cis δραστικά γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, το cloverleaf και CRE, και στην ιική μετάφραση (Nathan LY, 2010). Γι' αυτό το λόγο, οι καψιδιακές πρωτεΐνες θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες της εξέλιξης των εντεροϊών, σε σύγκριση με την 5'UTR, η οποία παρουσιάζει τους χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης.

Μαζί με τις μεταλλάξεις και οι ανασυνδυασμοί κατευθύνουν την εξέλιξη των ιών (Hirst G, 1962). Ο γενετικός ανασυνδυασμός, δηλαδή η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA, παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό, αλλά γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών. Με τον όρο ανασυνδυασμό αναφερόμαστε στον σχηματισμό νέων, ομοιοπολικά συνδεδεμένων συνδυασμών γενετικού υλικού προερχόμενα, είτε από δύο διαφορετικά πατρικά γενώματα, είτε από διαφορετικές πλευρές του ίδιου γενώματος. Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό γενετικής ποικιλομορφίας, που συμβάλλει σε πολύ σημαντικές και κρίσιμες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες των κυττάρων. Γενετικός ανασυνδυασμός έχει βρεθεί τόσο στους DNA όσο και στους RNA ιούς (Domingo E, 2006)..

Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στην διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου. Ακόμη συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) (Kyriakopoulou, et.al 2011).

Για το σκοπό αυτό στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια για την κατασκευή in vitro ανασυνδυασμών μεταξύ στελεχών του εμβολίου S1, S2, S3 (εντεοϊοί ομάδας C) και εντεροϊών της ομάδας B(Echo19). Η πειραματική διαδικασία συνίστατο στη μόλυνση των κυττάρων Rd με τα στελέχη του εμβολίου S1 ή S2 ή S3 και με Echo19 (εντεροϊό ομάδας B). Η ανίχνευση και ταυτοποίηση πιθανών ανασυνδυασμών επιτεύχθηκε με την εφαρμογή σύγχρονων μοριακών μεθόδων RT-PCR, στοχεύοντας και ενισχύοντας τμήματα σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος των ιών από το 5'UTR έως το 3'UTR. Για τις διαδικασίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν 9 ζεύγη κατάλληλων εκκινητών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, κλωνοποίηση και αλληλούχιση. Εξετάστησαν οι περισσότεροι ευμετάβλητες περιοχές του γονιδιώματος των Εντεροϊών, δηλαδή οι κωδικές περιοχές των

δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, καθώς εξελίσσονται πιο γρήγορα και καθώς συγκεντρώνουν τις περισσότερες μεταλλάξεις.

Για τα δείγματα που έδωσαν ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση τόσο με εκκινητές ειδικούς για τα εμβολιακά στελέχη, όσο και με εκκινητές ειδικούς για τον Echo19, υπήρξε μία υπόνοια ότι μπορεί να πρόκειται περί ανασυνδυασμού και αλληλουχίθηκαν. Ενώ τα δείγματα που έδιναν ζώνες με εκκινητές ειδικούς μόνο για τα εμβολιακά στελέχη και μόνο για τον Echo19, δεν πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης μέσω του blast.ncbi.nlm.nih.gov, δεν μπορεί να επιτευχθεί ανασυνδυασμός μεταξύ εντεροϊών της ομάδας B (όπως ο Echo19) και εντεροϊών της ομάδας C (S1, S2, S3).

Μέχρι σήμερα δεν έχει επιχειρηθεί *in vitro* ανασυνδυασμός μεταξύ εντεροϊών ομάδας B και ομάδας C. Η μόνη προηγούμενη μελέτη που έχει γίνει αφορούσε ένα *in vitro* σύστημα στοχευμένου ανασυνδυασμού στην 5' UTR, με σκοπό να αξιολογηθεί κατά πόσο το γονιδίωμα των πολιοϊών μπορεί να δεχθεί την 5' UTR από άλλους Εντεροϊούς (όλων των ομάδων), εφόσον η δική τους 5'UTR είχε απενεργοποιηθεί με μεταλλαξιγένεση (Muslin C, et.al 2015). Μόνο σε αυτήν την περίπτωση, στοχευμένου ανασυνδυασμού, έχει εμφανιστεί ανασυνδυασμός μεταξύ εντεροϊών διαφορετικών ομάδων. Σε κάθε άλλη περίπτωση, είτε *in vitro* στο εργαστήριο είτε στη φύση δεν έχει εμφανιστεί ακόμα κάποιος ανασυνδυασμός (μη στοχευμένος) μεταξύ εντεροϊών διαφορετικών ομάδων. Και αν πάλι εμφανιζόταν ένας τέτοιος ανασυνδυασμός δεν είναι γνωστό το κατά πόσο θα ήταν βιώσιμος και αν θα μπορούσε να επικρατήσει.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για την καλύτερη κατανόηση της φυσικής εξέλιξης των Εντεροϊών μέσω γεγονότων ανασυνδυασμού, καθώς ο γενετικός ανασυνδυασμός θεωρείται ότι είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο μεταξύ εντεροϊών, αλλά και στην ευρύτερη οικογένεια των Picorna ιών, διαμορφώνοντας την ποικιλομορφία τους. Ωστόσο, τα πρότυπα ανασυνδυασμού μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων ειδών των εντεροϊών.

Περαιτέρω πειράματα *in vitro* ανασυνδυασμού, χρησιμοποιώντας και άλλα στελέχη της οικογένειας των Εντεροϊών, μπορούν να εμβαιώσουν ή και να ανατρέψουν την παραπάνω υπόθεση.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). Archives of Virology 158: 2023–2030.
2. **Agol V. I. 1997.** Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. Seminars in Virology 8:77-84
3. **Akst, Jef** (1 July 2015). "Driven to Extinction". The Scientist. Retrieved 11 November 2015.
4. **Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D.** An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein.1978. Cell 1978;15:1439–1446.
5. **Andino R1, Silvera D, Suggett SD, Achacoso PL, Miller CJ, Baltimore D, Feinberg MB.** Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. The Rockefeller University, New York, New York, United States.10/1994; 265(5177):1448-51. DOI: 10.1126/science.8073288.
6. **Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S** (eds.) (2009). "Poliomyelitis". Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book) (PDF) (11th ed). Washington DC: Public Health Foundation. pp. 231–44.
7. **Bacon C. J. & Sims D. G.** Echovirus 19 infection in infants under six months. Arch Dis Child 51, 631–633 (1976).
8. **Baltimore D.** Evolution of RNA Viruses.1980 Department of Biology Center for Cancer Research Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts 02139.
9. **Barton DJ, Clark SJ, Eleazer PD, Scheetz JP, Farman AG.** Tuned-aperture computed tomography versus parallax analog and digital radiographic images in detecting second mesiobuccal canals in maxillary first molars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Aug;96(2):223-8.
10. **Bell EJ, McCartney RA, Basquill D, Chaudhuri AK.** (1986) Mu-antibody capture ELISA for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. J Med Virol. 1986 Jul;19(3):213-7.
11. **Bergelson, J.M., M. Chan, K.R. Solomon, N.F. St. John, H. Lin, and R.W. Finberg,** (1994). Decay –accelarating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol- anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6245-6248.
12. **Bolonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2006). Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B Cocksackie viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions. Virus Genes 32:249-59.

13. **Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al.** An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005;79:11962–11973.
14. **Casas I., Powell L., Klapper P. E., and Cleator G. M.** (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 53: 25 – 36.
15. **CDC:** Centers for Disease Control and Prevention.
16. **Chandra R** (14 June 1975). "Reduced secretory antibody response to live attenuated measles and poliovirus vaccines in malnourished children". *Br Med J* 2 (5971): 583–5.
17. **Chamberlin SL, Narins B** (eds.) (2005). *The Gale Encyclopedia of Neurological Disorders*. Detroit: Thomson Gale. pp. 1859–70. ISBN 0-7876-9150-X.
18. **Chezzi C** (July 1996). "Rapid diagnosis of poliovirus infection by PCR amplification". *J Clin Microbiol* 34 (7): 1722–5.
19. **Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL.** (1988) Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 1988 Dec;26(12):2576-80.
20. **Colston E, Racaniello VR.** Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J* 1994;13:5855–5862.
21. **Davis L, Bodian D, Price D, Butler I, Vickers J** (1977). "Chronic progressive poliomyelitis secondary to vaccination of an immunodeficient child". *N Engl J Med* 297 (5): 241–5.
22. **De Jesus NH** (2007). "Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis". *Virol. J.* 4:70.doi:10.1186/1743-422X-4-70.
23. **Didier Hober¹, Famara Sané¹, Karena Riedweg¹, Ilham Moumna¹, Anne Goffard¹, Laura Choteau¹, Enagnon Kazali Alidjinou¹ and Rachel Desailoud¹**] Université Lille 2, CHRU, Laboratoire de Virologie/ EA3610, 59037 Lille, France
24. **Domingo E., Martinez – Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortin J., Lopez – Galindez C., Perez – Brena P., Villanueva N., Najera R., et al.** (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review. *Gene* 40(1): 1 – 8
25. **Echeverri AC, Dasgupta A.** Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995; 208:540–553.
26. **Evans C** (1960). "Factors influencing the occurrence of illness during naturally acquired poliomyelitis virus infections" (PDF). *Bacteriol Rev* 24 (4): 341–52.
27. **Falconer M, Bollenbach E** (2000). "Late functional loss in nonparalytic polio". *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 79 (1): 19–23.

28. **Figlerowicz M, M. Magdalena Alejska, A. Kurzynska-Kokorniak.** Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518 (2003)
29. **Fine P, Carneiro I** (15 November 1999). "Transmissibility and persistence of oral polio vaccine viruses: implications for the global poliomyelitis eradication initiative". *Am J Epidemiol* 150 (10): 1001–21.
30. **Fricks CE, Hogle JM.** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990;64:1934–1945.
31. **Gavrilin GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM, Agol VI.** (2000). Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol* 74:7381-90.
32. **Gawande A** (12 January 2004). "The mop-up: eradicating polio from the planet, one child at a time". *The New Yorker*: 34–40. ISSN 0028-792X.
33. **Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., and Agol A. I.** (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* 73(11): 8958 – 8965
34. **Goodsell DS** (1998). *The machinery of life*. New York: Copernicus. ISBN 0-387-98273-6
35. **Gromeier M., Alexander L., and Wimmer E.** (1996) Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *PNAS*. 93(6): 2370 – 2375
36. **Guskey LE, Smith PC, Wolff DA.** Patterns of cytopathology and lysosomal enzyme release in poliovirus- infected HEp-2 cells treated with either 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole or guanidine HCl. *J Gen Virol* 1970;6:151-161.
37. **Hammon W** (1955). "Passive immunization against poliomyelitis". *Monogr Ser World Health Organ* 26: 357–70.
38. **Hellen C. U., Facke M., Krausslich H. G., Lee C. K., Wimmer E.** (1991) Characterization of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* 65(8): 4226 – 4231.
39. **Hirst G. K.** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 303 – 309.
40. **Hogle J** (2002). "Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways". *Annu Rev Microbiol* 56: 677–702. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160757.
41. **Horstmann D** (1950). "Acute poliomyelitis relation of physical activity at the time of onset to the course of the disease". *J Am Med Assoc* 142 (4): 236–41.
42. **ICTV: Virus Taxonomy** 2015.

43. **Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P.** Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol* 1993 67:2961–2971.
44. **Kauder S. E. and Racaniello V. R.** (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113(12): 1743 – 1753 .
45. **Kessler HH, Santner B, Rabenau H, et al.** (1997). Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:976-977.
46. **Kew O, De L, Yang C-F, et al.** The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* 1993;215-246.
47. **Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, et al.** Molecular epidemiology of polioviruses. In: *Kew OM, Nathanson N, eds. Molecular Epidemiology. Seminars in Virology, Vol 6. New York: Academic Press; 1995:401-414.*
48. **Kew O, Sutter R, de Gourville E, Dowdle W, Pallansch M** (2005). "Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication". *Annu Rev Microbiol* 59: 587–635. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123625. PMID 16153180.
49. **Khetsuriani N, Parashar UD.** (2006) Enteric viral infections. In: Dale DC, Federman DD, eds. *Scientific American medicine*. New York, NY: WebMD, Inc.; 2003:1758--66.
50. **King AMQ.** Genetic recombination in positive strand RNA viruses. In: *Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P, eds. RNA Genetics. Boca Raton FL: CRC Press; 1988.*
51. **Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981; 291:547–553.
52. **Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47(3): 433 – 443 77.
53. **Knipe D. M., and Howley P. M.** (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
54. **Knowles N. J., Hovi T., Hyypia T., King A. M. Q., Lindberg A. M., Pallansch M. A M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R.** *Picornaviridae*. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (2012) Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: (2012) Elsevier, pp 855-880.
55. **Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N, Takeuchi K, Takegami T, Nomoto A.** The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* 1990 Oct.
56. **Koike S, Ise I, Nomoto A.** Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4104-4108.
57. **Kopecka H, Brown B, Pallansch M.** Genotypic variation in coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. *Virus Res* 1995; 38:125-136.

58. **Koprowski, Hilary** (15 October 2010). "Interview with Hilary Koprowski, sourced at History of Vaccines website". College of Physicians of Philadelphia. Retrieved 15 October 2010.
59. **Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., Markoulatos P.** (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* 151:1117-32.
60. **Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P.** (2007) Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58(4): 407 – 412.
61. **Kuttner-Kondo, L., Medof, M. E., Brodbeck, W. & Shoham, M.** (1996) *Protein Eng.* 9, 1143–1149.
62. **Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pliaka V, Mastorakos P, Stamati A, Pratti A, Levidiotou-Stafanou and Markoultaos P.** Molecular identification and full genome analysis of an echovirus 7 strain isolated from the environment in Greece. *Virus Genes* (2010) 40 (2), 183-192.
63. **Liao S, Racaniello V.** Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* 1997; 71:9770–9777.
64. **Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, et al.** Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol* 1995; 76:16878 1699.
65. **Lublin DM, Atkinson JP.** Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:35-58.
66. **Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., and Ilonen J.** (2005) Recombination in circulating Human Enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 86:3281-90.
67. **Magnius LO, Saleh LH, Vikerfors T, Norder H.** (1988). A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J Virol Methods.* 1988 May;20(1):73-82.
68. **Maier MK, Seth S, Czeloth N; et al.** (2007). "The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens". *European Journal of Immunology* 37 (8): 2214–25.
69. **Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A.** (2006) A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oriL by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA* 12(9): 1671 – 1682 .
70. **Melnick J. L., Rennick V., Hampil, Schmidt N. J., Ho H. H.** (1973) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the

- identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. World Health Organ.* 48(3): 263 – 268.
71. **Melnick JL.** Current status of poliovirus infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996 Jul;9(3):293-300.
 72. **Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **1989**;56:855–865.
 73. **Minor D. Philip, Morgan-Capner Peter, Muir Peter,** (2000), Enteroviruses, Principles and Practice of Clinical Virology, Fourth Edition Pages: 427–449, 2000 Published Online: 15 OCT 2002.
 74. **Mirand, A.; Henquell, C.; Archimbaud, C.; Peigue-Lafeuille, H.; Bailly, J.** Emergence of echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 166–176.
 75. **Moscufo N, Yafal AG, Rogove A, et al.** A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* 1993;67:5075–5078.
 76. **Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M.** (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202 – 227.
 77. **Murray KE, Barton DJ.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 2003;77:4739–4750.
 78. **Muslin C, Joffret ML, Pelletier I, Blondel B, Delpeyroux F.** PLoS Pathog. 2015 Nov 12;11(11):e1005266.
 79. **Nathan LY, Peter SC, Aubree G, Saira S, Guillermina K, Angel B,** et al. Human enterovirus 109: a novel interspecies recombinant enterovirus isolated from a case of acute pediatric respiratory illness in Nicaragua. *J Virol* 2010; 84(18): 9047-9058.
 80. **Nomoto A., Detjen B. M., Pozzatti R., Wimmer E.** (1977) Location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268(5617): 208 – 213.
 81. **Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA.** (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003 Apr;26(3):375-7.
 82. **Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A.** (2004) Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.* 78:855-67.
 83. **Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA.** (2006) Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol.* 2006 Jan;87(Pt 1):119-28.

84. **Ochs K., Saleh L., Bassili G., Sonntag V., Zeller A., and Niepmann M.** (2002) Interaction of translation factor eIF4B with poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.* 76(5): 2113 – 2122.
85. **OIE:** World Organisation for Animal Health.
86. **Olen M. Kew; Peter F. Wright; Vadim I. Agol; Francis Delpeyroux; Hiroyuki Shimizu; Neal Nathanson; Mark A. Pallansch** (24 October 2003). "Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge". Bulletin of the World Health Organization. Retrieved 28 October 2015.
87. **Ohri, Linda K.; Jonathan G. Marquess** (1999). "Polio: Will We Soon Vanquish an Old Enemy?". *Drug Benefit Trends* 11 (6): 41–54. Archived from the original on 5 February 2005. Retrieved 23 August 2008.
88. **Pallansch M. and Roos R.,** (2007). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 840-893
89. **Parker SP** (ed.) (1998). *McGraw-Hill Concise Encyclopedia of Science & Technology*. New York: McGraw-Hill. p. 67. ISBN 0-07-052659-1.
90. **Pathak H., Marcotte L., Wass.A, Arnold. J, Gohara. D, Filman. D,** *Journal of Virology.* 05/2007; 81(7):3583-96.
91. **Paul JR** (1971). *A History of Poliomyelitis.* (Yale studies in the history of science and medicine). New Haven, Conn: Yale University Press. ISBN 0-300-01324-8.
92. **Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E.** (1998) Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250(1): 241 – 253.
93. **Pettersson RF, Flanagan JB, Rose JK, et al.** 5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* 1977; 268:270–272.
94. **Pfister T., C. Mirzayan, and E. Wimmer.** Molecular Biology of poliovirus. *Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.* 1999.
95. **Racaniello and Baltimore; Baltimore, D** (1981). "Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (8): 4887–91. doi:10.1073/pnas.78.8.4887. PMC 320284. PMID 6272282.
96. **Pilipenco E. V., Gmyl A. P., and Agol V. I.** (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 23(11): 1870 – 1875.
97. **Principles of Virology** Jane Flint, Vincent R. Racaniello, Glenn F. Rall, Anna Marie Skalka eISBN-13: 9781555819521.ASM Press 2015.
98. **Racaniello VR.** Poliovirus vaccines. *Biotechnology.* 1992, 20:205-22. Review. PMID: 1318134.

99. **Racaniello VR.** One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*. 2006 Jan 5;344(1):9-16.
100. **Racaniello V.** Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 796-830.
101. **Ramos-Alvarez M. & Sabin A. B.** Enteropathogenic viruses and bacteria; role in summer diarrheal diseases of infancy and early childhood. *J Am Med Assoc* 167, 147–156 (1958).
102. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987; 160:311-322.
103. **Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al.** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylation. *J Virol* 2000; 74:10371–10380.
104. **Rinaldo C** (2005). "Passive Immunization Against Poliomyelitis: The Hammon Gamma Globulin Field Trials, 1951–1953". *Am J Public Health* 95 (5): 790–9. doi:10.2105/AJPH.2004.040790.
105. **Rivers TM, Horsfall FL.** *Viral and Rickettsial Infections of Man*. J.B. Lippincott; 1959.
106. **Rohll J. B., Moon D. H., Evans D. J., and Almond J. W.** (1995) The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.* 69(12): 7835 – 7844.
107. **Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Viktorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., and Agol V. I.** (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* 155(1): 202 – 213.
108. **Romero JR.** (1999). Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Dec;123(12):1161-9. Review.
109. **Rossmann MG.** The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 1989;264:14587-14590.
110. **Rossmann MG.** The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 1989;264:14587–14590.
111. **Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM.** The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:912–919.
112. **Ryan KJ; Ray CG, ed.** (2004). **Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 537–9. ISBN 0-8385-8529-9.**
113. **SABIN AB.** Oral, live poliovirus vaccine for elimination of poliomyelitis. *Arch Intern Med*. 1960 Jul; 106:5-9.

114. **Sanofi Pasteur Inc:** Competition to develop an oral vaccine at the Wayback Machine (archived October 7, 2007) Accessed 16 December 2009.
115. **Sawyer M. H.** Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J* 18, 1033–1039; (1999).
116. **Schlegel A, Giddings Jr TH, Ladinsky MS, et al.** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 1996; 70:6576–6588.
117. **Shaukat Khan, Xiaozhong Peng, Jiang Yin, Ping Zhang, Eckard Wimmer** *Journal of Virology* July 2008 p.7167-7179.
118. **Shulman L.M., Manor Y., Azar R., Handsch R., Vonsover A., Mendelson E., Rothman S., Hassin D., Halmut T., Abramovitz B., Varsano N.** (1997). Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 35(8): 2145-9.
119. **Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway.** 2001. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95.
120. **Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J.** (2003). Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes.* 17(2-3): 113-23.
121. **Spector DH, Baltimore D.** Requirement of 3'-terminal poly-(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71:2983–2987.
122. **Stanway G., Hughes P. J., Mountford R. C., Minor P. D. and Almond J. W.** (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* 12(20): 7859 – 7875.
123. **Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71(11): 2483 – 2501.
124. **Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966–971.
125. **Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, et al.** Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 2005;170(5):769-779.
126. **Todd S, Towner JS, Brown DM, et al.** Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol* 1997; 71:8868–8874.
127. **Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans.** 1993. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
128. **Tuthill TJ, Groppelli E, Hogle JM, Rowlands DJ.** Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 343:43-89.

129. **Todd S., Nguyen J.H., Semler B.L.** (1995). RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* 69(6): 3605-14.
130. **Vaught, Maureen** (10 April 2015). "Polio Vaccine Celebrates 60th Anniversary". Rotary International. Retrieved 11 November 2015.
131. **Wang S, Cheng XX, Chen SY, Lin FQ, Chen SL, Zhu XL, Wang JX, Huang MQ, Zheng M.** *Gene*. 2016 Mar 1;578(1):124-31. doi: 10.1016/j.gene.2015.12.018. Epub 2015 Dec 9
132. **WHA:** World Health Assembly.
133. **WHO:** World Health Organization.
134. **Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao.** 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
135. **Wimmer E (1998).** "Mechanism of Injury-Provoked Poliomyelitis". *J. Virol.* 72 (6): 5056–60.
136. **Wood, Lawrence D. H.; Hall, Jesse B.; Schmidt, Gregory D.** (2005). Principles of Critical Care (3rd ed.). McGraw-Hill Professional. p. 870. ISBN 0-07-141640-4.
137. **Yin-Murphy M, Almond JW** (1996). Baron S *et al.* ed. *Picornaviruses*. in: *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.2862>
138. **Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 61:1101–1109.
139. **Yongning He, Valorie D. Bowman, Steffen Mueller, Carol M. Bator, Jordi Bella, Xiaozhong Peng, Timothy S. Baker, Eckard Wimmer, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann** *Biochemistry* 2000.
140. **Yozwiak NL, Skewes-Cox P, Gordon A, Saborio S, Kuan G, Balmaseda A, Ganem D, Harris E, DeRisi JL.** *J Virol.* 2010 Sep;84(18):9047-58.
141. **Zhang P, Mueller S, Morais MC, Bator CM, Bowman VD, Hafenstein S, Wimmer E, Rossmann MG** (November 2008). "Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (47): 18284–9.