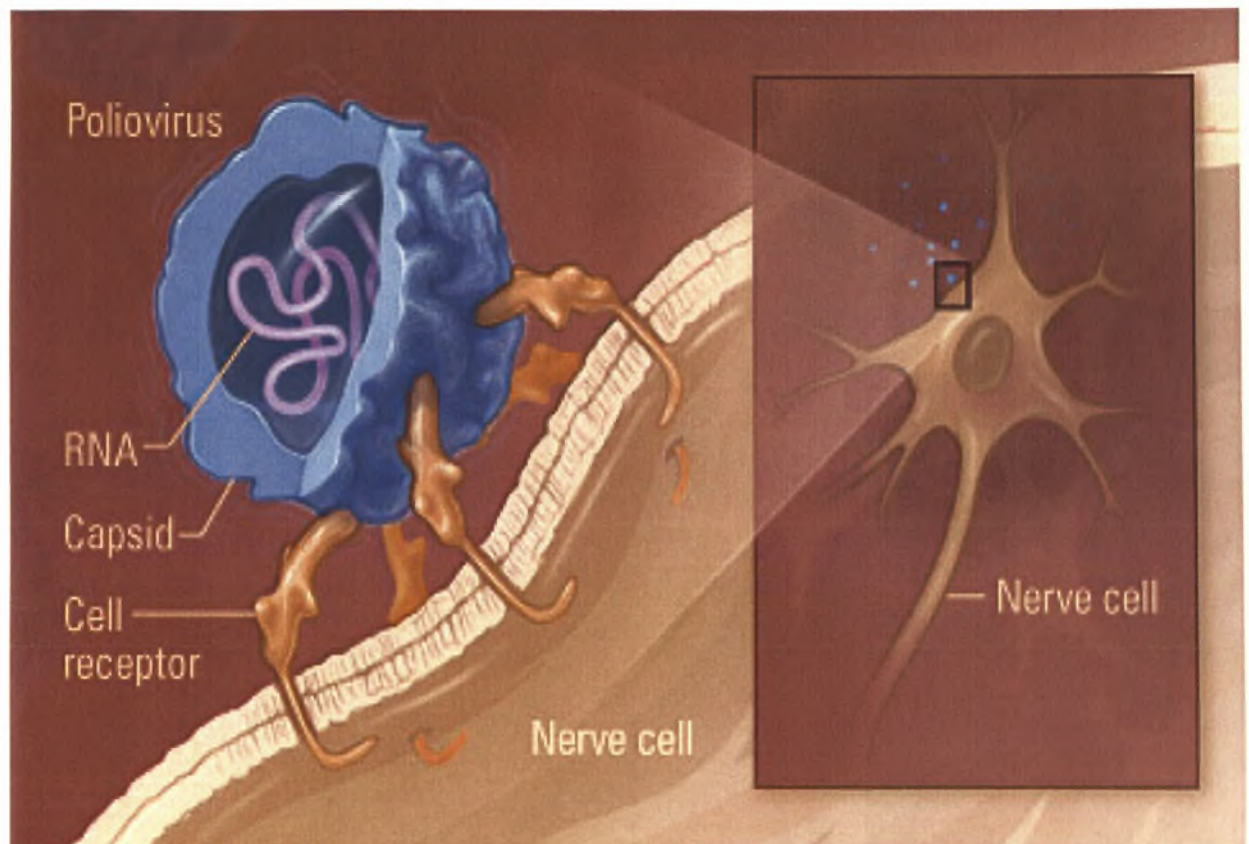


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

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



ΠΛΙΑΚΑ ΒΑΪΑ

Επιβλέπων καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

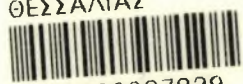
ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4728/1
Ημερ. Εισ.: 27-02-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΠΛΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087839

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από το Μάρτιο ως τον Οκτώβριο του 2005.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την συμπαράσταση, την ενθάρυνση και την βοήθεια σε όποιες δυσκολίες συνάντησα. Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Δεδεψίδα Βαγγέλη για την καθοδήγηση και την βοήθεια κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τέλος νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τις Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου και Γιάννα Παπαδοπούλου για την φιλία τους και την βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 13 κλινικά δείγματα Sabin που προέρχονταν από ασθενείς που είχαν εμβολιαστεί με το OPV. Συγκεκριμένα τα δείγματα μελετήθηκαν για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στις 5'-NTR και VP1 περιοχές του ιικού γενώματος όπου βρίσκονται οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin στελεχών. Προκειμένου να μελετήσουμε αυτές τις δύο γενωμικές περιοχές ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία: εκχύλιση του ιικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA και μετατροπή σε cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της κάθε περιοχής και αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των αλληλουχιών των δειγμάτων με ειδικά προγράμματα βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και και τυχόν αμινοξικών αλλαγών. Τέλος, μετά τον εντοπισμό των αμινοξικών αλλαγών, επιτεύχθηκε απεικόνιση των θέσεων των αμινοξικών αλλαγών της VP1 περιοχής, με τη χρήση κατατεθειμένων τρισδιάστατων δομών προτύπων στελεχών ώστε να εντοπιστεί η θέση τους στο ιικό καψίδιο και να μπορεί να προβλεφθεί η επίδρασή τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών.

Επίσης για τον καθορισμό του γενότυπου των εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 ή Sabin 3) πραγματοποιήθηκε RFLP ανάλυση η οποία βασίζεται στην πέψη του PCR προϊόντος ενός υψηλά συντηρημένου τμήματος της 5'-NTR περιοχής με τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (HaeIII, HpaII και NcoI). Από τα 13 συνολικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν δέκα στελέχη Sabin τύπου 2 και τρία στελέχη Sabin τύπου 1.

Στην VP1 περιοχή το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων ήταν συνώνυμες το οποίο συμφωνεί με το γενικό πρότυπο των μεταλλάξεων των πολιοϊών. Η πλειοψηφία των

αμινοξικών αλλαγών (Ile90Met, Lys99Glu, Thr106Ala, Phe237Ile, Ile143Thr/Val/Asn) εντοπίζεται στο εξωτερικό του καψιδίου (αντιγονικές θέσεις και θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα) ενώ μόνο δύο (Val56Ile, Phe136Cys) εντοπίζονται στο εσωτερικό του λόγω της υψηλής αντιγονικής πίεσης που υφίστανται οι πρώτες. Γενικά οι αμινοξικές αλλαγές επηρεάζουν είτε την αλληλεπίδραση ιού-αντισωμάτων (Ile90Met, Lys99Glu) είτε τα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής των πολιοϊών (αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα, απελευθέρωση του ιικού RNA στο κύτταρο ξενιστή) (Phe237Ile, Phe136Cys, Val56Ile, Ile143Thr/Val/Asn).

Σχεδόν όλα τα στελέχη εμφανίζουν ποσοστό απόκλισης της VP1 αλληλουχίας τους από την αντίστοιχη αλληλουχία των πρότυπων εμβολιακών στελεχών μικρότερη του 1% και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως Sabin-like. Εξάιρεση αποτελεί ένα μόνο στέλεχος στο οποίο το ποσοστό απόκλισης είναι 1,87% και συνεπώς χαρακτηρίζεται ως cVDPV.

Στην 5'-NTR περιοχή οι μεταλλάξεις εντοπίζονται τόσο σε μονόκλωνες όσο και σε δίκλωνες περιοχές του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου απαραίτητου για την μετάφραση των πολιοϊών. Οι μεταλλάξεις βρίσκονται σε θέσεις που αποτελούν τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin στελεχών (A481G στα Sabin τύπου 2) είτε σε άλλες θέσεις με μικρότερη επίδραση στον φαινότυπο (T398C, T437C στα Sabin τύπου 2) αλλά όλες δρουν τροποποιώντας την αναδίπλωση του RNA και επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ του RNA και παραγόντων του ξενιστή απαραίτητων για την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος. Για παράδειγμα η μετάλλαξη C583G στα στελέχη Sabin τύπου 1 επηρεάζει την αλληλεπίδραση του κυτταρικού πεπτιδίου p52 με την περιοχή VI του IRES γενετικού στοιχείου ενώ η μετάλλαξη T525C επηρεάζει την αλληλεπίδραση του παράγοντα eIF4G με την περιοχή V του IRES γενετικού στοιχείου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ
2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ
 - 2.1 Ταξινόμηση
 - 2.2 Δομή και αντιγονικότητα των ικών σωματιδίων
 - 2.3 Οργάνωση του ικού γενώματος
3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ
 - 3.1 Υποδοχέας και είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή
 - 3.2 Μετάφραση του ικού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία
 - 3.3 Αντιγραφή
 - 3.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ικών σωματιδίων
 - 3.5 Κυτταρικές αποκρίσεις στην μόλυνση με πολιοϊό
4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ
6. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
 - 7.1 Παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών
 - 7.2 Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών
8. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ
 - 8.1 Μεταλλάξεις
 - 8.2 Ανασυνδυασμός
9. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ
 - IPV (inactivated poliovirus vaccine)
 - OPV (oral poliovirus vaccine)
10. OPV ΚΑΙ VAPP (vaccine-associated paralytic poliomyelitis)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA
4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)
5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)
6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ RFLP
7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΩΝ PCR ΚΑΙ RFLP
8. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR
9. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RFLP
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ
4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ RASMOL
5. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ 5'-NTR ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

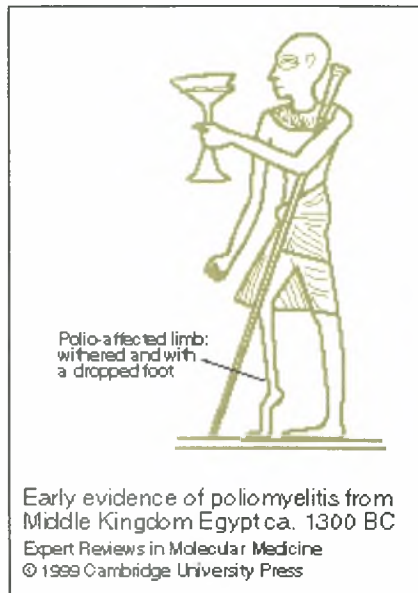
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Η πολιομυελίτιδα είναι μια ασθένεια σημαντικής παλαιότητας. Η αρχαιότερη καταγραφή της βρίσκεται σε μια επικήδειο στήλη από το μεσαίο βασίλειο της Αιγύπτου, περίπου το 1300 π. Χ (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Μία από τις εικόνες από την επικήδειο στήλη του ιερέα Rom με τυπική ένδειξη παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Από Expert Reviews in Molecular Medicine: <http://www.expertreviews.Org/>).

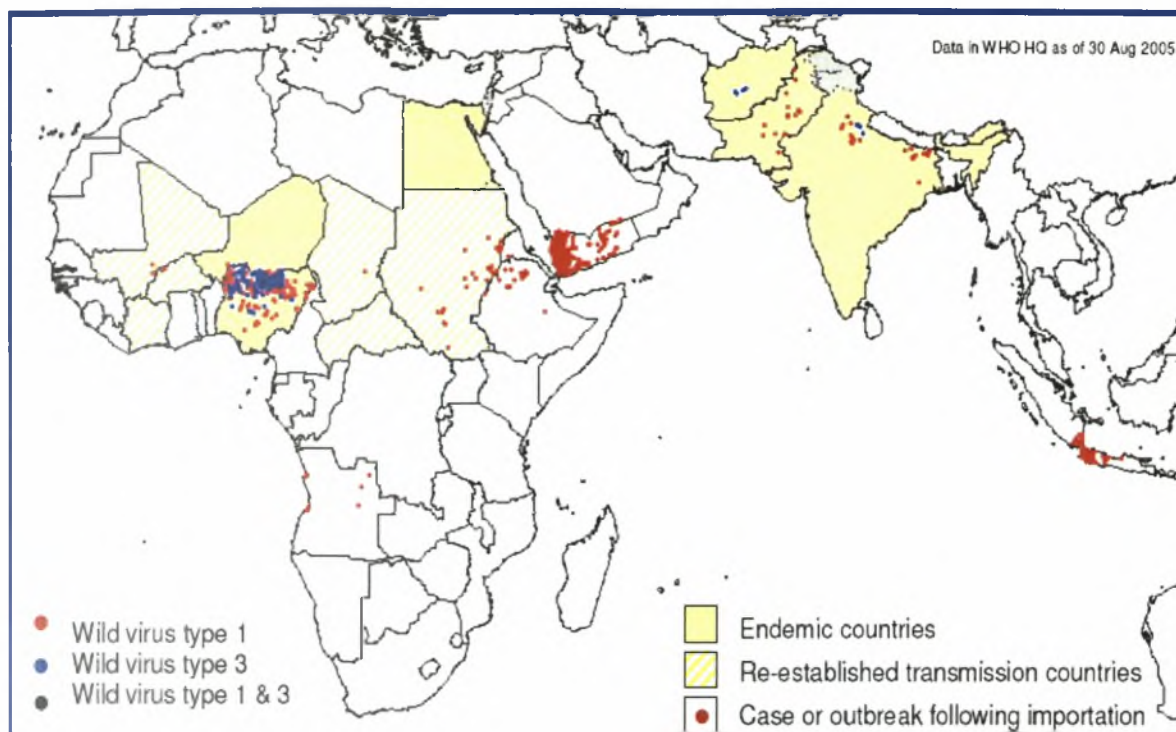
Διάφορες σποραδικές αναφορές της ασθένειας επίσης εμφανίζονται στην βιβλιογραφία από τον 17^ο και 18^ο αιώνα. Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η Βιομηχανική Επανάσταση οδήγησε σε αυξημένη αστικοποίηση στην Ευρώπη και στην βόρειο Αμερική και, μαζί με αυτό, σε σημαντικές αλλαγές και βελτιώσεις στις συνθήκες επιβίωσης. Ταυτόχρονη με αυτές τις μαζικές αλλαγές ήταν η έλευση μεγαλύτερων και πιο συχνών επιδημιών πολιομυελίτιδας. Από τα τέλη του 1800, επιδημίες εμφανίζονταν σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στις Ηνωμένες Πολιτείες και παρέμειναν ένα κύριο πρόβλημα της δημόσιας υγείας στον αναπτυσσόμενο κόσμο για το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα.

Ορόσημο στην μελέτη της πολιομυελίτιδας ήταν το επιτυχές πέρασμα του ιού σε πιθήκους από τους Landsteiner και Popper το 1909. Η διαθεσιμότητα ζωικών μοντέλων επέτρεψε τη μελέτη της ασθένειας και την απόκτηση σημαντικών πληροφοριών όσον αφορά τη διαδικασία της μόλυνσης και την παθοφυσιολογία της. Η ανάπτυξη συστημάτων καλλιέργειας ιστών από τους Enders, Weller και Robbins το 1949 επέτρεψε τον πολλαπλασιασμό in vitro του ιού και συνεπώς την περαιτέρω ανάλυση του μολυσματικού παράγοντα. Αυτή η πρόοδος, και η αναγνώριση των τριών διαφορετικών οροτύπων άνοιξε το

δρόμο για την έρευνα πάνω στα εμβόλια και στην μελέτη των βιοχημικών και βιοφυσικών ιδιοτήτων των πολιοϊών.

Από το 1950, αναπτύχθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την παρεμπόδιση της πολιομυελίτιδας μέσω εμβολιασμού. Οι Salk και Younger παρήγαγαν το πρώτο επιτυχές εμβόλιο το 1954 μέσω χημικής απενεργοποίησης του ιού με φορμαλδεΰδη κατόπιν πολλαπλασιασμού του ιού σε ιστοκαλλιέργεια. Αυτό το εμβόλιο (IPV: inactivated poliovaccine) ήταν πλήρως μη-μολυσματικό και κατόπιν χορήγησής του με τη μορφή ένεσης, προκαλούσε ανοσολογική απόκριση η οποία ήταν ικανή να παρέχει προστασία από την ασθένεια. Κατά τη διάρκεια της ίδιας περιόδου, πολλά εργαστήρια προσπαθούσαν να παράγουν εμβόλιο από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών. Τελικά το 1961 ο Sabin παρήγαγε ένα τέτοιο εμβόλιο, το OPV (oral polio vaccine). Εκστρατείες μαζικής ανοσοποίησης σε πολλές χώρες ξεκίνησαν το 1962 και 1963. Τόσο το απενεργοποιημένο εμβόλιο κατά των πολιοϊών IPV όσο και το OPV περιέχουν και τους τρεις οροτύπους των πολιοϊών. Μερικές χώρες χρησιμοποιούν το ενισχυμένο IPV εμβόλιο (eIPV) το οποίο περιέχει περισσότερες D-αντιγονικές μονάδες ανά δόση για τους οροτύπους 2 και 3 σε σύγκριση με το παραδοσιακό IPV. Η ευρεία ανοσοποίηση με το IPV και από το 1963 με το OPV έχει σχεδόν εξαλείψει την πολιομυελίτιδα στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες.

Η παγκόσμια προσπάθεια εκρίζωσης των πολιοϊών είναι ο μεγαλύτερος στόχος στον τομέα της δημόσιας υγείας στην ιστορία. Από το 1988 όταν ξεκίνησε η προσπάθεια αυτή, σημαντική πρόοδος έχει γίνει όσον αφορά την παρεμπόδιση της μετάδοσης των αγρίων στελεχών πολιοϊών και την προσπάθεια επίτευξης παγκόσμιας πιστοποίησης της εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας μέχρι το 2005. Το 1988 οι πολιοϊοί υπήρχαν σε 125 χώρες σε 5 ηπείρους και περισσότερα από 350.000 παιδιά εμφάνισαν πολιομυελίτιδα εκείνη τη χρονιά. Μέχρι το τέλος του 2002, ο αριθμός των χωρών είχε μειωθεί σε 7, οι πολιοϊοί είχαν εξαλειφθεί από 3 ηπείρους και τα αναφερόμενα περιστατικά πολιομυελίτιδας μειώθηκαν σε 1900. Η μετάδοση της πολιομυελίτιδας έχει διακοπεί στην Αμερική, στην Ευρώπη και στις δυτικές περιοχές του Ειρηνικού, και μέχρι το τέλος του 2002 περισσότερες από 180 χώρες ήταν ελεύθερες πολιοϊών. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας είχε θέσει ως στόχο την εκρίζωση της ασθένειας μέχρι το 2004 αλλά ο αριθμός των περιστατικών πολιομυελίτιδας ανήλθε σε 1.185 σε 17 χώρες από 784 σε 15 χώρες το 2003. Το 2005 αναφέρθηκαν 205 περιστατικά πολιομυελίτιδας τα οποία κατανέμονται στις εξής περιοχές: 78 στη Νιγηρία, 66 στην Υεμένη, 24 στο Σουδάν, 14 στην Ινδία, 8 στην Ινδονησία, 7 στο Πακιστάν, 5 στην Εθιοπία, 1 στο Καμερούν και 1 στο Αφγανιστάν. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η μετάδοση των πολιοϊών αγρίου τύπου κατά το έτος 2005.



Εικόνα 1.2: Απεικονίζεται η μετάδοση των πολιοϊών αγρίου τύπου 1 και 3 κατά το έτος 2005 (Από WHO).

2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

2.1 Ταξινόμηση

Οι πολιοϊοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πολιομυελίτιδα, αποτελούν μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* και συγκεκριμένα ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών. Η οικογένεια *Picornaviridae* περιλαμβάνει εκτός των Εντεροϊών επιπλέον 8 γένη (πίνακας 2.1.1) (Hyypia et al. 1997, Oberste et al. 1999).

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

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

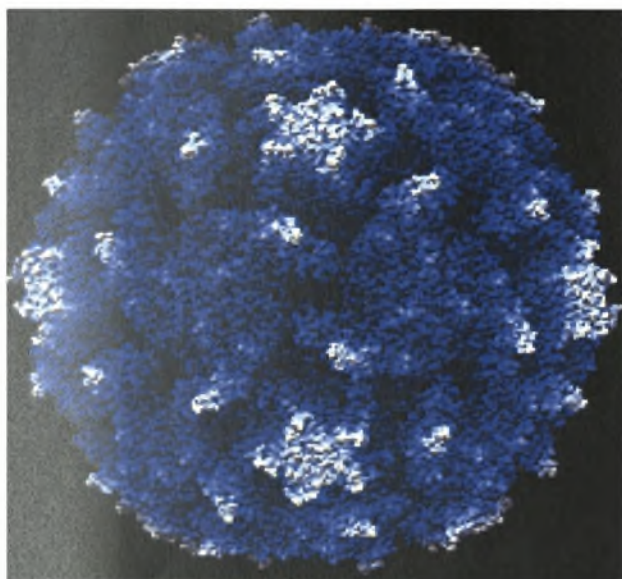
Οι Εντεροϊοί αρχικά είχαν ταξινομηθεί στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες με βάση τις ασθένειες που προκαλούσαν στους ανθρώπους και την μολυσματικότητα/παθογένεσή τους σε ενδοκρανιακώς εμβολιασμένα ποντίκια: i) πολιοϊοί (PV: υπεύθυνοι για την πολιομυελίτιδα στους ανθρώπους και γενικά μη παθογόνοι στα ποντίκια), ii) coxsackie A ιοί (CAV: υπεύθυνοι για ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος των ανθρώπων και για παράλυση στα ποντίκια), iii) coxsackie B ιοί (CBV: υπεύθυνοι για ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος των ανθρώπων και ασθένειες της καρδιάς, καθώς και της σπαστικής παράλυσης στα ποντίκια) και iv) echoviruses (E: μη παθογόνοι στα ποντίκια και γενικά δεν σχετίζονται με ασθένειες στους ανθρώπους). Ωστόσο, γρήγορα έγινε εμφανές ότι αυτό το σχήμα ήταν ανεπαρκές για την ταξινόμηση των εντεροϊών, επειδή απομονώθηκαν ιοί παθογόνοι στα ποντίκια οι οποίοι ήταν οροτυπικώς ταυτόσημοι με γνωστούς echoviruses και επιπλέον αποδείχτηκε σύντομα ότι οι echoviruses σχετίζονται με ένα μεγάλο εύρος ασθενειών στους ανθρώπους. Κατόπιν οι νεοεμφανιζόμενοι ορότυποι εντεροϊών απλώς ονομάστηκαν "Έντεροϊοί" και αριθμήθηκαν διαδοχικά, ξεκινώντας με τον EV68. Μέχρι σήμερα αναγνωρίστηκαν συνολικά 64 ορότυποι εντεροϊών. Στο πιο πρόσφατο σχήμα ταξινόμησης, το οποίο λαμβάνει υπόψη τόσο βιολογικές όσο και μοριακές ιδιότητες των ιών, οι Εντεροϊοί ταξινομούνται σε 5 είδη (πίνακας 2.1.2) (King et al. 1999). Εντούτοις το παρόν σύστημα ταξινόμησης θα πρέπει να αναθεωρηθεί καθώς η στενή γενετική συγγένεια μεταξύ των πολιοϊών και μελών του είδους HEV-C δείχνει ότι αυτοί θα έπρεπε να αποτελούν ένα μόνο είδος (Brown et al 2003).

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

Πίνακας 2.1.2: Ταξινόμηση των εντεροϊών με βάση βιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά τους (king et al. 1999).

2.2 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

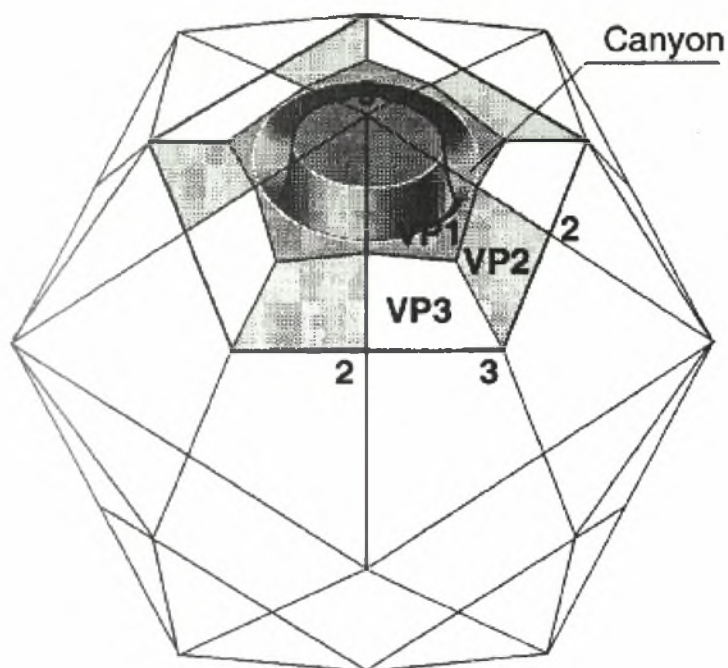
Το ιικό σωματίδιο των πολιοϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA μόριο θετικής πολικότητας το οποίο περιβάλλεται από ένα μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο. Η τρισδιάστατη δομή του ιικού σωματιδίου και των τριών οροτύπων των πολιοϊών έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (εικόνα 2.2.1) (Lentz et al. 1997).



Εικόνα 2.2.1: Η ατομική δομή του πολιοϊού τύπου 2 ύστερα από ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Είναι εμφανής οι αυλακώσεις (canyons) που περιβάλλουν τις επιφανειακές προεξοχές (star-like) στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας (Από Hogle 2002).

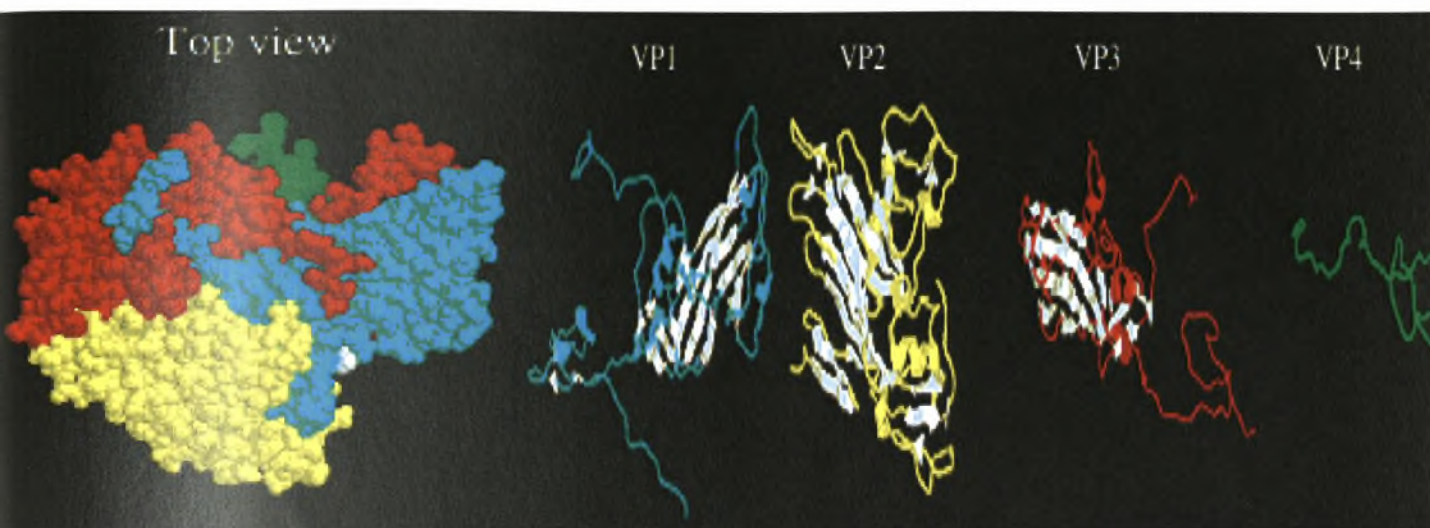
Το καψίδιο τους αποτελείται από 60 αντίγραφα κάθε μιας από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι προϊόντα πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης. Κατά την πρωτεόλυση, η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3,VP1). Κατόπιν τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και δίνουν τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)₅]. Τέλος τα πενταμερή συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν το προκαψίδιο [(VP0, VP3,VP1)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA ‘‘πακετάρεται’’ στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2. Το ώριμο πλέον ιικό σωματίδιο είναι πολύ σταθερό, για παράδειγμα, εμφανίζει ανθεκτικότητα σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS, σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε χαμηλό pH (Pfister et al. 1999). Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων

συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Πιο συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου (εικόνα 2.2.2) (Blondel et al. 1998).



Εικόνα 2.2.2: Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Είναι εμφανής οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας και οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς. Επίσης φαίνεται η αύλακα (canyon) η οποία περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας (Από Blondel et al. 1998).

Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 εμφανίζουν κοινή τριτοταγή δομή η οποία συνίσταται σε ένα 8-κλωνο αντιπαράλληλο β-βαρέλι να πλαισιώνεται από δύο α-έλικες συνδεόμενες με διαφορετικές θηλιές (εικόνα 2.2.3).



Εικόνα 2.2.3: Αριστερά φαίνεται το χωροπληρωτικό μοντέλο ενός πρωτομερούς. VP1, θαλασσί χρώμα; VP2, κίτρινο χρώμα; VP3, κόκκινο χρώμα; VP4, πράσινο χρώμα; μόριο σφιγγοσίνης (rocket factor), άσπρο χρώμα.

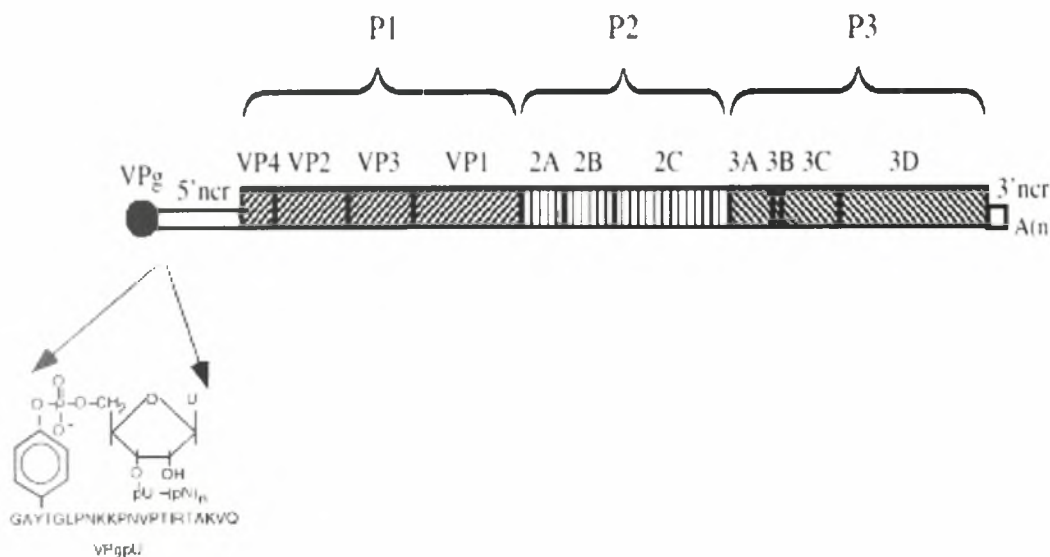
Δεξιά φαίνονται οι δευτεροταγές δομές των δομικών πρωτεϊνών (οι α-έλικες και οι θηλιές είναι τονισμένες με διαφορετικό χρώμα για την κάθε δομική πρωτεΐνη ενώ τα β-φύλλα είναι άσπρα) (Από A. Airaksinen 2000).

Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIa και N-AgIIIb. Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1. Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-226 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2. Η N-AgIIIa αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60 και 71-73 της VP3 και τέλος η N-AgIIIb από τα αμινοξέα 76-79 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2. Αξιοσημείωτο είναι ότι υπάρχουν μόνο τρεις διαφορετικές ομάδες των τεσσάρων αυτών N-Ags με αποτέλεσμα να υπάρχουν μόνο τρεις διαφορετικοί ορότυποι των πολιοϊών (PV1, PV2, PV3) οι οποίοι χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι αντισώματα που επάγονται κατά του ορότυπου 1 δεν εξουδετερώνουν 100% την μολυσματικότητα των ορότυπων 2 ή 3 (Pfister et al. 1999).

Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ. Μία βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας (εικόνες 2.2.1 και 2.2.2). Αυτή η αύλακα αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα (Blondel et al. 1998).

2.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος

Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο μολυσματικού RNA θετικής πολικότητας μεγέθους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3'-άκρο του και συνδεδεμένο με μία μικρή ιική πρωτεΐνη (VPg) στο 5'-άκρο του. Πιο συγκεκριμένα, η 5'-τελική μονοφωσφορική ομάδα του ιικού γενώματος σχηματίζει έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του τελικού νουκλεοτιδίου ουρακίλης του RNA και ενός καταλοίπου τυροσίνης της ιικής πρωτεΐνης VPg (VPg-Tyr-O⁴-pUUAAA...)(εικόνα 2.3.1) (Wimmer et al. 1993).

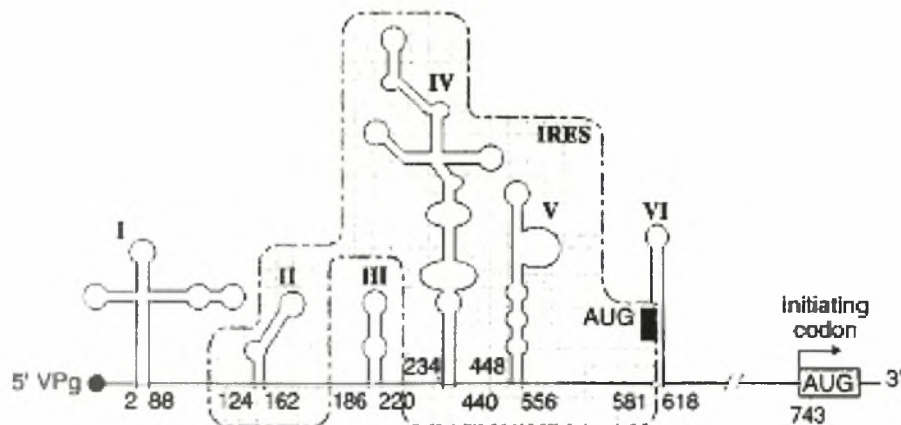


Εικόνα 2.3.1: Οργάνωση του ιικού γενώματος. Επίσης φαίνεται η VPg ιική πρωτεΐνη (δομή και αλληλουχία στην αριστερή πλευρά) η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του ιικού RNA (Από S. Mueller et al. 2005).

Η αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας στο RNA παρά στο DNA είναι μία κακή επιλογή γιατί i) το RNA είναι χημικά λιγότερο σταθερό από το DNA, ii) κατά την είσοδο στο κύτταρο το RNA είναι πιο ευαίσθητο προς αποικοδόμηση ή τροποποίηση από τα διάφορα κυτταρικά ένζυμα και iii) οι RNA ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις κυτταρικές λειτουργίες επιδιόρθωσης ώστε να περιορίσουν τα λάθη που συμβαίνουν τυχαία κατά την αντιγραφή του γενώματός τους με ρυθμό 10^{-4} ανά προστιθέμενο νουκλεοτίδιο. Γι' αυτό το λόγο οι RNA ιοί πρέπει να επιβιώνουν με υψηλούς ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης. Όλοι οι RNA ιοί, περιλαμβανομένων των πολιοϊών, έχουν ανταποκριθεί σε αυτά τα μειονεκτήματα περιορίζοντας το μέγεθος των γενωμάτων τους το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μικρότερο ή ίσο των 15.000 nt. Το μικρό μέγεθος του γενώματος και ο υψηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης έχουν το πλεονέκτημα της γρήγορης αντιγραφής και προσαρμογής σε ένα νέο περιβάλλον όπως π. χ ανθεκτικότητα σε ένα φάρμακο. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος του γενώματος προσδίδει σε αυτούς τους ιούς το μειονέκτημα ότι πρέπει να ζουν κάτω από συνθήκες υπερβολικής γενετικής αυστηρότητας (περιορισμένη χωρητικότητα κωδικοποίησης για πρωτεΐνες) (Pfister et al. 1999).

Το γένωμα των πολιοϊών είναι οργανωμένο στις εξής περιοχές: ένα μεγάλο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) το οποίο πλαισιώνεται από δύο μη-κωδικές περιοχές (NCR) 742 nt στο 5' άκρο της και 72 nt στο 3' άκρο της και συνδεδεμένη στην 3'-NCR η ουρά πολύ-A. Η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλούχιση του γενώματος και των τριών οροτύπων των πολιοϊών αποκάλυψε έναν υψηλό βαθμό ομολογίας, αν και συγκεκριμένες περιοχές όπως μία αλληλουχία 154 nt που βρίσκεται στο τέλος της 5'-NTR περιοχής και οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του καψιδίου είναι λιγότερο όμοιες (Wimmer et al. 1993).

Η 5'-NTR είναι μία περιοχή μεγέθους 742 nt και πλούσια σε περίπλοκες δευτεροταγές δομές. Τα πρώτα 100 nt σχηματίζουν μία δομή που είναι γνωστή ως cloverleaf και η οποία αποτελεί ένα απαραίτητο cis-acting γενετικό στοιχείο που εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας. Αυτή η δομή ακολουθείται από ένα δεύτερο cis-acting γενετικό στοιχείο γνωστό ως IRES (internal ribosomal entry site) μεγέθους περίπου 400 nt το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της μετάφρασης (εικόνα 2.3.2.). Η αλληλουχία της 5'-NTR περιοχής εμφανίζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών γεγονός το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής της και την συμμετοχή της σε σημαντικές λειτουργίες του ιού. Εξαίρεση αποτελεί όπως ήδη αναφέρθηκε μία αλληλουχία 154 nt που βρίσκεται μεταξύ της IRES δομής και του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου η οποία είναι λιγότερο διατηρημένη (Wimmer et al. 1993).



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

Το mRNA των πολιοϊών κωδικοποιεί ένα μόνο μεγάλο πολυπεπτίδιο και γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως μονοκιστρονικό. Όμως το πολυπεπτίδιο αυτό αποτελείται από πολλαπλές λειτουργικές περιοχές που ξεχωρίζουν μεταξύ τους κατά την διαδικασία της πρωτεόλυσης οδηγώντας έτσι στην παραγωγή των διαφόρων ικών πρωτεϊνών. Συνεπώς το πολυπεπτίδιο αυτό αποτελεί μία πολυπρωτεΐνη. Η κωδικοποίηση ενός πολυπεπτιδίου από ένα μόνο mRNA παρέχει στους ιούς αυτούς το πλεονέκτημα της περαιτέρω συμπίεσης του γενώματός τους καθώς δεν απαιτούνται γενετικά στοιχεία για την ρύθμιση της μεταγραφής υπογενωμικών mRNA. Επίσης, λόγω του φαινομένου wobble του γενετικού κώδικα, η λανθασμένη ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην τρίτη θέση των κωδικονίων τα οποία αποτελούν το ORF (85% του ικού γενώματος) δεν θα είναι τόσο καταστροφική όσο οι σημειακές μεταλλάξεις σε ρυθμιστικές περιοχές. Από την άλλη μεριά η κωδικοποίηση ενός μόνο πολυπεπτιδίου έχει το μειονέκτημα ότι απαιτούνται πολύ εξειδικευμένες πρωτεάσες για την παραγωγή των τελικών ικών πρωτεϊνών (Wimmer et al. 1993).

Η 3'-NCR περιοχή αποτελείται από 65 nt και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου αρνητικής πολικότητας. Η βιολογική της λειτουργία βασίζεται είτε σε μία δομή ψευδοκόμβου ή σε μία αλληλεπίδραση μεταξύ δύο φουρκετών σε αυτή τη περιοχή (Wimmer et al. 1993).

Η πολύ-A ουρά του γενώματος των πολιοϊών κωδικοποιείται από το ίδιο το γένωμα του ιού. Έτσι στο RNA (-) η πολύ-A ουρά προκύπτει από μία αλληλουχία πολύ-U που βρίσκεται στο 5'-άκρο του RNA (+). Αντίθετα, στα mRNA των κυττάρων η πολύ-A ουρά προστίθεται στο 3'-άκρο τους με τη βοήθεια ενζύμων τα οποία αναγνωρίζουν εξειδικευμένα σήματα

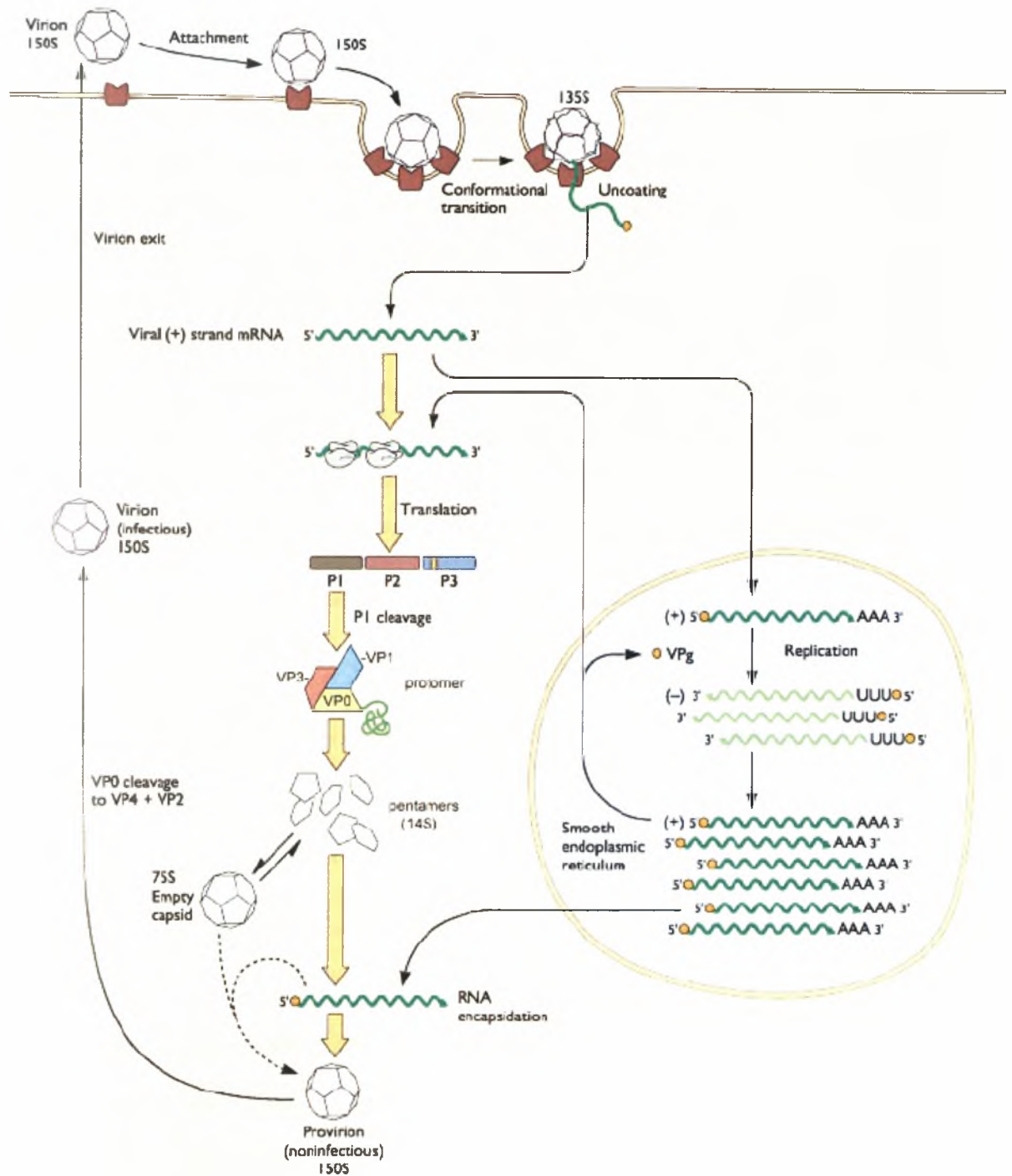
πολυαδενυλίωσης. Το μέσο μήκος της πολύ-A ουράς των πολιοϊών είναι 60 nt (μεγαλύτερο ή μικρότερο μήκος είναι μη-ιδανικό). Για παράδειγμα RNA με μήκος πολύ-A ουράς 20 nt ή λιγότερα εμφανίζει μόνο το 5% της μολυσματικότητας του φυσιολογικού ιικού RNA. Επίσης σε μολυσμένα από πολιοϊό κύτταρα εντοπίστηκαν ιικά RNA με μήκος της πολύ-A ουράς μεγαλύτερο των 60 nt, γεγονός που πιθανόν δείχνει ότι οι αδενυλοτρανσφεράσες του ξενιστή τροποποιούν τα ιικά RNA. Ωστόσο, τέτοιου είδους ιικά RNA ποτέ δεν εντοπίστηκαν σε ώριμα ιικά σωματίδια (Wimmer et al. 1993).

3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Αμέσως μετά την είσοδο του ιικού γενώματος στο κύτταρο, το ιικό RNA το οποίο είναι ίδιας πολικότητας με το mRNA αρχίζει να μεταφράζεται. Η πρωτεϊνόςύνθεση κορυφώνεται σε διάστημα 2,5 έως 3,5 ωρών μετά την μόλυνση. Κατά το ίδιο διάστημα, αρχίζουν να εμφανίζονται στο κύτταρο μεμβρανώδη κυστίδια τα οποία επάγονται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες του ιού. Η μέγιστη RNA σύνθεση καθυστερεί περίπου 1 ώρα σε σύγκριση με την πρωτεϊνόςύνθεση. Η εμφάνιση μολυσματικών ιικών σωματιδίων συνδέεται στενά με την RNA αντιγραφή. Ένας μολυσματικός κύκλος διαρκεί μόνο 6-7 ώρες και κάτω από ιδανικές συνθήκες σε κατάλληλα κύτταρα ξενιστές (π. χ. HeLa κύτταρα, μία ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά), παράγονται μέχρι και 10^5 νέα ιικά σωματίδια ανά κύτταρο. Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών μπορεί να συνοψιστεί στα ακόλουθα στάδια (εικόνα 3) (Pfister et al. 1999).

1. Ο ιός προσδένεται και αποσταθεροποιείται από τον κυτταρικό υποδοχέα CD155.
2. Η είσοδος του ιικού γενώματος στο κύτταρο ξενιστή συμβαίνει πιθανόν μέσω ενδοκύττωσης.
3. Το ιικό RNA αμέσως μεταφράζεται σε μία πολυπρωτεΐνη η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ιικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$) ώστε να παραχθούν οι λειτουργικές ιικές πρωτεΐνες. Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από το IRES γενετικό στοιχείο ενώ η διαδικασία της πρωτεόλυσης από εξειδικευμένες αμινοξικές αλληλουχίες που πλαισιώνουν τα σημεία διάσπασης.
4. Η παραγωγή της ιικής πρωτεΐνης 2BC οδηγεί στην εμφάνιση μεμβρανωδών κυστιδίων στα οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του RNA. Η πρωτεϊνόςύνθεση του κυττάρου ξενιστή αναστέλλεται από τη δράση της $2A^{pro}$ που επάγει τη διάσπαση του παράγοντα eIF-4G.
5. Η αντιγραφή του RNA ακολουθεί το κοινό μονοπάτι RNA (+) → RNA(-) → RNA (+). Η έναρξη της RNA σύνθεσης από την $3D^{pol}$ απαιτεί την VPg ιική πρωτεΐνη ως primer.

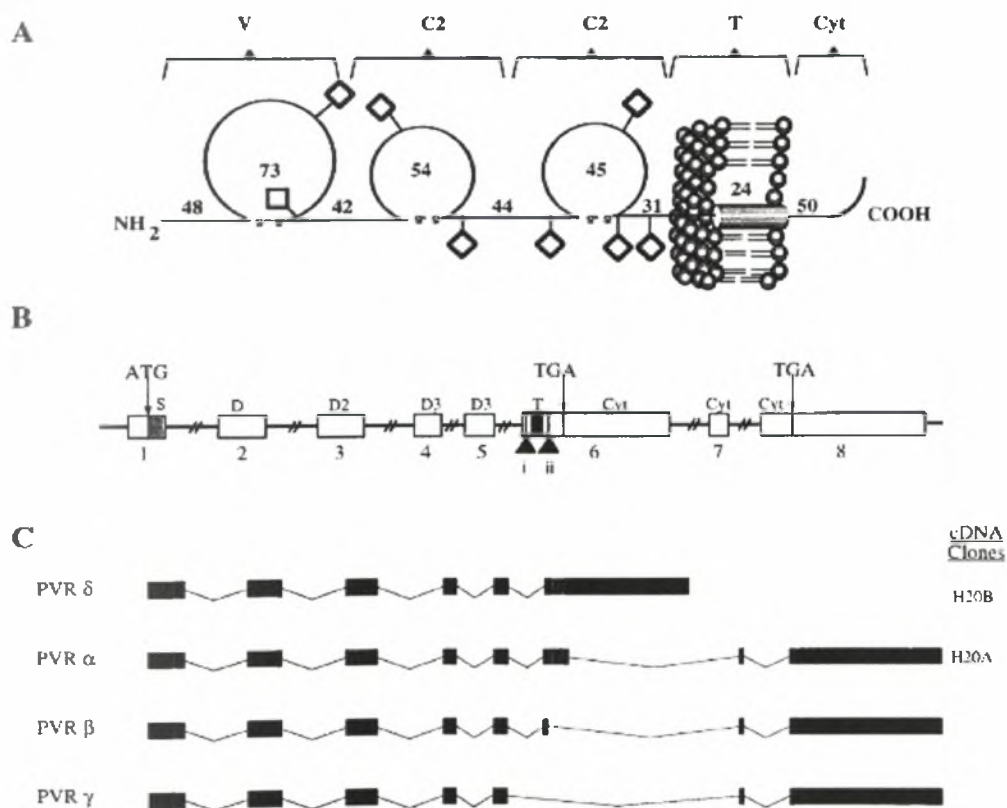
6. Τα νεοσυντεθέντα μόρια RNA (+) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μία από τις εξής τρεις διαδικασίες: i) αντιγραφή για την παραγωγή νέων μορίων RNA (+) ii) πρωτεϊνοσύνθεση iii) καψιδίωση για την παραγωγή μολυσματικών ικών σωματιδίων.
7. Τέλος, πραγματοποιείται η συναρμολόγηση των νέων ικών σωματιδίων η οποία όμως δεν είναι πλήρως κατανοητή.



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής των πολιοϊών (Από Hogle 2002).

3.1 Υποδοχέας CD155 των πολιοϊών και είσοδος στο κύτταρο ξενιστή.

Όπως αναφέρθηκε, το αρχικό γεγονός του κύκλου ζωής των πολιοϊών είναι η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα. Στους ανθρώπους ο υποδοχέας των πολιοϊών (hPVR) έχει ταυτοποιηθεί ως ένα μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών του οποίου ο φυσιολογικός ρόλος είναι ακόμα άγνωστος, αν και έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και αναγνώριση. Ο hPVR, μία γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 80 KDa, αποτελείται από τρεις εξωκυττάριες περιοχές (V-C2-C2) που έχουν τη δομή αντισώματος, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά (εικόνα 3.1.1.A). Η N-τελική V περιοχή του hPVR είναι απαραίτητη για την μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς και συνεπώς για την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Το γονίδιο του hPVR έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και περιέχει οκτώ εξόνια (εικόνα 3.3.1.B). Ο hPVR εκφράζεται ως ένα μίγμα τεσσάρων ισομορφών οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του (εικόνα 3.3.1.C): δύο ενσωματωμένες στη μεμβράνη ισομορφές (hPVRα και hPVRδ) και δύο εκκρινόμενες ισομορφές από τις οποίες απουσιάζει το εξόνιο της διαμεμβρανικής περιοχής (hPVRβ και hPVRγ). Οι ισομορφές hPVRα και hPVRδ χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς του ιού και διαφέρουν μόνο στην αλληλουχία της C-τελικής κυτταροπλασματικής περιοχής τους (Solecki et al. 1998).



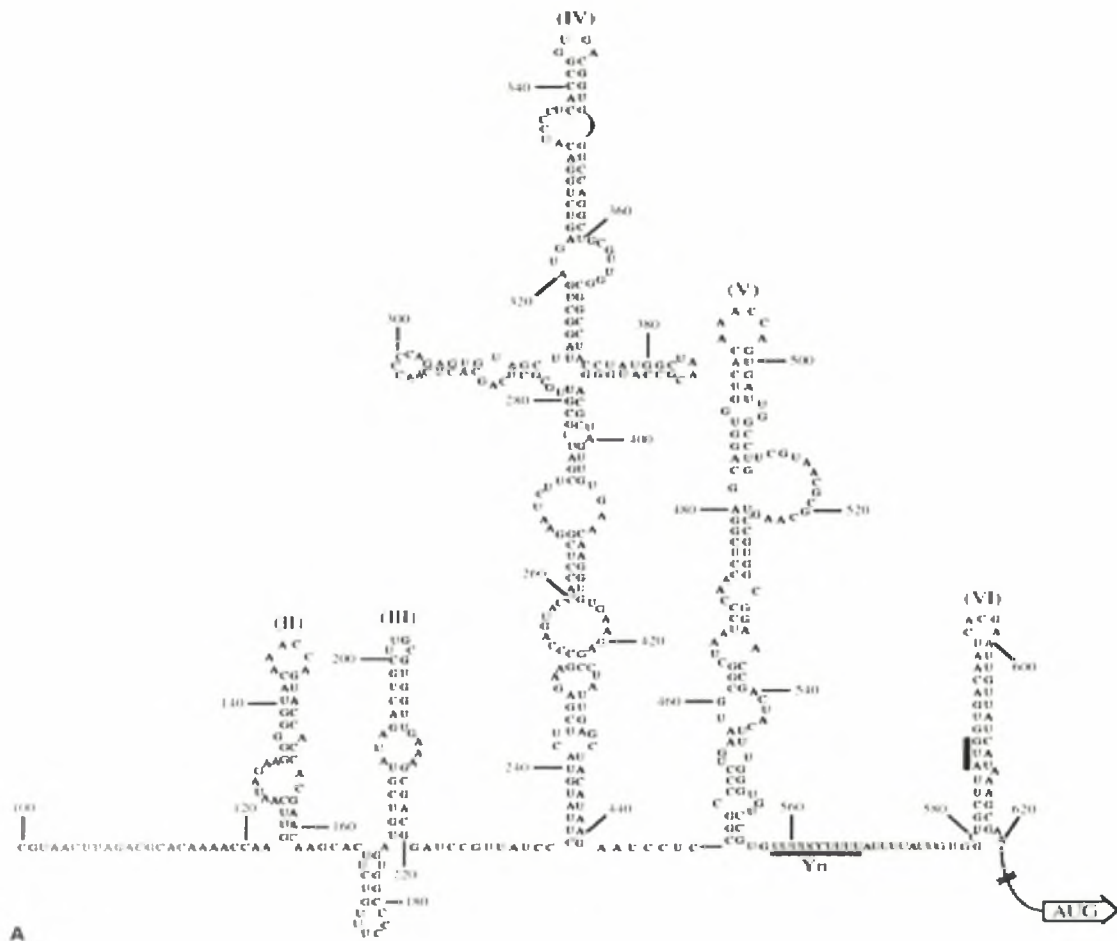
Εικόνα 3.1.1: A) οι λειτουργικές περιοχές του hPVR. B) το γονίδιο του hPVR. C) οι τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα (Από D. Solecki et al. 1998).

Ο hPVR έχει μία διπλή λειτουργία κατά την μόλυνση των πολιοϊών: είναι υπεύθυνος τόσο για την πρόσδεση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια όσο και για την αποσταθεροποίηση του ιικού σωματιδίου η οποία επιτυγχάνεται μέσω μεταβολών της διαμόρφωσης του καψιδίου απαραίτητων για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κύτταρο. Αυτές οι μεταβολές της διαμόρφωσης περιλαμβάνουν την απώλεια της εσωτερικής πρωτεΐνης του καψιδίου VP4 και την εξώθηση του εσωτερικού N-τελικού άκρου της VP1. Αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών είναι ότι τα ιικά σωματίδια έχουν μικρότερο συντελεστή καθίζησης (135S έναντι 160S των ανέπαφων ιικών σωματιδίων), είναι ευαίσθητα σε πρωτεάσες και είναι πολύ πιο υδρόφοβα από τα ανέπαφα ιικά σωματίδια. Τα 135S ιικά σωματίδια είναι ικανά να μολύνουν κύτταρα με τρόπο ανεξάρτητο υποδοχέα όταν είναι παρόν σε υψηλές συγκεντρώσεις και πιστεύετε ότι αποτελούν ένα απαραίτητο ενδιάμεσο στην διαδικασία εισόδου του ιού στο κύτταρο. Επίσης, θεωρείται πιθανό ότι η ικανότητα του καψιδίου να υφίσταται αυτές τις μεσολαβούμενες από τον υποδοχέα δομικές μεταβολές ρυθμίζεται από ένα υδρόφοβο λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης γνωστό και ως <rocket factor> το οποίο προσδένεται στη βάση της αύλακας (canyon) και συγκεκριμένα στον πυρήνα του β-βαρελιού της VP1. Τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο, είτε απευθείας μέσω της πλασματικής μεμβράνης μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα είτε με ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι δεν απαιτείται ένα στάδιο χαμηλού pH για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος. Το N-τελικό άκρο της VP1 και το μυριστιλιωμένο N-τελικό άκρο της VP4 είναι πιθανόν ότι σχηματίζουν ένα κανάλι διαμέσου της κυτταροπλασματικής ή της ενδοσωμικής μεμβράνης επιτρέποντας έτσι στο ιικό RNA να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα (Blondel et al. 1998, Hogle 2002).

3.2 Μετάφραση του ιικού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία

Αμέσως μετά την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, μία κυτταρική πρωτεάση απομακρύνει την VPg από το 5' άκρο του ιικού γενώματος και πραγματοποιείται η μετάφραση από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Η έναρξη της μετάφρασης του ιικού RNA δεν απαιτεί μία 5' m⁷G δομή καλύπτρας και η πρόσδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας συμβαίνει σε μία εσωτερική αλληλουχία, γνωστή ως IRES (εικόνα 3.2.1), η οποία βρίσκεται 100 nt upstream του κωδικονίου έναρξης AUG. Τόσο ένα σιωπηλό κωδικόνιο AUG στη θέση 586 όσο και μία περιοχή ολιγοπυριμιδίνης που βρίσκεται 22 nt upstream αυτού είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική λειτουργία του IRES γενετικού στοιχείου (αποτελεσματική είσοδο των ριβοσωμάτων). Γι'αυτό το λόγο το μοτίβο αυτό (Y_n-X_m-AUG

όπου Y πυριμιδίνη, n=6-8 νουκλεοτίδια, X οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, m=18-20 νουκλεοτίδια) είναι συντηρημένο στα IRES στοιχεία όλων των picorna ιών (Pfister et al. 1999). Στοιχεία IRES υπάρχουν σε όλους τους picorna ιούς και χωρίζονται με βάση τις πρωτοταγείς και δευτεροταγείς δομές τους σε τρεις κατηγορίες: στα στοιχεία IRES τύπου 1 (enteroviruses και rhinoviruses), στα στοιχεία τύπου 2 (cardioviruses και arthroviruses) και στα στοιχεία τύπου 3 (HAV) (Wimmer et al. 1993).



Εικόνα 3.2.1: Δομή του γενετικού στοιχείου IRES του πολιοϊού τύπου 1. Φαίνονται το συντηρημένο μοτίβο Y_n-X_m-AUG και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της πολυπρωτεΐνης (Από T. Pfister et al. 1999).

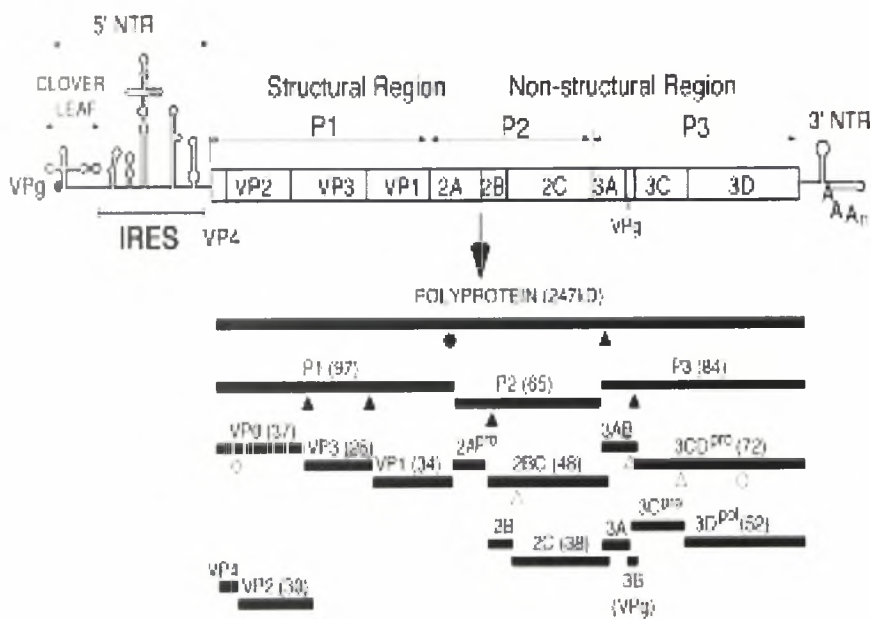
Κατά την έναρξη της μετάφρασης στους πολιοϊούς, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα κατευθύνεται σε μία μικρή περιοχή του IRES που εμπεριέχει το σιωπηλό κωδικόνιο AUG, πιθανόν μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης. Για την μετάφραση του ιικού RNA σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs) είναι απαραίτητοι, με

μοναδική εξαίρεση τον παράγοντα eIF4E ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα (cap). Στην cap-εξαρτώμενη μετάφραση των ευκαρυωτικών mRNA, οι παράγοντες eIF4G1, eIF4E και eIF4A συναρμολογούν το eIF4F σύμπλοκο, το οποίο αλληλεπιδρά με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα μέσω του eIF3 ώστε να σχηματιστεί το 43S σύμπλοκο (περιέχει επίσης τους παράγοντες eIF5, eIF2, GTP και Met-tRNAi). Κατόπιν το 43S σύμπλοκο προσδένει το mRNA στο 5' cap άκρο του ώστε να σχηματιστεί το 48S σύμπλοκο το οποίο μετακινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του mRNA ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Deborah Prevot et al. 2003). Στους πολιοϊούς η θέση πρόσδεσης των eIFs δεν είναι ακόμα γνωστή. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η πρόσδεσή τους γίνεται κυρίως στην περιοχή V του στοιχείου IRES καθώς κάθε μετάλλαξη που επηρεάζει τη δομή της καθιστά το IRES στοιχείο μη-λειτουργικό (Kerstin Ochs et al. 2002). Συνεπώς έχει προταθεί ότι κατά την μετάφραση του ιικού RNA, ο παράγοντας eIF4G1 αλληλεπιδρά απευθείας με το mRNA στην περιοχή IRES και κατόπιν συνδέεται με τον παράγοντα eIF4A προάγοντας την συναρμολόγηση του 48S συμπλόκου. Τελικά, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αφού προσδεθεί στο mRNA κινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Deborah Prevot et al. 2003).

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

Όπως αναφέρθηκε το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο μεταφράζεται ώστε να παράγει αρχικά μία 247 KDa πολυπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται από τις ικές πρωτεάσες (2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro}) και έτσι προκύπτουν οι λειτουργικές ικές πρωτεΐνες. Το πρώτο 1/3 της πολυπρωτεΐνης ονομάζεται P1 και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του καψιδίου ενώ τα υπόλοιπα 2/3 της, τα οποία χωρίζονται στις P2 και P3 περιοχές, κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες (εικόνα 3.2.2) (Wimmer et al. 1993). Η πρωτεόλυση από τις 3C^{pro} και 3CD^{pro} συμβαίνει σε δεσμούς Gln-Gly ενώ από την 2A^{pro} σε δεσμούς Tyr-Gly. Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης συμβαίνει σε τρία στάδια μόλις ολοκληρωθεί η μετάφραση. Αρχικά η 2A^{pro} πραγματοποιεί μία cis-διάσπαση του δεσμού Tyr-Gly στο δικό της N-τελικό άκρο και οδηγεί στην απελευθέρωση της πρόδρομης πρωτεΐνης του καψιδίου P1. Το δεύτερο στάδιο είναι η απελευθέρωση της P3 από το πρόδρομο πολυπεπίδιο P2- P3. Αυτό πραγματοποιείται μέσω

cis-διάσπασης από την 3CD^{pro}. Σε μία αλληλουχία γεγονότων trans-διάσπασης από την 3CD^{pro}, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων και γι'αυτό αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης (Pfister et al. 1999).



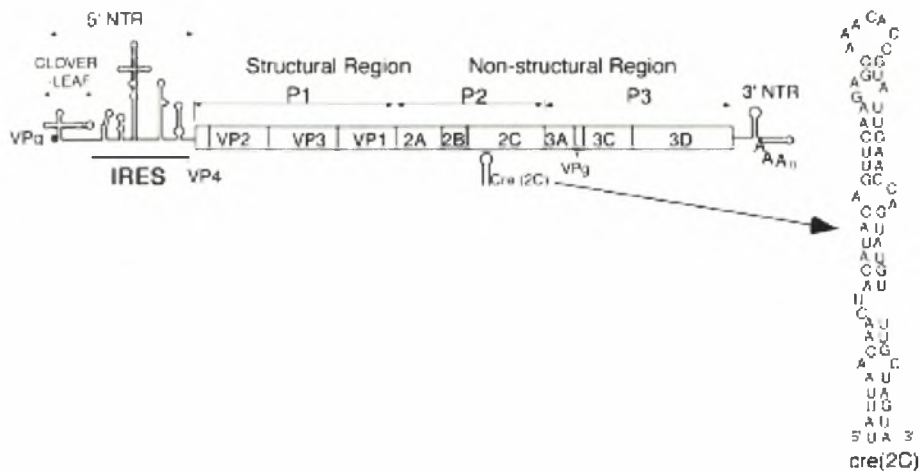
Εικόνα 3.2.2: πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης. Τα τρίγωνα δείχνουν τα σημεία πρωτεόλυσης από τις 3C^{pro} /3CD^{pro} και οι κύκλοι από την 2A^{pro} όπου τα μαύρα σχήματα δείχνουν γεγονότα πρωτεόλυσης που συμβαίνουν με γρήγορο ρυθμό και τα άσπρα σχήματα με αργό ρυθμό (Από S. Mueller et al. 2005).

3.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

Η αντιγραφή του ιικού RNA προχωράει μέσω του ακόλουθου μονοπατιού: εισερχόμενο ιικό RNA(+) \rightarrow σύνθεση RNA(-) \rightarrow RF \rightarrow σύνθεση RNA(+) \rightarrow RI \rightarrow RNA(+) όπου RF σημαίνει (replicative form) το οποίο είναι δίκλωνο RNA και RI σημαίνει (replicative intermediate) το οποίο είναι ένας κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+) (Wimmer et al. 1993). Ωστόσο, αυτή η απλή αναπαράσταση δεν ανταποκρίνεται στην πραγματική περίπλοκη φύση της αντιγραφής του ιικού RNA η οποία αποτελεί αντικείμενο έρευνας εδώ και 30 χρόνια.

Πολυάριθμες γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι όλες οι μη-δομικές πρωτεΐνες συμμετέχουν σε κάποιο στάδιο της αντιγραφής του ιικού RNA (Pfister et al. 1999). Φυσικά, η πιο άμεση λειτουργία αποδίδεται στην RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ($3D^{pol}$). Η $3D^{pol}$ η οποία εξαρτάται από την παρουσία primer καταλύει τόσο τη σύνθεση των κλώνων RNA(-) όσο και τη σύνθεση των RNA(+). Επίσης, εμφανίζει δύο τύπους καταλυτικής δραστηριότητας, αφενός μεν επιμηκύνει τους RNA κλώνους πάνω σε ένα κατάλληλο εκμαγείο και αφετέρου δε ευθύνεται για την ουριδιλίωση της VPg (Aniko V. Paul et al. 1998). Η μικρή πρωτεΐνη VPg (3B) λειτουργεί ως primer αφού πρώτα ουριδιλιωθεί σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης ώστε να προκύψει η μορφή VPg-pU- pU, γεγονός το οποίο αποτελεί το πρώτο στάδιο της σύνθεσης τόσο του RNA(+) όσο και του RNA(-). Για πολλά χρόνια ήταν αποδεκτό ότι η ουριδιλίωση της VPg συμβαίνει στην πολύ-A ουρά των RNA(+). Ωστόσο, ήταν ασαφής ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνονταν εξειδίκευση σε μία τέτοια αντίδραση αν λάβουμε υπόψη τα πολυάριθμα κυτταρικά mRNA τα οποία επίσης φέρουν πολύ-A ουρά. Σημαντική πρόοδος στην κατανόηση αυτής της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με την ανακάλυψη μιας εσωτερικής δομής φουρκέτας στο RNA γνωστή ως cre (cis-replicating element). Αρχικά ανακαλύφθηκε στην VP1 κωδική περιοχή του HRV14 (human rhinovirus 14) και αργότερα βρέθηκε ότι στους πολιοϊούς το cre περιέχεται στην 2C κωδική περιοχή (εικόνα 3.3.1) (Goodfellow et al. 2000, Goodfellow et al. 2003). Μετά την ανακάλυψη του cre γενετικού στοιχείου, αποδείχτηκε ότι μία συντηρημένη αλληλουχία $^1GXXXAAACXXXXXA^{14}$ η οποία βρίσκεται στη θηλιά της φουρκέτας αντιπροσωπεύει το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg. Πιο συγκεκριμένα, η A-5 χρησιμοποιείται για την προσθήκη και των δύο νουκλεοτιδίων ουρακίλης στο -OH της τυροσίνης της VPg από την $3D^{pol}$ (Aniko V. Paul et al. 2003). Αυτή η αντίδραση ενισχύεται σημαντικά σε ένα in vitro σύστημα ουριδιλίωσης από την $3CD^{pro}$, και πιθανόν εξαρτάται από αυτήν και in vivo (Kenneth E. Murray et al. 2003). Πιστεύεται ότι η $3CD^{pro}$ παρέχει την απαραίτητη εξειδίκευση σε αυτή την αντίδραση in vivo. Πρόσφατα έχει προταθεί ότι η cre εξαρτώμενη

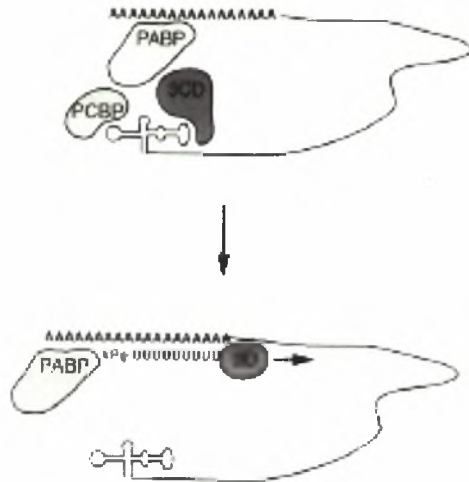
ουριδιλίωση της VPg εμπλέκεται μόνο στην σύνθεση του RNA(+) και όχι του RNA(-) (B. Joan Morasco et al. 2003, Kenneth E. Murray et al. 2003).



Εικόνα 3.3.1: Δομή του cre γενετικού στοιχείου. Φαίνεται η συντηρημένη αλληλουχία ${}^1\text{GXXXAAACXXXXXXA}{}^{14}$ στη κορυφαία θηλιά της δομής (Από S. Mueller et al. 2005).

Παραδόξως, η ουριδιλίωση της VPg και η σύνθεση του RNA(-) απαιτούν ανέπαφη την δομή cloverleaf του 5' άκρου του ιικού RNA (David J. Barton et al. 2001, Traci Lyons et al. 2001). Αυτή η άποψη υποστηρίζεται επίσης από τους Herold και Andino σύμφωνα με τους οποίους η 5' cloverleaf και η πολύ-A ουρά αλληλεπιδρούν κατά την μετάβαση από την μετάφραση στην σύνθεση του RNA(-), με αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του γενώματος. Η παρατήρησή τους ότι η 3CD^{pro} μπορεί να προσδεθεί στην κυτταρική πρωτεΐνη PABP (poly(A) binding protein) δείχνει ότι το ιικό RNA(+) πιθανόν κυκλοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης του $3\text{AB}/3\text{CD}^{\text{pro}}/\text{PCBP2}$ ριβονουκλεοπρωτεϊνικού (RNP) συμπλόκου του 5' cloverleaf και της PABP της πολύ-A ουράς (εικόνα 3.3.2) (Jens Herold and Raul Andino 2001). Η συναρμολόγηση του RNP συμπλόκου στο 5' cloverleaf και η επακόλουθη κυκλοποίηση του ιικού RNA είναι πιθανόν ότι εμποδίζουν την πρόσβαση των κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας έτσι την μετάβαση από την μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al. 1993). Επιπλέον, αυτός ο μηχανισμός αντιγραφής εξασφαλίζει ότι μόνο τα ανέπαφα RNA (πλήρους μήκους) θα αποτελέσουν εκμαγεία για την 3D^{pol} .

Poliovirus RNA



Εικόνα 3.3.2: Μοντέλο κυκλοποίησης του ιικού RNA κατά την σύνθεση του RNA(-) (Από J. Herold and R. Andino 2001).

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

Η αντιγραφή του RNA συμβαίνει σε μεμβρανώδεις δομές (*rosette-like*) που επάγονται από την δράση των ιικών πρωτεϊνών 2C και 2BC και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου (Cho et al. 1994, Christy Jurgens and James B. Flanagan 2002, Mark H. Fogg et al. 2003). Το μεμβρανώδες υλικό προέρχεται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου ξενιστή. Μία υδρόφοβη περιοχή στην ιική πρωτεΐνη 3AB είναι πιθανόν να ευθύνεται για την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης σε αυτές τις μεμβρανικές δομές και συνεπώς και του συμπλόκου αντιγραφής λόγω συγγένειας της 3AB προς τις 3D^{pol} και 3CD^{pro} (John M. Lyle et al. 2002, Sunny S. Choe and Karla Kirkegaard 2004).

3.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων

Ο σχηματισμός των νέων ιικών σωματιδίων ή καψιδίωση φαίνεται πως είναι συζευγμένη με την αντιγραφή του RNA εφόσον και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Ansardi et al. 1996). Στο πρώτο στάδιο της καψιδίωσης, το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπτίδιο τεμαχίζεται από την 3CD^{pro} και δίνει τις VP0, VP3 και VP1 οι οποίες τότε συσσωματώνονται ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al. 1999). Υπάρχουν δύο μοντέλα όσον αφορά το σχηματισμό του ιικού σωματιδίου: i) το ιικό RNA εισέρχεται στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, ii) τα πενταμερή συσσωματώνονται γύρω από το ιικό RNA. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της καψιδίωσης, η VP0 τεμαχίζεται στις VP2 και VP4 (πιθανόν αυτοκαταλυτικά) δίνοντας έτσι το ώριμο ιικό σωματίδιο (Basavappa et al. 1994). Η μυριστιλίωση της VP0 και συνεπώς και της VP4 είναι απαραίτητη για την μορφογένεση και την σταθερότητα του καψιδίου (Krausslich et al. 1990).

Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των πολιοϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι πολιοϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή με λύση του (Tucker et al. 1993). Ωστόσο, νέα ιικά σωματίδια μπορούν να εντοπιστούν πριν τη λύση του κυττάρου και επιπλέον οι πολιοϊοί είναι ικανοί να εγκαθιδρύσουν μόνιμη μόλυνση χωρίς το θάνατο του κυττάρου. Συνεπώς είναι πολύ πιθανό να υπάρχει κάποιο εναλλακτικό μονοπάτι απελευθέρωσης των νέων ιικών σωματιδίων.

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολιοϊοί μπορούν να επάγουν την απόπτωση στο κύτταρο ξενιστή μέσω των δράσεων των 2A^{pro} και 3C^{pro}. Ωστόσο, είναι ακόμα άγνωστο αν η απόπτωση πράγματι συμβάλει στο θάνατο των μολυσμένων από πολιοϊό κυττάρων αφού έχουν εντοπιστεί ικές πρωτεΐνες με αντιαποπτωτική λειτουργία (Agol 2002).

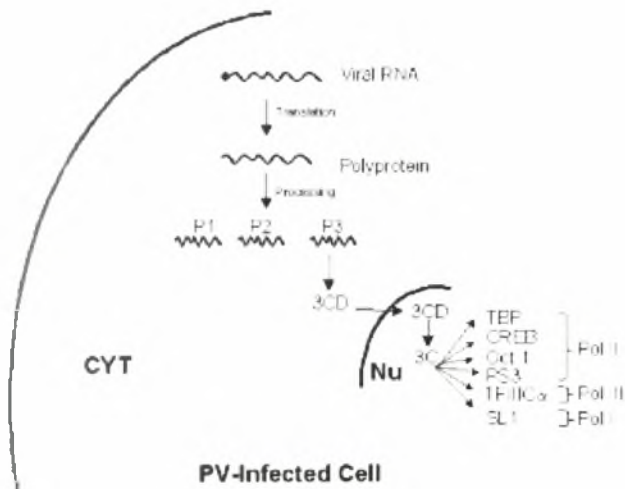
3.5 Κυτταρικές αποκρίσεις στη μόλυνση με πολιοϊό

Κατά την μόλυνση κυττάρων από πολιοϊό in vitro, τα κύτταρα ξενιστές υφίστανται δραματικές μεταβολικές και μορφολογικές αλλαγές περιλαμβανομένων την στρογγυλοποίηση και την αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα. Συλλογικά, αυτές οι αλλαγές είναι γνωστές ως CPE (cytopathic effect) (Pfister et al. 1999).

Η μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς οδηγεί στην γρήγορη αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης, κυρίως μέσω της δράσης της ιικής πρωτεΐνης 2A, η οποία

επάγει είτε άμεσα είτε έμμεσα την διάσπαση των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης της μετάφρασης eIF4GI και eIF4GII (Pfister et al. 1999, Deborah Prevot et al. 2003). Η διάσπαση της PABP πρωτεΐνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση των κυτταρικών mRNA, μέσω της δράσης της 3C^{pro} θεωρείται εξίσου σημαντική στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνσύνθεσης (N. Muge Kuyumcu-Martinez et al. 2004). Άλλες τροποποιήσεις παραγόντων έναρξης όπως η φωσφορυλίωση του eIF2α πιθανόν συνεισφέρουν επίσης στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνσύνθεσης. Επιπλέον, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι οι πολιοϊοί ενεργοποιούν τον καταστολέα της μετάφρασης 4E-BP1, ο οποίος αναστέλλει την cap-εξαρτώμενη μετάφραση μέσω πρόσδεσής του στον παράγοντα eIF4E (Bruno Blondel et al. 1998).

Η μόλυνση με πολιοϊό επίσης οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής μεταγραφής, πιθανόν λόγω της τροποποίησης κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων από την 3C^{pro}. Πιο συγκεκριμένα, η 3C^{pro} διασπά κάποιους παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την δράση της RNA πολυμεράσης II, της RNA πολυμεράσης III και της RNA πολυμεράσης I. Η 3C^{pro} εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου με την μορφή του προδρόμου της 3CD^{pro} και είναι πιθανόν ότι ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που βρίσκεται στην αλληλουχία της 3D ευθύνεται για αυτή τη μεταφορά (εικόνα 3.5.1) (Mary K. Weidman et al. 2003).



Εικόνα 3.5.1: Πιθανό μοντέλο αναστολής της μεταγραφής στα μολυσμένα από πολιοϊό κύτταρα. Η 3CD^{pro} εισέρχεται στον πυρήνα και δημιουργεί την 3C^{pro} με αυτό-πρωτεόλυση. Η πρωτεολυτική διάσπαση των παραγόντων TBP, CREB, Oct-1 και p53 καταλήγει στην αναστολή της Pol II-εξαρτώμενης μεταγραφής. Επίσης η πρωτεόλυση των παραγόντων TFIIICα και TAF₁₁₀ (SL1) οδηγεί στην αναστολή της Pol III-εξαρτώμενης και Pol I-εξαρτώμενης μεταγραφής, αντίστοιχα (Από M. Weidman et al. 2003).

Σε αντίθεση με την μεταγραφή και την μετάφραση, η λιπιδική σύνθεση διεγείρεται μετά από μόλυνση με πολιοϊό, και πολλά από τα νεοσυντιθέμενα λιπίδια εντοπίζονται στα μεμβρανικά κυστίδια τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα (Bruno Blondel et al. 1998). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca^{++} αυξάνεται σημαντικά και η πλασματική μεμβράνη εμφανίζει αυξημένη διαπερατότητα τόσο σε μονοθενή κατιόντα όσο και σε αναστολείς της μετάφρασης. Πρόσφατα έχει προταθεί ότι οι ιικές πρωτεΐνες 2B και 3AB ίσως μπορούν να τροποποιούν την διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης (Aitziber Agirre et al. 2002). Επίσης, οι ιικές πρωτεΐνες 2BC, 2B και 3A είναι πιθανόν ότι αναστέλλουν την έκκριση πρωτεϊνών από το κύτταρο ξενιστή (Aitziber Agirre et al. 2002, Angel Barco and Luis Carrasco 1998, Christy Jurgens et al. 2003).

Στα μολυσμένα με πολιοϊό κύτταρα έχουν παρατηρηθεί επίσης μορφολογικές και κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις. Συγκεκριμένα μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με κυτταροσκελετό, η MAP-4 (microtubule-associated protein 4) έχει βρεθεί ότι διασπάται πιθανόν μέσω της δράσης της 3C^{pro} (Joachims et al. 1995). Αυτές οι αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού υποβοηθούν τον πολλαπλασιασμό του ιού αφού αυξάνουν την κυτταρική λύση και συνεπώς την απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων.

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Πριν την εισαγωγή των εμβολίων, (<1960), οι πολιοϊοί ήταν ενδημικοί στις τροπικές περιοχές, με ταχεία εξάπλωση στα μικρά παιδιά (η κακή υγιεινή διευκολύνει την μετάδοση του ιού μέσω της εντερικής οδού) με ελάχιστα περιστατικά παράλυσης (λόγω της προστατευτικής δράσης των εναπομεινάντων αντισωμάτων από τη μητέρα). Αυτό εξασφάλιζε υψηλή ανοσία χωρίς επιδημίες.

Στις εύκρατες περιοχές, οι πολιοϊοί εμφάνιζαν έξαρση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Καθώς οι συνθήκες υγιεινής βελτιώθηκαν, η μετάδοση του ιού περιορίστηκε και η ηλικία της πρωτογενούς έκθεσης στον ιό αυξήθηκε. Η πρωτογενή μόλυνση κατά την ενηλικίωση οδήγησε σε μία πολύ μεγαλύτερη εμφάνιση περιστατικών παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Αυτά τα περιστατικά έφτασαν σε ύψιστο βαθμό στις Σκανδιναβικές χώρες λίγο πριν την εισαγωγή των εμβολίων, όταν αυτές δοκιμάστηκαν από καταστρεπτικές επιδημίες παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Μετά την εισαγωγή των εμβολίων: ο παγκόσμιος εμβολιασμός ξεκίνησε στις αρχές του 1960 και έχει εξαλείψει τους πολιοϊούς από τον δυτικό κόσμο, περιλαμβανομένων της βόρειας, κεντρικής και νότιας Αμερικής. Η ασθένεια έχει επίσης περιορισθεί σε σημαντικό βαθμό στην Αφρική και στην Ασία. Στην νότια Αφρική, η μετάδοση των πολιοϊών έχει σημαντικά περιορισθεί αλλά επανεισαγωγές πολιοϊών σε περιοχές με ανεπαρκή προγράμματα εμβολιασμού έχουν οδηγήσει σε τοπικές εξάρσεις (π. χ 1982 και 1988).

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

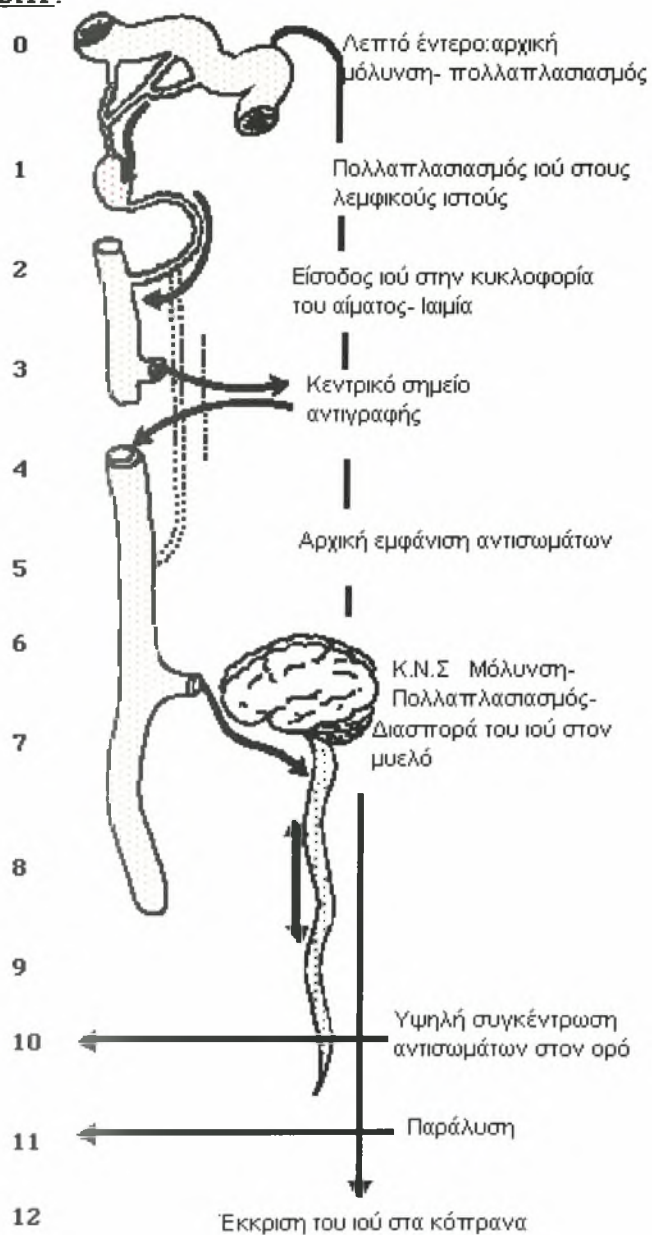
Όσον αφορά την παθογένεια των πολιοϊών έχουν προταθεί τρία κυρίως μοντέλα (Philip D. Minor 1999):

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

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

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

DAY:



Εικόνα 7. 1: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών (Από www.micro.msb.le.ac.uk/.../balti4/balti24.html).

6. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Τα συμπτώματα της κύριας ασθένειας της πολιομυελίτιδας είναι τα ίδια και για τους τρεις οροτύπους. Μηνιγγίτιδα, η οποία είναι επίσης γνωστή ως <αποτυχημένη πολιομυελίτιδα> (abortive poliomyelitis) μπορεί επίσης να εμφανιστεί. Όσον αφορά τις περιπτώσεις παραλυτικής πολιομυελίτιδας, το 5-10% είναι θανατηφόρες, το 10% αναρρώνουν πλήρως και οι υπόλοιποι εμφανίζουν κάποια εναπομείναντα παράλυση. Τα πραγματικά κλινικά συμπτώματα εξαρτώνται από την περιοχή του ΚΝΣ που προσβάλλεται. Πρώτον, η νωτιαία παράλυση (spinal paralysis) προέρχεται από την μόλυνση των κατώτερων κινητικών νευρώνων και επηρεάζει μόνο το ένα πόδι. Δεύτερον, η πιο σοβαρή βολβοειδή πολιομυελίτιδα (bulbar poliomyelitis) επηρεάζει την αναπνοή. Τρίτον, η εγκεφαλίτιδα (encephalitis) προέρχεται από την μόλυνση του ίδιου του εγκεφάλου. Αυτή αποτελεί περίπου το 1% όλων των περιπτώσεων και είναι συνήθως θανατηφόρα (Philip D. Minor 1999).

7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

7.1 Παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Siafakas et al. 2001):

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

CPE) μέσα σε λίγες μέρες ενώ ίσως χρειαστούν περισσότερες από 14 ημέρες όταν πρόκειται για δύσκολα στελέχη ή μίγματα ιών.

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

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

7.2 Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Siafakas et al. 2001):

-τεχνολογία υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων: οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων τους επιτρέπει τη χρησιμοποίηση cDNA ανιχνευτών προερχόμενων από έναν ορότυπο για την ανίχνευση των γενωμάτων ενός μεγάλου εύρους εντεροϊών. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος είναι επίπονη.

- RT-PCR: Η σύγκριση των αλληλουχιών γενωμάτων εντεροϊών επέτρεψε τον εντοπισμό συντηρημένων αλληλουχιών και συνεπώς τον σχεδιασμό κατάλληλων primers ικανών προς ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των

οποίων δεν είναι εφικτή η καλλιέργειά τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και επίσης τα αποτελέσματα μπορούν να αποκτηθούν σε λιγότερο από 5 ώρες και γι' αυτό μπορεί να έχει σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μη ικανότητα ταυτοποίησης του ορότυπου του εντεροϊού. Συνεπώς όταν απαιτείται κάτι τέτοιο, η RT-PCR θα πρέπει να συμπληρώνεται με κάποια από τις παραπάνω παραδοσιακές μεθόδους. Εναλλακτικά η ταυτοποίηση του εντεροϊού μπορεί να γίνει με τις εξής μεθόδους: PCR με primers εξειδικευμένα για την ενίσχυση μίας μόνο συγκεκριμένης υποομάδας εντεροϊών, αλληλούχιση των PCR προϊόντων και σύγκρισή τους με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες άλλων εντεροϊών, RFLP ανάλυση των PCR προϊόντων, υβριδισμός των PCR προϊόντων με ανιχνευτές ειδικούς για κάθε τύπο, SSCP ανάλυση των PCR προϊόντων.

8. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Οι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία των πολιοϊών είναι δύο: ι) οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιικού RNA και ιι) ο μοριακός ανασυνδυασμός (E. Domingo and J. J Holland 1997).

8.1 Μεταλλάξεις

Η μοριακή βάση του υψηλού ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA βρίσκεται ι) στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι ενσωματώνει 10^{-4} έως 10^{-5} νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής και ιι) στην απουσία μηχανισμών για την επιδιόρθωση των λαθών που έχουν γίνει κατά την αντιγραφή. Έτσι, οι πολιοϊοί εμφανίζουν έναν υψηλό ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων ($6,3 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των λυτικών RNA ιών. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει τις εξής συνέπειες (Wimmer et al. 1993):

1. Οι πολιοϊοί έχουν εξελιχθεί ώστε να έχουν ένα μικρό γένωμα.
2. Οι πολιοϊοί αντιγράφονται κοντά στο όριο της καταστροφής λόγω μεταλλάξεων.
3. Οι πολιοϊοί υπάρχουν ως πληθυσμοί πολλών διαφορετικών γενοτύπων και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως 'quasi-species' (περίπου είδη).
4. Η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους πολιοϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον.

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

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των πολιοϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. 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 ικών ενζύμων). Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές δεν είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Επίσης, cis-acting γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ική αντιγραφή (cloverleaf και CRE) ή στην ική μετάφραση (IRES) δέχονται ακόμα πιο λίγες μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγής δομής τους. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που ερμηνεύει τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης των διάφορων γενωμικών περιοχών είναι ο ομοτυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών συνυπαρχόντων γενεαλογιών, ο οποίος όμως δεν μπορεί να αναγνωριστεί. Η ευκολία με την οποία συμβαίνει ο ετεροτυπικός ανασυνδυασμός δείχνει ότι ο ομοτυπικός συμβαίνει ακόμα πιο συχνά (Elena A. Cherkasova et al. 2002).

Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση των μεταλλάξεων σε έναν ικό πληθυσμό είναι λιγότερο κατανοητοί. Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη οικολογική θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη. Οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις που οδηγούν σε αλλαγές στο “νόημα” των κωδικονίων (μη-συνώνυμες μεταλλάξεις) είναι λιγότερο πιθανό να είναι ουδέτερες σε σύγκριση με τις υποκαταστάσεις που δεν επηρεάζουν το “νόημα” των κωδικονίων (συνώνυμες μεταλλάξεις). Η εγκαθίδρυση μεταλλάξεων που παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα είναι εύκολα κατανοητή στα πλαίσια της θετικής επιλογής του Δαρβίνου.

Αντίθετα, μεταλλάξεις που παρέχουν ένα επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται από την αρνητική επιλογή (E. Domingo and J. J Holland 1997).

Η πιθανότητα της εγκαθίδρυσης μιας μετάλλαξης εξαρτάται όχι μόνο από τις σχετικές αλλαγές στην αρμοστικότητα του ιού αλλά σε μεγάλο βαθμό και από το μέγεθος του πληθυσμού. Συνεχείς κυτταροκαλλιέργειες που εμπλέκουν μικρούς ιικούς πληθυσμούς, μία κατάσταση η οποία είναι τυπική της φυσιολογικής μόλυνσης των πολιοϊών, είναι πιθανόν ότι οδηγεί στη συσσώρευση ουδέτερων μεταλλάξεων ή μεταλλάξεων που οδηγούν σε εξασθενημένο φαινότυπο (ένα φαινόμενο γνωστό ως Muller's ratchet). Έτσι, οι συνεχόμενες αλλαγές στις ιικές γενεαλογίες δεν είναι απαραίτητως προσαρμοστικού χαρακτήρα αλλά είναι πιθανόν ότι οφείλονται στην τυχαία δειγματοληψία (E. Domingo and J. J Holland 1997).

8.2 Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών αρχικά περιγράφηκε για τους πολιοϊούς από τον Hirst το 1962. Επακόλουθες μελέτες προσδιόρισαν ότι η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει με συχνότητα ισότιμη με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή, και επίσης ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων και από την απόσταση μεταξύ των γενετικών δεικτών. Ο King το 1988 υπολόγισε ότι το 10-20% των ικών γενωμάτων υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού (Rohit Duggal et al. 1997).

Ο ανασυνδυασμός των RNA γενωμάτων λαμβάνει χώρα σε κύτταρα συν-μολυσμένα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου (homotypic) είτε διαφορετικών οροτύπων (heterotypic). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό:

1) ο αντιγραφικός μηχανισμός (replicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA και ξαφνικά σταματά και ξανασυνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch). Όταν η μετάβαση από το ένα στο άλλο εκμαγείο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός παρατηρείται στα περισσότερα βιώσιμα ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία έχουν ανασυνδυαστεί μέσα στην κωδική περιοχή τους. Αντίθετα, μία μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π. χ σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός είναι πιο πιθανός στις μη-κωδικές περιοχές του ιικού γενώματος (V. I. Agol

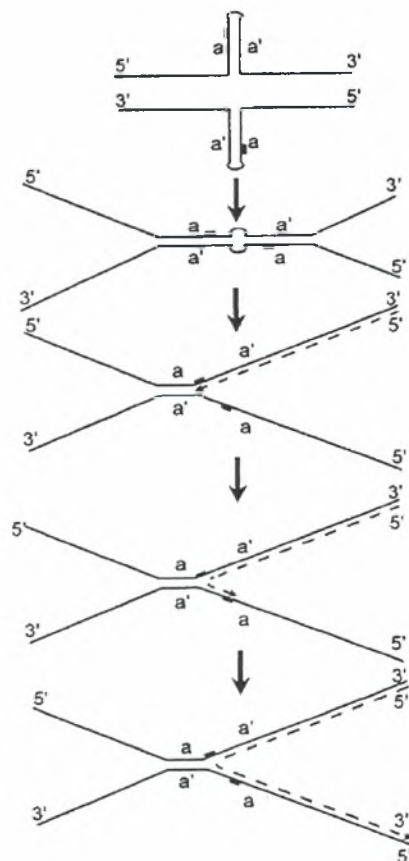
2002). Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των RNA (-) κλώνων για δύο κυρίως λόγους : i) η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι RNA (+) κλώνοι σε σύγκριση με τους RNA (-) κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο μολυσμένο κύτταρο, ii) οι RNA (-) βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία. (V. I. Agol 1997).

Όσον αφορά τον αντιγραφικό μηχανισμό, πρέπει να υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που διευκολύνουν τον τερματισμό της RNA σύνθεσης πάνω στο πρώτο εκμαγείο, τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου κλώνου (πιθανόν μαζί με την RNA πολυμεράση) και την αναγνώριση της σωστής θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο. Ο πρώτος τερματισμός της RNA σύνθεσης είναι πιθανόν ότι προκαλείται από κάποιες δευτεροταγές δομές του εκμαγείου ή/και από την ενσωμάτωση ενός μη-συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου. Ο εμπλουτισμός μιας RNA περιοχής με U (και πιθανόν A) είναι πιθανόν ότι διευκολύνει τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου RNA κλώνου μετά τον πρώτο τερματισμό (V. I. Agol 2002). Είναι πιθανόν ότι η ακριβής αναγνώριση της θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο εξασφαλίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του 3' άκρου του αναπτυσσόμενου κλώνου και της συμπληρωματικής περιοχής του δεύτερου εκμαγείου. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται πως εμπλέκει μόνο λίγα νουκλεοτίδια και έτσι η σύνδεση μπορεί εύκολα να είναι μη ακριβής λόγω των πολλαπλών μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο ιικό RNA. Ένας παράγοντας που ενδεχομένως μπορεί να φέρει τις κατάλληλες περιοχές των δύο εκμαγείων κοντά είναι ο σχηματισμός ενός ετεροδιμερούς από ανεστραμμένες επαναλήψεις που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές φουρκετών (εικόνα 8.2.1) (V. I. Agol 1997).

2) ο μη-αντιγραφικός μηχανισμός (nonreplicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από την σύνδεση προσυντεθέμενων RNA τμημάτων προερχόμενων από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Θεωρητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκύπτουν αυτά τα RNA τμήματα: i) από την πρώιμη λήξη της μετάφρασης, ii) από την αποικοδόμηση του ιικού RNA από κυτταρικές RNases, iii) από δραστηριότητα ριβοενζύμου του ίδιου του ιικού RNA. Αν και το γένωμα των πολιοϊών φέρει απαραίτητα μοτίβα ολιγονουκλεοτιδίων, μία διαμόρφωση χαρακτηριστική των ριβοενζύμων (hammerhead) είναι απίθανη αλλά ακόμα δυνατή (V. I. Agol 2002). Κατόπιν, η σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκει είτε μία RNA λιγάση είτε κάποια δραστηριότητα ριβοενζύμου (V. I. Agol 1997).

Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών: i) βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς

συμβάλλει στην διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου , ii) συμβάλλει στην δημιουργία ικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση και iii) επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή και ακόμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (Wimmer et al. 1993).



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

9. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

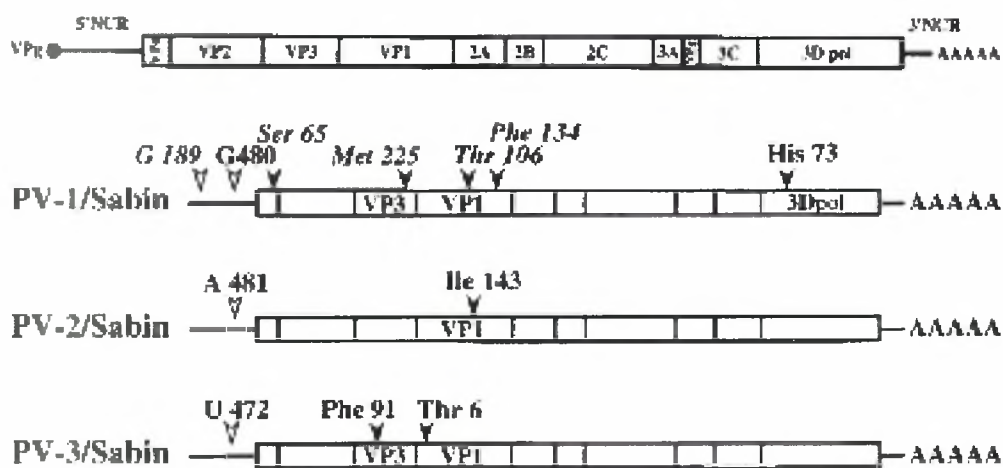
Από το 1960, η πολιομυελίτιδα ελέγχεται αποτελεσματικά με την χρήση δύο εμβολίων (IPV και OPV).

-IPV: Το απενεργοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine) προέκυψε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεύδη. Το IPV είναι ασφαλές και επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Δυστυχώς ωστόσο, το IPV επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία και για αυτό δεν είναι αποτελεσματικό για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό (Blondel et al. 1998).

-OPV: Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A.B Sabin ύστερα από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων *in vitro* και *in vivo* κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin (P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα άγρια νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41 και P2/P712/56 αντίστοιχα τα οποία απομονώθηκαν από τα κόπρανα υγιών παιδιών. Το εξασθενημένο στέλεχος P3/Sabin (P3/Leon 12a₁, b) προήλθε από το άγριο νευροτοξικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (F. Friedrich 1996).

Η μοριακή βάση της εξασθένησης (όπου ο ιός καθίσταται λιγότερο ικανός να προκαλεί ασθένεια) ή της μετατροφής των εμβολιακών στελεχών (όπου ο ιός επανακτά την ικανότητα να προκαλεί ασθένεια) έχει μελετηθεί συγκρίνοντας την αλληλουχία του εμβολιακού στελέχους του κάθε οροτύπου με αυτή ενός συγγενούς στελέχους, είτε του προδρόμου του εμβολιακού στελέχους είτε ενός νευρομολυσματικού στελέχους που απομονώθηκε από περίπτωση VAPP (vaccine-associated paralytic poliomyelitis) (Blondel et al. 1998). Οι συγκρίσεις των αλληλουχιών για τα ζεύγη των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τους τρεις οροτύπους φαίνονται παρακάτω (εικόνα 9.1). Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P3/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P3/Leon/37) σε 11 βάσεις από τις οποίες όμως μόνο οι δύο είναι ισχυροί καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου: μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 472 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 91 της VP3 περιοχής. Επίσης, η αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 6 της VP1 είναι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στον εξασθενημένο φαινότυπο. Στην περίπτωση του εμβολιακού στελέχους P2/Sabin, μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 481 της 5'-NTR περιοχής και μία

αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 143 της VP1 περιοχής είναι οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου. Το γένωμα του εμβολιακού στελεχούς P1/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P1/Mahoney/41) σε 54 βάσεις. Οι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου του P1/Sabin βρέθηκε ότι κατανέμονται σε όλο το γένωμα καθιστώντας την ανάλυσή τους πιο περίπλοκη από αυτή των άλλων δύο οροτύπων. Μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 480 της 5'-NTR περιοχής και πιθανόν μία δεύτερη στη θέση 189 της ίδιας περιοχής έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Τέσσερις επιπλέον αμινοξικές υποκαταστάσεις στην περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Οι δύο από αυτές (τα αμινοξέα 65 της VP4 και 134 VP1) βρίσκονται στο εσωτερικό του ιού καψιδίου ενώ οι άλλες δύο (τα αμινοξέα 106 της VP1 και 225 της VP3) βρίσκονται στο εξωτερικό του. Επιπλέον ασθενείς καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου βρίσκονται στο 3' τελικό άκρο του ιικού γενώματος και συγκεκριμένα στη θέση 73 της 3D^{pol} περιοχής.



Εικόνα 9.1: Θέση των καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου των εμβολιακών στελεχών Sabin και των τριών οροτύπων. Τα νουκλεοτίδια (λευκά τρίγωνα) και τα αμινοξέα (μαύρα τρίγωνα) που συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο φαίνονται στην 5'-NTR περιοχή και στην κωδική περιοχή αντίστοιχα, των γενομάτων των Sabin στελεχών (Από B. Blondel et al 1998).

Το OPV έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με το IPV. Κατ' αρχήν το OPV χορηγείται από το στόμα και όχι σε ενέσιμη μορφή όπως γίνεται στην περίπτωση του IPV. Επιπλέον το OPV επάγει μία ισχυρή και μεγάλης διάρκειας ανοσολογική απόκριση περιλαμβανομένης τοπικής ανοσίας στο έντερο. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του OPV μπορεί να θεωρηθεί η διασπορά των ζωντανών στελεχών του εμβολίου από τα εμβολιασμένα άτομα

σε άλλα άτομα του στενού περιβάλλοντός τους με αποτέλεσμα την επίτευξη ευρύτερης ανοσοποίησης. Γι' αυτούς τους λόγους το OPV επικράτησε έναντι του IPV στο μεγαλύτερο μέρος του κόσμου και βοήθησε στην εξάλειψη της πολιομυελίτιδας από τις περισσότερες χώρες (Walter R. Dowdle et al. 2003).

10. OPV και VAPP

Σε έναν πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων ο εμβολιασμός με το OPV συνδέεται με την εμφάνιση εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) η οποία επηρεάζει είτε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, λόγω σημειακών μεταλλάξεων και γενετικού ανασυνδυασμού. Πράγματι, νευρομολυσματικά στελέχη που προέρχονται από τα αντίστοιχα Sabin εμβολιακά στελέχη έχουν βρεθεί στο έντερο υγιών εμβολιασμένων ατόμων και στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών με VAPP. Νευρομολυσματικά στελέχη προερχόμενα από τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις (περίπου το 88% των περιπτώσεων) πιο συχνά σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το στέλεχος PV-1/Sabin. Προφανώς αυτό σχετίζεται με τον μεγαλύτερο αριθμό των μεταλλάξεων που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στο στέλεχος PV-1/Sabin σε σύγκριση με τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη (Walter R. Dowdle et al. 2003).

Ο παθογόνος χαρακτήρας αυτών των νευρομολυσματικών στελεχών σχετίζεται γενικά με δύο ειδών μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στα εμβολιακά στελέχη των πολιοιών έχει βρεθεί ότι αντιστρέφονται (μέσω μεταλλάξεων στα σημεία που αποτελούν τους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου) ή καταστέλλονται (μέσω μεταλλάξεων σε άλλα σημεία εκτός των καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου) σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από VAPP περιπτώσεις. Η απομόνωση νευρομολυσματικών στελεχών από VAPP περιπτώσεις χωρίς επαναμεταλλάξεις σε σημαντικούς καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου έχει οδηγήσει στην άποψη ότι πιθανόν οι επαναμεταλλάξεις δεν είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση της ασθένειας. Είναι πιθανόν ότι άλλες μεταλλάξεις (όπως μεταλλάξεις καταστολής ή μεταλλάξεις στις αντιγονικές θέσεις) θα μπορούσαν να αυξήσουν την νευρομολυσματικότητα ή να συμμετέχουν με κάποιο τρόπο στην εγκαθίδρυση της ασθένειας (F. Friedrich 1996).

Ο ανασυνδυασμός είναι επίσης ένα συχνό γεγονός σε άτομα εμβολιασμένα με το OPV οδηγώντας σπάνια σε VAPP. Η ανάλυση VAPP περιπτώσεων παρουσιάζει ανασυνδυασμούς

πολιοϊών με μία 50% συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 2 και 67% συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 3. Αντίθετα η συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 1 σε ανασυνδυασμούς είναι πολύ σπάνια (Liu HM. et al. 2000). Πιθανόν ο αιτιολογικός παράγοντας αυτού του φαινομένου είναι ο μικρότερος χρόνος παραμονής στο έντερο των στελεχών Sabin τύπου 1 σε σύγκριση με τα στελέχη Sabin τύπου 2 και τύπου 3. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι ο ανασυνδυασμός είναι κυρίως δια-τυπικός και συμβαίνει: i) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin (Cuervo et al. 2001, Georgopoulou and Markoulatos 2001), ii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου (Dahourou et al. 2002, Georgescu et al. 1995) και iii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (NPEVs: non-polio Enteroviruses) (Brown et al. 2003). Μυστήριο παραμένει ακόμα ο εντοπισμός των θέσεων ανασυνδυασμού σε επιλεγμένες περιοχές του γενώματος των πολιοϊών. Έτσι έχει βρεθεί ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κυρίως σε εκείνες τις περιοχές του ιικού γενώματος που κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (P2 και P3 περιοχές) (Cuervo NS et al. 2001, Guillot et al. 2000). Μία πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου στηρίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το καψίδιο είναι οι πιο ποικιλόμορφες μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών (δυσμενή συνθήκη για ομόλογο ανασυνδυασμό) και επιπλέον η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων του καψιδίου είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία των προδρόμων τους. Έτσι οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών προτιμούν τον ανασυνδυασμό στις περιοχές P2 και P3 οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας (Rohit Duggal and Eckard Wimmer 1999). Ωστόσο, σε κάποιες πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμός έχει εντοπιστεί στα άκρα της περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο (P1) (Blomqvist et al. 2003, Cherkasova et al. 2002, Martin et al. 2002). Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων στελεχών χαρακτηρίζονται μόνο από μία θέση ανασυνδυασμού, υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις στις οποίες έχουν εντοπιστεί πολλαπλά σημεία ανασυνδυασμού (Georgescu et al. 1995, Karakasiliotis et al. 2004, Karakasiliotis et al. 2005).

Η απομόνωση στελεχών Sabin με παρόμοιες γενετικές τροποποιήσεις τόσο από περιπτώσεις VAPP όσο και από υγιή εμβολιασμένα άτομα οδήγησε στην άποψη ότι επίσης παράγοντες του ξενιστή παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας. Πιθανόν, κάποιοι τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσε να ήταν αυτοί που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με την 5'-NTR περιοχή. Επίσης ως παράγοντες του ξενιστή θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι ανοσοανεπάρκειες (π. χ λόγω μόλυνσης με τον HIV). Επιπλέον ενδομυϊκές ενέσεις μέσα σε περίοδο 30 ημερών μετά την έκθεση στο OPV αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση VAPP περιπτώσεων (F. Friedrich 1996). Ο συνεχής γενετικός χαρακτηρισμός στελεχών πολιοϊών που

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

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων στις 5'-NTR και VP1 περιοχές του γενώματος εμβολιακών στελεχών πολιοϊών (Sabin) και η ερμηνεία του ρόλου τους στην αμνοστικότητα των Sabin στελεχών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλινικά δείγματα

Για την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 14 κλινικά δείγματα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο ορότυπος του κάθε δείγματος ο οποίος ήταν ήδη γνωστός καθώς είχε προηγηθεί η διαδικασία της οροεξουδετέρωσης. Επίσης φαίνεται ο γενότυπος των δειγμάτων ο οποίος ήταν ήδη γνωστός για κάποια από αυτά ενώ για τα υπόλοιπα προσδιορίστηκε με την διαδικασία του RFLP (περισσότερες πληροφορίες αναφέρονται παρακάτω).

Ορότυπος	Γενότυπος	Δείγμα
P2	S2	5
P1	S1	7
P2	S2	8
P2	S2	9
P2	S2	11
P2	S2	12
P1	S1	152
P2	S2	IA
P2	S2	IC
P2	S2	ID
P2	S2	IF
P1	S1	IH
P2	S2	I34

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

2. Καλλιέργεια των ιών

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε erpendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π. χ στο πρώτο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erpendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των erpendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (εικόνα 2.1) οι οποίες περιείχαν κύτταρα Her2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε erpendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού κυτταροπαθολογικού φαινομένου (CPE: cytopathic effect) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Her2 με θρεπτικό

υλικό MEM-D). Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας της όσο δυνατόν μεγαλύτερης αραιώσης με CPE ενοφθαλμίστηκε σε φλάσκες που περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό. Οι φλάσκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (φλάσκες με κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό). Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι φλάσκες διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού. Σκοπός των σειριακών αραιώσεων και του ενοφθαλμισμού των φλασκών με την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αραιώση είναι η αποφυγή μιγμάτων του ιού καθώς όπως αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικό των πολιοϊών η ύπαρξή τους ως quasi-species.

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

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

3. Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas (Casas et al. 1995). Συγκεκριμένα, μέσα σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 600μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (4×10^3 μg/ml) (-20 °C) και τέλος 200μl δείγματος από τη φλάσκα. Ακολούθησε vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 800μl ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκε 1ml αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200μl ddH₂O. Τα eppendorf παρέμειναν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

4. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

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

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N9) (Takara) (50nmol/μl) (1μl/tube), 10mM dNTPs (1μl/tube) και ddH₂O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε ειδικό μηχάνημα. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M DTT (2μl/tube) και RNase out (40units/μl) (1μl/tube). Στη συνέχεια προστέθηκαν 7μl του δευτέρου μίγματος σε κάθε eppendorf και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 37 °C για 2 λεπτά. Τέλος σε κάθε eppendorf προστέθηκε 1μl MMLV-RT (200units/μl) (Invitrogen) και ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 37 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων (primers). Επειδή σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη δυο περιοχών του γενώματος των στελεχών Sabin (5'-NTR και VP1), ήταν απαραίτητη η ενίσχυσή τους με τη χρήση ειδικών primers. Πιο συγκεκριμένα για τη μελέτη μέρους της 5'-NTR περιοχής που μας ενδιέφερε χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος primer UG52/UC53 το οποίο είναι κατάλληλο για την ανίχνευση όλων σχεδόν των εντεροϊών καθώς στοχεύει στην ενίσχυση μιας υψηλά συντηρημένης περιοχής του ιικού γενώματος (με εξαίρεση τους τύπους των εντεροϊών 68-71 και τους CAV1, CAV19, CAV22). Για την ενίσχυση της VP1 περιοχής χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη primer ώστε να πετύχουμε την αποτελεσματική αλληλούχιση ολόκληρης της περιοχής. Για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος primer UG1/222 ενώ για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη primer (S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651) ειδικά για κάθε ένα από τα τρία στελέχη Sabin (S1, S2, S3). Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι πληροφορίες όσον αφορά την αλληλουχία των primers, τον τύπο του Sabin στελέχους που αναγνωρίζουν και το μήκος του PCR προϊόντος.

Εμβολιακό στέλεχος	Μήκος PCR προϊόντος σε bp	Primer sense 5'→3'	Primer antisense 3'→5'
S1	568	UG1:2402-TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2421	222:2951-TACAWRYAIGGIGGCCIC-2969
S2	568	UG1:2404-TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2423	222:2953-TACAWRYAIGGIGGCCIC-2971
S3	568	UG1:2399-TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2418	222:2948-TACAWRYAIGGIGGCCIC-2966
S1	652	S ₁ 37:2837-AGGAAATGGAGTCTTACC-2857	S ₁ 688:3468-TTTGCGTCACTTGCAGTACA-3488
S2	659	S ₂ 30:2830-CAACTGAGACGCAAACTGGA-2849	S ₂ 688:3469-TTACGGCACTCACAGTACAC-3488
S3	626	S ₃ 26:2826-GCCGTAAGTGGAGTFTTTCAC-2847	S ₃ 651:3430-GATGGTAGAGCGGTGATTCCTC-3451
S1	434	UG52:162-CAAGCACTTCTGTTTCCCGG-182	UC53:577-ACCGACCAATACCACTGTT-595
S2	434	UG52:162-CAAGCACTTCTGTTTCCCGG-182	UC53:578-ACCGACCAATACCACTGTT-596
S3	434	UG52:164-CAAGCACTTCTGTTTCCCGG-184	UC53:580-ACCGACCAATACCACTGTT-598

Πίνακας 5.1: Στις τρεις πρώτες οριζόντιες γραμμές φαίνονται πληροφορίες για το ζεύγος primer που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1, στις τρεις επόμενες γραμμές για τα ζεύγη primer που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1 και στις τρεις τελευταίες γραμμές για το ζεύγος primer που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός μέρους της 5'-NTR περιοχής. Στην τρίτη και τέταρτη στήλη οι αριθμοί αναφέρονται στις θέσεις στις οποίες υβριδίζονται οι primers.

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

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	5 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους (40 κύκλους για UG1/222 και UG52/UC53, 35 κύκλους για S ₁ 37/S ₁ 688, S ₂ 30/S ₂ 688, S ₃ 26/S ₃ 651)	-20 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -20 δευτερόλεπτα στους 45 °C για τον υβριδισμό των primers στους κλώνους του cDNA (45 °C για UG1/222, 55 °C για S ₁ 37/S ₁ 688, S ₂ 30/S ₂ 688, S ₃ 26/S ₃ 651 και 45 °C για UG52/UC53) -20 δευτερόλεπτα στους 74 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	15 λεπτά στους 78 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

6. Προσδιορισμός του γενότυπου των εμβολιακών στελεχών με RFLP

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το ζεύγος primer UG52/UC53 οδηγεί στην ενίσχυση ενός υψηλά συντηρημένου τμήματος της 5'-NTR περιοχής. Η RFLP ανάλυση (restriction fragment length polymorphism) αυτού του PCR προϊόντος (434 bp) επιτρέπει τον πλήρη (δια-τυπικό και ενδο-τυπικό) προσδιορισμό του γενότυπου των πολιοϊών με τη χρήση τουλάχιστον 4 περιοριστικών ενδονουκλεασών (HaeIII, DdeI, NcoI και AvaI). Εάν το RFLP πρότυπο δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό του γενότυπου λόγω σημειακών μεταλλάξεων ή/και ανασυνδυασμού τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν 2 επιπλέον περιοριστικές ενδονουκλεάσες (HpaII και StyI) (Georgoroulou et al. 2000).

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 3 περιοριστικές ενδονουκλεάσες (HaeIII, HpaII και NcoI) για τον προσδιορισμό του γενότυπου των Sabin στελεχών. Στον παρακάτω

πίνακα φαίνονται τα προϊόντα που προκύπτουν μετά από πέψη των προτύπων στελεχών Sabin με τα τρία αυτά ένζυμα (πίνακας 6.1).

Εμβολιακό στέλεχος ένζυμο	Hae III	Hpa II	NcoI
Sabin 1	209, 90, 80, 55	162, 150, 109	232, 210
Sabin 2	210, 149, 80	150, 121, 108	No cut
Sabin 3	146, 130, 70, 53	148 (+148), 121	315, 120

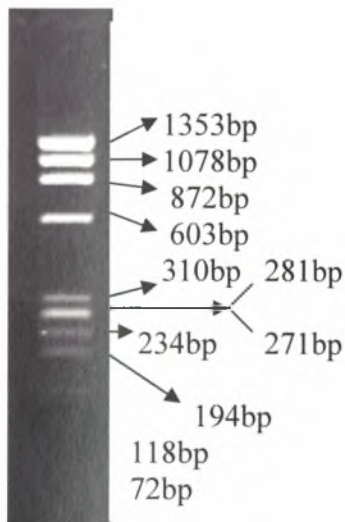
Πίνακας 6.1: προϊόντα πέψης (σε bp) των προτύπων στελεχών Sabin με τις τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (HaeIII, HpaII και NcoI).

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την RFLP αντίδραση είναι το εξής: Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει 2μl/tube περιοριστικής ενδονουκλεάσης (10 Units/μl) και 2μl/tube 10X Buffer (ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την δράση του κάθε ενζύμου). Κατόπιν σε σωληνάρια των 500μl προστίθενται 4μl/tube του παραπάνω μίγματος, 3μl του PCR προϊόντος που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα και το υπόλοιπο συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 20μl /tube. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε ειδικό μηχάνημα στους 37 °C για 2 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης, σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 5μl Loading Buffer (κατάλληλο διάλυμα χρωστικής) για την παύση της ενζυμικής αντίδρασης.

7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR και RFLP

Τα προϊόντα των PCR και RFLP ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης [INVITROGEN AGAROSE για τα προϊόντα της PCR και NUSIEVE AGAROSE(FMC BIOPRODUCTS) για τα προϊόντα του RFLP]. Το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA). Επίσης προστέθηκαν 85μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl) το οποίο είναι απαραίτητο καθώς προσδέεται στο DNA και το καθιστά έτσι εμφανές σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στα πηγαδάκια του πηκτώματος φορτώνουμε 10μl από κάθε PCR προϊόν (ενώ στην περίπτωση του RFLP: φορτώνουμε 25μl δείγματος ήδη αναμεμιγμένα με χρωστική) , αναμεμιγμένα με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής ώστε να μπορούμε να παρακολουθούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους που προέρχεται από την πέψη του φάγου ΦΧ174 με το ένζυμο HaeIII

(στην περίπτωση του RFLP φορτώνουμε επιπλέον στο τελευταίο πηγαδάκι 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους που προέρχεται από την πέψη του φάγου ΦΧ174 με το ένζυμο HinfI). Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόζεται τάση 200V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε κατάλληλη συσκευή υπεριωδών ακτίνων.



Εικόνα 7. 1: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους HaeIII ΦΧ174.

8. Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων που έγιναν με τα ζεύγη primers UG52/UC53, UG1/222 και S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651 στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Macrogen στην Κορέα.

9. Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

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

Στην συγκεκριμένη εργασία το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την στοίχιση των κατατεθειμένων αλληλουχιών των VP1 και 5'-NTR περιοχών των προτύπων στελεχών S1 (AY184219), S2 (AY184220) και S3 (AY184221) με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από

την αλληλούχιση των δειγμάτων. Όσον αφορά την 5'-NTR περιοχή η διαδικασία έγινε ως εξής: το PCR προϊόν (UG52/UC53) των δειγμάτων στοιχήθηκε με ολόκληρη την 5'-NTR περιοχή των προτύπων στελεχών. Όσον αφορά την VP1 περιοχή η διαδικασία έγινε ως εξής: αρχικά έγινε στοίχιση χωριστά του πρώτου μισού και του δεύτερου μισού της VP1 των δειγμάτων με ολόκληρη την VP1 των προτύπων κατατεθειμένων στελεχών. Στη συνέχεια έγινε σύρραψη του πρώτου μισού και του δεύτερου μισού της VP1 των δειγμάτων με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος (δες παρακάτω). Κατόπιν ολόκληρη πλέον η VP1 αλληλουχία του κάθε δείγματος στοιχήθηκε με την VP1 αλληλουχία του προτύπου στελέχους που αντιστοιχεί. Οι νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών αποτελούσαν μεταλλάξεις των εμβολιακών στελεχών που μελετήσαμε. Τέλος το πρόγραμμα clustalw χρησιμοποιήθηκε για την στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των VP1 περιοχών των δειγμάτων μας με τις αλληλουχίες της VP1 περιοχής των αντίστοιχων κατατεθειμένων προτύπων στελεχών για τον εντοπισμό τυχόν αμινοξικών διαφορών.

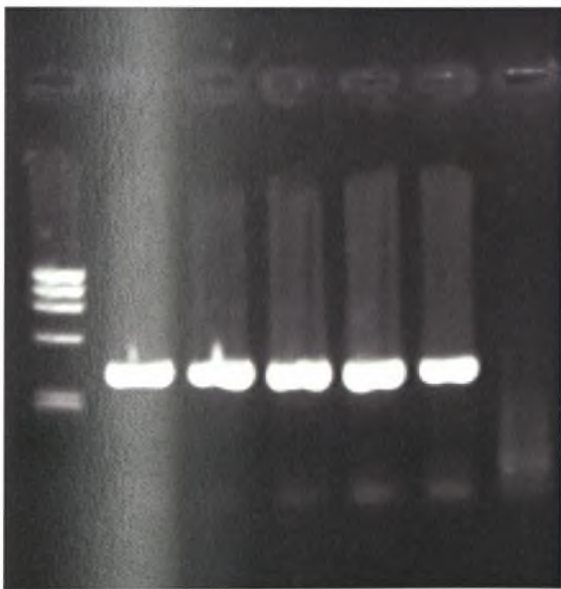
-Gene Runner V. 3.05: είναι ένα πρόγραμμα με πολλές ιδιότητες. Στην συγκεκριμένη εργασία το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των VP1 περιοχών των δειγμάτων μας στα 6 πιθανά πλαίσια ανάγνωσης από τα οποία επιλέξαμε εκείνο το πλαίσιο που δεν περιείχε κωδικόνιο λήξης. Επίσης το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την σύρραψη του πρώτου μισού και του δεύτερου μισού της VP1 των δειγμάτων μας.

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

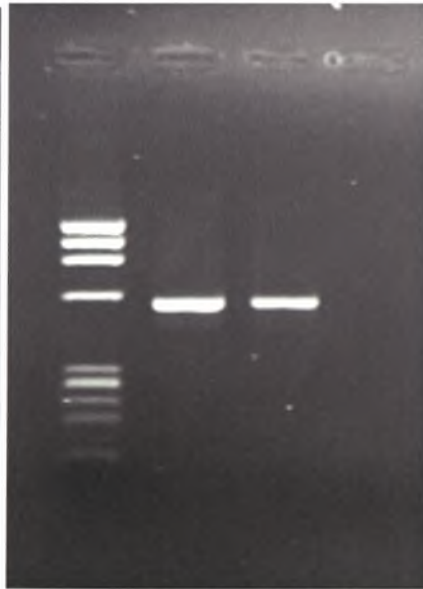
1. Αποτελέσματα PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την ενίσχυση ενός υψηλά συντηρημένου τμήματος της 5'-NTR περιοχής χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος primer UG52/UC53 ενώ για την ενίσχυση της VP1 περιοχής χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά ζεύγη primers. Πιο συγκεκριμένα για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος primer UG1/222 σε όλα τα δείγματα ενώ για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη primer (S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651) ειδικά για κάθε ένα από τα τρία στελέχη Sabin (S1, S2, S3) αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (Rd) μη μολυσμένα από ιό ως αρνητικός μάρτυρας στις PCR αντιδράσεις. Παρακάτω φαίνονται φωτογραφίες από PCR και με τα πέντε ζεύγη primers.



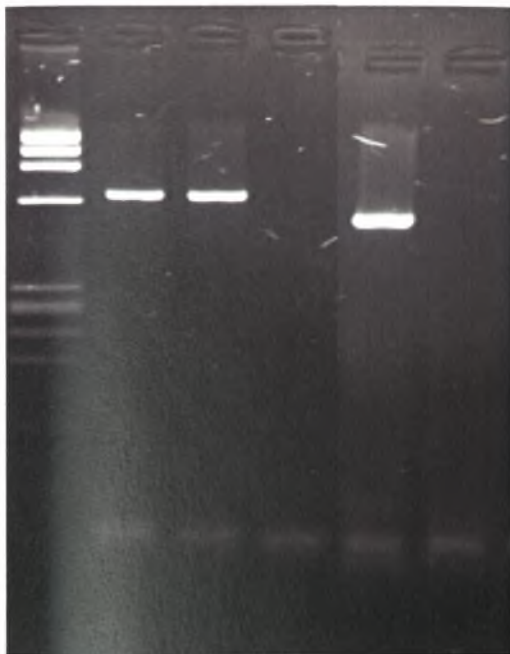
Ζεύγος UG52/UC53

(Lanes 1-5: PCR προϊόντα 440 bp,
Lane 6: αρνητικός μάρτυρας Rd).



Ζεύγος UG1/222,

(Lanes 1-2: PCR προϊόντα 568 bp,
Lane 3: αρνητικός μάρτυρας Rd).

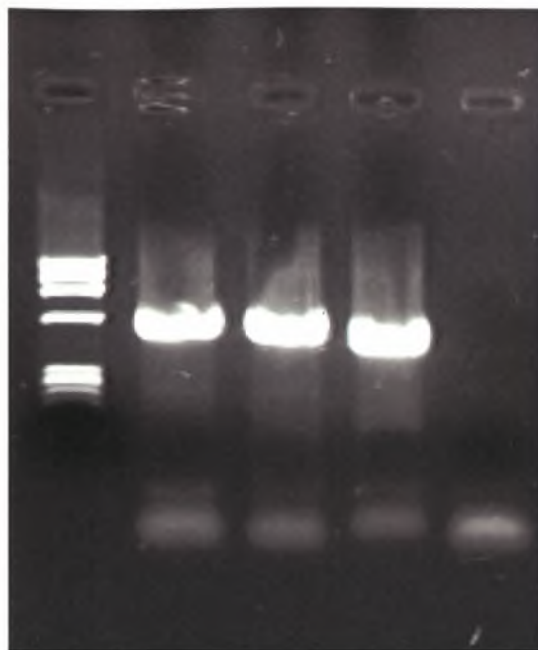


Ζεύγος S₁₃₇/S₁₆₈₈

(Lanes 1-2: PCR προϊόντα 652 bp,
Lane 3: αρνητικός μάρτυρας Rd).

Ζεύγος S₃₂₆/S₃₆₅₁

(Lanes 4: PCR προϊόν 626 bp,
Lane 5: αρνητικός μάρτυρας Rd).



Ζεύγος S₂₃₀/S₂₆₈₈

(Lanes 1-2: PCR προϊόντα 659 bp)

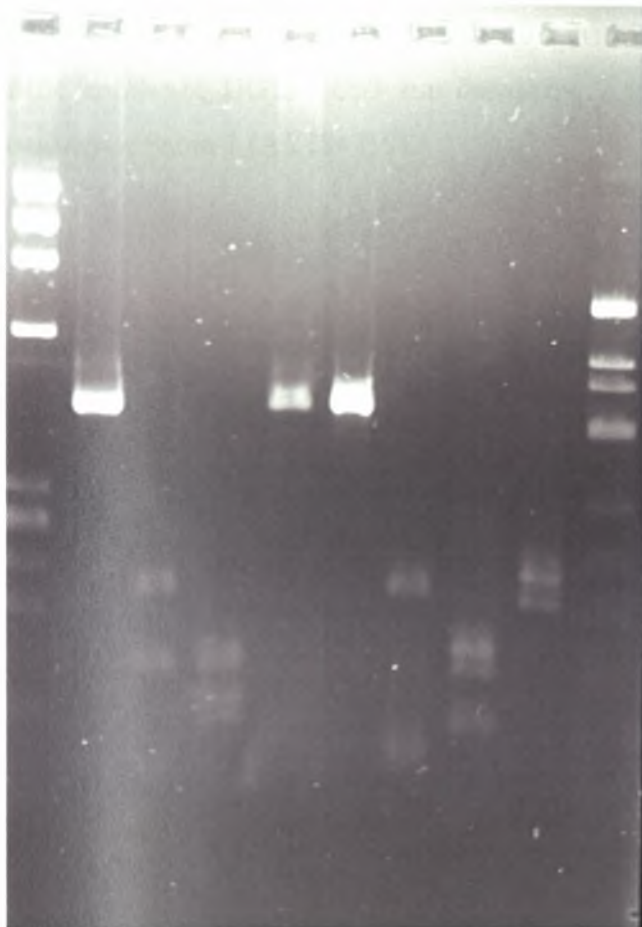
Ζεύγος S₃₂₆/S₃₆₅₁

(Lane 3: PCR προϊόν 626 bp,
Lane 4: αρνητικός μάρτυρας Rd)

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

2. Αποτελέσματα RFLP

Όπως αναφέρθηκε, για τον προσδιορισμό του γενότυπου των εμβολιακών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (HaeIII, HpaII και NcoI). Παρακάτω παρουσιάζεται φωτογραφία από RFLP με τα τρία αυτά ένζυμα.



Αποτελέσματα πέψης των δειγμάτων 12 (Sabin 2) και 152 (Sabin 1).

Δείγμα 12: (Lanes 1-4)

Lane 1: άκοπο PCR προϊόν (440 bp)

Lanes 2, 3, 4: προϊόντα πέψης του δείγματος 12 με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII, HpaII και NcoI αντίστοιχα.

Δείγμα 152: (Lanes 5-8)

Lane 5: άκοπο PCR προϊόν (440 bp)

Lanes 6, 7, 8: προϊόντα πέψης του δείγματος 152 με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII, HpaII και NcoI αντίστοιχα.

Στην πρώτη και τελευταία διαδρομή του πηκτώματος φαίνονται οι μάρτυρες μοριακού βάρους. Αριστερά: ΦΧ174 (HaeIII), Δεξιά: ΦΧ174 (HinfI)

3. Αποτελέσματα ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Όπως αναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για στοίχιση (μέσω του clustalw) με τις αλληλουχίες των κατατεθειμένων πρότυπων στελεχών Sabin με σκοπό την εύρεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών μεταλλάξεων. Παρακάτω απεικονίζεται η στοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του PCR προϊόντος UG52/UC53 του δείγματος 7 με την 5'-NTR αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin 1 (AY184219).

```
7 -----
5'-UTR TTAA AACAGCTCTGGGTTGCACCCACCCAGAGGCCACGTGGCGGCTAGTACTCCGGT 60

7 -----
5'-UTR ATTGCGGTACCCTTGTACGCCTGTTTATACTCCCTTCCCGTAACTTAGACGCACAAAAC 120

7 -----
5'-UTR CAAGTTCAATAGAAGGGGTACAAACCAGTACCACCACGAACAAGCACTTCTGTTTCCCC 180

7 ----ATGTTGTATAGACTGCTTGCCTGGTTGAAAGCGACGGATCCGTTATCCGCTTATGT 56
5'-UTR GGTGATGTTGTATAGACTGCTTGCCTGGTTGAAAGCGACGGATCCGTTATCCGCTTATGT 240
*****

7 ACTTCGAGAAGCCCAGTACCACCTCGGAATCTTCGATGCGTTGCGCTCAGCACTCAACCC 116
5'-UTR ACTTCGAGAAGCCCAGTACCACCTCGGAATCTTCGATGCGTTGCGCTCAGCACTCAACCC 300
*****

7 CAGAGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCTGGACATCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCT 176
5'-UTR CAGAGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCTGGACATCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCT 360
*****

7 GCGTTGGCGGCCACCTATGGCTAACGCCATGGGACGCTAGTTGTGAACAAGGTGTGAAG 236
5'-UTR GCGTTGGCGGCCACCTATGGCTAACGCCATGGGACGCTAGTTGTGAACAAGGTGTGAAG 420
*****

7 AGCCTATTGAGCTACATAAGAATCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACCTCGGG 296
5'-UTR AGCCTATTGAGCTACATAAGAATCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACCTCGGG 480
*****

7 GCAGGTGGTACAAAACAGTGATTTGGCCTGTCGTAACGCGCAAGTCCGTGGCGGAACCGA 356
5'-UTR GCAGGTGGTACAAAACAGTGATTTGGCCTGTCGTAACGCGCAAGTCCGTGGCGGAACCGA 540
*****

7 CTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATTTTATTTGTTGGCTGGTTATGGTGACAAT---- 412
5'-UTR CTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATTTTATTTGTTGGCTGGTTATGGTGACAATCACA 600
*****

7 -----
5'-UTR GATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATTGGCCATCCGGTGAAAGTGAGATTCATTATCTAT 660

7 -----
5'-UTR CTGTTTGCTGGATTCGCTCCATTGAGTGTGTTACTCTAAGTACAATTTCAACAGTTATT 720

7 -----
5'-UTR TCAATCAGACAATTGTATCATA 742
```

Ακολουθεί η στοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 του δείγματος 7 με την VP1 του πρότυπου στελέχους Sabin 1 (AY184219).

```

7VP1      GGGTTAGGT CAGATGCTT GAAAGCATGATTGACAACACAGTCCCGTGA AACCGGTGGGGGC 59
VP1S1    GGGTTAGGT CAGATGCTT GAAAGCATGATTGACAACACAGTCCCGTGA AACCGGTGGGGGC 59
          *****
7VP1      GCGGACGTCTAGAGACGCTCTCCCAAACACTGAAGCCAGTGGACCAGCACACTCCAAGGA 120
VP1S1    GCGGACGTCTAGAGACGCTCTCCCAAACACTGAAGCCAGTGGACCAGCACACTCCAAGGA 119
          *** *****
7VP1      AATCCGGCCTCACC CGGTGGAGACTGGGGCCACAAATCCACTAATCCCTTCTGATAC 180
VP1S1    AATCCGGCCTCACC CGCAGTGGAAACTGGGGCCACAAATCCACTAGTCCCTTCTGATAC 179
          *****
7VP1      AGTGCAAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCATAGAGTCTTT 240
VP1S1    AGTGCAAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCATAGAGTCTTT 239
          *****
7VP1      CTTCCGCGCGGGTGCATGCGTGGCCATTATGACCGTGGATAACTCAGCCTCCACCGAGAA 300
VP1S1    CTTCCGCGCGGGTGCATGCGTGGCCATTATTAACCGTGGATAACTCAGCCTCCACCAAGAA 299
          *****
7VP1      CAAGGATAAGTATTTG CAGTGTGGAAGTCACTTATAAAGATACTGTCCAGTTACGGAG 360
VP1S1    TAAGGATAAGTATTTACAGTGTGGAAGTCACTTATAAAGATACTGTCCAGTTACGGAG 359
          *****
7VP1      GAAATTGGAGTTCCTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAATTTACCTTTGTGGTACTGC 420
VP1S1    GAAATTGGAGTTCCTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAATTTACCTTTGTGGTACTGC 419
          *****
7VP1      AAATTTTACTGAGACTAACAATGGGCATGCCCTTAAATCAAGTGTACCAATTAATGTACGT 480
VP1S1    AAATTTTACTGAGACTAACAATGGGCATGCCCTTAAATCAAGTGTACCAATTAATGTACGT 479
          *****
7VP1      ACCACCAGGCGCTCCAGTCCCGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAA 540
VP1S1    ACCACCAGGCGCTCCAGTCCCGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAA 539
          *****
7VP1      TCCATCAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCCGGATCTCGGTGCCATATGTTGG 600
VP1S1    TCCATCAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCCGGATCTCGGTACCCTATGTTGG 599
          *****
7VP1      TATTTGCAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCCTGAAAGACCA 660
VP1S1    TATTTGCAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCCTGAAAGACCA 659
          *****
7VP1      GTCGGCAGCACTAGGTGATFCCCTCTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACATCGGTATTTT 720
VP1S1    GTCGGCAGCACTAGGTGACTCCCTCTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACTTCGGTATTTT 719
          *****
7VP1      GGCTGTTAGAGTAGTCAATGATCACAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGTA 780
VP1S1    GGCTGTTAGAGTAGTCAATGATCACAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGTA 779
          *****
7VP1      TCTAAAACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGGTCCACCGAGGGCAGTGGCGTACTA 840
VP1S1    TCTAAAACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGGTCCACCGAGGGCAGTGGCGTACTA 839
          *****
7VP1      CGGCCCTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACACTTACACCCCTCTCCACCAAGGATCTGAC 900
VP1S1    CGGCCCTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACACTTACACCCCTCTCCACCAAGGATCTGAC 899
          *****
7VP1      CACATAT 907
VP1S1    CACATAT 906
          *****

```

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

Παρακάτω απεικονίζεται η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της VP1 του δείγματος 7 με την VP1 του πρότυπου στελέχους Sabin 1 (AY184219). Όπως ήδη αναφέρθηκε η αμινοξική αλληλουχία όλων των δειγμάτων ανακτήθηκε μέσω του προγράμματος GeneRunner.

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη
S1	7	C471 T C583 G
	152	T525 C C583 G
	IH	C583 G
S2	5	G302 A A481 G C584 G
	8	A481 G T575 A C584 G
	9	T398 C T437 C A481 G C576 T C584 G
	11	C584 G
	12	A481 G C584 G T597 A
	I34	A481 G C584 G
	IC	A481 G C584 G
	ID	A481 G T567 A
	IF	T398 C A481 G C584 G
	IA	T398 C A481 G C584 G

Πίνακας 3. 1: Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην 5'-NTR περιοχή (PCR προϊόν UG52/UC53) όλων των δειγμάτων. Οι αριθμοί παριστάνουν τις θέσεις των μεταλλάξεων. Με μπλε χρώμα παριστάνονται τα νουκλεοτίδια των πρότυπων εμβολιακών στελεχών ενώ με κόκκινο τα αλλαγμένα νουκλεοτίδια των στελεχών που μελετήσαμε.

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη	Αλλαγή αμινοξέος
S1	7	A2542G	
		A2617G	
		A262G	
		G2645A	Val56Ile
		A2749G	Ile90Met
		T2767C	
		A2774G	Lys99Glu
		T2779C	
		C2789T	
		A2795G	Thr106Ala
		C2905T	
		A3067G	
		G3070A	
		G3133A	
		C3157T	
		T3188A	Phe237Ile
		G3349A	
	152	A2623G	
		A2749G	Ile90Met
	IH	A3022G	
S2	5	A2908G	Ile143Val
	8	A2906T	
	9	T2909A	Ile143Asn
		C3252T	
	11	-	
	12	A2859G	
		T2888G	Phe136Cys
		T2909C	Ile143Thr
	I34	A2908G	Ile143Val
		T3330C	
IC	-		
ID	-		
IF	-		
IA	T2909C	Ile143Thr	

Πίνακας 3.2: Συνώνυμες και μη συνώνυμες μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή όλων των δειγμάτων. Οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος παριστάνονται με κόκκινο χρώμα. Τα αμινοξέα των πρότυπων εμβολιακών στελεχών παριστάνονται με μπλε χρώμα ενώ τα αλλαγμένα αμινοξέα των στελεχών που μελετήσαμε παριστάνονται με πράσινο χρώμα.

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

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μια ποικιλία πολιοϊών εμβολιακής προέλευσης μπορούν να απομονωθούν από άτομα που τους έχει χορηγηθεί το OPV εμβόλιο ή άτομα του στενού περιβάλλοντός τους, πιο συχνά απουσία κλινικών συμπτωμάτων. Ο βαθμός απόκλισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 περιοχής τους από την αντίστοιχη περιοχή των Sabin στελεχών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα "μοριακό ρολόι" για τον υπολογισμό της χρονικής διάρκειας κυκλοφορίας των πολιοϊών. Γενικά όλα τα στελέχη πολιοϊών που απομονώνονται από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα και προέρχονται από τα OPV στελέχη χαρακτηρίζονται ως πολιοϊοί εμβολιακής προέλευσης (VDPVs: vaccine-derived polioviruses). Ωστόσο, τα στελέχη αυτά έχουν ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες:

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

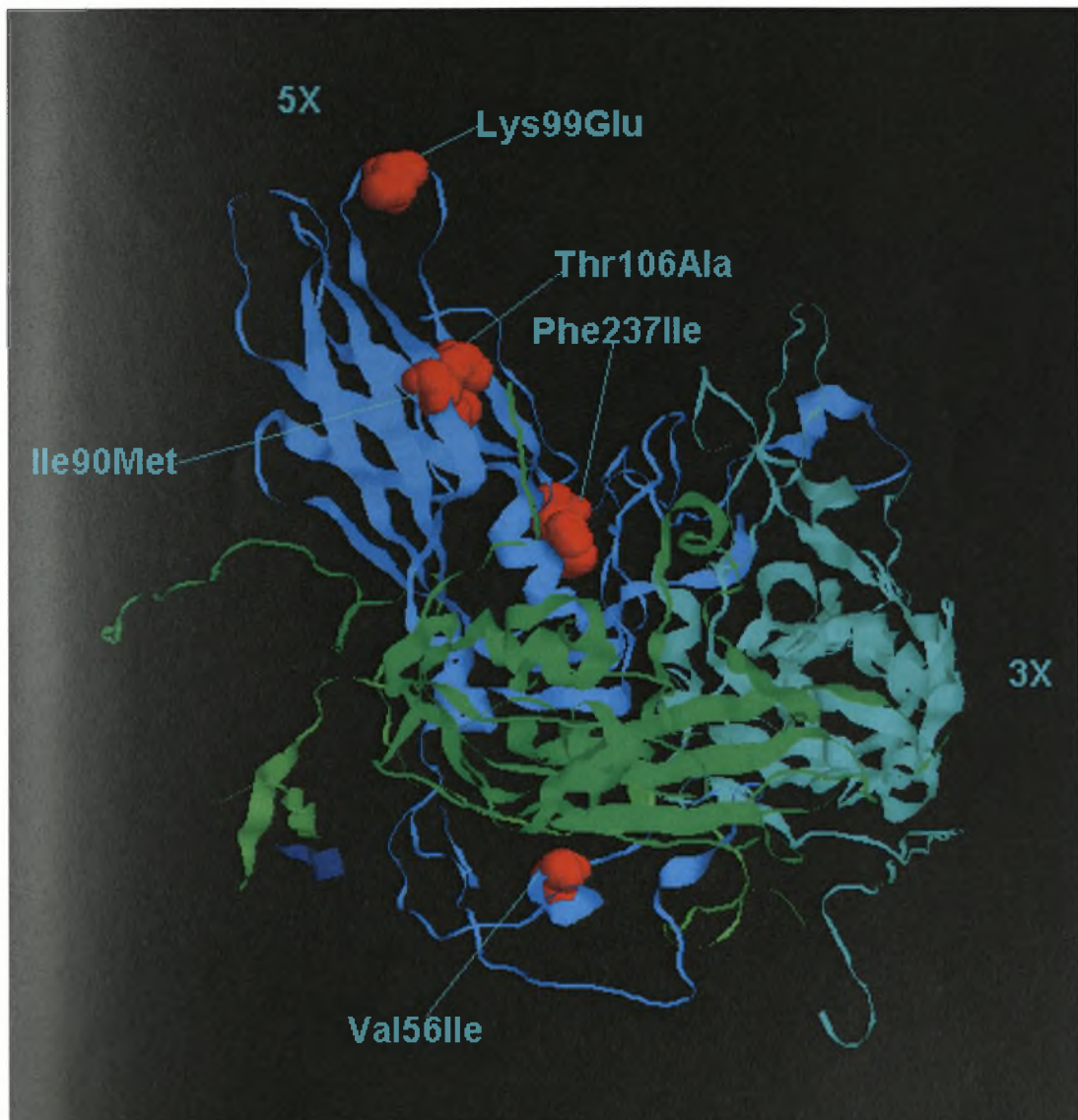
"Vaccine-derived polioviruses": Τα σπάνια στελέχη VDPV δείχνουν < ή = 99% ομοιότητα στην VP1 αλληλουχίας τους με αυτή των OPV στελεχών και ο βαθμός των γενετικών διαφορών τους είναι ενδεικτικός της παρατεταμένης κυκλοφορίας τους. Έχουν αναγνωριστεί δύο κατηγορίες των VDPV στελεχών: πολιοϊοί εμβολιακής προέλευσης που έχουν απομονωθεί από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPVs: immunodeficient VDPVs) και μεταδιδόμενοι εμβολιακής προέλευσης πολιοϊοί (cVDPVs: circulating VDPVs) (Walter R. Dowdle et al. 2003).

Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Ποσοστό απόκλισης
S1 (906bp)	7	1,87%
	152	0,22%
	1H	0,11%
S2 (903bp)	5	0,11%
	8	0,11%
	9	0,22%
	11	0%
	12	0,33%
	134	0,22%
	1C	0%
	1D	0%
	1F	0%
	1A	0,11%

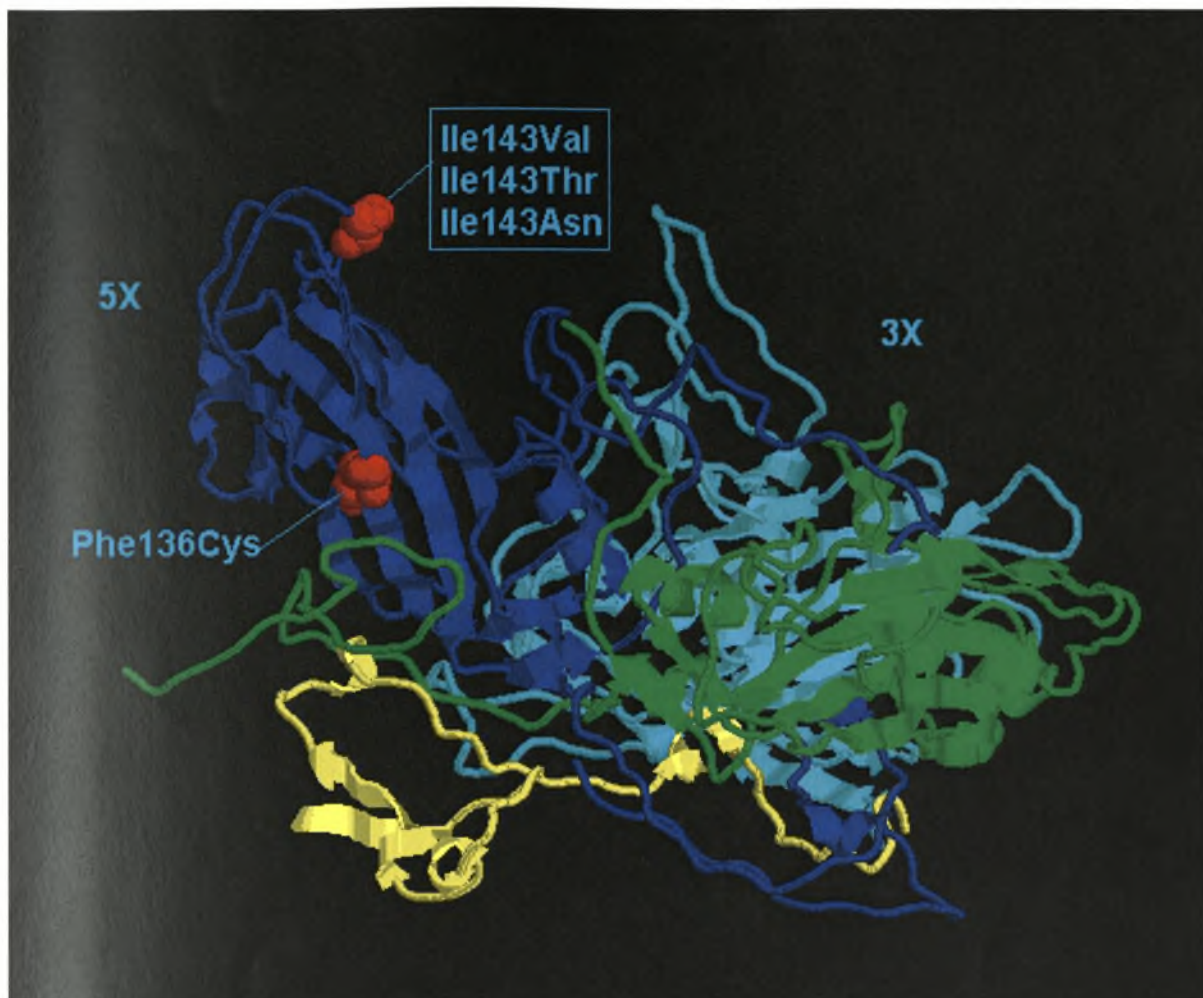
Πίνακας 3. 3: Το ποσοστό απόκλισης υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην VP1 περιοχή του κάθε δείγματος με το μήκος της VP1 του πρότυπου εμβολιακού στελέχους στο οποίο αντιστοιχεί το δείγμα.

4. Επεξεργασία αποτελεσμάτων με Rasmol V. 2.7.1.1

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



Εικόνα 4.1: Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 1 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό και η VP3 με πράσινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.

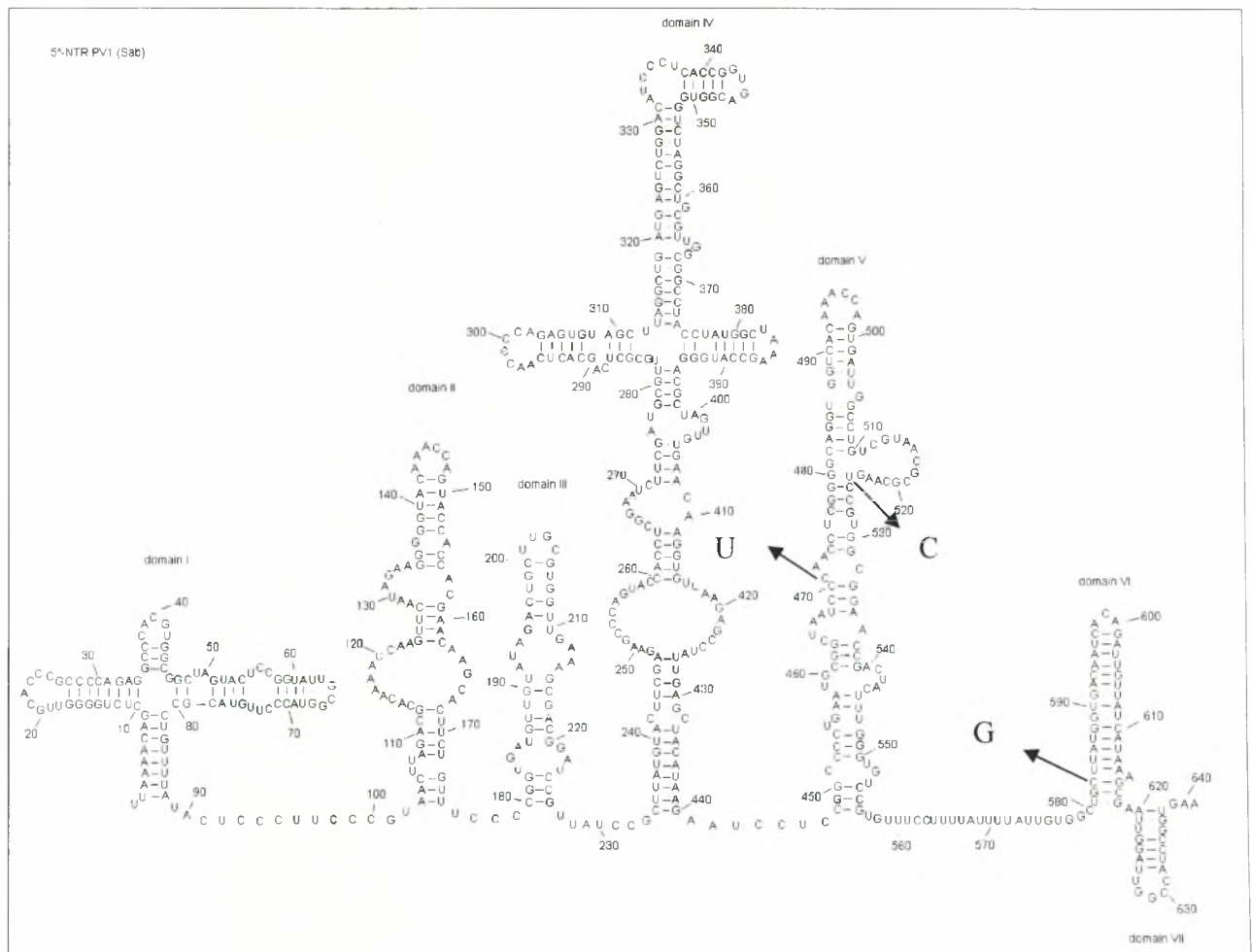


Εικόνα 4.2: Οι αμινοξικές αλλαγές όλων των στελεχών Sabin 2 αναπαρίστανται στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό, η VP3 με πράσινο και η VP4 με κίτρινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.

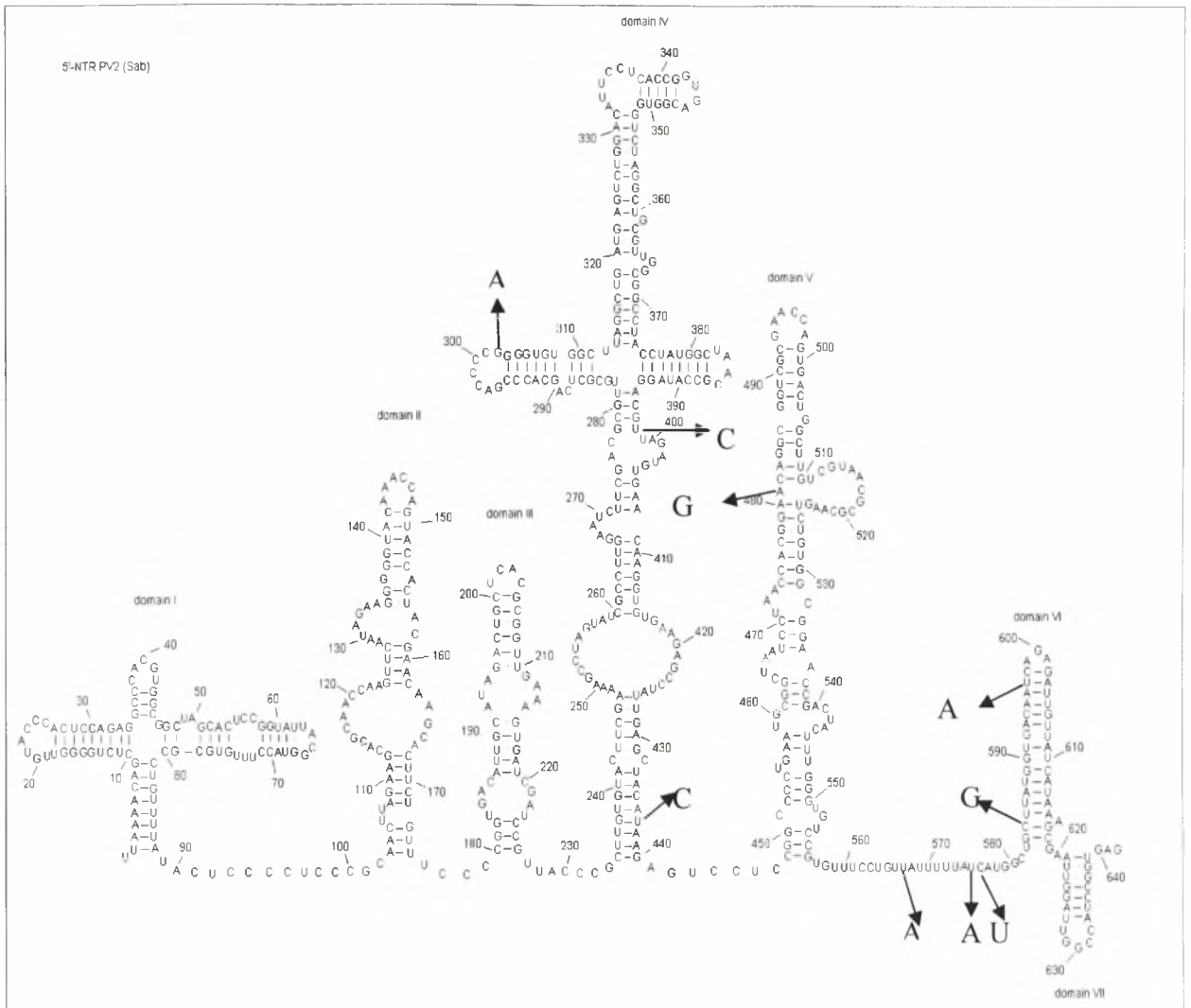
Με τη βοήθεια των εικόνων 4.1 και 4.2 αλλά και μέσω άλλων φωτογραφιών που απεικονίζουν τη δομή του πενταμερούς του ιού και ολόκληρου του καψιδίου ταξινομήσαμε τις αμινοξικές αλλαγές σε δύο κύριες κατηγορίες: 1) σε αυτές που βρίσκονται στο εξωτερικό του καψιδίου και 2) σε αυτές που βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου. Στα στελέχη Sabin 1 οι αμινοξικές αλλαγές Ile90Met, Lys99Glu, Thr106Ala, Phe237Ile είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και μόνο η Val56Ile εντοπίζεται στο εσωτερικό του. Στα στελέχη Sabin 2 η αμινοξική αλλαγή Ile143X (όπου X: Thr, Val ή Asn) εντοπίζεται στο εξωτερικό του καψιδίου ενώ η Phe136Cys βρίσκεται στο εσωτερικό του.

5. Εντοπισμός των μεταλλάξεων στην 5'-NTR περιοχή του ιικού γενώματος

Η ενίσχυση της 5'-NTR περιοχής του ιικού γενώματος με τη χρήση του ζεύγους primer UG52/UC53 οδήγησε στην παραγωγή PCR προϊόντος το οποίο εκτείνεται στην περιοχή 162-595 nt στα στελέχη τύπου Sabin 1 και στην περιοχή 162-596 nt στα στελέχη τύπου Sabin 2. Το PCR προϊόν μήκους 434 bp περιλαμβάνει τις περιοχές II-VI του IRES γενετικού στοιχείου. Μετά την αλληλούχιση του PCR προϊόντος και με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής εντοπίστηκαν οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην 5'-NTR περιοχή οι οποίες ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: 1)σε αυτές που εντοπίζονται σε μονόκλωνες περιοχές της δευτεροταγής δομής του IRES γενετικού στοιχείου και 2)σε αυτές που εντοπίζονται σε δίκλωνες περιοχές του IRES γενετικού στοιχείου. Παρακάτω ακολουθεί ο εντοπισμός των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων των στελεχών Sabin 1 και Sabin 2 που μελετήθηκαν, με τη χρήση των δευτεροταγών δομών των IRES γενετικών στοιχείων των αντίστοιχων προτύπων στελεχών Sabin.



Εικόνα 5.1: Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις των Sabin 1 στελεχών που μελετήθηκαν, με τη βοήθεια της δευτεροταγής δομής του IRES γενετικού στοιχείου του προτύπου στελέχους Sabin 1.



Εικόνα 5.2: Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις των Sabin 2 στελεχών που μελετήθηκαν, με τη βοήθεια της δευτεροταγής δομής του IRES γενετικού στοιχείου του προτύπου στελεχούς Sabin 2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP).

Όπως αναφέρθηκε το ζεύγος primer UG52/UC53 χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός υψηλά συντηρημένου τμήματος της 5'-NTR περιοχής. Η RFLP ανάλυση του τμήματος αυτού με τα ένζυμα περιορισμού HaeIII, HpaII και NcoI επέτρεψε τον καθορισμό του γενοτύπου τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεταξύ των συνολικά 13 κλινικών στελεχών, υπήρχαν τρία στελέχη Sabin τύπου 1 και δέκα στελέχη Sabin τύπου 2 (πίνακας 1.1). Κανένα από τα 13 κλινικά στελέχη δεν εμφάνισε πρότυπο διαφορετικό από τα αναμενόμενα των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin ούτε άθροισμα μπαντών μεγαλύτερο από το αναμενόμενο (434 bp). Αυτή η μέθοδος καθορισμού του γενοτύπου έχει το πλεονέκτημα ότι παρέχει πιο ακριβή και γρήγορα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους αλλά χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων καθώς τυχόν μεταλλάξεις σε κάποια από τα σημεία πέψης μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικό από το αναμενόμενο πρότυπο πέψης ή η ύπαρξη μιγμάτων πολιοϊών μπορεί να οδηγήσει σε άθροισμα μπαντών μεγαλύτερο από το αναμενόμενο (Georgoroulou et al. 2000).

Μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή του ιικού γενόματος

Από τις 30 συνολικά μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα κλινικά στελέχη μόνο οι 12 ήταν μη-συνώνυμες ενώ οι υπόλοιπες 18 ήταν συνώνυμες. Έτσι το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων (60%) ήταν συνώνυμες γεγονός το οποίο συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (Cherkasova et al. 2002, Figlerowicz et al. 2003). Οι συνώνυμες μεταλλάξεις παρά το γεγονός ότι δεν οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων δεν σημαίνει ότι είναι πάντα φαινοτυπικά ουδέτερες καθώς μπορεί να εντοπίζονται σε σημαντικές δευτεροταγές δομές και έτσι να επηρεάζουν την βιολογία του ιού (Agol 2002). Επίσης οι περισσότερες μεταλλάξεις (26 από τις 30) είναι transitions γεγονός το οποίο συμφωνεί με την τάση της 3D^{pol} να εισάγει κυρίως transitions κατά την ιική αντιγραφή (Agol 2002).

Σχεδόν όλα τα στελέχη εμφανίζουν ποσοστό απόκλισης της VP1 αλληλουχίας τους από την αντίστοιχη αλληλουχία των πρότυπων εμβολιακών στελεχών μικρότερη του 1% (πίνακας 3.3) και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως Sabin-like. Μάλιστα τα στελέχη 11, IC, ID και IF εμφανίζουν 0% απόκλιση από την αντίστοιχη αλληλουχία των πρότυπων εμβολιακών στελεχών γεγονός το οποίο δείχνει ότι η χρονική διάρκεια κυκλοφορίας τους είναι πολύ

μικρή. Εξαιρέση αποτελεί το στέλεχος 7 στο οποίο το ποσοστό απόκλισης είναι 1,87% και συνεπώς χαρακτηρίζεται ως cVDPV. Πιο συγκεκριμένα το στέλεχος 7 συγκεντρώνει 17 από τις 30 συνολικά μεταλλάξεις και 5 από τις 12 συνολικά μη-συνώνυμες μεταλλάξεις (πίνακας 3.2). Οι πιο σημαντικές βιολογικές ιδιότητες των cVDPV στελεχών είναι η αυξημένη ικανότητά τους να προκαλούν παραλυτική πολιομυελίτιδα στους ανθρώπους και η μεγαλύτερη ικανότητα μετάδοσής τους από άνθρωπο σε άνθρωπο. Πειραματικά έχει βρεθεί ότι τα cVDPV στελέχη είναι τόσο νευρομολυσματικά όσο και οι πολιοϊοί αγρίου τύπου και επίσης ότι έχουν αντιγονικές ιδιότητες που μοιάζουν περισσότερο με εκείνες των πολιοϊών αγρίου τύπου παρά με αυτές των Sabin στελεχών. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των cVDPV στελεχών είναι ότι στην πλειοψηφία τους είναι ανασυνδυασμένα με εντεροϊούς που εμφανίζουν στενή συγγένεια με τους πολιοϊούς (μέλη του είδους HEV-C) (Kew et al. 2004). Τα τελευταία προηγούμενα χρόνια, επιδημίες πολιομυελίτιδας που σχετίζονται με cVDPV έχουν συμβεί στην Ισπανία (2000-2001), στις Φιλιππίνες (2001) και στην Μαδαγασκάρη (2001-2002). Ο ανεπαρκής εμβολιασμός με το OPV και η προηγούμενη εκρίζωση του αντίστοιχου ορότυπου των ενδογενών πολιοϊών αγρίου τύπου ήταν οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου στις παραπάνω επιδημίες (Kew et al. 2004). Γενικά ο κίνδυνος της εμφάνισης επιδημιών από cVDPV έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια καθώς η κυκλοφορία των πολιοϊών αγρίου τύπου έχει σταματήσει στις περισσότερες χώρες του κόσμου. Παρά το γεγονός ότι το στέλεχος 7 είναι Sabin τύπου 1 ο κίνδυνος εμφάνισης cVDPV είναι υψηλότερος για τα OPV στελέχη τύπου 2 λόγω της μεγαλύτερης τάσης τους να μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο (Kew et al. 2004).

Στα στελέχη Sabin τύπου 1 (7, 152 και IH) εντοπίζονται οι 6 από τις συνολικά 12 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις. Στα στελέχη Sabin τύπου 2 (πίνακας 3.2) εντοπίζονται οι υπόλοιπες 6 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις. Παρακάτω ακολουθεί μια περιγραφή των μη-συνώνυμων μεταλλάξεων όσον αφορά τον εντοπισμό τους στο καψίδιο και τον πιθανό ρόλο τους στην αρμοστικότητα των στελεχών.

Δείγμα 7 (Sabin 1): Συγκεντρώνει 5 μη-συνώνυμες μεταλλάξεις από τις οποίες οι 4 (Ile90Met, Lys99Glu, Thr106Ala, Phe237Ile) είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και μόνο μία (Val56Ile) εντοπίζεται στο εσωτερικό του (εικόνα 4.1).

Η μετάλλαξη Val56Ile βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της VP1 το οποίο όπως είναι γνωστό αλληλεπιδρά με τα αμινοτελικά άκρα των υπόλοιπων πρωτεϊνών (VP2, VP3, VP4) στο εσωτερικό του καψιδίου και αυτή η αλληλεπίδραση παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου (Pfister et al. 1999). Μάλιστα έχει υποστηριχθεί ότι το κατάλοιπο 56 της VP1 συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο 225 της VP3 (Cherkasova et al. 2002). Επίσης το αμινοτελικό άκρο της VP1 παίζει σημαντικό ρόλο

στα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής των πολιοϊών. Πιο συγκεκριμένα η εξώθηση του αμινοτελικού άκρου της VP1 αποτελεί μία από τις μεταβολές που υφίσταται το καψίδιο μετά την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Έχει προταθεί ότι αυτή η μεταβολή συμβάλλει στην απελευθέρωση του ιικού RNA στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς το αμινοτελικό άκρο της VP1 χάρη στις υδρόφοβες ιδιότητές του οδηγεί στον σχηματισμό πόρου στην κυτταρική μεμβράνη (Blondel et al. 1998). Ωστόσο, η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν φαίνεται να επηρεάζει τις παραπάνω λειτουργίες καθώς τόσο η βαλίνη όσο και η ισολευκίνη χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη υδρόφοβων αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων.

Οι μεταλλάξεις Ile90Met και Thr106Ala περιλαμβάνουν κατάλοιπα που βρίσκονται στα β-πτυχωτά φύλλα B και C, αντίστοιχα. Αυτά τα δύο κατάλοιπα συμμετέχουν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (εικόνα 4.1) και συνεπώς συμβάλουν στην χαρακτηριστική αναδίπλωση της VP1 (8-κλώνο αντιπαράλληλο β-βαρέλι). Το κατάλοιπο 90 συμμετέχει επίσης στον σχηματισμό της αντιγονικής θέσης N-AgI. Τόσο η μετάλλαξη Ile90Met όσο και η μετάλλαξη Thr106Ala αποτελούν μεταστροφές στον γενότυπο του πατρικού στελέχους Mahoney (Cherkasova et al. 2002). Μάλιστα η μετάλλαξη Thr106Ala έχει συσχετισθεί με αυξημένη νευρομολυσματικότητα και πιθανόν αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αλανίνη συμμετέχει σε πιο ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την ισολευκίνη σε σύγκριση με την θρεονίνη η οποία είναι λιγότερο υδρόφοβη (Bouchard et al. 1995).

Η μετάλλαξη Lys99Glu βρίσκεται στην κορυφή της B-C θηλιάς της VP1 η οποία συνίσταται από τα κατάλοιπα 96-104 (εικόνα 4.1) (Cherkasova et al. 2002). Η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει τη δομή της αντιγονικής θέσης N-AgI η οποία όπως αναφέρθηκε σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 90-105 της VP1 (Herremans et al. 2000). Γενικά η συσσώρευση μεταλλάξεων στις αντιγονικές θέσεις του ιού είναι ένα συχνό φαινόμενο λόγω του γεγονότος ότι αυτές οι θέσεις είναι οι πιο εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς υφίστανται υψηλή αντιγονική πίεση. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στις θέσεις αυτές παρέχει στον ιό το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διαφεύγει της αναγνώρισης από τα αντισώματα του οργανισμού και συνεπώς να πολλαπλασιάζεται πιο αποτελεσματικά. Μάλιστα η αντικατάσταση της λυσίνης η οποία ανήκει στα βασικά αμινοξέα (θετικά φορτισμένα) από το γλουταμινικό οξύ το οποίο ανήκει στα όξινα αμινοξέα (αρνητικά φορτισμένα) αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά τη δομή της N-AgI.

Η μετάλλαξη Phe237Ile βρίσκεται στη βάση της αύλακας η οποία όπως αναφέρθηκε αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα. Σύμφωνα με τους Elizabeth Colston και Vincent Racaniello μετάλλαξη στην γειτονική θέση 236 επηρεάζει την μετάβαση από το 160S στο 135S ιικό σωματίδιο πιθανόν τροποποιώντας τις αλληλεπιδράσεις στην διεπιφάνεια μεταξύ

των πρωτομερών. Έτσι είναι πολύ πιθανό ότι στη θέση 237 η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης η οποία φέρει μια υδρόφοβη αρωματική πλευρική αλυσίδα από την ισολευκίνη η οποία φέρει υδρόφοβη αλειφατική πλευρική αλυσίδα θα επηρεάσει την παραπάνω μετάβαση η οποία όπως αναφέρθηκε είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κύτταρο ξενιστή.

Δείγματα 152 και IH (Sabin 1): Το δείγμα 152 φέρει μόνο μία μη-συνώνυμη μετάλλαξη (Ile90Met) της οποίας ο πιθανός ρόλος αναφέρθηκε παραπάνω ενώ το δείγμα IH δε φέρει μη-συνώνυμες μεταλλάξεις.

Δείγματα 5, 9, 12, I34, IA (Sabin 2): Όλα φέρουν μετάλλαξη στη θέση 143 στην οποία η ισολευκίνη αντικαθίσταται από τη βαλίνη, ασπαραγίνη ή θρεονίνη. Η ισολευκίνη κωδικοποιείται από την τριπλέτα ATT η οποία στα δείγματα 5, I34 μεταλλάσσεται σε GTT (βαλίνη), στα δείγματα 12 και IA μεταλλάσσεται σε ACT (θρεονίνη) ενώ στο δείγμα 9 μεταλλάσσεται σε AAT (ασπαραγίνη). Η μετάλλαξη Ile143Thr αποτελεί μεταστροφή στον γενότυπο του νευρομολυσματικού πατρικού στελέχους. Επιπλέον η παρουσία της ισολευκίνης στη θέση 143 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin 2 στελεχών. Συνεπώς η αντικατάσταση της ισολευκίνης από κάποιο άλλο αμινοξύ όπως βαλίνη, ασπαραγίνη ή θρεονίνη είναι πιθανό ότι οδηγεί σε αυξημένη νευρομολυσματικότητα των ιικών στελεχών. Η μετάλλαξη Ile143Val πιθανόν έχει μικρότερη επίδραση στο φαινότυπο καθώς εμπλέκει αμινοξέα με παρόμοιες ιδιότητες ενώ αντίθετα οι μεταλλάξεις Ile143Thr και Ile143Asn αναμένεται να τον επηρεάζουν περισσότερο καθώς τα αμινοξέα θρεονίνη και ασπαραγίνη είναι λιγότερο υδρόφοβα από την βαλίνη. Το κατάλοιπο 143 της VP1 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου στη DE θηλιά η οποία συνδέει τα β-πτυχωτά φύλλα D και E της VP1 (εικόνα 4.2). Η DE θηλιά αλληλεπιδρά στενά με την BC θηλιά της VP1 (Yeates et al. 1991) ώστε να σχηματίσουν την N-AgI ενώ παράλληλα έχει προταθεί ότι η BC θηλιά επηρεάζει το εύρος ξενιστή των πολιοϊών μέσω εξαρτώμενων από τον υποδοχέα γεγονότων στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (Moss and Racaniello 1991). Έτσι είναι πιθανό ότι το κατάλοιπο 143 της VP1 επηρεάζει γεγονότα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα στα αρχικά στάδια της μόλυνσης.

Το δείγμα 12 φέρει επιπλέον τη μετάλλαξη Phe136Cys. Η μετάλλαξη Phe136Cys βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου κοντά στη θέση πρόσδεσης του μορίου της σφιγγοσίνης στη VP1 (εικόνα 4.2). Σύμφωνα με τους Elizabeth Colston και Vincent Racaniello μετάλλαξη στο κατάλοιπο 132 το οποίο επίσης βρίσκεται κοντά στο σημείο πρόσδεσης της σφιγγοσίνης επηρεάζει τη θέση της και το γεγονός αυτό με τη σειρά του τροποποιεί τη δομή της αύλακας και κατά συνέπεια την συγγένεια πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα. Έτσι είναι πιθανό ότι στη θέση 136 η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης η οποία

φέρει αρωματική πλευρική αλυσίδα από την κυστεΐνη η οποία φέρει μικρότερη πλευρική αλυσίδα επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ ιού-υποδοχέα.

Δείγματα 8, 11, IC, ID, IF (Sabin 2): Το δείγμα 8 δεν φέρει μη-συνώνυμη μετάλλαξη ενώ τα δείγματα 11, IC, ID, IF δεν φέρουν καθόλου μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή τους.

Μεταλλάξεις στην 5'-NTR περιοχή του ιικού γενώματος

Από τις συνολικά 32 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα στελέχη τύπου Sabin 1 και Sabin 2 οι περισσότερες ήταν transitions και μάλιστα η πλειοψηφία τους αφορούσε μετάλλαξη από πουρίνη σε πουρίνη (A → G). Παρακάτω ακολουθεί μια ερμηνεία των μεταλλάξεων όσον αφορά τον εντοπισμό τους και τον πιθανό ρόλο τους στην αρμοστικότητα των στελεχών.

Στελέχη τύπου Sabin 1 : Και στα τρία στελέχη Sabin 1 εντοπίστηκε η μετάλλαξη C583G. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη βρίσκεται σε δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 5.1) και συγκεκριμένα στην περιοχή VI η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης (559-624 nt) του κυτταρικού πεπτιδίου p52 (αυτοαντιγόνο La) σημαντικού παράγοντα για την μετάφραση του γενώματος των πολιοϊών (Equestre et al. 1991). Η μετάλλαξη C583G θα οδηγούσε σε καταστροφή της δευτεροταγής δομής της VI περιοχής λόγω μετατροπής του ζεύγους CG σε GG. Ωστόσο είναι πολύ πιθανό ότι αυτό αποφεύγεται χάρη στο φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance).

Η μετάλλαξη C471T στο στέλεχος 7 εντοπίζεται σε μονόκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 5.1) και συνεπώς δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της δευτεροταγής δομής της. Ωστόσο, η παρουσία της και σε άλλα στελέχη Sabin 1 που έχουν απομονωθεί από VAPP περιπτώσεις (Cherkasova et al. 2002) δείχνει ότι πιθανόν έχει θετική επίδραση στην αρμοστικότητα του ιού.

Τέλος η μετάλλαξη T525C στο δείγμα 152 βρίσκεται σε δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 5.1) και συνεπώς σταθεροποιεί τη δευτεροταγή δομή της V περιοχής του καθώς οδηγεί σε μετατροπή του ζεύγους GU σε GC. Το νουκλεοτίδιο στη θέση 525 σχηματίζει ζεύγος βάσεων με το νουκλεοτίδιο στη θέση 480 το οποίο αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των στελεχών Sabin 1 (Minor 1999, Guillot et al. 1994). Έχει προταθεί ότι η μετατροπή του ζεύγους AU (480-525) του νευρομολυσματικού στελέχους Mahoney στο ασθενέστερο ζεύγος βάσεων GU συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στον εξασθενημένο φαινότυπο των Sabin 1. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η μετάλλαξη αποσταθεροποιεί τοπικά την αναδίπλωση του RNA και οδηγεί σε εξασθένηση

της αλληλεπίδρασης του παράγοντα eIF4G με την περιοχή V του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου με συνέπεια την μείωση της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης (Ochs et al. 2003). Συνεπώς η μετάλλαξη T525C οδηγεί σε αύξηση της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης και της νευρομολυσματικότητας του ιού.

Στελέχη τύπου Sabin 2: Σε όλα τα στελέχη Sabin τύπου 2 εντοπίστηκε η μετάλλαξη A481G η οποία αποτελεί μεταστροφή στον γενότυπο του πατρικού νευρομολυσματικού στελέχους. Η παρουσία της αδενίνης στη θέση 481 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin 2 και έχει προταθεί ότι ο εξασθενημένος φαινότυπος προκύπτει λόγω μείωσης της αποτελεσματικότητας της μετάφρασης όπως και στην περίπτωση του νουκλεοτιδίου στη θέση 480 των Sabin 1 (Guillot et al. 1994, Ochs et al. 2003). Η μετάλλαξη A481G έχει εντοπιστεί σε στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή άτομα λίγο μετά την χορήγηση του εμβολίου ή από VAPP περιπτώσεις (Guillot et al. 1994, Equestre et al. 1991). Έχει βρεθεί ότι η μετάλλαξη A481G στα στελέχη Sabin τύπου 2 συμβαίνει συχνότερα σε σύγκριση με την μετάλλαξη G480A στα στελέχη Sabin τύπου 1 (Minor 1999) γεγονός το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αφού όλα τα στελέχη Sabin τύπου 2 έφεραν τη πρώτη μετάλλαξη ενώ κανένα από τα στελέχη Sabin τύπου 1 δεν έφερε την τελευταία μετάλλαξη.

Μία άλλη μετάλλαξη που εντοπίστηκε σε τρία από τα δέκα στελέχη Sabin 2 είναι η T398C. Έχει προταθεί ότι τόσο η μετάλλαξη T398C όσο και η μετάλλαξη T437C που εντοπίστηκε στο στέλεχος 9 οδηγούν σε αύξηση της νευρομολυσματικότητας των Sabin 2 αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις A481G και Ile143Thr (Friedrich 1996). Τόσο η μετάλλαξη T398C όσο και η μετάλλαξη T437C εντοπίζονται σε δίκλωνες περιοχές του IRES γενετικού στοιχείου (εικόνα 5. 2) και συγκεκριμένα οδηγούν σε μετατροπή του ζεύγους GU σε GC. Κατά συνέπεια αυξάνεται η σταθερότητα της δευτεροταγής δομής της, η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και η νευρομολυσματικότητα. Μάλιστα η μετάλλαξη T398C έχει εντοπιστεί συγχρόνως με την μετάλλαξη A481G αρκετά συχνά σε στελέχη που απομονώθηκαν από VAPP περιπτώσεις (Friedrich 1996).

Χαρακτηριστική είναι επίσης η παρουσία της μετάλλαξης C584G σε εννιά από τα δέκα στελέχη Sabin 2. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη βρίσκεται σε δίκλωνη περιοχή του IRES γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στην περιοχή VI (εικόνα 5.1). Η μετάλλαξη αυτή θα οδηγούσε σε καταστροφή της δευτεροταγής δομής της καθώς μετατρέπει το ζεύγος CG σε GG. Ωστόσο είναι πιθανό ότι κάτι τέτοιο αποφεύγεται λόγω του φαινομένου της συν-μεταβλητότητας. Η μετάλλαξη T597A στο στέλεχος 12 δρα με τον ίδιο τρόπο όπως και η μετάλλαξη C584G (εικόνα 5. 2). Τέλος οι μεταλλάξεις T567A στο στέλεχος ID, T575A στο

στέλεχος 8 και C576T στο στέλεχος 9 εντοπίζονται σε μονόκλωνη περιοχή του IRES γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στη μεταβλητή περιοχή (X_m) του συντηρημένου μοτίβου Y_n-X_m-AUG (εικόνα 5.1). Συνεπώς δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των δύο περιοχών (5'-NTR και VP1) του ιικού γενώματος. Η διαφορά αυτή είναι πιο εμφανής στο στέλεχος 7 το οποίο στην VP1 περιοχή συγκεντρώνει 17 νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις ενώ στην 5'-NTR μόνο δύο. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η 5'-NTR περιοχή φέρει σημαντικές για την μετάφραση και την αντιγραφή του ιού δευτεροταγές δομές ενώ αντίθετα η VP1 περιοχή χαρακτηρίζεται από μέτριο ως υψηλό P-number (δείκτης για την τάση των νουκλεοτιδίων να σχηματίζουν ζεύγη βάσεων) που σημαίνει ότι δεν φέρει συντηρημένες δευτεροταγές δομές. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι η 5'-NTR περιοχή εμφανίζεται να είναι υψηλά συντηρημένη και επίσης να χαρακτηρίζεται από την υψηλή παρουσία του φαινομένου της συν-μεταβλητότητας. Επίσης χαρακτηριστικός είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διάφορων λειτουργικών περιοχών της VP1 πρωτεΐνης. Έτσι για παράδειγμα οι περιοχές της VP1 πρωτεΐνης που είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου (θηλιές και αντιγονικές θέσεις) συσσωρεύουν περισσότερες μεταλλάξεις από τις περιοχές που βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου ή στην αύλακα λόγω της υψηλής αντιγονικής πίεσης που υφίστανται οι πρώτες.

Ανασυνδυασμός

Η αλληλούχιση των δύο περιοχών του ιικού γενώματος (5'-NTR και VP1) δεν εντόπισε κάποιο ανασυνδυασμό γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς στην 5'-NTR περιοχή δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι τώρα ανασυνδυασμός ενώ στην VP1 περιοχή είναι πολύ σπάνιος (Blomqvist et al. 2003, Cherkasova et al. 2002, Martin et al. 2002). Για τον εντοπισμό ανασυνδυασμού θα πρέπει να αλληλουχηθούν οι P2 και P3 περιοχές του ιικού γενώματος στις οποίες λαμβάνει χώρα συνήθως ο ανασυνδυασμός (Rohit Duggal and Eckard Wimmer 1999). Μάλιστα ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η αλληλούχιση του στελέχους 7 το οποίο είναι cVDPV και όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι πολύ πιθανό να είναι ανασυνδυασμένο στην P2 ή P3 περιοχή με κάποιο μέλος του είδους HEV-C.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Papers:

- 1) **Agirre A., A. Barco, L. Carrasco, and J. L. Nieva. 2002.** Viroporin-mediated membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* 277(43):40434-40441.
- 2) **Andino R., G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso, and D. Baltimore. 1993.** Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5'-end of viral RNA. *The EMBO Journal* 12(9): 3587-3598.
- 3) **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- 4) **Barco A. and L. Carrasco. 1998.** Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J. Virol.* 72(5):3560-3570.
- 5) **Barton D. J., B. J. O'Donnell, and J. B. Flanagan. 2001.** 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *The EMBO Journal* 20(6): 1439-1448.
- 6) **Basavappa R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly:structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 angstrom resolution. *Protein Sci.* 3:1651-1669.
- 7) **Betty Brown, M. Steven Oberste, Kaija Maher, and Mark A. Pallansch. 2003.** Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77:8973-8984.
- 8) **Blomqvist S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi. 2003.** Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* 84(3):573-580.
- 9) **Bouchard M. J., D. H. Lam, and V. R. Racaniello. 1995.** Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J. Virol.* 69:4972-4978.
- 10) **Boussadia O., M. Niepmann, L. Creancier, A. C. Prats, F. Dautry, and H. Jacquemin-Sablon. 2003.** Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the Internal Ribosome Entry Sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.* 77(6): 3353-3359.

- 11) **Brown B., S. Oberste, K. Maher, and M. Pallansch. 2003.** Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(16):8973-8984.
- 12) **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
- 13) **Cherkasova E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002.** Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76(13):6791-6799.
- 14) **Cho M.W., N. Teterina, D. Egger, K. Bienz, and E. Ehrenfeld. 1994.** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202: 129-145.
- 15) **Choe S. S. and K. Kirkegaard. 2004.** Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* 78(11): 5973-5982.
- 16) **Colston E. and V. R. Racaniello. 1994.** Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *The EMBO Journal* 13(24): 5855-5862.
- 17) **Cuervo N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic, and F. Delpeyroux. 2001.** Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.* 75(13):5740-5751.
- 18) **Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. 2002.** Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.
- 19) **Duggal R., A. Cuconati, M. Gromeier, and E. Wimmer. 1997.** Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13786-13791.
- 20) **Duggal R. and E. Wimmer. 1999.** Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology* 258:30-41.
- 21) **Equestre M., D. Genovese, F. Cavalieri, L. Fiore, R. Santoro, and R. P. Bercoff. 1991.** Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J. Virol.* 65(5): 2707-2710.
- 22) **Fogg M. H., N. L. Teterina, and E. Ehrenfeld. 2003.** Membrane requirements for uridylation of the poliovirus VPg protein and viral RNA synthesis in vitro. *J. Virol.* 77(21): 11408-11416.

- 23) **Georgescu M. M., F. Delpeyroux, and R. Crainic. 1995.** Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* 76(9):2343-2348.
- 24) **Georgopoulou A., P. Markoulatos, N. Spyrou, and N. C. Vamvakopoulos. 2000.** Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):337-4342.
- 25) **Georgopoulou A., and P. Markoulatos. 2001.** Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11):792-799.
- 26) **Goodfellow I., Y. Chaudhry, A. Richardson, J. Meredith, J. W. Almond, W. Barclay, and D. J. Evans. 2000.** Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74(10): 4590-4600.
- 27) **Goodfellow I., D. Kerrigan, and D. J. Evans. 2003.** Structure and function analysis of the poliovirus cis-acting replication element (CRE). *RNA* 9: 124-137.
- 28) **Guillot S., D. Otelea, F. Delpeyroux and R. Crainic. 1994.** Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. *Vaccine* 12(6): 503-507.
- 29) **Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert- Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2000.** Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74(18):8434-8443.
- 30) **Herold J. and R. Andino. 2001.** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.
- 31) **Herremans T., J. H. J. Reimerink, T. G. Kimman, H. G. A. M. VAN DER Avoort, and M. P. G. Koopmans. 2000.** Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with Oral Live Attenuated or Inactivated Poliovirus Vaccine and after natural exposure. *Clin. and Diagn. Labor. Immunol.* 7(1): 40-44.
- 32) **Hyypia, T., T. Hovi, N. J. Knowles, and G. Stanway. 1997.** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78:1-11.
- 33) **Joachims M., K. S. Harris, and D. Etchison. 1995.** Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* 211:451-461.

- 34) **Jurgens C. and J. B. Flanagan. 2003.** Initiation of poliovirus negative-strand RNA synthesis requires precursor forms of P2 proteins. *J. Virol.* 77(2): 1075-1083.
- 35) **Karakasiliotis I., P. Markoulatos, and T. Kartsorchis. 2004.** Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell Probes.* 18(2):103-109.
- 36) **King, A. M. Q., F. Brown, P. Christian, T. Hovi, T. Hyypia, N. J. Knowles, S. M. Lemon, P. D. Minor, A. C. Palmenberg, T. Skern, and G. Stanway. 1999.** Picornaviridae, p. 996. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle and R. B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, Calif.
- 37) **Krausslich H. G., C. Holscher, Q. Reuer, J. Harber, and E. Wimmer. 1990.** Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of the capsid and for viral infectivity. *J. Virol.* 64:2433-2436.
- 38) **Kuyumcu-Martinez N. M., M. E. Van Eden, P. Younan, and R. E. Lloyd. 2004.** Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. and Cell. Biology* 24(4):1779-1790.
- 39) **Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, Cox S, Buontempo P, Skelton A, Demartino J, Rozhon E, Schwartz J, Girijavallabhan V, O'Connell J, Arnold E. 1997.** Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent sch48973-comparison of the structural and biological properties of the three poliovirus serotypes. *Structure* 5:961-978.
- 40) **Liu H. M., D. P. Zheng, L. B. Zhang, M. S. Oberste, M. A. Pallansch, and O. M Kew. 2000.** Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* 74(23):11153-11161.
- 41) **Lyle J. M., A. Clewell, K. Richmond, O. C. Richards, D. A. Hope, S. C. Schultz, and K. Kirkegaard. 2002.** Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 277(18): 16324-16331.
- 42) **Lyons T., K. E. Murray, A. W. Roberts, and D. J. Barton. 2001.** Poliovirus 5'-Terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 75(22): 10696-10708.

- 43) **Martin J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor. 2002.** Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76(21):1092-10928.
- 44) **Morasco B. J., N. Sharma, J. Parilla, and J. B. Flanagan. 2003.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9): 5136-5144.
- 45) **Moss E. G., V. R. Racaniello. 1991.** Host range determinants located on the interior of the poliovirus capsid. *EMBO J.* 10: 1067-1074.
- 46) **Murray K. E. and D. J. Barton. 2003.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(8): 4739-4750.
- 47) **Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch. 1999.** Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941-1948.
- 48) **Ochs K., L. Saleh, G. Bassili, V. H. Sonntag, A. Zeller, and M. Niepmann. 2002.** Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.* 76(5): 2113-2122.
- 49) **Ochs K., A. Zeller, L. Saleh, G. Bassili, Y. Song, A. Sonntag, and Michael Niepmann. 2003.** Impaired Binding of Standard Initiation Factors Mediates Poliovirus Translation Attenuation. *J. Virol.* 77(1): 115-122
- 50) **Paul A. V., J. H. van Boom, D. Filippov, and E. Wimmer. 1998.** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *NATURE* 393: 280-284.
- 51) **Paul A. V., J. Yin, J. Mugavero, E. Rieder, Y. Liu, and E. Wimmer. 2003.** A 'Slide-back' mechanism for the initiation of Protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Biol. Chem.* 278(45): 43951-43960.
- 52) **Prevot D., D. Decimo, C. H. Herbreteau, F. Roux, J. Garin, J. L. Darlix, and T. Ohlmann. 2003.** Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal* 22(8): 1909-1921.
- 53) **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.
- 54) **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.

- 55) **Weidman M. K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai, and A. Dasgupta. 2003.** The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Research* 95:75-85.
- 56) **Yeates T. O., D. H. Jacobson, A. Martin, C. Wychowski, M. Girard, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1991.** Three-dimensional structure of a mouse-adapted type-2/type-1 poliovirus chimera. *EMBO J.* 10: 2331-2341.

Reviews:

- 1) **Agol V. I. 1997.** Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
- 2) **Agol V. I. 2002.** Genome instability in picornaviruses. *Mol. Biol.* 36(2):216-222.
- 3) **Agol V. I., 2002.** Picornavirus genome:an overview. In: Semler B. L., Wimmer E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses.* ASM Press, Washington, DC, pp. 127-148.
- 4) **Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin. 1998.** Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* 4:1-26.
- 5) **Domingo E. and J. J. Holland. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
- 6) **Dowdle W. R., E. De Gourville, O. M. Kew, M. A. Pallansch, and D. J. Wood. 2003.** Polio eradication: the OPV paradox. *Rev. Med. Virol.* 13:277-291.
- 7) **Figlerowicz M, M. Magdalena Alejska, A. Kurzyn'ska-Kokorniak, M. Figlerowicz . 2003.** Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518.
- 8) **Friedrich F. 1996.** Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.
- 9) **Hogle, J. M., 2002.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.
- 10) **Kew O. M, P. F Wright, V. I Agol, F. Delpeyroux, H. Shimizu, N. Nathanson, and M. A. Pallansch. 2004.** Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bulletin of the World Health Organization* 82:16-23.

- 11) **Minor D. P. 1999.** Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- 12) **Muir P., U. Kammerer, K. Korn, M. N. Mulders, T. Poyry, B. Weissbrich, R. Kandolf, G. M. Cleator, and A. M. Van Loon. 1998.** Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Reviews* 11(1):202-227.
- 13) **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. 1999.** Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.
- 14) **Solecki D., M. Gromeier, J. Harber, G. Bernhardt, and E. Wimmer. 1998.** Poliovirus and its cellular receptor: a molecular genetic dissection of a virus/receptor affinity interaction. *J. Mol. Recogn.* 11:2-9.
- 15) **Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.