

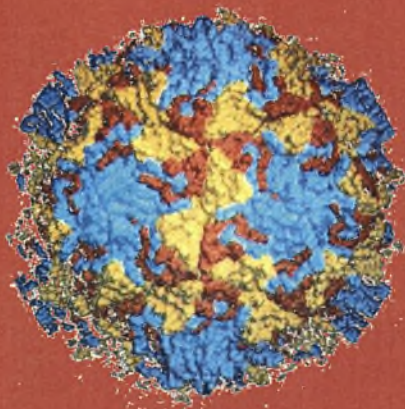
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Εντοπισμός γενετικών ανασυνδυασμών
και μεταλλάξεων και σύνδεσή τους με
την αντιγραφική λειτουργία
εμβολιακών στελεχών πολιοϊών**

ΠΑΠΑΔΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

Λάρισα 2009



Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Εντοπισμός γενετικών ανασυνδυασμών και
μεταλλάξεων και σύνδεσή τους με την αντιγραφική
λειτουργία εμβολιακών στελεχών πολιοϊών**

Παπαδή Γεωργία

Λάρισα 2009



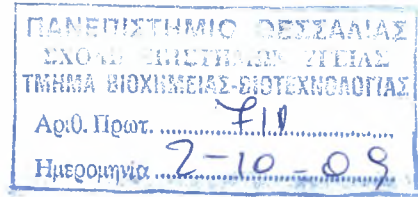
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αρθ. Εισ.: 7652/1
Ημερ. Εισ.: 03-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087179



Επιβλέπων καθηγητής

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Τοιμελής επιτροπή

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής, Γενετική Ζωικών Πληθυσμών,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος

Λέκτορας, Βιοτεχνολογία Μικροβίων,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επιβλέπων καθηγητής

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Τριμελής επιτροπή

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής, Γενετική Ζωικών Πληθυσμών,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος

Λέκτορας, Βιοτεχνολογία Μικροβίων,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Στη ζωή μας βάζουμε συνεχώς στόχους, άλλοτε μικρούς, άλλοτε μεγάλους. Η πορεία προς την επίτευξή τους πολλές φορές δεν μας επιτρέπει να αναλογιστούμε τη σημασία τους. Μέσα από απογοητεύσεις, δυσκολίες, κούραση, αλλά και χαρές, ενθουσιασμό, ικανοποίηση, ανακούφιση, φτάνουμε κάποια στιγμή στο τέλος και τότε μόνο κοιτάζουμε πίσω και συνειδητοποιούμε τη συνολική μας πορεία και κυρίως τους ανθρώπους που την επηρέασαν. Σ' αυτούς τους ανθρώπους θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο, στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία κατά την περίοδο Οκτωβρίου 2006 – Ιουνίου 2008. Εκτιμώ ιδιαίτερα την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, την υπομονή και την καλοσύνη του, ιδιότητες που με παρότρυναν να εργαστώ σκληρά για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Ζήση Μαμούρη και κ. Δημήτρη Μόσιαλο που δέχτηκαν να συμπεριληφθούν στην τριμελή επιτροπή αλλά και για τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Το περιβάλλον στο οποίο εργάζεται κανείς και η αρμονική συνεργασία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Νιώθω λοιπόν τυχερή που σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας εργαζόμουν σε ένα φιλικό, ευχάριστο και αρμονικό περιβάλλον. Για το λόγο αυτό θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, ιδιαίτερα στην κ. Βίκυ Πλιάκα και τον κ. Βαγγέλη Δεδειψίδη, για την πολύτιμη βοήθειά τους, τη στήριξη σε όλες τις δυσκολίες και τη φιλία τους. Επίσης την κ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία.

Οι δυσκολίες ήταν πάρα πολλές και σε συνδυασμό με το αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, δεν έλειψαν οι απογοητεύσεις. Εκεί ήταν ανελλιπώς δίπλα μου η οικογένεια μου, στην οποία αξίζουν οι περισσότερες ευχαριστίες, για την υπομονή τους και την απόλυτη στήριξη, υλική και ψυχολογική, που ήταν πολύ σημαντική και απαραίτητη για την επίτευξη των στόχων μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την βοήθεια, την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Στην οικογένεια και τους φίλους μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ιστορία της πολιομυελίτιδας

1.2 Ταξινόμηση

1.3 Οργάνωση του γονιδιώματος των πολιοϊών

1.3.1 5-μη μεταφραζόμενη περιοχή – 5-UTR

1.3.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

1.3.2.1 Δομική περιοχή

1.3.2.2 Λειτουργική περιοχή

1.3.3 3-μη μεταφραζόμενη περιοχή - 3-UTR

1.4 Κύκλος ζωής των πολιοϊών

1.4.1 Πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα CD155 των πολιοϊών και είσοδος του ιϊκού RNA του κυττάρου ξενιστή

1.4.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA

1.4.3 Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης

1.4.4 Αντιγραφή του ιϊκού RNA

1.4.5 Καψιδίωση – Δημιουργία ιϊκών σωματιδίων

1.4.6 Κυτταρικές μεταβολές κατά τη μόλυνση με πολιοϊό

1.5 Επιδημιολογία

1.6 Παθογένεια

1.7 Κλινικές εκδηλώσεις

1.8 Εργαστηριακή διάγνωση

1.9 Εμβόλια κατά των πολιοϊών

1.9.1 IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine)

1.9.2 OPV (Oral Poliovirus Vaccine)

1.9.3 Εμβολιοσυνδεόμενη Παραλυτική Πολιομυελίτιδα (V.A.P.P)

1.10 Μηχανισμοί εξέλιξης των πολιοϊών

1.10.1 Μεταλλάξεις στους πολιοϊούς

1.10.2 Μηχανισμοί ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ιική απομόνωση

2.2 Προσδιορισμός γενοτύπου και ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων OPV-παραγόμενων στελεχών

2.3 Έλεγχος Θερμοευαισθησίας - RCT test

2.4 Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου

2.5 Ανάλυση με προγράμματα βιοπληροφορικής

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενότυποι και τύποι ανασυνδυασμού OPV-στελεχών

3.2 Θερμοευαισθησία των OPV-στελεχών

3.3 Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου

3.4 Ανάλυση νουκλεοτιδίων και αμινοξικών αλληλουχιών

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Εντοπισμός γενετικών ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων και σύνδεσή τους με την αντιγραφική λειτουργία εμβολιακών στελεχών πολιοϊών

Περίληψη

Οι πολιοϊοί, ο αιτιολογικός παράγοντας της πολιομυελίτιδας, είναι RNA ιοί θετικής πολικότητας που ανήκουν στην οικογένεια των Picorna ιών και στο γένος των εντεροϊών. Το μικρό μονόκλωνο RNA τους, μήκους 7500 νουκλεοτιδίων, περιβάλλεται από ένα μη ελυτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, με διάμετρο 28nm. Διακρίνονται σε τρεις οροτύπους (PV1, PV2, PV3). Το πρόγραμμα εμβολιασμού κατά της πολιομυελίτιδας ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και με τη χρήση δύο εμβολίων, του IPV και του OPV, επιτεύχθηκε η σχεδόν πλήρης εκρίζωση της ασθένειας στις ανεπτυγμένες χώρες. Τα εξασθενημένα στελέχη Sabin του OPV εμβολίου, πολλαπλασιάζονται στην ανθρώπινη εντερική κοιλότητα και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (vaccine-associated paralytic poliomyelitis – VAPP). Η γενετική αστάθεια των Sabin στελεχών, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών, αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες εμφάνισης VAPP. Τα ιικά στελέχη που απομονώνονται σε τέτοιες περιπτώσεις ονομάζονται VDPVs (Vaccine Derived Polioviruses).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξης, οχτώ OPV παραγόμενων στελεχών (έξι από τα οποία ήταν ανασυνδυασμένα) και έγινε προσπάθεια συσχέτισής τους με γενωμικές τροποποιήσεις (μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς). Όλα τα OPV-παραγόμενα στελέχη εμφάνισαν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις του ιικού γενώματος, οι οποίες σχετίζονται με τον εξασθενημένο και θερμοευαίσθητο φαινότυπο των Sabin στελεχών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο οι μεταλλάξεις όσο και οι ανασυνδυασμοί θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των Sabin παραγόμενων στελεχών και ίσως να οδηγήσουν στην αναστροφή των εμβολιακών στελεχών προς νευρομολυσματικά.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ιστορία της πολιομυελίτιδας και των πολιοϊών

Η πρώτη αναφορά στην πολιομυελίτιδα φαίνεται σε μια Αιγυπτιακή στήλη που χρονολογείται περίπου στο 1400-1350 πΧ. (Εικόνα 1.1). Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η Βιομηχανική Επανάσταση οδήγησε σε αυξημένη αστικοποίηση στην Ευρώπη και στην βόρειο Αμερική καθώς επίσης και σε σημαντικές αλλαγές και βελτιώσεις στις συνθήκες επιβίωσης. Ταυτόχρονα αυξήθηκε και η συχνότητα των επιδημιών πολιομυελίτιδας. Από τα τέλη του 1800, επιδημίες εμφανίζονταν σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στις Ηνωμένες Πολιτείες και παρέμειναν ένα κύριο πρόβλημα για τη δημόσια υγεία στον αναπτυσσόμενο κόσμο για το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα.

Το 1909, οι Landsteiner και Popper, κατόρθωσαν να περάσουν επιτυχώς τον ιό σε πιθήκους, γεγονός μεγάλης σημασίας στη μελέτη της πολιομυελίτιδας. Με τη χρήση ζωικών μοντέλων συλλέχθηκαν σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στη διαδικασία της μόλυνσης και την παθοφυσιολογία της ασθένειας. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του ιού, που έγινε εφικτός με την ανάπτυξη συστημάτων καλλιέργειας ιστών από τους Enders, Weller και Robbins το 1949, καθώς και η αναγνώριση των τριών διαφορετικών οροτύπων, άνοιξαν το δρόμο για την έρευνα πάνω στα εμβόλια και στην μελέτη των βιοχημικών και βιοφυσικών ιδιοτήτων των πολιοϊών.

Από το 1950, άρχισαν να γίνονται προσπάθειες για την εξάλειψη της πολιομυελίτιδας μέσω εμβολιασμού. Το πρώτο επιτυχές εμβόλιο παράχθηκε το 1954 από τους Salk και Younger μέσω χημικής απενεργοποίησης του ιού με φορμαλδεΐδη μετά από πολλαπλασιασμό του ιού σε ιστοκαλλιέργεια. Αυτό το πλήρως μη-μολυσματικό εμβόλιο (IPV: inactivated polio vaccine), μετά τη χορήγησή του σε ενέσιμη μορφή, προκαλούσε ανοσολογική απόκριση η οποία ήταν ικανή να παρέχει προστασία από την ασθένεια. Κατά την ίδια περίοδο, γίνονταν προσπάθειες για την παραγωγή εμβολίου από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών. Τελικά το 1961 ο Sabin παρήγαγε ένα εμβόλιο αυτού του είδους, το OPV (Oral Polio Vaccine). Το 1962 και 1963 ξεκίνησαν εκστρατείες μαζικής ανοσοποίησης σε πολλές χώρες. Τόσο το απενεργοποιημένο εμβόλιο κατά των πολιοϊών IPV όσο και το OPV περιέχουν και τους τρεις οροτύπους των πολιοϊών. Η ευρεία ανοσοποίηση με το IPV και από το 1963 με το OPV έχει σχεδόν εξαλείψει την πολιομυελίτιδα στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες.



Εικόνα 1.1: Απεικόνιση θύματος πολιομυελίτιδας, Αίγυπτος, 18^η Δυναστεία (Photo: Deutschen Grünen)

1.2 Ταξινόμηση

Οι πολιοϊοί ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των Picornaviridae, η ονομασία της οποίας προέρχεται από τη λατινική λέξη Pico (μικρός) και τη λέξη RNA. Σύμφωνα μ' αυτή την ονομασία οι Picorna ιοί αποτελούν μια ευρεία οικογένεια μικρών, μη ελυτροφόρων RNA-ιών θετικής πολικότητας, η οποία περιλαμβάνει αρκετά παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο και για άλλα είδη θηλαστικών.

Η οικογένεια των Picorna ιών περιλαμβάνει 230 οροτύπους, οι οποίοι διακρίνονται σε 9 γένη: τους εντεροϊούς (enteroviruses), τους ρινοϊούς (rhinoviruses), τους καρδιοϊούς (cardioviruses), τους αφθοϊούς (arphthoviruses), τους ιούς της Ηπατίτιδας Α (hepatoviruses), τους parecho-ιούς (parechoviruses), τους ιούς Β της ρινίτιδας των ιπποειδών (equine rhinitis B viruses – erboviruses), τους kobuviruses και τους teschoviruses (King et al., 2000). Η ομαδοποίηση τους γίνεται με βάση τη διαφοροποίηση που παρουσιάζουν στα αντιγονικά χαρακτηριστικά τους, τα όργανα τα οποία προσβάλλουν και την ποικιλία των ξενιστών τους, καθώς επίσης και στις διάφορες φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και η επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός τους (pH).

Το γένος των εντεροϊών στο οποίο ανήκουν οι πολιοϊοί, αποτελείται από 80 διαφορετικούς οροτύπους και μπορεί επιπλέον να κατηγοριοποιηθεί σε 8 είδη. Τα 5 από αυτά παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια και είναι: 1) οι πολιοϊοί (PV1-3), 2) οι ανθρώπινοι εντεροϊοί Α (HEV-A), 3) οι ανθρώπινοι εντεροϊοί Β (HEV-B), 4) οι ανθρώπινοι εντεροϊοί C (HEV-C), και 5) οι ανθρώπινοι εντεροϊοί D (HEV-D) (Πίνακας 1.1) (King et al., 2000).

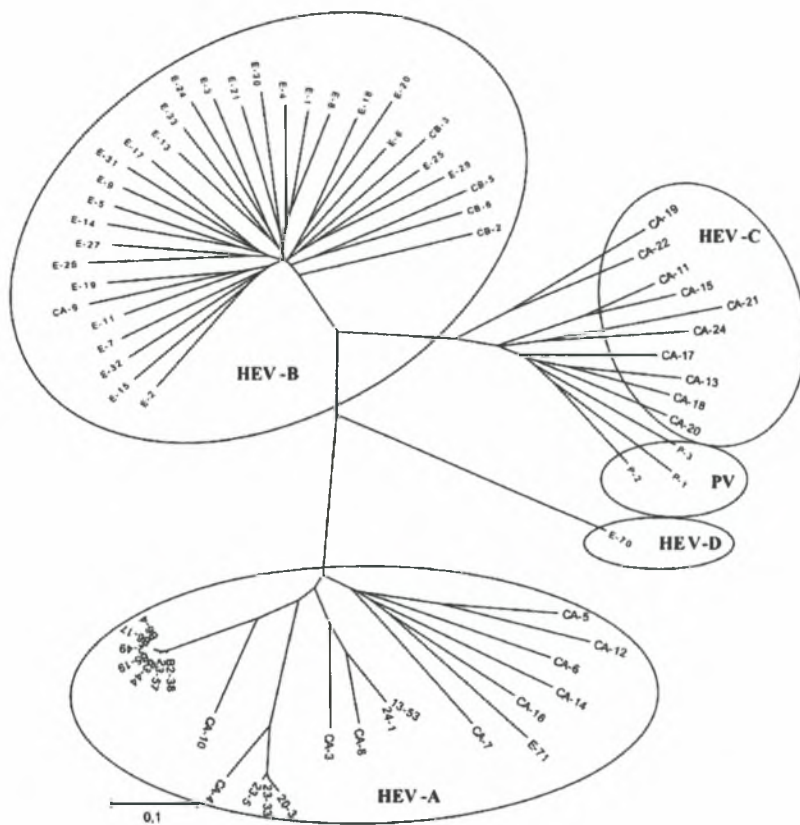
Οι πολιοϊοί παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τους εντεροϊούς C και διαφοροποιούνται μόνο λόγω της ικανότητας των πολιοϊών να προκαλούν πολιομυελίτιδα. Για τον λόγο αυτό έχει προταθεί η αναταξινόμηση με σκοπό να συμπεριληφθούν οι πολιοϊοί στο είδος C των εντεροϊών (Brown et al., 2003) (Εικόνα 1.2). Η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς τροποποιείται εξαιτίας της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων.

Table 2: Classification within the Enterovirus Genus

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

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση των εντεροϊών

Υπάρχουν τρεις ορότυποι πολιοϊών (PV1, PV2, PV3) ταξινομημένοι με βάση τα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά και την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Κάθε ορότυπος υποδιαιρείται σε διαφορετικά στελέχη τα οποία μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω οροεξουδετέρωσης ή μέσω προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Ο πολιοϊός τύπου 1, στέλεχος Mahoney, [PV1(M)] ήταν το πρώτο γονιδίωμα ριζογναίου του οποίου η αλληλουχία προσδιορίστηκε στο σύνολό της (Pfister et al., 1999)



Εικόνα 1.2: Φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα είδη των εντεροϊών τα οποία εμφανίζουν ανθρώπινη παθογένεια. Φαίνεται η ομοιότητα των πολιοϊών με τους ανθρώπινους εντεροϊούς C, λόγω της οποίας έχει προταθεί η συγχώνευση των δύο ειδών. (Luis Sarmiento Pérez et al., 2007)

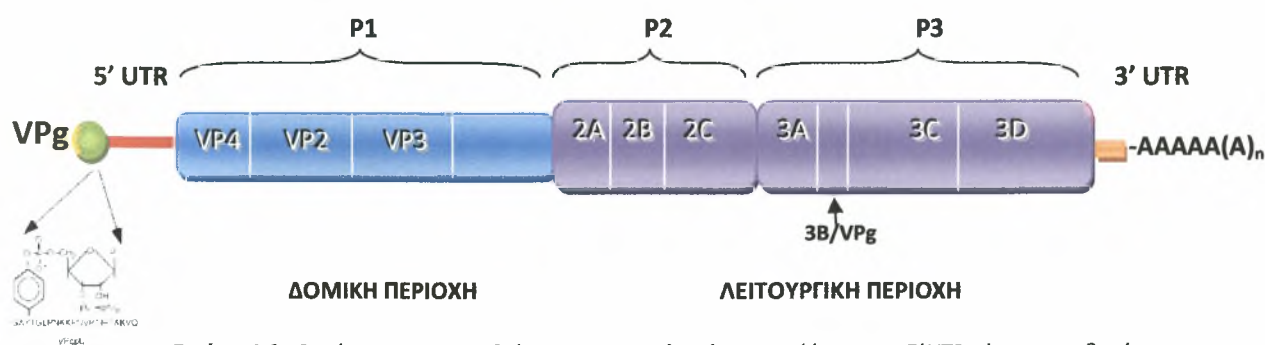
PV: πολιοϊός, HEV-A: ανθρώπινοι εντεροϊοί τύπου A, HEV-B: ανθρώπινοι εντεροϊοί τύπου B, HEV-C: ανθρώπινοι εντεροϊοί τύπου C, HEV-D: ανθρώπινοι εντεροϊοί τύπου D.

1.3 Οργάνωση του γονιδιώματος των πολιοϊών

Το γονιδίωμα των πολιοϊών είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας με μήκος περίπου 7500 βάσεις (PV1, PV2 και PV3 είναι 7440, 7439 και 7434 αντίστοιχα), το οποίο είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3'-άκρο του και το 5'-άκρο του συνδέεται ομοιοπολικά με μια μικρή πρωτεΐνη 22 αμινοξέων, την VPg, η οποία φαίνεται να συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του γενώματος και στην συγκρότηση των ιϊκών σωματιδίων (εγκλεισμός του γενώματος στο καψίδιο).

Η αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας στο RNA παρά στο DNA δεν είναι καλή επιλογή καθώς το RNA είναι χημικά πιο ασταθές από το DNA, ακόμα και σε φυσιολογικό PH και κατά την είσοδο του στο κύτταρο, είναι πιο ευαίσθητο προς αποικοδόμηση ή τροποποίηση από τα διάφορα κυτταρικά ένζυμα. Επιπλέον, τα λάθη που συμβαίνουν τυχαία κατά την αντιγραφή του γενώματός τους με ρυθμό 10^{-4} ανά προστιθέμενο νουκλεοτίδιο, δεν μπορούν να επιδιορθωθούν, καθώς οι RNA ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου. Συνεπώς, οι RNA ιοί πρέπει να επιβιώνουν με υψηλούς ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης. Η επιβίωση όλων των RNA ιών, σε τέτοιες συνθήκες, επιτυγχάνεται με τον περιορισμό του μεγέθους του γενώματός τους, το οποίο σε συνδυασμό με τον υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, δίνουν το πλεονέκτημα της γρήγορης αντιγραφής και προσαρμογής του ιού σε ένα νέο περιβάλλον (πχ ανθεκτικότητα σε ένα φάρμακο). Το μειονέκτημα που προκύπτει, είναι ότι πρέπει να ζουν κάτω από συνθήκες μεγάλης γενετικής αυστηρότητας, έχουν δηλαδή περιορισμένη ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών (Pfister et al. 1999).

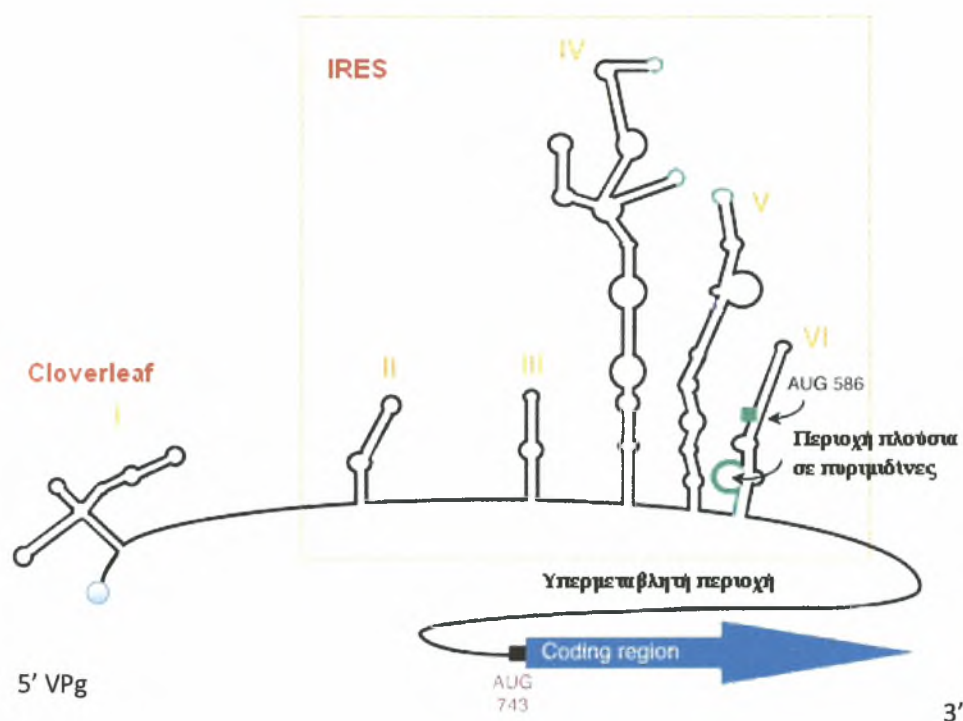
Το γονιδίωμα των πολιοϊών είναι οργανωμένο στις εξής τέσσερις περιοχές: την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR, 742nt), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR, 72nt). Στο 5' άκρο είναι συνδεδεμένη η πρωτεΐνη VPg(3B) και στο 3' άκρο βρίσκεται η πολυαδενυλιωμένη ουρά (poly(A) tract) (Εικόνα 1.3)



Εικόνα 1.3. Οργάνωση του γονιδιώματος των πολιοϊών. Στο 5' άκρο της 5' UTR είναι προσδεμένη η VPg πρωτεΐνη, κωδικοποιούμενη από τον ίδιο τον ιό και στο 3' άκρο της 3' UTR βρίσκεται η πολυA ουρά. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

1.3.1 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή - 5' UTR

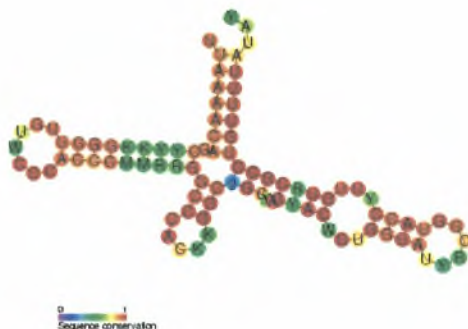
Η 5' UTR είναι μια περιοχή που αποτελείται από 742 νουκλεοτίδια (8-12% του γενώματος) και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο, γεγονός που φαίνεται από την υψηλά διατηρημένη δομή της μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών. Ο ρόλος της συνδέεται άμεσα με την αλληλουχία της. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια G-C, συγκριτικά με το υπόλοιπο γονιδίωμα, υποδηλώνει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής. Περιέχει λοιπόν συντηρημένα στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της μετάφρασης και αντιγραφής του ιού. Περιλαμβάνει 6 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VI) και χωρίζεται σε 2 περιοχές: στο cloverleaf (I) και στο Internal ribosome entry site (IRES) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI (Εικόνα 1.4). Λιγότερο διατηρημένη είναι μόνο μια αλληλουχία 154 νουκλεοτιδίων η οποία βρίσκεται μεταξύ της δομής IRES και του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (Wimmer et al., 1993).



Εικόνα 1.4. Δευτεροταγής δομή της 5'UTR περιοχής του γενώματος των πολιοϊών. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES. Έξω από το στοιχείο IRES προ το 3' άκρο της 5' UTR βρίσκεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

Το cloverleaf είναι ένα *cis-acting* γενετικό στοιχείο το οποίο αποτελείται από 88 νουκλεοτίδια, τα οποία σχηματίζουν 4 δομές μίσχου – θηλιάς (Εικόνα 1.5). Το cloverleaf διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του ιού σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε με κυτταρικές, είτε με ιϊκές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του ιϊκού RNA, καθώς και την κυκλοποίηση του, που είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και την αντιγραφή του ιού. Το cloverleaf δρα επίσης και σαν μοριακός διακόπτης συντονίζοντας τη μετάβαση από τη μετάφραση του ιϊκού γενώματος στην αντιγραφή.

Τα 5 δομικά RNA στοιχεία (II-VI) της 5'-UTR περιοχής αποτελούν το IRES, μια δομή 400 νουκλεοτιδίων η οποία περιλαμβάνει, μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, ένα κωδικόνιο έναρξης AUG, το οποίο είναι σιωπηλό και μία υπερμεταβλητή περιοχή. Το IRES είναι απαραίτητο στοιχείο για την έναρξη της μετάφρασης, καθώς προσδένονται στο εσωτερικό του τα ριβοσώματα, οι παράγοντες της μετάφρασης και άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες διεγείρουν την ιική μετάφραση.



Εικόνα 1.5: Δομή του *cis-acting* γενετικού στοιχείου cloverleaf

1.3.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

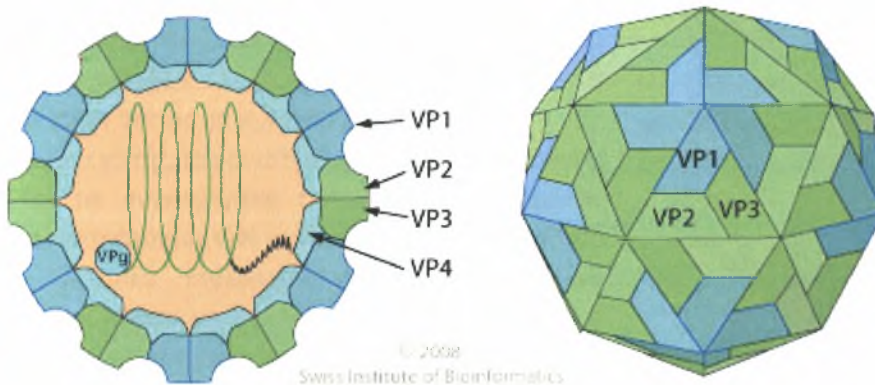
Το γονιδίωμα των πολιοϊών, όπως και όλων των ιών με RNA θετικής πολικότητας, είναι από μόνο του μολυσματικό μόλις μπει στο κύτταρο ξενιστή. Το ιϊκό RNA είναι μονοκιστρονικό, κωδικοποιεί δηλαδή μια πολυπρωτεΐνη 247 kDa, η οποία αποτελείται από 2 περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική. Μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι ώριμες δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και ενδιάμεσες ιϊκές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Fields Virology, 2007).

1.3.2.1 Δομική περιοχή

Δομή καψιδίου και ιδιότητες δομικών πρωτεϊνών

Το γονιδίωμα των πολιοϊών περιβάλλεται από ένα σχετικά μικρό (~28nm), μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από 60 ασύμμετρα πρωτομερή. Κάθε πρωτομερές αποτελείται από ένα αντίγραφο των καψιδιακών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες προκύπτουν από πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης. Η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου πρωτεολύεται και δημιουργούνται τα τρία πολυπεπίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3,VP1). Από την συσσωμάτωση των πρωτομερών σχηματίζονται τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)₅], δώδεκα από τα οποία συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν το «προκαψίδιο» [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA «πακετάρεται» στα ιϊκά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2. **(Εικόνα 1.6)**

Το ώριμο ιϊκό σωματίδιο χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα. Εμφανίζει ανθεκτικότητα σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS, σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε όξινο pH (~3), ιδιότητα που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ιού στο έντερο όπου κυριαρχεί το όξινο περιβάλλον. (Pfister et al. 1999).



Εικόνα 1.6: Αναπαράσταση της δομής του ιϊκού καψιδίου. Στο εσωτερικό φαίνεται το ιϊκό RNA με την πολύ-A ουρά στο 3' άκρο και την πρωτεΐνη VPg στο 5' άκρο.

Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Τα πρωτομερή συνδέονται μεταξύ τους γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας και δημιουργούν τα πενταμερή ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής και ο διμερής άξονας συμμετρίας. Συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας (Blondel et al. 1998). (Pfister et al., 1999). Οι VP1, VP2 και VP3 πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η VP4, που είναι η μικρότερη από τις καψιδιακές πρωτεΐνες, βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. (Fields Virology, 2007). **(Εικόνα 1.7)**

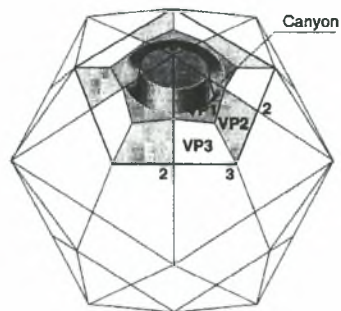
Οι πρωτεΐνες του καψιδίου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος και την αμινοξική τους αλληλουχία. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση. Παρουσιάζουν ένα κοινό δομικό μοτίβο, το οποίο είναι ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων. Αντίθετα, η VP4 φαίνεται έχει μια λιγότερο αυστηρά καθορισμένη διαμόρφωση (Hogle, 2002).

Οι κλώνοι των β-βαρελιών συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε πρωτεΐνη και προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου (Εικόνα 1.8). Αυτές οι αμινοξικές θηλιές αποτελούν τις κύριες δομές των αντιγονικών θέσεων του ιού (N- Ags). Στους πολιοϊούς έχουν αναγνωριστεί 4 θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων (N-AgI, N-AgII, AgIIIa, N-AgIIIb) (Minor et al., 1986).

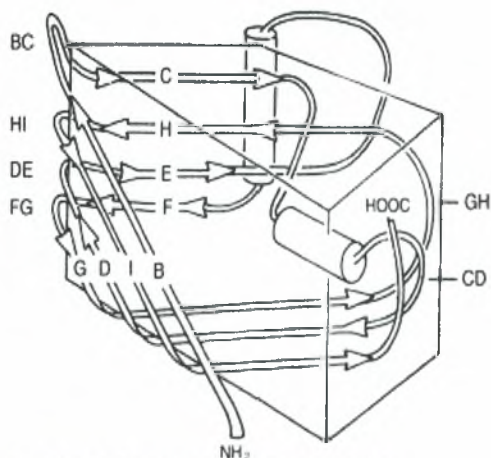
Γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, στο εξωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται μια διαμόρφωση αύλακας γνωστή και ως canyon που σχηματίζεται από αμινοξέα των VP1, VP2 και VP3 καψιδιακών πρωτεϊνών. Η αύλακα πιστεύεται πως αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα CD155 των πολιοϊών (Colton & Racaniello 1994; Belnap et al., 2000; He et al., 2000).

Στο εσωτερικό της, φέρει κατάλληλες περιοχές οι οποίες συνδέονται με συγκεκριμένα τμήματα του κυτταρικού υποδοχέα, επιτρέποντας έτσι την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο. Ο πολύ σημαντικός ρόλος των σημείων προσκόλλησης καθώς και η εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς δικαιολογούν την εξελικτική τους σταθερότητα, η οποία όμως τα καθιστά ευπαθή στα αντισώματα. Ωστόσο, προστατεύονται από την άμυνα του οργανισμού ξενιστή, λόγω της θέσης τους στο εσωτερικό της αύλακας (Stanway G., 1990). Αντίθετα, περιοχές του ιικού καψιδίου που έχουν μικρή λειτουργική σημασία για τον ιό, παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της αύλακας και λειτουργούν ως επίτοποι. Η αποφυγή της ανοσολογικής απάντησης επιτυγχάνεται με την ευμεταβλητότητα των περιοχών αυτών, με αποτέλεσμα την εξέλιξη νέων οροτύπων.

Στη βάση της αύλακας, στο εσωτερικό του β-βαρελίου της VP1 υπάρχει μια υδρόφοβη περιοχή στην οποία υπάρχει ένα λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης, το οποίο πιστεύεται ότι ελέγχει την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές μεταβολές κατά την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, με σκοπό την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρικό περιβάλλον, διαδραματίζει δηλαδή σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου. (Filman et al., 1989). Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλεύονται πολλές αντι-ιικές φαρμακευτικές ουσίες οι



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Διακρίνονται οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας, οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς και η αύλακα (canyon) η οποία περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας (Από Blondel et al. 1998).



Εικόνα 1.8: Η δομή των καψιδικών πρωτεϊνών των πολιοϊών (VP1, VP2, VP3), β-βαρέλι. (Pfister et al., 1999)

οποίες προκαλούν μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη της θέσης αυτής με σκοπό την παρεμπόδιση της δέσμευσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα.

Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα του καψιδίου σημειώνονται μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών. Ειδικότερα, γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας τα αμινοτελικά άκρα 5 μορίων της VP3 δημιουργούν ένα σχηματισμό β-κυλίνδρου. Η συγκεκριμένη δομή περιβάλλεται από 5 β-πτυχωτά φύλλα τριών κλώνων το καθένα, που σχηματίζονται από τα αμινοτελικά άκρα των VP4 και VP1. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών δομών συντονίζονται μέσω του μυριστικού οξέος που βρίσκεται προσδεμένο στην VP4 (Chow et al., 1987). Η λειτουργική αυτή διαφοροποίηση του αμινοτελικού άκρου της VP4 συμβάλλει επίσης στην προσκόλληση του ιού στους υποδοχείς του ξενιστή και στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρικό περιβάλλον. Σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος στον ξενιστή παίζει επίσης η δυνατότητα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών VP2 και VP4 από κυτταρικές κινάσες, με την αποσταθεροποίηση του καψιδίου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται μέσω της δομής ενός β-βαρελίου 7 κλώνων το οποίο συντίθεται από 4 β-κλώνους της δομής β-βαρελίου της VP3 και 1 β-κλώνο που προέρχεται από το αμινοτελικό άκρο της VP1, ο οποίος εσωκλείει 2 β-κλώνους που προέρχονται από το αμινοτελικό άκρο της VP2 πρωτεΐνης του γειτονικού πενταμερούς (Colston & Racaniello 1994). Τέλος, πιστεύεται ότι το αμινοτελικό άκρο της VP1 συμμετέχει στην καψιδίωση του ιϊκού RNA (Kirkegaard, 1990).

1.3.2.2 Λειτουργική περιοχή

Στο 3' άκρο του γονιδιώματος των πολιοϊών, βρίσκονται οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) καθώς και των λειτουργικών πρόδρομων μορίων των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD), που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές λειτουργίες του ιού. Συγκεκριμένα, εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, στην επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης, στο σταμάτημα των κυτταρικών λειτουργιών, στην αλλαγή διαμόρφωσης των κυτταρικών μεμβρανών και στη δημιουργία κυστιδίων.

Ιδιότητες των λειτουργικών πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη 2A είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης η οποία υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ τυροσίνης (Tyr) και γλυκίνης (Gly). Καταλύει το πρωτεολυτικό κόψιμο μεταξύ των περιοχών P1 και P2 της ιϊκής πολύπρωτεΐνης, διαχωρίζοντας έτσι τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου από τις λειτουργικές πρωτεΐνες (Sommergruber et al., 1989, Toyoda et al., 1986). Επίσης, ευθύνεται για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή, προκαλώντας τη διάσπαση του αμινοτελικού άκρου των παραγόντων eIF4G1 και eIF4GII, καθώς και του καρβοξυτελικού άκρου της PABP (Ventoso et al., 1998). Η αναστολή της παραγωγής πρωτεϊνών απαραίτητων για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της κασπάσης 3 (Calandria et al., 2004). Μια ακόμη

λειτουργία της 2A η σταθεροποίηση του ιϊκού RNA, μέσω πρωτεολυτικής τροποποίησης κάποιας κυτταρικής πρωτεΐνης, η οποία προσδένεται απευθείας στο cloverleaf του ιϊκού RNA αποτρέποντας την αποδόμηση του από τις ριβονουκλεάσες. Με αυτόν τον τρόπο διεγείρεται περαιτέρω η ιική μετάφραση (Jurgens et al., 2006).

Η πρωτεΐνη 2B Εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi και δρα σαν πολυμερές, μορφή απαραίτητη για την ιική αντιγραφή (Cucopati et al., 1998). Αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών, με αποτέλεσμα, την παρεμπόδιση της μεταφοράς γλυκοπρωτεϊνών από το σύμπλεγμα Golgi στην κυτταρική επιφάνεια, την αλλαγή στη διαμόρφωση των ενδοκυττάρων μεμβρανών και της πλασματικής μεμβράνης, την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωση Ca^{2+} και την επαγωγή της απόπτωσης (Madan et al., 2008).

Η πρόδρομη πρωτεΐνη 2BC παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα αύξησης της διαπερατότητας των μεμβρανών σε σχέση με την πρωτεΐνη 2B. Η 2BC εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και η σημαντικότερη ιδιότητά της είναι ότι προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα και αποτελούν θέσεις όπου επιτελείται η ιική αντιγραφή. (Rust et al., 2001, Doedens & Kirkegaard 1995).

Η πρωτεΐνη 2C είναι σε υψηλό βαθμό συντηρημένη στην οικογένεια των Picorna ιών. Παρουσιάζει δραστηριότητα ΑΤΡάσης που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού γενώματος (Phister et al., 1999, Wimmer et al., 1999). Είναι προσδεσμένη σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και συμβάλει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής (Bienz et al., 1990). Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στην καψιδίωση του ιϊκού RNA και αναστέλλει την πρωτεολυτική ικανότητα των 3C και 3CD πρωτεασών. Τέλος η 2C παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου ενώ η πρόσδεσή της στο 3' cloverleaf του αρνητικής πολικότητας κλώνου προάγει την εκκίνηση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας κλώνου (Banerjee et al., 2001).

Η πρωτεΐνη 3A αποτελεί μέρος του συμπλόκου αντιγραφής. Προσδένεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και στρατολογεί το σύμπλεγμα πρωτεϊνών GBF1/Arf1, το οποίο επάγει αλλαγές στις μεμβράνες και τον σχηματισμό κυστιδίων αντιγραφής του ιού (Belon et al., 2007, Strauss et al., 2003). Η 3A σταματάει την πρωτεϊνική κυκλοφορία από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi καθλώνοντάς τα σύμπλοκα μεταφοράς πρωτεϊνών στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Έτσι δρα και κατά της απόπτωσης του κυττάρου καθώς πρωτεϊνικά μόρια που σχετίζονται με την απόπτωση, δεν φτάνουν ποτέ στην κυτταρική επιφάνεια (Kondratova et al., 2005). Εκτός από τον ρόλο στην πρόσδεση σε μεμβράνες, η αμινοτελική περιοχή της 3A είναι παίζει σημαντικό ρόλο και στη σύνθεση του θετικής πολικότητας κλώνου καθώς και στη σωστή επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης (Towner et al., 2003).

Η πρόδρομη πρωτεΐνη 3AB είναι και αυτή μέλος του συμπλόκου αντιγραφής. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση του συμπλόκου αντιγραφής του ιού και προσδένει την ιική 3D πολυμεράση, διεγείροντας έτσι τη δραστηριότητα επιμήκυνσης της αλυσίδας του RNA (Fujita et al., 2007). Επίσης προσδένει το λειτουργικό ενδιάμεσο 3CD και διεγείρει την αυτοκατάλυσή του σε 3C και 3D. Μια ακόμη σημαντική ιδιότητά της 3AB είναι ότι παίζει το ρόλο μορίου συνοδού (chaperon). Συγκεκριμένα, διπλώνει το ιικό RNA στην ευνοικότερη

θερμοδυναμικά διαμόρφωση, «ξεδιπλώνει» σύνθετες δευτεροταγείς RNA δομές προκειμένου να προσδεθεί η ιική πολυμεράση και διαχωρίζει τους κλώνους θετικής και αρνητικής πολικότητας κατά τη δημιουργία του αντιγραφικού ενδιάμεσου. Επίσης προάγει και τον ανασυνδυασμό τοποθετώντας ατελώς νεοσυντιθέμενα μόρια σε διαφορετικό καλούπι προκειμένου να ολοκληρωθεί η σύνθεσή τους (DeStefano et al., 2006).

Η πρωτεΐνη 3B (VPg) είναι μια μικρή πρωτεΐνη 22 αμινοξέων και βρίσκεται προσδεδεμένη στο 5' άκρο του ιϊκού γενώματος, μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του υδροξυλίου του καταλοίπου τυροσίνης στη θέση 3 και της φωσφορικής ομάδας της ουρακίλης του ιϊκού γενώματος. Στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, η VPg συναντάται με την μορφή VPgUrU. Η ουριδιλωμένη αυτή μορφή χρησιμεύει σαν εκκινητικό μόριο κατά την ιική αντιγραφή (Lyle et al., 2002). Τα αμινοξέα 14, 17 και 20 της VPg παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ουριδιλίωσή της από την 3D ιική πολυμεράση (Schein et al., 2006).

Η πρωτεΐνη 3C, είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης και υδρολύει δεσμούς μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης. Η 3C μαζί με το πρόδρομό της μόριο 3CD, είναι υπεύθυνες για την πρωτεολυτική επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Marcotte et al., 2007). Η 3C στα αρχικά στάδια της μόλυνσης διεγείρει την ιική μετάφραση με 2 διαφορετικές δράσεις. Αποκόπτει το καρβοξυτελικό άκρο της κυτταρικής πρωτεΐνης La, το οποίο περιέχει αλληλουχία τοποθέτησης της La στον πυρήνα, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης La στο κυτταρόπλασμα, η οποία διεγείρει την ιική μετάφραση, προσδεδεμένη στο IRES. Επίσης, η 3C αποκόπτει την πρωτεΐνη PABP μπλοκάροντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μετάφραση (Kuyumcu-Martinez et al., 2004). Τέλος, η 3C αποκόπτει την PTB (Polyuridylation Tract Binding Protein) η οποία προάγει την ιική μετάφραση, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για την εκκίνηση της ιϊκής αντιγραφής (Back et al., 2002). Και οι δύο πρωτεάσες 3C και 2A αναστέλλουν την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση. Αποτελούν την κύρια στρατηγική με την οποία οι πολιοϊοί σκοτώνουν τα κύτταρα ξενιστές κατά την λυτική τους μόλυνση (Kuyumcu-Martinez et al., 2004).

Η πρωτεΐνη 3CD παρουσιάζει ισχυρότερη δραστικότητα πρωτεάσης από την 3C, αλλά δεν παρουσιάζει δραστικότητα πολυμεράσης (Marcotte et al., 2007). Η 3CD διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή. Ειδικότερα, συμβάλλει στη δημιουργία κυστιδίων αντιγραφής «στρατολογώντας» το σύμπλοκο πρωτεϊνών BIG1, BIG2/Arg στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Belon et al., 2007). Επίσης, μέσω του κοψίματος του καρβοξυτελικού άκρου της PCBP2 προκαλεί το τέλος της ιϊκής μετάφρασης και σηματοδοτεί την εκκίνηση της ιϊκής αντιγραφής (Perera et al., 2007). Η 3CD διαθέτει ικανότητες πρόσδεσης RNA με συνέπεια η πρόσδεσή της στο cloverleaf και στο Cis Response Element (CRE) να διεγείρει την αντιγραφή και την ουριδιλίωση της VPg αντίστοιχα (Paul et al., 2000). Τέλος, η 3CD εξαιτίας μιας αλληλουχίας πυρηνικής τοποθέτησης (Nuclear Localisation Signal) που υπάρχει στο 3D τμήμα της, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου και αυτοκαταλύεται σε 3C και 3D. Στο εσωτερικό του πυρήνα η 3C πλέον, πρωτεολύει μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων, σταματώντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου (Weidmann et al., 2003).

Η πρωτεΐνη 3D αποτελεί την RNA πολυμεράση των picorna ιών. Έχει τη δομή χεριού και αποτελείται από τις περιοχές του αντίχειρα, της παλάμης και των τεσσάρων δακτύλων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των καταλοίπων φαινυλαλανινών 30 και 34 του δείκτη και των

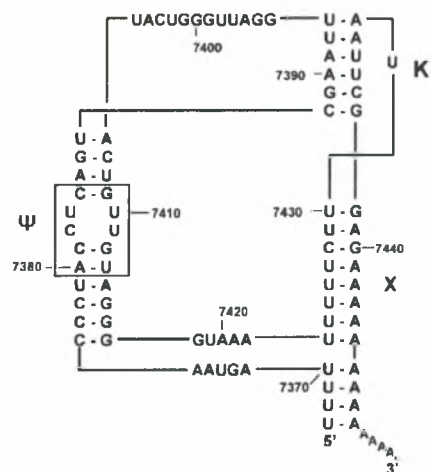
υδροφοβικών περιοχών του αντίχειρα, σταθεροποιούν τη 3D (Hansen et al., 1997). Το ενεργό κέντρο της 3D βρίσκεται στην περιοχή της παλάμης και αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 327, ασπαραγινικό 328 και ασπαραγινικό 329. Η 3D^{pol} είναι το κύριο ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός κατά την αντιγραφή του. Έχει όμως 4 διαφορετικές δράσεις: μπορεί να συνθέτει RNA χρησιμοποιώντας σαν εκκινητικό μόριο την VPg πρωτεΐνη, έχει την ικανότητα να παράγει θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης που ξεδιπλώνει τα σημεία όπου το RNA έχει δημιουργήσει διπλή έλικα κατά το στάδιο επιμήκυνσης της αντιγραφής και τέλος, είναι ικανή να προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά στο 3' άκρο του RNA και να συμβάλει έτσι στην ολοκλήρωση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας ιϊκού RNA (Pfister et al., 1999).

1.3.3 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή – 3'-UTR

Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR) αποτελείται από 65 νουκλεοτίδια τα οποία σχηματίζουν 2 δευτεροταγείς RNA δομικές περιοχές (X και Ψ) του τύπου μίσχος - θηλιά οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της περιοχής K (Pilipenko et al., 1996) (Εικόνα 1.9). Στο τέλος της η 3'-UTR φέρει μια poly-(A) ουρά, η οποία σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά mRNA, κωδικοποιείται γενετικά από τον ίδιο τον ιό. Η περιοχή αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού (Rohll et al., 1995).

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιϊκής μετάφρασης διαδραματίζει η αλληλεπίδραση της 3' UTR με το IRES. Έχει αποδειχθεί ότι η 3CD σε σύμπλοκο με την 3AB καθώς και μια πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή μεγέθους 34-36kDa, αλληλεπιδρούν με την 3'UTR (Todd et al. 1995). Ωστόσο ο βιολογικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι γνωστός. Η πρόσδεση κυτταρικών παραγόντων στην 3' UTR φέρνει την πολυ(A)ουρά κοντά στην 3D διεγείροντας με αυτόν τον τρόπο την εκκίνηση του κλώνου αρνητικής πολικότητας κατά την ιϊκή αντιγραφή. Ωστόσο, η 3' UTR δεν είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου (Dobrikova et al., 2003).

Η πολυαδενυλική ουρά των πολιοϊών έχει μήκος περίπου 60 νουκλεοτίδια και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής, μέσω μιας RNA δευτεροταγούς δομής θηλιάς (Jacobson et al., 1993), και της μετάφρασης του ιϊκού γενώματος (Fields Virology, 2007). Συγκεκριμένα, η πρόσδεση της PABP στην poly(A)tail έχει σαν αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του ιϊκού γενώματος που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Τέλος η Poly(A)tail δρα σαν καλούπι για την VPg εξαρτώμενη, εκκίνηση της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Silvestri et al., 2006).



Εικόνα 1.9. Η δευτεροταγής RNA δομή της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής

1.4 Κύκλος ζωής των πολιοϊών

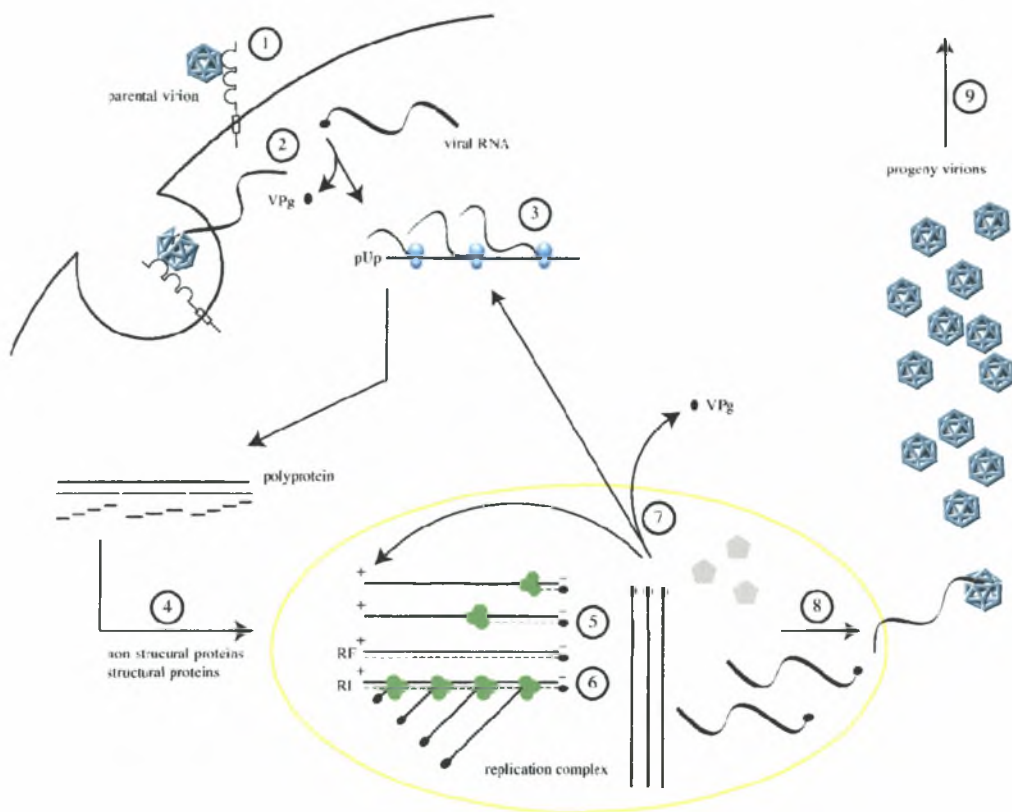
Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών αρχίζει με την προσκόλλησή του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή, μέσω του υποδοχέα CD155. Ακολουθεί η αποσταθεροποίηση του ιϊκού καψιδίου και η είσοδος ιϊκού γενώματος στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή. Στο κυτταρόπλασμα, η VPg πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη στην 5'-UTR περιοχή του ιϊκού γενώματος αποκόπτεται από μια φωσφοδιεστεράση του κυττάρου ξενιστή.

Ακολουθεί η μετάφραση του ιϊκού γενώματος σε μία πολυπρωτεΐνη, από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Η πολυπρωτεΐνη υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ιϊκές πρωτεάσες (2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro}) ώστε να παραχθούν οι λειτουργικές ιϊκές 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. Η πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου ξενιστή αναστέλλεται από τη δράση της 2A^{pro} που επάγει τη διάσπαση του παράγοντα eIF-4G, ενώ αναστέλλεται και η μεταγραφή του κυττάρου ξενιστή από την 3C^{pro}.

Η αντιγραφή του RNA λαμβάνει χώρα σε μεμβρανικά κυστίδια, ο σχηματισμός των οποίων προάγεται από τις 2BC και 3C ιϊκές πρωτεΐνες. Η έναρξη της σύνθεσης του RNA από την 3D^{pol} απαιτεί την ουριδυλιωμένη VPg ιϊκή πρωτεΐνη ως εκκινητή. Το θετικής πολικότητας RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού αρνητικής πολικότητας κλώνου, παράγοντας ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF). Από τον αρνητικής πολικότητας κλώνο, συντίθενται πολλοί κλώνοι θετικής πολικότητας παράγοντας ένα αντιγραφικό ενδιάμεσο (replicative intermediate, RI).

Τα νεοσυντιθέμενα θετικής πολικότητας μόρια RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εκμαγείο για i) την αντιγραφή και παραγωγή νέων μορίων RNA θετικής πολικότητας, ii) την πρωτεϊνοσύνθεση και iii) την καψιδίωση για την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων, αφού συνδεθεί στο 5' άκρο του η πρωτεΐνη VPg.

Την καψιδίωση του RNA ακολουθεί η αντίδραση ωρίμανσης του καψιδίου η οποία συμβαίνει με την αυτοκαταλυτική διάσπαση της πρωτεΐνης VP0 σε VP2 και VP4 και έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή του προ-ιού σε ένα ώριμο μολυσματικό ιικό σωματίδιο. Τα ώριμα μολυσματικά σωματίδια απελευθερώνονται με τη λύση του κυττάρου (**Εικόνα 1.10**) (Pfister et al., 1999, De Jesus NH, 2007).

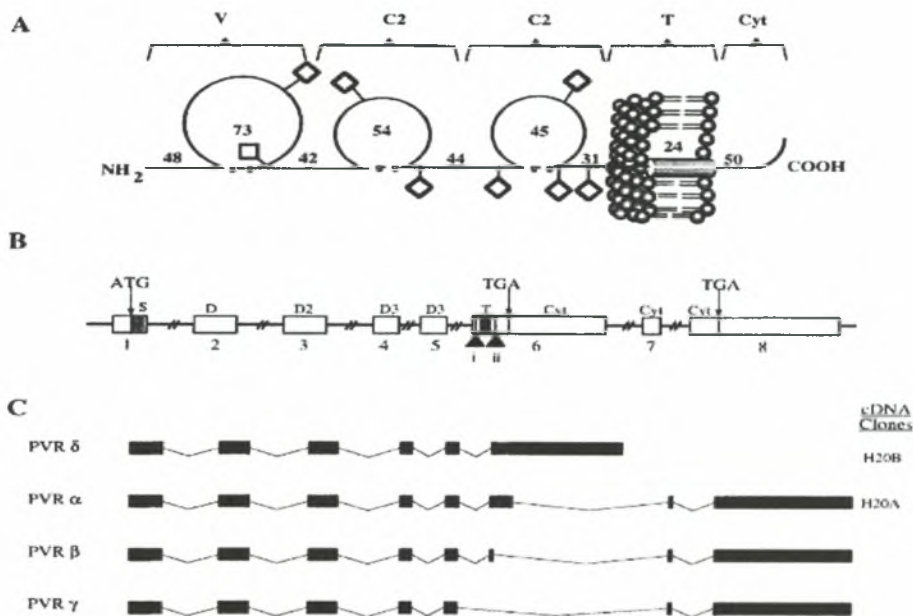


Εικόνα 1.10: Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών. (1) Ο ιός προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια, μέσω του υποδοχέα CD155. (2) Ο υποδοχέας μεσολαβεί στην αποσταθεροποίηση του ιικού καψιδίου και ιικό RNA εξέρχεται από το καψίδιο και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. (3) Η ιική πρωτεΐνη VPg αποκόπτεται από μια φωσφοδιεστεράση του κυττάρου και ακολουθεί η μετάφραση του ιικού RNA. (4) Η πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης αποδίδει τις ώριμες δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. (5) Το θετικής πολικότητας RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού αρνητικής πολικότητας κλώνου, παράγοντας ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF). (6) Η έναρξη της σύνθεσης πολλών κλώνων θετικής πολικότητας από έναν αρνητικής πολικότητας κλώνο ένα παράγει το αντιγραφικό ενδιάμεσο (RI). (7) Τα νεοσυντιθέμενα θετικής πολικότητας μόρια RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εκμαγείο για τη μετάφραση, για την αντιγραφή ή (8) να υποστούν καψιδίωση και να προκαλέσουν τη διάσπαση ωρίμανσης της VP0, μέσω της οποίας παράγονται νέα ιικά σωματίδια. (9) Με τη λύση του κυττάρου απελευθερώνονται τα μολυσματικά ιικά σωματίδια. (De Jesus NH, 2007)

1.4.1 Πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα CD155 των πολιοϊών και είσοδος του ιϊκού RNA στο κυττάρο ξενιστή

Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών αρχίζει με την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα. Ο ανθρώπινος υποδοχέας των πολιοϊών (hPVR) ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και είναι μία γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 80 KDa. Αποτελείται από τρεις εξωκυτταρικές περιοχές (D1, D2 και D3) οι οποίες έχουν δομή αντισώματος, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία καρβοξυτελική κυτταροπλασματική ουρά (Εικόνα 1.11.A).

Η N-τελική D1 περιοχή του hPVR έρχεται σε επαφή με το ιϊκό καψίδιο και είναι απαραίτητη για την μόλυνση των κυττάρων καθώς περιέχει την θέση αναγνώρισης για τους πολιοϊούς (Freistadt et al., 1991, Selinka et al., 1991). Οι περιοχές D2 και D3 έχουν βοηθητικό ρόλο κατά την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα του (Racaniello V., 1996).



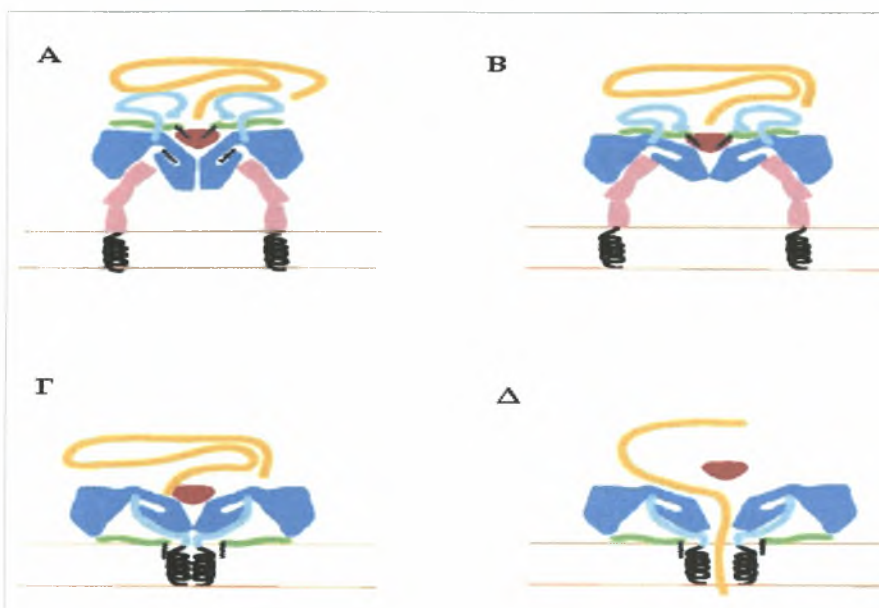
Εικόνα 1.11: A) οι λειτουργικές περιοχές του hPVR. B) το γονίδιο του hPVR. C) οι τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα (Από D. Solecki et al. 1998).

Η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του καψιδίου οι οποίες είναι απαραίτητες για την είσοδο του ιϊκού RNA στο κύτταρο. Η περιοχή του καψιδίου που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα είναι γνωστή ως αύλακα (canyon). Στη βάση της αύλακας, στον πυρήνα του β βαρελιού της VP1, βρίσκεται προσδεμένο ένα υδρόφοβο λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης (rocket factor) το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην αποσταθεροποίηση του καψιδίου (Harber et al., 1995, Pfister et al. 1999).

Η αμινοτελική περιοχή του υποδοχέα προσδένεται στο κάτω μέρος της αύλακας, απελευθερώνοντας το μόριο σφιγγοσίνης (He et al., 2003). Η πρωτεΐνη VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 μεταφέρονται από το εσωτερικό, στην εξωτερική επιφάνεια του ιϊκού καψιδίου,

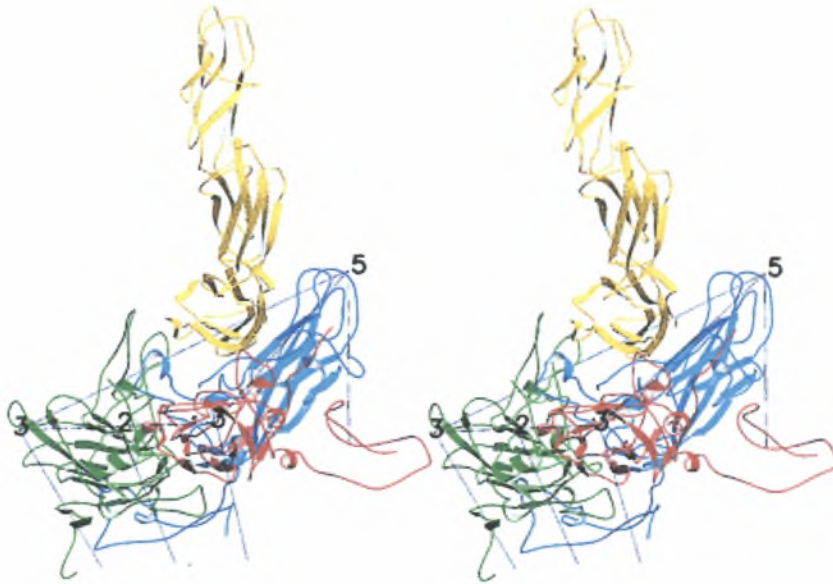
προσδίδοντας του υδρόφοβες ιδιότητες (Fricks et al., 1990). Κατόπιν, το μυριστιλιωμένο N-τελικό άκρο της VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 προσδένονται στις λιπιδωμικές μεμβράνες των κυττάρων ξενιστών με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πόρου-καναλιού, μέσω του οποίου εισέρχεται το ιικό RNA στο κύτταρο (Bubeck et al., 2005)(**Εικόνα 1.12**).

Τα ιικά σωμάτια που προκύπτουν ονομάζονται σωμάτια A. Τα σωμάτια αυτά περιέχουν μολυσματικό RNA, ωστόσο, έχουν μικρότερο συντελεστή καθίζησης (135S) σε σχέση με τα άθικτα ιικά σωμάτια (160S) και χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία σε πρωτεάσες και από την απουσία της VP4 καψιδικής πρωτεΐνης (Wimmer et al, 1994).



Εικόνα 1.12. Αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα και είσοδος ιϊκού RNA στο κύτταρο. Α) Αλληλεπίδραση υποδοχέα με την ιική αύλακα. Β) Απελευθέρωση μορίου σφιγγοσίνης. Γ) Έξοδος N-τελικού άκρου VP1 και VP4 και πρόσδεσή τους σε κυτταρικές μεμβράνες. Δ) Δημιουργία καναλιού, είσοδος ιϊκού RNA στο κύτταρο. (CD155:ροζ, ικόπρωτομερές:μπλε, N-τελικό άκρο της VP1:κυανό, VP4:πράσινο, σφιγγοσίνη:μαύρο, ιικό RNA:κίτρινο)

Το γονίδιο του hPVR έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και περιέχει οκτώ εξόνια (**Εικόνα 1.11.B**). Εκφράζεται στους ανθρώπινους ιστούς με τέσσερις ισομορφές οι οποίες είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος (**Εικόνα 1.11.C**). Οι δύο από αυτές είναι ενσωματωμένες στη κυτταρική μεμβράνη (hPVRα και hPVRδ) και χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς πολιοϊών, ενώ οι άλλες δύο (hPVRβ και hPVRγ) εκκρίνονται από τα κύτταρα ως υδρόφιλες και θερμοδυναμικά σταθερότερες στο εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου και από αυτές απουσιάζει το εξόνιο της διαμεμβρανικής περιοχής. Οι ισομορφές hPVRα και hPVRδ διαφέρουν μόνο στην αλληλουχία της C-τελικής κυτταροπλασματικής περιοχής τους (Solecki et al. 1998).



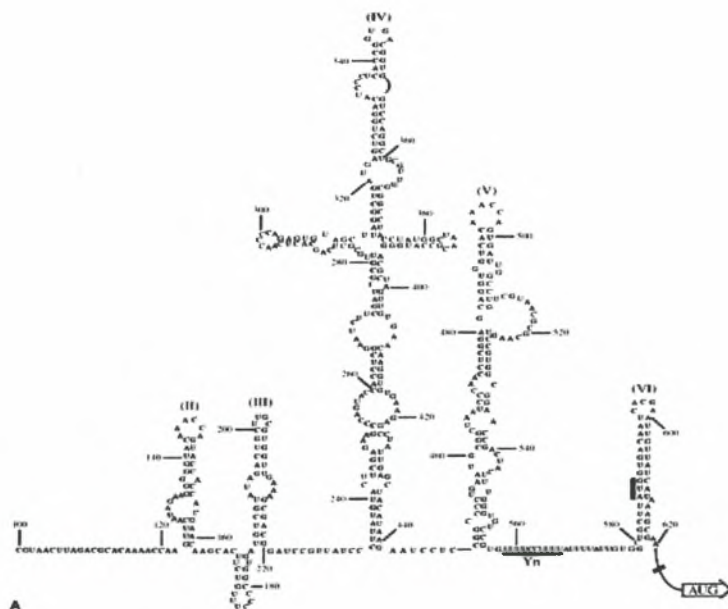
Εικόνα 1.13: Σερεοαπεικόνιση του υποδοχέα CD155 των πολιοϊών(κίτρινο) που είναι συνδεδεμένος στην επιφάνεια του καψιδίου. (VP1: μπλε, VP2: πράσινο, VP3: κόκκινο) ([Yongning He et al., 2000](#))

1.4.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA

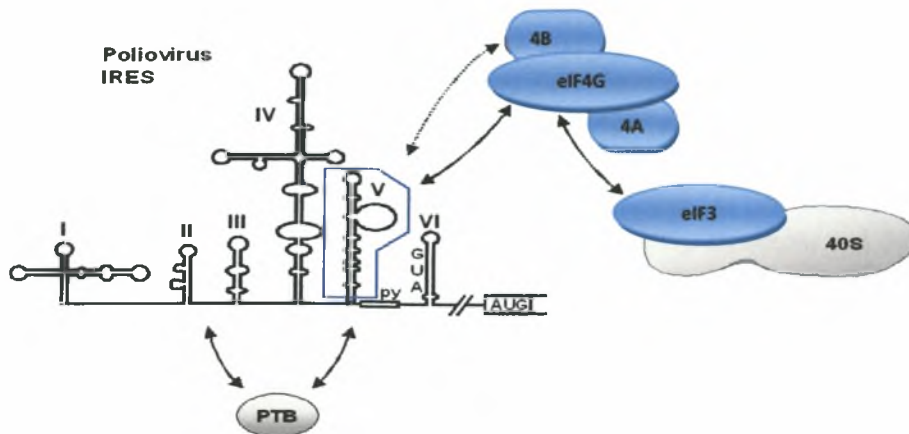
Καθώς το θετικής πολικότητας ιικό RNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη VPg απομακρύνεται από το 5' άκρο από μια κυτταρική φωσφοδιεστεράση και το RNA μεταφράζεται απευθείας από τα ριβοσώματα του κυττάρου σε μια πολυπρωτεΐνη. (Gulevich et al., 2001)

Ανόμοια με τα ευκαρυωτικά mRNAs, στη μετάφραση του ιϊκού RNA συμμετέχει ένα γενετικό στοιχείο της 5' UTR περιοχής του ιϊκού γενώματος, γνωστό ως IRES (internal ribosome entry site) (Εικόνα 1.14) το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για την σωστή πρόσδεση των ριβοσωμάτων. Το στοιχείο IRES αποτελείται από υψηλά διατηρημένες δευτεροταγείς δομές RNA και περιέχει μια χαρακτηριστική περιοχή ολιγοπυριμιδίνης η οποία ακολουθείται από ένα πολύ σημαντικό συντηρημένο σιωπηλό κωδικόνιο AUG στο 3' άκρο (μοτίβο Y_n-X_m-AUG , Y =πυριμιδίνη, $n=6-8$, X =οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και $m=18-20$ νουκλεοτίδια) (Pfister et al. 1999, Ehrenfeld E. και Semler B. L. 1995). Το ενεργό κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται περίπου 100nt καθοδικά του IRES (Wimmer et al.1993).

Κατά την έναρξη της μετάφρασης, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S κατευθύνεται στην περιοχή του IRES που περιέχει το σιωπηλό κωδικόνιο AUG, πιθανόν μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης. Για τη μετάφραση του ιϊκού RNA είναι απαραίτητοι σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIFs) των ευκαρυωτικών κυττάρων, με εξαίρεση τον eIF4E ο οποίος προσδέεται στην καλύπτρα cap των ευκαρυωτικών mRNAs (Ochs K. et al., 2002). (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.14: 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 (Pfister et al. 1999).



Εικόνα 1.15: Αλληλεπίδραση των eIF παραγόντων με το στοιχείο IRES κατά την έναρξη της μετάφρασης του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Διακρίνεται η PTB πρωτεΐνη που προσδέεται στην πολυπυριμιδική περιοχή καθώς και το σιωπηλό κωδικόνιο AUG στην VI περιοχή της 5UTR.

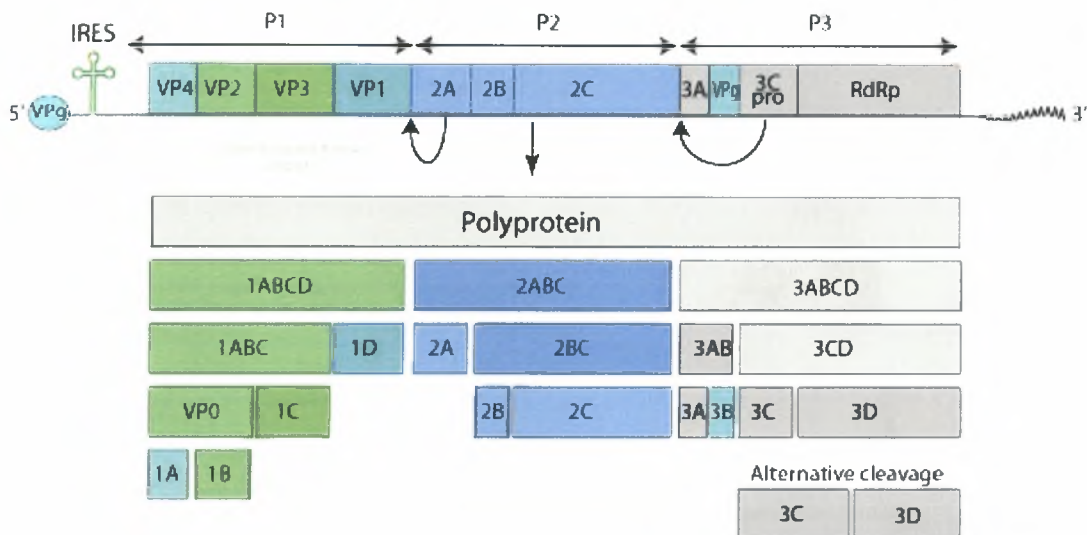
Στην cap- εξαρτώμενη μετάφραση των κυτταρικών mRNA οι παράγοντες eIFG1, eIF4E και ο eIF4A συναρμολογούν το σύμπλοκο eIF4F το οποίο αλληλεπιδρά με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S μέσω του eIF3 για να σχηματίσει το σύμπλοκο 43S. Στη συνέχεια το σύμπλοκο 43S προσδέεται στο 5'cap του mRNA και δημιουργείται το σύμπλοκο 48S το οποίο κινείται με κατεύθυνση 5→3 μέχρι να συναντήσει το εναρκτήριο κωδικόνιο. Κατά τη μετάφραση του ιϊκού RNA ο παράγοντας eIF4G αλληλεπιδρά απευθείας με το RNA και συνδέεται με τον eIF4A προάγοντας την δημιουργία του 48S συμπλόκου. Αφού συνδεθεί η μικρή υπομονάδα στο RNA κινείται με κατεύθυνση 5'→3' μέχρι να συναντήσει το εναρκτήριο κωδικόνιο (Deborah Prevot et al.2003).

Στο στοιχείο IRES, εκτός από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, προσδέονται και άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή, οι οποίες ενισχύουν τη μετάφραση, ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ της μετάφρασης και της αντιγραφής του ιϊκού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί παράγοντες ITAFs ειδικόι για τα στοιχεία IRES, τέσσερις από τους οποίους είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: η πρωτεΐνη PTB (polypyrimidine tract-binding protein) των 57kDa η οποία προσδέεται στην πολυπυριμιδική περιοχή, η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP2 [poly(rC)-binding protein2] 39 kDa, το αυτοαντιγόνο La 52kDa και η Unr (Upstream of N-Ras). Ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF₄₅ μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο (Kerstin Ochs et al.2002, Murray et al, 2001; Costa-Mattioli et al, 2004; Boussadia et al., 2003).Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι απαραίτητες αλλά όχι επαρκείς από μόνες τους για την έναρξη της μετάφρασης (Hunt S.L., 1999), εκτός από την Unr η οποία είναι πράγματι αναγκαία σ' αυτή τη διαδικασία (Boussadia et al., 2003).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταφράζεται τελικά σε μια πολύπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται από τις ιϊκές πρωτεάσες 2A^{pro}, 3C και 3CD, προκειμένου να δημιουργηθούν οι λειτουργικές ιϊκές πρωτεΐνες.

1.4.3 Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης

Το μονοκιστρονικό γονιδίωμα των πολιοϊών, κωδικοποιεί μια ασταθή πολυπρωτεΐνη 247kDa, από την οποία προκύπτουν μετά από πρωτεόλυση όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες. Αποτελείται από τρία πρόδρομα πολυπεπτίδια, P1, P2 και P3. Οι δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 είναι προϊόντα του πρόδρομου πολυπεπτιδίου του P1, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες προέρχονται από τα πρόδρομα πολυπεπτίδια P2 και P3. Μετά την πρωτεολυτική διαδικασία, από την P2 περιοχή προκύπτουν οι ιϊκές πρωτεΐνες 2A^{pro} (πρωτεάση), 2B και 2C^{ATPase}, από την P3 η 3A, η 3B^{VPg}, η 3C^{pro} και η 3D^{pol} (RNA πολυμεράση). Σε ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας δημιουργούνται πρόδρομα μόρια των παραπάνω μη-δομικών πρωτεϊνών όπως τα 2BC, 3AB και 3CD^{pro}, τα οποία έχουν διαφορετικές λειτουργίες από τις αντίστοιχες ώριμες πρωτεΐνες (Agol et al., 1999, Wimmer et al.1993). Η πρωτεολυτική διάσπαση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (Εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16 : Πρωτεόλυση ιϊκής πολυπρωτεΐνης.

Στο πρώτο στάδιο, η 2A^{pro} πραγματοποιεί μία cis-διάσπαση του δεσμού Tyr-Gly στο N-τελικό της άκρο και οδηγεί στην απελευθέρωση της πρόδρομης πρωτεΐνης P1. Στο δεύτερο στάδιο μέσω cis-διάσπασης από την 3C^{pro} απελευθερώνεται η P3 από το πρόδρομο πολυπεπτίδιο P2-P3. Σε μία αλληλουχία γεγονότων trans-διάσπασης από την 3C^{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. Στην τελευταία αντίδραση πρωτεόλυσης η οποία πραγματοποιείται κατά τη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 διασπάται, μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, στις VP2 και VP4. Η αντίδραση αυτή αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης και είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων. (Pfister et al.1999).

1.4.4 Αντιγραφή του ιϊκού RNA

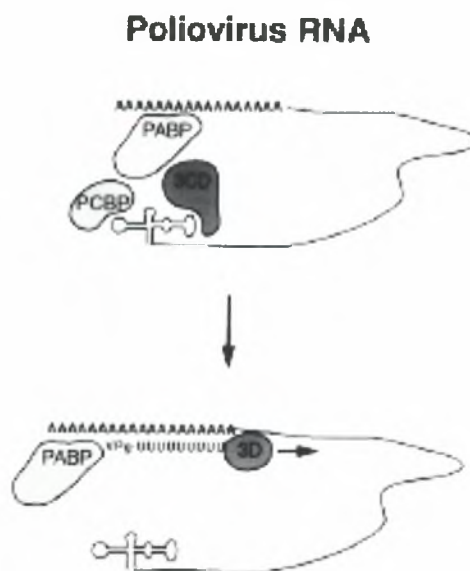
Μετά την μετάφραση του ιϊκού γενώματος και την έκφραση των ιϊκών γονιδίων, το θετικής πολικότητας RNA (+RNA) των πολιοϊών χρησιμοποιείται για τον αυτοδιπλασιασμό του, δηλαδή για την δημιουργία νέων μορίων RNA με την ίδια πολικότητα. Απαραίτητη είναι η παρεμβολή ενός ενδιάμεσου μορίου RNA με αντίθετη πολικότητα, το οποίο χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας της θυγατρικής γενιάς. (Kirkegaard et al 1999, D.J. Barton 2003).

Η διαδικασία της αντιγραφής, ξεκινά, μετά την απομάκρυνση των ριβοσωμάτων από το RNA, με την ολοκλήρωση της μετάφρασης. Λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Απαραίτητη είναι η δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγραφής στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των κυστιδίων, το οποίο αποτελείται από ιϊκές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Επίσης μέρος του συμπλόκου αντιγραφής αποτελεί και το ιϊκό RNA, το οποίο περιέχει cis-acting στοιχεία απαραίτητα για την σύνθεση του (-)RNA, όπως η δομή "cloverleaf" που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. (Egger et al., 2000, Egger et al., 2002, P.F.Stadler et al).

Η έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA, απαιτεί την κυκλοποίηση του γενώματος, η οποία επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των PCBP2 και 3CD που είναι προσδεσμένες στο cloverleaf και των PABP και 3CD που είναι συνδεδεμένες σε poly(A)tail και 3' UTR αντίστοιχα (Lyons et al., 2001) (Εικόνα 1.17).

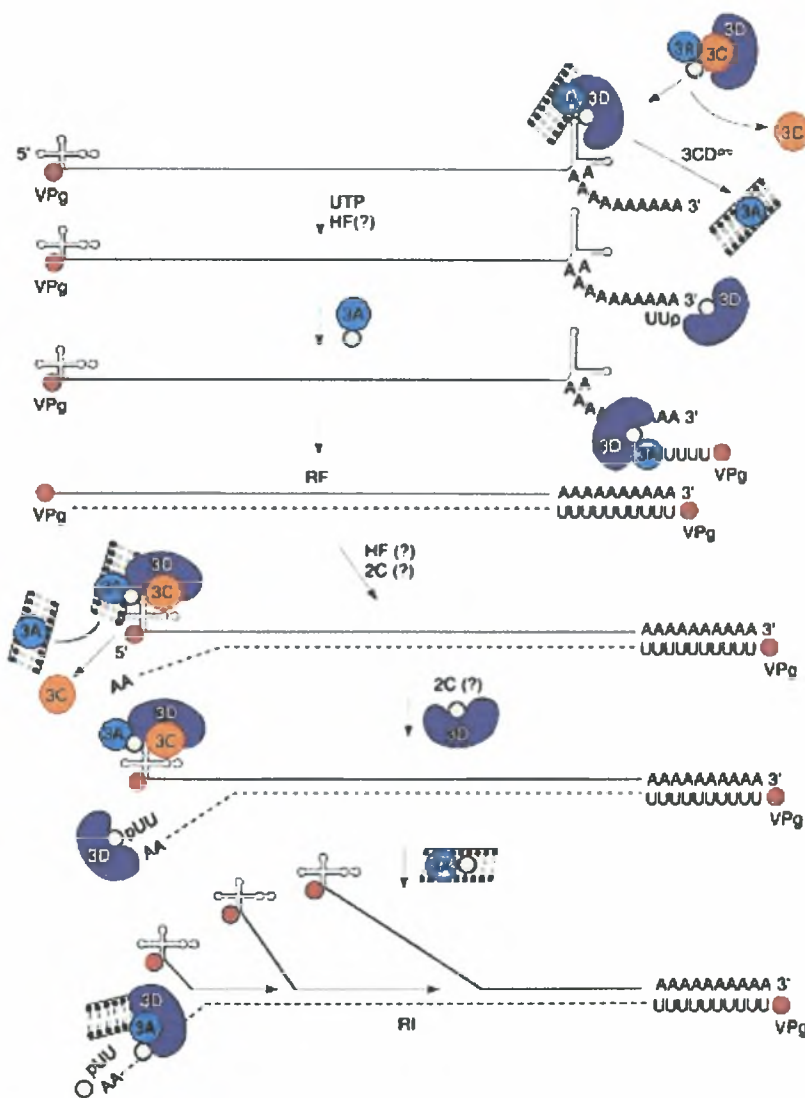
Εμποδίζεται έτσι η πρόσβαση των κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας την μετάβαση από την μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al. 1993). Επιπλέον, αυτός ο μηχανισμός αντιγραφής εξασφαλίζει ότι μόνο τα ανέπαφα RNA (πλήρους μήκους) θα αποτελέσουν εκμαγεία για την 3D^{pol}.

Στη συνέχεια, οι 3CD πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε κοντινή επαφή, αποκόπτουν την προσδεσμένη σε μεμβράνες 3AB, σε 3A και VPg καθώς και την 3CD σε 3C και 3D (Murray & Barton 2003). Στην επιφάνεια της 3D, η VPg, η poly(A)tail και UTP-Mg²⁺ προσδέονται σε κατάλληλη διαμόρφωση, τέτοια ώστε τα κατάλοιπα 17 και 20 της VPg να καταλύσουν την ουριδυλίωσή της VPg σε VPg_{pU} (Schein et al., 2006). Το μόριο VPg_{pU} χρησιμοποιείται σαν εκκινήτήριο μόριο από την 3D^{pol} για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Μετά το τέλος της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου δημιουργείται ένα δίκλωνο μόριο RNA γνωστό ως αντιγραφικό ενδιάμεσο.



Εικόνα 1.17 Μοντέλο κυκλοποίησης του ιϊκού RNA κατά την σύνθεση του RNA(-). (Herold et al., 2001)

Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου, η VPg ουριδιλιώνεται σε VPgrUρU, μέσω της πρόσδεση 2 μορίων 3CD στην περιοχή μίσχου του CRE και την πρόσδεση στο σύμπλοκο της VPg και της 3D. Το CRE είναι ένα δομικό RNA στοιχείο που βρίσκεται στη 2C περιοχή του γενώματος, στη θηλιά του οποίου βρίσκεται η αλληλουχία 5' AAAC 3' και χρησιμοποιείται από την 3D πολυμεράση σαν εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg σε VPgrUρU. Κατόπιν, η VPgrUρU χρησιμοποιείται σαν εκκινήτης για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Έχει βρεθεί ότι παράγονται 20 με 50 αντίγραφα θετικής πολικότητας ανά ένα μόριο αρνητικής πολικότητας. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης αντιγραφής κατά την οποία είναι εφικτή η ταυτόχρονη σύνθεση πολλαπλών κλώνων RNA(+) από έναν μόνο κλώνο RNA(-). (Murray & Barton, 2003) (Εικόνα 1.18).



Εικόνα 1.18 : Μοντέλο σύνθεσης του αρνητικού και θετικού κλώνου του κατά την αντιγραφή του ιϊκού RNA των πολιοϊών (Pfister et al., 1999)

1.4.5 Καψιδίωση – Δημιουργία ικών σωματιδίων

Μετά τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού γενώματος στο κύτταρο, δημιουργούνται τα ιϊκά σωματίδια. Η αντιγραφή του RNA και η καψιδίωση φαίνεται να είναι συζευγμένες διαδικασίες καθώς επιτελούνται και οι δυο πάνω στα ίδια επαγόμενα από τον ιό μεμβρανικά κυστίδια (Ansardi et al.1996).

Στο πρώτο στάδιο δημιουργίας του ιϊκού καψιδίου, το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπτίδιο διασπάται από την 3CD^{pro} στις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν το καψιδιακό 5S πρωτομερές. Τα 5S πρωτομερή, συναρμολογούνται σε 14S πενταμερή (VP0-3-1)₅, η παρουσία των οποίων απαιτείται για την καψιδίωση του RNA των πολιοϊών (Verliden et al., 2000). Στη συνέχεια δώδεκα πενταμερή ενώνονται και δημιουργούν το 75S προκαψίδιο, το οποίο με την είσοδο του RNA μετατρέπεται σε προϊικό σωματίδιο (Ansardi et al., 1994).

Το ιϊκό σωματίδιο δεν είναι σταθερός σχηματισμός εξαιτίας της έλλειψης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών στο εσωτερικό του καψιδίου. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της καψιδίωσης, πραγματοποιείται αυτόκαταλυτικά η αντίδραση ωρίμανσης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα και τη μολυσματικότητα του ιού (Curry et al., 1997). Το κατάλοιπο της ιστιδίνης 195 της VP2 πρωτεΐνης πιστεύεται ότι καταλύει την υδρόλυση της VP0 σε VP2 και VP4 (maturation cleavage) οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην δημιουργία των σταθερών, ώριμων ιικών σωματιδίων (Hindiyeh et al., 1999).

1.4.6 Κυτταρικές μεταβολές κατά τη μόλυνση με πολιοϊό

Κατά την μόλυνση των κυττάρων από πολιοϊό *in vitro*, τα κύτταρα ξενιστές υφίστανται μεταβολικές και μορφολογικές αλλαγές όπως η στρωγγυλοποίηση τους και η αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα. Οι αλλαγές αυτές είναι γνωστές ως CPE (cytopathic effect) (Pfister et al. 1999).

Η αντιγραφή των πολιοϊών λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Η παρουσία του πολιοϊού στο κύτταρο προκαλεί την αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης του και τον κυτταρικό θάνατο. Επηρεάζεται η μεταγραφή, η μετάφραση και στο σύστημα έκκρισης των πρωτεϊνών του μολυσμένου κυττάρου.

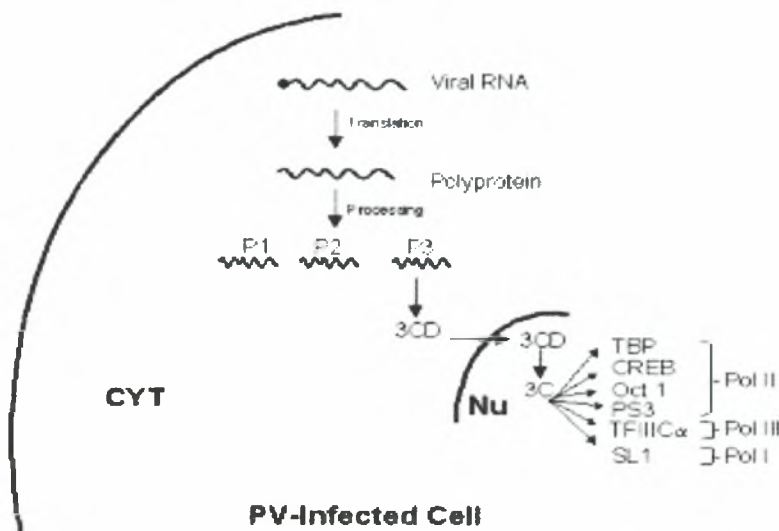
Η μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς οδηγεί στην γρήγορη αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνσύνθεσης, κυρίως μέσω των πρωτεασών των πολιοϊών, της 2A^{pro} και της 3C^{pro}. Η 2A^{pro} προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο (Goldstaub et al., 2000) και επάγει τη διάσπαση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G1 στα σημεία που αυτός προσδέεται στην δομή cap του mRNA και στο ριβόσωμα καθώς και του eIF4GII (Lamphear et al., 1995, Pfister et al. 1999, Deborah Prevot et al. 2003). Εξίσου σημαντική στην αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή είναι η αποικοδόμηση, από την ιϊκή πρωτεάση 3C^{pro}, της πρωτεΐνης PABP (poly(A) binding protein), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση των κυτταρικών

mRNA. Δεν επηρεάζεται η αλληλεπίδραση eIF4G1-PABP αλλά μάλλον αναστέλλονται μεταγενέστερα βήματα της μετάφρασης. Η 2A^{pro} τέμνει επίσης την PABP κατά την διάρκεια της μόλυνσης αλλά σε διαφορετικά σημεία από την 3C^{pro} (Kuyumcu-Martinez et al., 2002). Οι δυο αυτές πρωτεάσες 2A^{pro} και 3C^{pro} δρουν σε συνεργασία για την αναστολή της μετάφρασης. Η 2A^{pro} εμποδίζει την έναρξη της μετάφρασης καταστρέφοντας τον eIF4G1, ενώ η 3C^{pro} αδρανοποιεί την PABP εμποδίζοντας την ανακύκλωση των ριβοσωμάτων (Kuyumcu-Martinez et al., 2004).

Άλλες τροποποιήσεις παραγόντων έναρξης όπως η φωσφορυλίωση του eIF2α πιθανόν συνεισφέρουν επίσης στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι πολιοϊοί ενεργοποιούν τον καταστολέα της μετάφρασης 4E-BP1, ο οποίος αναστέλλει την cap-εξαρτώμενη μετάφραση μέσω πρόσδεσής του στον παράγοντα eIF4E (Blondel et al. 1998).

Εκτός από την μετάφραση, οι ιϊκές πρωτεάσες 2A^{pro} και 3C^{pro} απενεργοποιούν και τα τρία συστήματα μεταγραφής του κυττάρου (Dasgupta et al. 2002), γεγονός που δείχνει την αλληλεπίδραση του ιού με τον πυρήνα (Weidman et al., 2003) (Εικόνα 1.19). Το σύστημα μεταγραφής της RNA Polymerase I είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του ριβοσωμικού RNA (rRNA) και η απενεργοποίησή του, η οποία γίνεται πολύ νωρίς (1,5-2h μετά την μόλυνση) συνοδεύεται από πολλαπλά κοψίματα του παράγοντα TAF₁₁₀ (TBP-Associated Factor), από την 3C^{pro} στις θέσεις gln-gly (Dasgupta et al. 2003). Το σύστημα μεταγραφής της polIII είναι υπεύθυνο για την παραγωγή όλων των tRNA και των 5S rRNA. Η απενεργοποίηση του συστήματος γίνεται με την απενεργοποίηση της α-υπομονάδας του παράγοντα μεταγραφής TFIIIC από την 3C^{pro} (Shen et al., 1996). Η παραγωγή των mRNA αναστέλλεται από τις δύο ιϊκές πρωτεάσες, οι οποίες απενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής όπως η TBP (TATA-binding protein), η CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein), η Oct-1 (Octamer-binding factor) και την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Das and Dasgupta, 1993; Yalamanchili et al., 1997a; Yalamanchili et al., 1996; Yalamanchili et al., 1997b; Weidman et al., 2001). Ενδεχομένως, η 3C^{pro} να ενεργοποιεί έναν κυτταρικό παράγοντα ο οποίος με την σειρά του να αλλοιώνει την p53. Η καταστροφή της πρωτεΐνης αυτής φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιεί ο ιός για να καθυστερήσει ο κυτταρικός θάνατος, έτσι ώστε να μπορέσει να ολοκληρώσει την αναπαραγωγή του.

Τέλος, οι ιϊκές πρωτεΐνες 3A, 2B και 2BC εκτός από τον ρόλο τους στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής, εμποδίζουν την μεταφορά των πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi επιδρώντας στο εκκριτικό σύστημα του κυττάρου (Doedens et al., 1995; Barco and Carrasco, 1998) με την υπερβολική παραγωγή κυστιδίων, χαρακτηριστικών της μόλυνσης με εντεροϊό.



Εικόνα 1.19 . Η πρόδρομος πρωτεΐνη 3CD^{pro} εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και με αυτοπρωτεόλυση δημιουργεί την 3C^{pro}. Η ιϊκή πρωτεάση επιδρά σε διάφορους παράγοντες μεταγραφής και των τριών συστημάτων του ξενιστή 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 (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 μονοσθενή κατιόντα όσο και σε αναστολείς της μετάφρασης . Έχει προταθεί ότι οι ιϊκές πρωτεΐνες 2B και 3AB ίσως μπορούν να τροποποιούν την διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης (Aitziber Agirre et al. 2002). Επίσης, οι ιϊκές 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 ιϊκών σωματιδίων.

1.5 Επιδημιολογία

Οι μολύνσεις από πολιοϊούς είναι εποχιακές σε περιοχές εύκρατων κλιμάτων και συμβαίνουν κυρίως το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Αντίθετα, σε τροπικού κλίματος περιοχές μολύνσεις συμβαίνουν όλο το χρόνο. Οι πολιοϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ σε αναπτυγμένες χώρες μεταδίδονται μέσω αναπνευστικών εκκρίσεων. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που ευνοούν την μετάδοση των πολιοϊών είναι οι κακές συνθήκες υγιεινής, τα τροπικά και υποτροπικά κλίματα και η υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα (Sabin, 1985).

Ο ιός της πολιομυελίτιδας μολύνει μόνο τον άνθρωπο. Όπως και οι υπόλοιποι εντεροϊοί, είναι ανθεκτικός σε περιβαλλοντικές συνθήκες και στα υγρά του γαστρεντερικού σωλήνα, γεγονός που διευκολύνει τη μετάδοση με την εντεροστοματική οδό. Ο ιός βρίσκεται στο φάρυγγα και στον εντερικό σωλήνα και αποβάλλεται με τα κόπρανα πριν ακόμα εμφανιστούν τα συμπτώματα. Εξαφανίζεται γρήγορα από το φάρυγγα, αλλά η αποβολή του ιού από τα κόπρανα μπορεί να συνεχιστεί ακόμα και ένα μήνα μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η μετάδοση του ιού γίνεται από την σωματική επαφή με πάσχοντες ή με τα άτομα που αποβάλλουν τον ιό με τα κόπρανα τους.

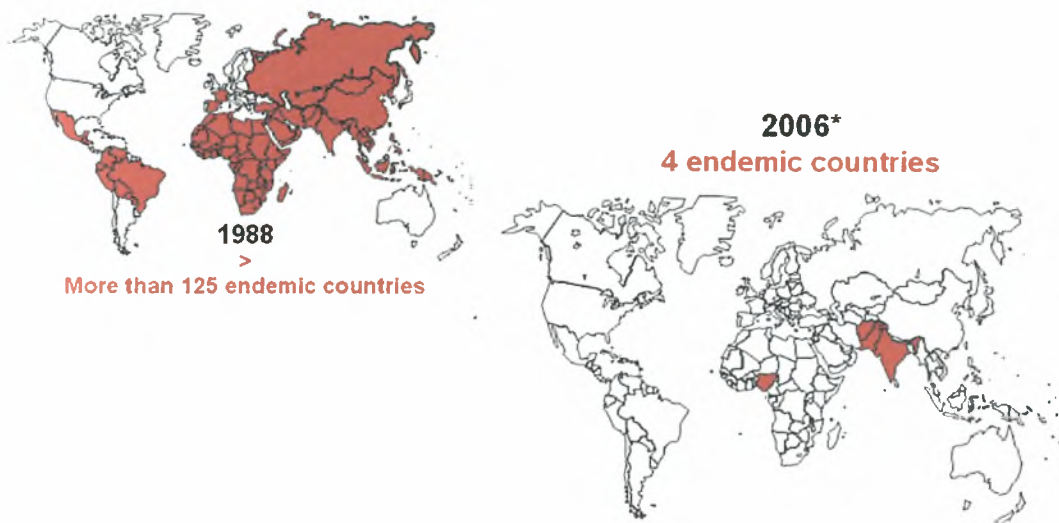
Οι κακές συνθήκες υγιεινής και η διαβίωση σε περιοχές με μεγάλη συγκέντρωση πληθυσμού ευνοούν τη μετάδοση του ιού. Οι πολιοϊοί συχνά εντοπίζονται σε αστικά λύματα, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν εστία μόλυνσης. Μόλυνση των παροχών νερού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα επιδημίες. Στις εύκρατες περιοχές, η νόσος είναι πιο συχνή κατά τους θερινούς μήνες. Η ασθένεια εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες αλλά τα παιδιά φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα απ' ότι οι ενήλικες (Melnick J.L, 1996). Αυτό οφείλεται στην επίκτητη ανοσία του ενήλικου πληθυσμού. Σε απομονωμένες κοινωνίες (π.χ. οι Εσκιμώοι της Αρκτικής) ο ιός προσβάλλει όλες τις ηλικίες. Σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπου οι συνθήκες ευνοούν την ευρεία διάδοση του ιού, η ασθένεια εμφανίζεται κυρίως σε νήπια.

Πριν την εισαγωγή των εμβολίων η πολιομυελίτιδα ενδημούσε σε τροπικές χώρες και μεταδιδόταν ιδιαίτερα γρήγορα σε μικρά παιδιά, τα οποία παρουσίαζαν συμπτώματα ελάχιστης παράλυσης. Καθώς οι συνθήκες υγιεινής βελτιώθηκαν, η μετάδοση του ιού περιορίστηκε και η ηλικία της πρωτογενούς έκθεσης στον ιό αυξήθηκε. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην παρατήρηση αυξημένου αριθμού περιστατικών παραλυτικής πολιομυελίτιδας σε ενήλικες. Αυτά τα περιστατικά έφτασαν σε ύψιστο βαθμό στις Σκανδιναβικές χώρες λίγο πριν την εισαγωγή των εμβολίων, όταν αυτές δοκιμάστηκαν από καταστρεπτικές επιδημίες παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Το πρόγραμμα εμβολιασμού εναντίον της πολιομυελίτιδας ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και οδήγησε στη σχεδόν πλήρη εκρίζωση της ασθένειας στις ανεπτυγμένες χώρες. Το 1988 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) έθεσε ως στόχο τον μηδενισμό των κρουσμάτων πολιομυελίτιδας και την πλήρη εξάλειψη των αγρίων στελεχών πολιοϊών από όλα τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα που συλλέγονται σε όλο τον κόσμο, μέχρι το 2000 (WHO, 2004). Στο τέλος του 2002, ο αριθμός των περιστατικών αγρίου τύπου πολιοϊών από 350000 που ήταν μειώθηκε σε λιγότερο από 500 και ο αριθμός των ενδημικών χωρών από 125 σε 7 (Wood και Thorley, 2003; WHO, 2004). Την ίδια περίοδο έχουμε τη διακοπή της μετάδοσης

της ασθένειας σε πολλές χώρες της Ευρώπης, της Αμερικής, της Ασίας και του Νότιου Ειρηνικού Ωκεανού και 180 χώρες ανακηρύσσονται ως ελεύθερες από πολιοϊούς (polio-free).

Areas with Indigenous Polio

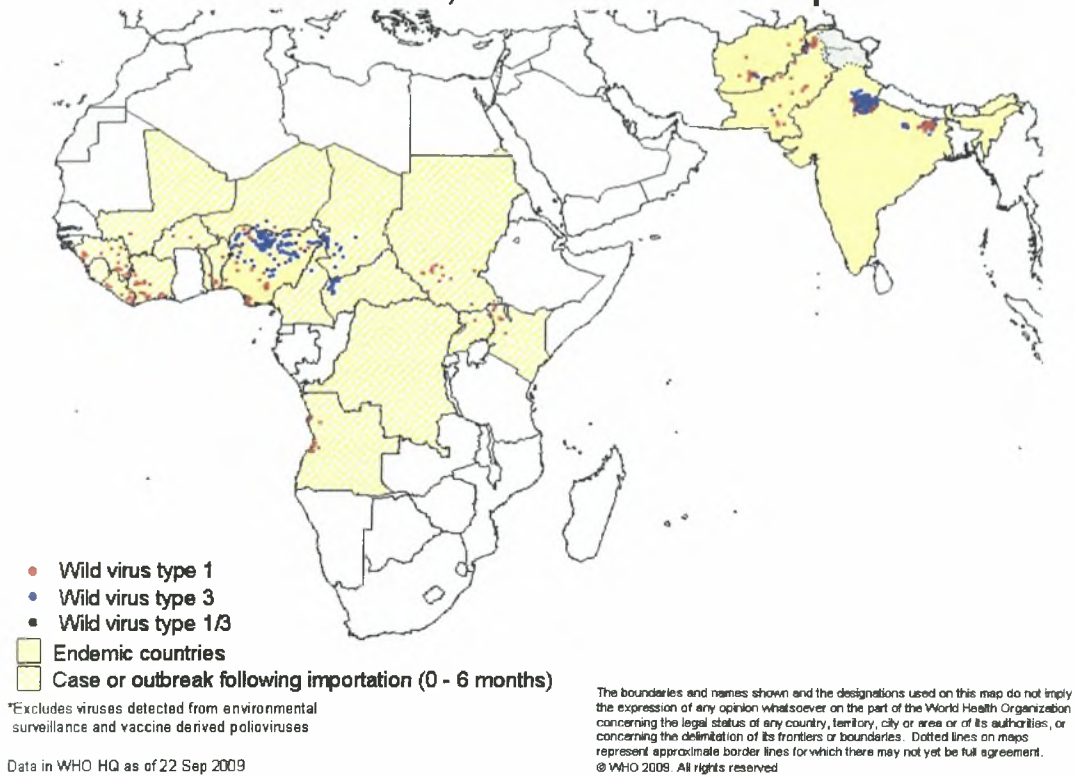


* as of 8 July 2006

Εικόνα 1.20. Παγκόσμια κατάσταση το 1988 στην οποία φαίνεται η σχεδόν η καθολική παρουσία των πολιοϊών σε όλο τον κόσμο, ακόμα και σε ανεπτυγμένες χώρες όπως η Γαλλία και Ισπανία. Β. Παρουσιάζεται η παγκόσμια εξάπλωση των πολιοϊών το 2006 (WHO)

Ο αριθμός των περιστατικών πολιομυελίτιδας ανήλθε σε 1.185 σε 17 χώρες από 784 σε 15 χώρες το 2003. (Εικόνα 18) 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 2009 (Εικόνα 1.21).

Wild Poliovirus*, 23 Mar 2009 – 22 Sep 2009



Εικόνα 1.21: Απεικονίζεται η μετάδοση των πολιοϊών άγρίου τύπου 1 και 3 κατά το έτος 2009 (Από WHO 2009).

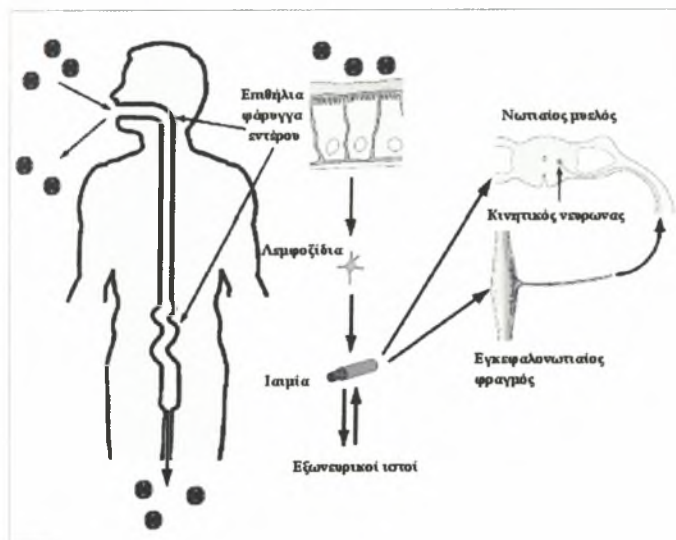
Από το 1950 έως το 1963, η Ελλάδα ήταν ενδημική χώρα για την πολιομυελίτιδα. Μετά της έναρξη χορήγησης του εμβολίου salk (IPV) το 1962 και από το 1964 του εμβολίου Sabin (OPV), η νοσηρότητα από πολιομυελίτιδα έπεσε κατακόρυφα. Μικρές επιδημίες καταγράφηκαν το 1976, καθώς και τη χρονική περίοδο 1981-1982 σε μη εμβολιασμένα άτομα. Τέλος πέντε περιπτώσεις πολιομυελίτιδας σε παιδιά που δεν είχαν εμβολιαστεί, αναφέρθηκαν στην Ελλάδα το έτος 1996 μετά από μια μεγάλη επιδημία που σημειώθηκε στη γειτονική Αλβανία. Τα κρούσματα αυτά ήταν τα πρώτα ύστερα από 14 χρόνια απουσίας κυκλοφορίας του πολιοϊού στον Ελλαδικό χώρο.

Η εφαρμογή του εμβολίου συνέβαλε ουσιαστικά στη διακοπή της κυκλοφορίας του άγριου ιού της πολιομυελίτιδας στην Ευρώπη και την Αμερική, όμως η εμφάνιση μικρών επιδημιών σε ορισμένες χώρες σε συνδυασμό με τις μεταναστεύσεις των πληθυσμών επιβάλλουν την αυξημένη επαγρύπνηση για την επιτήρηση της κυκλοφορίας άγριων στελεχών πολιοϊού ή στελεχών πολιοϊού που προέρχονται από το εμβόλιο έως ότου η πολιομυελίτιδα εξαλειφθεί παγκοσμίως.

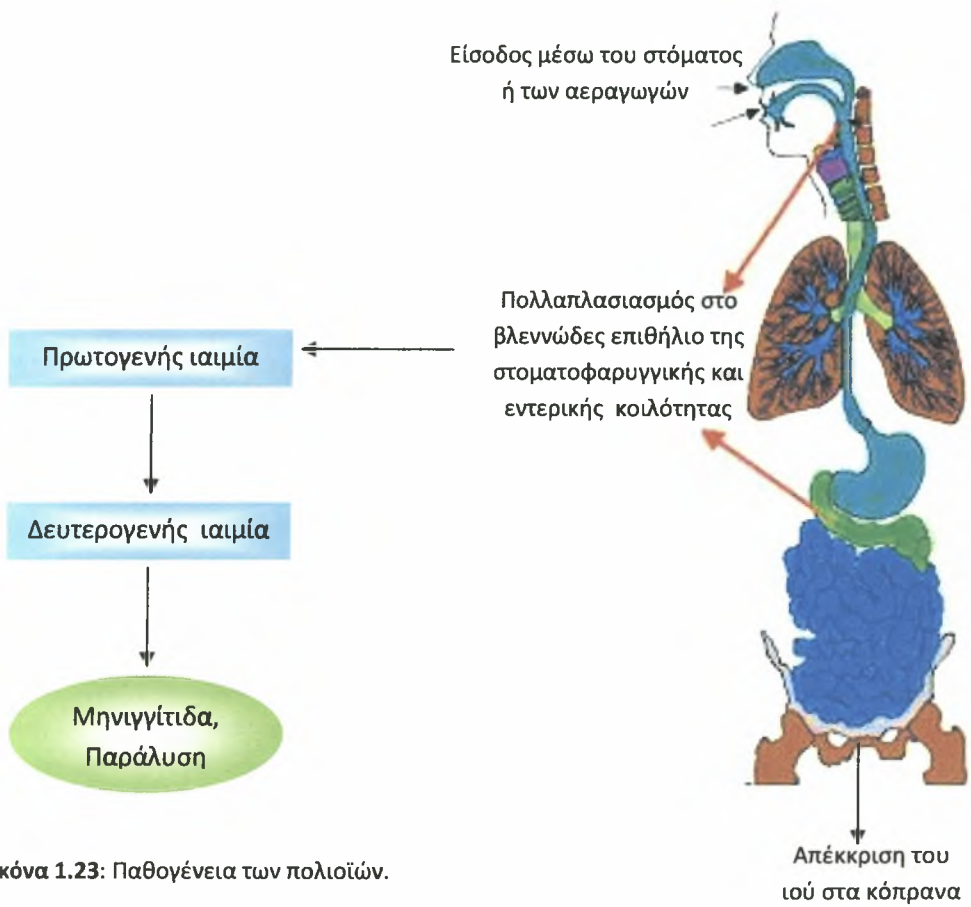
1.6 Παθογένεια

Ο ιός εισέρχεται στον οργανισμό μέσω του στόματος και ο πολλαπλασιάζεται στο βλεννώδες επιθήλιο της στοματοφαρυγγικής και εντερικής κοιλότητας. Σε αυτό το στάδιο της μόλυνσης, ο ιός απεκκρίνεται στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων, γεγονός που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη μετάδοσή του. Στη συνέχεια, ο ιός εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται στα λεμφοζίδια του εντέρου και από εκεί εισέρχεται στο αίμα, προκαλώντας ελαφριά μορφή ιαιμία, μέσω της οποίας ο ιός διασπείρεται στους ιστούς διαφόρων απομακρυσμένων οργάνων-στόχων που δεν ανήκουν στον νευρικό ιστό, όπως λεμφοζίδια και μύες. Ο πολλαπλασιασμός του έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων και μιας δευτερογενούς ιαιμίας, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα μόλυνσης του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Σε ποσοστό 1-2% των μολύνσεων ο ιός διέρχεται μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Πολλαπλασιασμός του ιού στο ΚΝΣ οδηγεί σε καταστροφή των κινητικών νευρώνων και παράλυση (παραλυτική πολιομυελίτιδα) (Bodian, 1955; Sabin, 1956) (Εικόνα 1.22, 1.23). Ο πολιοϊός έχει περιορισμένο τροπισμό και αναγνωρίζει υποδοχείς στα κύτταρα των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού, ραχιαία ριζικά γάγγλια και κινητικούς πυρήνες εγκεφαλικών νεύρων. Βλάβες παρατηρούνται επίσης στον υποθάλαμο και τον θάλαμο. Στον εγκέφαλο επηρεάζονται ο δικτυωτός σχηματισμός, ο αιθουσαίος πυρήνας καθώς επίσης και ο πυρήνας της παρεγκεφαλίδας. Ο φλοιός του εγκεφάλου μένει ανεπηρέαστος με εξαίρεση τον κινητικό φλοιό. Ο ιός αναπτύσσεται γρήγορα και προκαλεί άμεση καταστροφή των κυττάρων-στόχων.



Εικόνα 1.22: Παθογένεια της πολιομυελίτιδας



Εικόνα 1.23: Παθογένεια των πολιοϊών.

1.7 Κλινικές εκδηλώσεις – συμπτώματα

Τη μόλυνση με τον ιό της πολιομυελίτιδας, μπορεί να ακολουθήσει μια από τις παρακάτω αντιδράσεις: α) μόλυνση χωρίς συμπτώματα, β) ήπια ασθένεια, γ) άσηπτη μηνιγγίτιδα και/ή ήπια παροδική πάρεση (μη παραλυτική ή αποτυχημένη πολιομυελίτιδα) και δ) παραλυτική πολιομυελίτιδα. (Melnick J.L., 1996).

Περίπου το 90% των λοιμώξεων με πολιοϊό δεν παρουσιάζουν συμπτώματα και η λοίμωξη περιορίζεται στο στοματοφάρυγγα και στο έντερο.

Σε ποσοστό 4%-8% των περιπτώσεων μόλυνσης η νόσος εμφανίζεται ως ήπια μη ειδική νόσος η οποία ονομάζεται «αποτυχημένη» πολιομυελίτιδα (abortive poliomyelitis) και χαρακτηρίζεται από πυρετό, πονόλαιμο, φαρυγγίτιδα, αδιαθεσία, μυαλγία, υπνηλία, πονοκέφαλο, ναυτία, έμετο, διάρροια και γενικευμένη κούραση. Οι κλινικές εκδηλώσεις επικεντρώνονται κυρίως στο άνω αναπνευστικό και στο γαστρεντερικό σύστημα, όμοια με τις εκδηλώσεις της κοινής γρίπης (CDC, 2002)

Περίπου το 10% των ασθενών με «αποτυχημένη» πολιομυελίτιδα αναπτύσσουν άσηπτική μηνιγγίτιδα (aseptic meningitis) ή αλλιώς μη παραλυτική πολιομυελίτιδα. Σ' αυτή την περίπτωση ο ιός φτάνει στο ΚΝΣ και στις μήνιγγες και προκαλεί ακαμψία του αυχένα, της πλάτης και των κάτω άκρων. Τα συμπτώματα διαρκούν 2 -10 ημέρες και η ανάρρωση είναι σχεδόν πλήρης. (Rotbart, 1997; CDC, 2002).

Σε ποσοστό 1-2% των περιπτώσεων λοίμωξης από πολιοϊούς, η ασθένεια εξελίσσεται σε παραλυτική πολιομυελίτιδα και εμφανίζεται 3-4 ημέρες μετά την ήπια νόσο. Σε αυτή την περίπτωση ο ιός εισέρχεται από το αίμα στα κύτταρα των προσθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού και σε κινητικά κέντρα στο φλοιό του εγκεφάλου. Η κυριότερη ένδειξη για την εκδήλωση της ασθένειας είναι η χαλαρή παράλυση ως αποτέλεσμα βλάβης των κατωτέρων κινητικών νευρώνων. Επίσης μπορεί να παρουσιαστεί έλλειψη συντονισμού στο εγκεφαλικό στέλεχος και επίπονοι σπασμοί σε μυς οι οποίοι δεν έχουν παραλύσει. Η σοβαρότητα της παράλυσης καθορίζεται από την έκταση της λοίμωξης των νευρώνων και των προσβληθέντων νεύρων. Η ανάρρωση διαρκεί περίπου έξι μήνες όμως η παράλυση παραμένει για αρκετό καιρό, συχνά εφ' όρου ζωής.

Ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα, η παραλυτική πολιομυελίτιδα διακρίνεται σε τρεις τύπους. Τη νωτιαία παράλυση (spinal paralysis), η οποία χαρακτηρίζεται από καταστροφή των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού και ασύμμετρη παράλυση των κάτω άκρων, τη βολβοειδή ή κρανιακή πολιομυελίτιδα (bulbar), κατά την οποία έχουν μολυνθεί νευρώνες του ΚΝΣ, και χαρακτηρίζεται από παράλυση νευρώνων που ελέγχουν τους μύες των πνευμόνων και κατ' επέκταση δυσλειτουργίες στην αναπνοή, στη διάρθρωση της ομιλίας, στη κίνηση του οφθαλμού, καθώς και στην κίνηση διαφόρων μυϊκών ομάδων. Τρίτη μορφή είναι ο συνδυασμός των δύο τύπων η οποία ονομάζεται νωτιαιοβολβοειδής πολιομυελίτιδα (bulbospinal paralysis) (Bodian, 1972). Ο ιός αποβάλλεται με τα κόπρανα μέχρι και ένα μήνα μετά από την εμφάνιση των συμπτωμάτων.

1.8 Εργαστηριακή διάγνωση

Οι εντεροϊοί μπορούν να βρίσκονται στο έντερο υγιών και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη διάγνωσης και ταυτοποίησης των πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού, η οροταυτοποίηση και η ανίχνευση αντισωμάτων, αλλά και μοριακές τεχνικές. (Muir et al.1998, Siafakas et al. 2001).

Ανίχνευση και ταυτοποίηση των πολιοϊών με παραδοσιακές μεθόδους

Για την **απομόνωση των πολιοϊών**, χρησιμοποιούνται κλινικά δείγματα τα οποία λαμβάνονται κυρίως από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), από φαρυγγικά επιχρίσματα και από δείγματα που προέρχονται από το πεπτικό σύστημα όπως πρωκτικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων, τα οποία αποτελούν το πιο αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών. Η απομόνωση εντεροϊού από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστηματικής μόλυνσης. Η καλλιέργεια τέτοιων δειγμάτων ενδείκνυται για την διάγνωση λοίμωξης από πολιοϊό (Shulman et al, 1997).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την απομόνωση εντεροϊών, είναι η χρήση κυτταρικών σειρών. Η ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών όμως, δεν μπορεί να γίνει στον ίδιο τύπο κυττάρων. Για το λόγο αυτό, η εκλεκτική απομόνωση των πολιοϊών γίνεται από έναν συνδυασμό κυτταρικών σειρών όπως η L20B κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο για τον υποδοχέα των πολιοϊών (PVR) (WHO 2004), η κυτταρική σειρά RD από κύτταρα του ανθρώπινου ραβδομυοσαρκώματος, η κυτταρική σειρά HEL από ινοβλάστες ανθρώπινου εμβρυϊκού πνεύμονα, η κυτταρική σειρά Her-2 από κύτταρα του επιδερμικού καρκινώματος και η κυτταρική σειρά Vero από νεφρικά κύτταρα πράσινου αφρικανικού πιθήκου. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, η απομόνωση μπορεί να είναι εμφανής μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως (CPE) μέσα σε λίγες μέρες.

Μετά την απομόνωση του εντεροϊού, ακολουθεί η **ταυτοποίηση του οροτύπου** μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντιρό για κάθε ορότυπο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων εντεροϊών. Συγκεκριμένα, το προς ανάλυση δείγμα επώαζεται με κάθε διαφορετικό μίγμα αντιορού και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και αξιολογούνται τα αποτελέσματα.

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

Μέσω της **ορολογικής διάγνωσης**, μπορούμε να έχουμε ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊό, αφού τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του

οργανισμού (Melnick J.L., 2001). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα αντιδρά στη λοίμωξη από εντεροϊό με την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία ενεργούν έναντι ειδικών και κοινών επιτόπων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες και έχει μεγάλη ευαισθησία στη διάγνωση λοίμωξης από εντεροϊούς, όμως δεν μπορεί να διακρίνει τους διάφορους οροτύπους.

Ανίχνευση και ταυτοποίηση των πολιοϊών με μοριακές μεθόδους

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

Η ανάπτυξη της τεχνικής **RT – PCR** (Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση ιϊκού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων που στοχεύουν στις διατηρημένες περιοχές του ιϊκού γενώματος, όπως η 5'UTR, είναι δυνατή η ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η καλλιέργειά τους. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων και γι' αυτό το λόγο αποτελεί σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία ταυτοποίησης του ορότυπου του εντεροϊού. Συνεπώς, για την ταυτοποίηση του ιού απαιτείται κάποια μέθοδος συμπληρωματική της RT-PCR. Εκτός από τις παραπάνω παραδοσιακές μεθόδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν κάποιες μοριακές τεχνικές όπως η ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLP). (Siafakas et al., 2002 ; Siafakas et al., 2003).

Με την μέθοδο της **RFLP** ανάλυσης προϊόντων της RT-PCR από την 5'UTR περιοχή του ιϊκού γενώματος ταυτοποιήθηκαν απομονωθέντμένα στελέχη πολιοϊών όχι μόνο ως προς τον τύπο τους, αλλά και ως προς το εάν πρόκειται για στελέχη εμβολίου ή όχι, καθώς και άλλων εντεροϊών, προτείνοντας και έναν διαφορετικό τρόπο ταξινόμησης τους.

Εκτός από την διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η RT – PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορετικών στελεχών με την χρήση ειδικών ζευγών εκκινητικών μορίων που το καθένα αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Έχουν βρεθεί οι αλληλουχίες που προσδιορίζουν τις αντιγονικές ιδιότητες των ιών και έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια που τις στοχεύουν. Η ικανότητα των πολιοϊών να προσδένονται σε συγκεκριμένο υποδοχέα, τον PVR, οφείλεται σε ειδικές περιοχές πρωτεϊνών του ιϊκού καψιδίου. Η αμινοξική αλληλουχία των περιοχών αυτών έχει βρεθεί καθώς και εκκινητικά

μόρια που στοχεύουν σε ειδικές αλληλουχίες των πολιοϊών, έτσι ώστε να αναγνωρίζονται οι πολιοϊοί, όχι όμως άλλοι εντεροϊοί (Melnick J.L., 2001).

Ένας άλλος τρόπος ταυτοποίησης των εντεροϊών είναι η **εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας** του ιϊκού γενώματος. Τμήματα του RNA του ιού που έχουν πολλαπλασιασθεί με RT-PCR μπορούν να αλληλουχηθούν, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την ταυτότητα του ιού. Στην τράπεζα πληροφοριών υπάρχουν οι αλληλουχίες για πρότυπα και άγρια στελέχη εντεροϊών και η σύγκριση μ' αυτές μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση του ιού που μας ενδιαφέρει. Η αναγνώριση της αλληλουχίας της περιοχής του γενώματος που αντιστοιχεί στην VP1 καψιδική πρωτεΐνη, και η οποία φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε στελέχους, φαίνεται να είναι ο καλύτερος τρόπος ταυτοποίησης των διαφόρων εντεροϊών (Oberste et al., 1999; Caro et al., 2001; Oberste et al., 2003).

1.9 Εμβόλια κατά των πολιοϊών

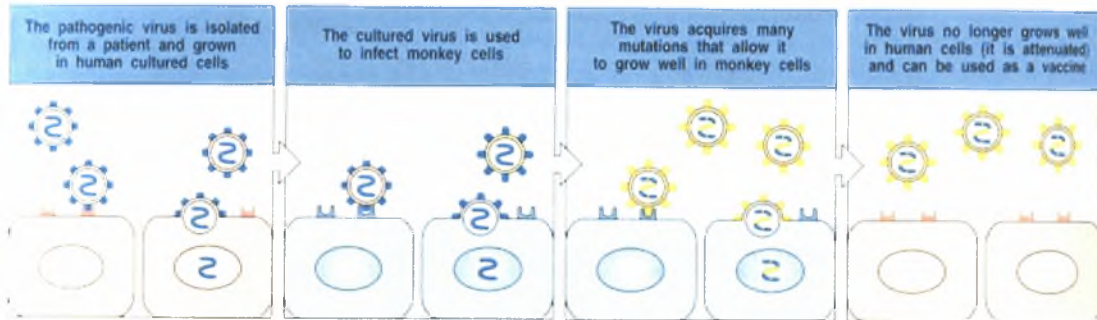
Η αντιμετώπιση των επιδημιών πολιομυελίτιδας ξεκίνησε στα μέσα του εικοστού αιώνα με προσπάθειες που έγιναν για την με την παραγωγή εμβολίων εναντίον της ασθένειας. Το πρώτο εμβόλιο ανακαλύφθηκε το 1955 από τον Jonas Salk και ήταν το Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV), το οποίο περιείχε αδρανοποιημένα άγριου τύπου ιϊκά σωματίδια και των τριών οροτύπων των πολιοϊών. Το δεύτερο εμβόλιο που ανακαλύφθηκε το 1963 από τον Albert Sabin ήταν το Oral Poliovirus Vaccine (OPV), που περιείχε ζωντανά εξασθενημένα ιϊκά σωματίδια και των τριών οροτύπων των πολιοϊών (Sabin et al., 1960).

1.9.1 IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine)

Το IPV παράγεται από αδρανοποίηση με τη χρήση φορμαλδεΰδης και των τριών, άγριου τύπου, στελεχών πολιοϊών. Αρχικά, τα ιϊκά στελέχη Mahoney (πολιοϊός τύπου 1), MEF-1 (πολιοϊός τύπου 2) και Saukett (πολιοϊός τύπου 3) αναπτύσσονται σε κυτταρικές σειρές Vero και στη συνέχεια, οι αντιγονικές τους θέσεις τροποποιούνται με τη χρήση φορμαλδεΰδης. Ωστόσο, παραμένουν λειτουργικές, με αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσίας στον εμβολιασμένο, αποτρέποντας την προσβολή του ΚΝΣ από τον ιό. Είναι αποτελεσματικό, εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Το IPV χορηγείται με ενδομυϊκή ένεση και είναι ασφαλές καθώς δεν περιέχει μολυσματικά στελέχη, γι' αυτό και είναι κατάλληλο για άτομα με ανοσοανεπάρκειες. Παρόλο που επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση, το σημαντικότερο μειονέκτημά του IPV είναι η αδυναμία πρόκλησης ανοσίας στην περιοχή του εντέρου. Κατά συνέπεια, δεν παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός του για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα στην περιοχή αυτή, και αυξάνεται έτσι η πιθανότητα μετάδοσης του ιού σε μη εμβολιασμένα άτομα μέσω των κοπράνων. Η τιμή του επίσης είναι υψηλή. (Ferguson et al., 1993, Blondel et al.1998)

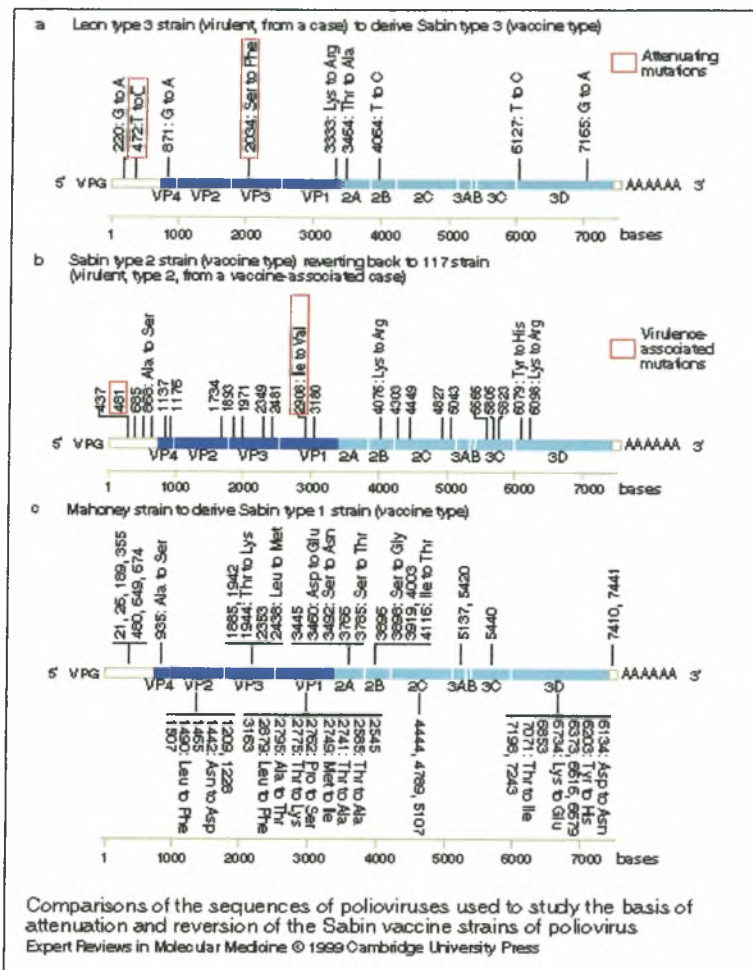
1.9.2 OPV (Oral Poliovirus Vaccine)

Το OPV περιέχει ζωντανά εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών και των τριών οροτύπων. Τα εξασθενημένα εμβολιακά στελέχη που περιλαμβάνονται στο OPV ονομάζονται Sabin 1 (πολιοϊός τύπου 1), Sabin 2 (πολιοϊός τύπου 2), Sabin 3 (πολιοϊός τύπου 3) και στο εμβόλιο βρίσκονται σε αναλογία 10:1:3 αντίστοιχα. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin (P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα αγρίου τυπου νευρομολυσματικά 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 αγρίου τύπου νευρομολυσματικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (F. Friedrich 1996). Αυτά τα αγρίου τύπου στελέχη, ύστερα από αρκετά περάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες συσσωρεύσαν πολλές μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους σε ανθρώπινα κύτταρα, με αποτέλεσμα να χάσουν τον νευρομολυσματικό τους φαινότυπο (Kew et al., 2005, Janeway et al., 2001) (Εικόνα 1.24).



Εικόνα 1.24 : Παραγωγή των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών του OPV (Janeway et al., 2001).

Συγκρίνοντας την αλληλουχία των προτύπων εμβολιακών στελεχών με την αλληλουχία του αντίστοιχου πατρικού στελέχους ή με νευρομολυσματικά στελέχη που έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) μπορεί να εξηγηθεί η μοριακή βάση της εξασθένησης ή της μεταστροφής των εμβολιακών στελεχών. Οι μεταλλάξεις που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξασθένηση ή στη μεταστροφή παρουσιάζονται στην εικόνα 1.25.



Εικόνα 1.25: Μελέτη των μεταλλάξεων στην αλληλουχία των πολιοϊών που ευθύνονται για την εξασθένηση ή τη μολυσματικότητα τους. α) Με κόκκινο πλαίσιο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εξασθένηση του πολιοϊού τύπου 3 (Leon) και την παραγωγή του εμβολιακού στελέχους Sabin 3. β) Με κόκκινο πλαίσιο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την μεταστροφή του εμβολιακού στελέχους Sabin 2 σε παθογόνο. γ) Μεταλλάξεις που οδηγούν στην παραγωγή του εμβολιακού στελέχους Sabin 1 από το στέλεχος Mahoney (Minor et al. 1999).

Το OPV χορηγείται από τα στόμα και κατά την είσοδό του στον οργανισμό πολλαπλασιάζεται στο φάρυγγα, στο γαστρεντερικό σωλήνα και στα λεμφοζύδια του εντέρου, χωρίς ωστόσο να μπορεί να προσβάλλει το ΚΝΣ. Τα στελέχη Sabin πυροδοτούν δύο διαφορετικές ανοσολογικές αποκρίσεις: την χυμική ανοσολογική απόκριση, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον και των τριών οροτύπων του ιού και την επιθηλιακή ανοσολογική απόκριση, η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή ιντερφερόνης και αντισωμάτων IgA, ειδικών για τον ιό, κατά μήκος του επιθηλίου του φάρυγγα και του γαστρεντερικού σωλήνα.

Το OPV είναι ένα αρκετά ασφαλές και φθηνό εμβόλιο το οποίο προκαλεί ισχυρότερη ανοσοποίηση από το IPV εναντίον του ιού και έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει και ανοσοποίηση μη εμβολιασμένων ατόμων μέσω της έκκρισής του στο περιβάλλον από τα ήδη εμβολιασμένα άτομα. Το 1988, το OPV, επιλέχθηκε από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ) για το πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, λόγω της ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης που προκαλεί και λόγω του χαμηλού του κόστους, με θεαματικά αποτελέσματα (Kew et al., 2005).

Ωστόσο, η γενετική αστάθεια του OPV μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση επιδημιών από κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεδεμένα στελέχη πολιοϊών (Circulating Vaccine Derived Poliovirus), στην πρόκληση εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Vaccine associated Paralytic Poliomyelitis) και σε χρόνιες μολύνσεις ατόμων με σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας.

1.9.3 Εμβολιοσυνδεδεμένη Παραλυτική Πολιομυελίτιδα (V.A.P.P)

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα του εξασθενημένου εμβολίου OPV είναι η γενετική του αστάθεια, εξαιτίας της οποίας μπορεί να προκληθεί εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP). Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά τον πολλαπλασιασμό των στελεχών Sabin στο εντερικό επιθήλιο των εμβολιασμένων ατόμων, μπορεί να σημειωθούν γενετικοί ανασυνδυασμοί και σημειακές μεταλλάξεις, σε περιοχές που σχετίζονται με μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε νευρομολυσματικά. Τα συγκεκριμένα στελέχη Sabin είναι ικανά να προκαλέσουν εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) σε άτομα τα οποία εμβολιάστηκαν πρόσφατα με το OPV ή σε άτομα από το οικείο τους περιβάλλον.

Τα ιικά στελέχη που απομονώνονται σε τέτοιες περιπτώσεις ονομάζονται VDPVs (Vaccine Derived Polioviruses) και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Τα VDPV1 στελέχη, τα οποία προέρχονται από άτομα με ανοσοανεπάρκειες και μπορούν να προκαλέσουν παραλυτική νόσο, τα κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεδεμένα στελέχη πολιοϊών cVDPVs, τα οποία έχουν μεγάλη ικανότητα μετάδοσης και πρόκλησης πολιομυελίτιδας, και τα αμφιλεγόμενα στελέχη aVDPVs, τα οποία απομονώνονται είτε από ασθενείς που δεν εμφανίζουν ανοσοανεπάρκειες είτε από το περιβάλλον, χωρίς να είναι γνωστή η προέλευσή τους (CDC, 2006).

Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε νευρομολυσματικά εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές 5'UTR και στη VP1 και για τους τρεις οροτύπους (Georgescu et al.1997, Martin and Minor 2002). Για τα Sabin 1 στελέχη, οι καθοριστές εξασθένησης βρίσκονται στα νουκλεοτίδια: 480, 935, 2438, 2795 και 2879, ενώ οι καθοριστές θερμοευαισθησίας, δηλαδή της ικανότητας του ιού να πολλαπλασιάζεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τη βέλτιστη, βρίσκονται στα νουκλεοτίδια 6203 και 7441. Στα στελέχη Sabin 2 και Sabin 3 οι καθοριστές εξασθένησης βρίσκονται στα νουκλεοτίδια: 481, 2908 και 472, και 2034,2493 αντίστοιχα (Bouchard et al., 1995). Τα περισσότερα στελέχη που έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις VAPP προέρχονται από τα στελέχη PV-2/Sabin και PV-3/Sabin . Προφανώς αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για την εξασθένηση των στελεχών PV-1/Sabin απαιτείται πολύ μεγαλύτερος αριθμός μεταλλάξεων συγκριτικά με τα άλλα δυο στελέχη.

Ο ανασυνδυασμός είναι επίσης συχνό φαινόμενο σε άτομα εμβολιασμένα με OPV, χωρίς αυτό να οδηγεί απαραίτητα σε VAPP. Το γεγονός ότι το OPV περιέχει σε εξασθενημένη μορφή στελέχη και των τριών οροτύπων πολιοϊών προσφέρει τις κατάλληλες συνθήκες για διατυπικό ανασυνδυασμό μεταξύ των εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3. Επίσης η ταυτόχρονη μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου από τα στελέχη Sabin 1, 2 και 3 καθώς και η ύπαρξη μικτών συμπλόκων αντιγραφή, τα οποία εντοπίζονται σε λίγες θέσεις στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων, είναι γεγονότα που αυξάνουν την πιθανότητα διατυπικού ανασυνδυασμού μεταξύ των εμβολιακών στελεχών (Egger & Bienz, 2002).

Ο ανασυνδυασμός μπορεί να συμβεί i) μεταξύ εμβολιακών στελεχών πολιοϊών, ii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών και πολιοϊών αγρίου τύπου και iii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών πολιοϊών και άλλων εντεροϊών και έχει προταθεί ότι προσδίδει πλεονεκτήματα στον πολλαπλασιασμό των στελεχών. (Friedrich 2000).

Ανασυνδυασμένα εμβολιακά στελέχη έχουν απομονωθεί τόσο από υγιείς εμβολιασμένους όσο και από ασθενείς με V.A.P.P. Ο διατυπικός ανασυνδυασμός παρατηρείται κυρίως στη μη δομική περιοχή του γονιδιώματος των εμβολιακών στελεχών και συγκεκριμένα στις περιοχές 2C και 3D (Guillot et al 2000, Georgoroulou & Markoulatos, 2000, Cuervo et al., 2001), με εξαίρεση κάποιες σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες έχουν παρατηρηθεί διατυπικοί ανασυνδυασμοί στο τέλος της P1 περιοχής που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του καψιδίου (Blomqvist et al.2003, Cherkasova et al 2002, Martin et al 2002). Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη μεγαλύτερης ποικιλομορφίας στη δομική περιοχή του γονιδιώματος μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών. Επιπλέον, η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων του καψιδίου εξαρτώνται από τη διατηρημένη αλληλουχία των προδρόμων τους. Συνεπώς, ο ανασυνδυασμός ευνοείται στις περιοχές P2 και P3 οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας (Rohit Duggal and Eckard Wimmer 1999) Στη 2C γενωμική περιοχή έχουν παρατηρηθεί, σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα, ανασυνδυασμοί τύπου Sabin 3/Sabin 2, ενώ στην 3D συναντώνται με πολύ μεγάλη συχνότητα ανασυνδυασμοί τύπου Sabin 2/Sabin X (X: Sabin 1 ή Sabin 3) (Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006; Paximadi et al., 2007).

1.10 Μηχανισμοί εξέλιξης των πολιοϊών

Οι πολιοϊοί συγκαταλέγονται στους περισσότερο ταχέως εξελισσόμενους ιούς. Χαρακτηριστικά, ο όρος *quasispecies* (σχεδόν είδη), αναφέρεται στους ταχέως εξελισσόμενους πληθυσμούς πολιοϊών. Μέσα σε ένα πληθυσμό πολιοϊών δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος γονότυπος, αλλά πολλοί διαφορετικοί, σχεδόν παρόμοιοι γονότυποι που συνεισφέρουν εξίσου στα χαρακτηριστικά του πληθυσμού. Επομένως στους πολιοϊούς το αντικείμενο εξελικτικής πίεσης είναι ο ιϊκός πληθυσμός και όχι το ιϊκό στέλεχος. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη των πολιοϊών είναι οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και οι γενετικοί ανασυνδυασμοί (Holland et al., 1992, E. Domingo and J. J Holland 1997).

1.10.1 Μεταλλάξεις στους πολιοϊούς

Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων (6.3×10^{-4} μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στους πολιοϊούς το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των λυτικών RNA ιών (Wimmer et al. 1993). Οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λάθους της ιϊκής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και την έλλειψη επιδιορθωτικής ικανότητας της, η οποία υπολογίζεται ότι ενσωματώνει $4,5 \times 10^{-4}$ νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής, δηλαδή 1 λάθος νουκλεοτίδιο ανά 2222 βάσεις, λόγω της απουσίας μηχανισμών ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής (μηχανισμός proof-reading) και επιδιόρθωσης (Ward et al., 1992, Rodriguez-Wells et al., 2001). Αυτό έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των πολιοϊών ώστε να έχουν μικρό γένωμα και να αντιγράφονται κοντά στο όριο της καταστροφής λόγω πολλών μεταλλάξεων. Υπάρχουν ως πληθυσμοί πολλών διαφορετικών γενοτύπων και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως 'quasi-species' (περίπου είδη). Ένα άγριο στέλεχος ορίζεται σαν quasi-species όταν ο πληθυσμός του δεν έχει μια μοναδική αλληλουχία αλλά έχει μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo et al., 1985). Αυτή η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους πολιοϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον.

Υπάρχουν κυρίως δυο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων και επομένως των quasi-species, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή. Το πρώτο βήμα για την καθιέρωση των μεταλλάξεων στους πληθυσμούς των πολιοϊών γίνεται στα λεμφοζύδια του εντέρου όπου συμβαίνει ο ιϊκός πολλαπλασιασμός. Εκεί, σε μικρού μεγέθους ιϊκούς πληθυσμούς καθιερώνονται είτε ουδέτερες είτε μη ευνοϊκές μεταλλάξεις. Κάποιες από τις μη ευνοϊκές μεταλλάξεις εξαλείφονται είτε από τη δράση της αρνητικής επιλογής, είτε μέσω ανασυνδυασμού. Στη συνέχεια η δράση της θετικής επιλογής σε κάποια στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις οι οποίες τους προσδίδουν μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα μπορεί να οδηγήσει είτε σε V.A.P.P (OPV στελέχη) είτε σε παραλυτική πολιομυελίτιδα (άγριου τύπου στελέχη) (Gavrilin et al., 2000).

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των πολιοϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιϊκού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται στις περιοχές οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό του ιϊκού καψιδίου και δέχονται αντιγονική πίεση. Από τις δομικές πρωτεΐνες η VP1 συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις πιθανόν γιατί συμμετέχει στη δημιουργία των περισσότερων αντιγονικών θέσεων, γι' αυτό δέχεται την μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή, με αποτέλεσμα την τάση δημιουργίας ποικιλόμορφων οροτύπων και την ικανότητα του ιού να διαφύγει την αναγνώριση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών. Η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων. Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι

αυτές δεν είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου αλλά στο εσωτερικό της αύλακας (canyon) που αποκλείει την αναγνώριση της περιοχής από αντισώματα και συνεπώς διαφεύγουν την αντιγονική πίεση.

Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι επίσης η 5'UTR περιοχή με εξαίρεση τα cis δραστικά γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, cloverleaf και CRE, και στην ιική μετάφραση, IRES . 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 δευτεροταγούς δομής τους (Georgescu et al 1997, Friedrich 2000, Martin and Minor 2002).

Η αλληλουχία, που κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες φαίνεται να είναι πιο συντηρημένη (Muir et al., 1998). Μελέτες που έχουν γίνει και σε άλλους εντεροϊούς οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδιώμά τους αποτελεί μια συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα απ' αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα (μονάδα εξέλιξης), δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα (Lukashen et al., 2003).

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).

1.10.2 Μηχανισμοί ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς

Ο ανασυνδυασμοί μαζί με τις μεταλλάξεις κατευθύνουν την εξέλιξη των ιών. Ο γενετικός ανασυνδυασμός όμως, αποτελεί ένα πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης από τις μεταλλάξεις, γιατί μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός (Guillot et al., 2000). Οι πολιοϊοί ήταν οι πρώτοι RNA ιοί στους οποίους παρατηρήθηκε ανταλλαγή γενετικού υλικού (Hirst G., 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 ιικών γενωμάτων υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού (Rohit Duggal et al. 1997).

Ο ευκολότερος τρόπος να παρατηρηθεί κάποιος RNA ανασυνδυασμός είναι η μόλυνση ενός κυττάρου με δύο συγγενικούς ιούς, οι οποίοι φέρουν διαφορετικούς δείκτες, έτσι ώστε ο πολλαπλασιασμός τους να είναι δυνατός μόνο στην περίπτωση που γίνει ανταλλαγή των ιικών γονιδιωμάτων (Lai MMC., 1992).

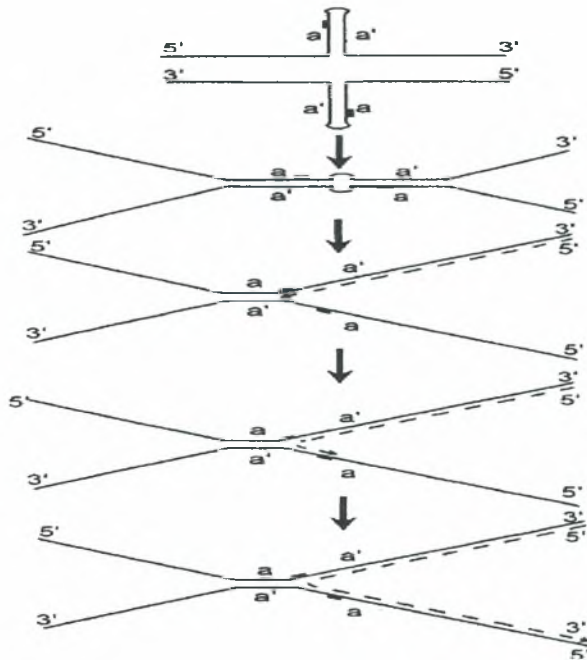
Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA γενωμάτων των πολιοϊών λαμβάνει χώρα σε κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί ταυτόχρονα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου

(homotypic) είτε διαφορετικών οροτύπων (heterotypic). (ενδότυπο ανασυνδυασμό - διάτυπο ανασυνδυασμό.)

Σε πολλά κλινικά δείγματα έχουν εντοπισθεί ανασυνδυασμένοι πολιοϊοί. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα στελέχη αυτά προέρχονταν από στελέχη του εμβολίου OPV. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ύπαρξη και των τριών οροτύπων (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) στο OPV, με αποτέλεσμα να ευνοείται η ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου από διάφορους συνδυασμούς οροτύπων (Furione et al., 1993). Έχουν απομονωθεί στελέχη Sabin ανασυνδυασμένα από υγιή άτομα που είχαν εμβολιαστεί με το OPV (Gammack et al., 1989, Blomqvist et al., 2003, Karakasiliotis et al., 2004) καθώς επίσης και από περιπτώσεις ασθενών με VAPP (Guillot et al., 2000).

Έχουν προταθεί 2 μηχανισμοί γενετικού ανασυνδυασμού : i) ο αντιγραφικός μηχανισμός ή μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard & Baltimore 1986) και ii) ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl et al., 1999).

Μηχανισμός αλλαγής μήτρας: Κατά την ιική αντιγραφή, η ιική πολυμεράση 3D χρησιμοποιεί σαν καλούπι για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας, τον θετικό κλώνο του ιού επάγοντας τη δημιουργία με αυτόν τον τρόπο ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστού ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου η ιική πολυμεράση δύναται να συναντήσει κάποιο «εμπόδιο», με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της ίδιας, καθώς και του νεοσυντιθέμενου αρνητικού RNA κλώνου, από τον θετικής πολικότητας κλώνο που χρησιμοποιείται σαν καλούπι (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Έχει προταθεί ότι το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια σταθερή δευτεροταγής RNA δομή (Romanova et al., 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο (Pilibenko et al., 1995). Η αποδέσμευση της ιικής πολυμεράσης σε σύμπλοκο με τον νεοσυντιθέμενο αρνητικό κλώνο οδηγεί στην δέσμευσή της ιικής πολυμεράσης, καθώς και του ημιτελούς αρνητικού κλώνου, σε περιοχή υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού κλώνου θετικής πολικότητας που θα λειτουργήσει τώρα σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Αν η μετάβαση από τον ένα κλώνο στον άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδυασμός είναι *ομόλογος* αν όμως δεν είναι ακριβής ο ανασυνδυασμός είναι *μη ομόλογος* και έχει αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των νέων στελεχών (Kirkegaard k. And Baltimore D. 1986). Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς (**Εικόνα 1.26**) (Romanova et al., 1986, King et al., 1988).



Εικόνα 1.26: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας κατά τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων

Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης: Ο μηχανισμός αυτός είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση των δύο ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός, με το 3' άκρο του άλλου μορίου. Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι χημικοί μηχανισμοί για το συγκεκριμένο τύπο αναδιάταξης. Σύμφωνα με τον πρώτο, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των δύο διαφορετικών μορίων δέχονται επίθεση από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο H_2O με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Στο δεύτερο χημικό μηχανισμό, ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός σε κάθε ανασυνδυαζόμενο μόριο δέχεται επίθεση από το παρακείμενο 2' OH, το οποίο παίζει το ρόλο του εσωτερικού νουκλεόφιλου. Το αποτέλεσμα σε κάθε μόριο είναι η παραγωγή ενός άκρου που περιέχει ένα κυκλικό 2', 3' φωσφορικό ενδιάμεσο και ενός 5' άκρου που φέρει OH. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω αντίδρασης τρανσεστεροποίησης (Gmyl et al., 1999).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η συσχέτιση των ανασυνδυασμών και των μεταλλάξεων που βρίσκονται σε εμβολιακά στελέχη πολιοϊών, με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ίική απομόνωση

Η ιική απομόνωση πραγματοποιήθηκε από δείγματα κοπράνων κατά τη διάρκεια 1978-1985 από ασθενείς με VAPP και υγιείς εμβολιασμένους σε κύτταρα Hep-2 και ανακαλλιεργήθηκαν για τον σκοπό της παρούσας μελέτης σε Hep-2 κυτταρική σειρά. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με ορο-εξουδετέρωση με πολυκλωνικά αντισώματα (National Institute for Public Health and Environment, RIVM, The Netherlands), σύμφωνα με τις εσώκλειστες οδηγίες. Για να αποφευχθεί η δημιουργία μειγμάτων των ικών στελεχών, πραγματοποιήθηκαν υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις. Η τελευταία αραιώση που παρουσίασε ολοκληρωτική κυτταροπαθογόνο δράση (CPE), περάστηκε μια ακόμα φορά σε κύτταρα Hep-2, και ο ορότυπος επανελέγχθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, 2, 3) που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή τη μελέτη παραχωρήθηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO).

2.2 Προσδιορισμός γενοτύπου και ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων OPV-παραγόμενων στελεχών

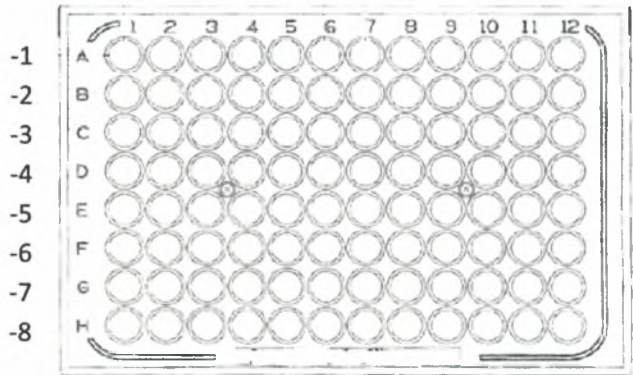
Για την ταυτοποίηση των ικών στελεχών και για τον προσδιορισμό του γενοτύπου των OPV-παραγόμενων στελεχών στην 5-UTR γενωμική περιοχή, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG52/UC53 (Georgoroulou et al., 2000). Προσδιορίστηκε επίσης ο γενότυπος των OPV-παραγόμενων στελεχών στην VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης ήταν το UG1/222 (Balanant et al., 1991, Mulders et al., 1999) για το πρώτο μισό του VP1 γονιδίου και ορο-ειδικά ζεύγη εκκινητών S₁37/S₂688, S₂30/S₂688 and S₃26/S₃651 για Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 στελέχη, αντιστοίχως, για το δεύτερο μισό του VP1 γονιδίου [Dedepsideis et al., 2006]. Η αναγνώριση των θέσεων ανασυνδυασμού των 580, IF, ID, 730, 744 και 8029 OPV-παραγόμενων στελεχών και η αλληλούχηση των περιοχών 2C-3D πραγματοποιήθηκε προηγουμένως από την ομάδα μας. (Karakasiliotis et al., 2004, Paximadi et al., 2006).

2.3 RCT test

Η αναπαραγωγική ικανότητα σε διαφορετικές θερμοκρασίες αξιολογήθηκε από μια δοκιμή γνωστή ως RCT (Reproductive Capacity at different Temperatures). Η τιμή RCT ορίζεται ως η διαφορά, μετά από επώαση 5 ημερών, ανάμεσα στο log₁₀ του ιικού τίτλου που εκφράζεται σε TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) ανά ml, στην ευνοϊκή (37°C) και στη μη ευνοϊκή θερμοκρασία (40°C) για την ιική αναπαραγωγή. Ο προσδιορισμός του ιικού τίτλου έγινε σε Hep-2 κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (Εικόνα 2.1). Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπολογίστηκε ο τίτλος δύο διαφορετικών ικών στελεχών.

Αρχικά μεταφέρθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10000 κύτταρα) ανά θέση στην πλάκα μικροτιτλοποίησης. Για κάθε ιικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την

αραίωση 10^{-7} . Κατόπιν 100μl από κάθε αραίωση μεταφέρθηκαν σε τέσσερις θέσεις σε κάθε μια από τις δυο πλάκες. Η μια πλάκα επώαστηκε στους 37°C και η δεύτερη στους 40°C. Μετά από επώαση 5 ημερών καθορίστηκε ο τίτλος για κάθε δείγμα (Nakano et al. 1978) εκφραζόμενος σε \log_{10} 50% TCID₅₀ (tissue culture infective dose units)ανά ml. Τα ιικά στελέχη θεωρούνται θερμοευαίσθητα (temperature sensitive, ts) όταν η τιμή RCT (διαφορά ανάμεσα στους 37 °C και 40°C) είναι μεγαλύτερη ή ίση με 2.00 και θερμο-ανθεκτικά (non ts) όταν η τιμή RCT είναι μικρότερη του 2.00.



Εικόνα 2.1: Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων

2.4 Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου (One-step growth curves)

Οι καμπύλες ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα Hep-2 στους 37°C και 40°C, μετά από μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) όπως προσδιορίστηκε μετά από τιτλοποίηση των ιικών δειγμάτων σε Hep-2 κύτταρα (Malnou et al 2002).

Συνοπτικά, κάθε δείγμα ενοφθαλμίστηκε σε πέντε θέσεις(replica wells) σε δύο πλάκες μικροτιτλοποίησης (96-well plates). Αφού οι πλάκες ανακινήθηκαν για δυο ώρες στους 37°C, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν προσεκτικά δύο φορές, κάθε φορά με 300 μl Eagle MEM για να απομακρυνθούν τα ιικά σωματίδια που δεν προσδέθηκαν στα κύτταρα. Σε κάθε θέση προστέθηκε 0.1-ml Eagle MEM και οι πλάκες επώαστηκαν η μία στους 37°C και η δεύτερη στους 40°C για 0, 2, 4, 6, 8, 10 και 12 ώρες. Οι πλάκες υποβλήθηκαν σε τρεις συνεχείς κύκλους ψύξης-απόψυξης και ο ιικός τίτλος του υπερκειμένου προσδιορίστηκε με τη δοκιμή TCID₅₀ σε Hep-2 κύτταρα στους 37°C για κάθε μια από τις προαναφερθείσες ώρες μετά τη μόλυνση.

2.4 Ανάλυση με προγράμματα βιοπληροφορικής

Για την ομοπαράθεση των αλληλουχιών(νουκλεοτιδικών και αμινοξικών) των γενομικών περιοχών 5'-UTR, VP1, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D όλων των ιικών δειγμάτων με αυτές των προτύπων στελεχών Sabin που παραθέτονται στην GenBank (Sabin type 1: AY184219, Sabin type 2: AY184220 and Sabin type 3: AY184221) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalW. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των γενωμικών περιοχών VP1, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D όλων των ιικών στελεχών προέκυψαν από τη χρήση του προγράμματος Gene-Runner V 3.05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενότυποι και τύποι ανασυνδυασμού των OPV-στελεχών

Οι γενότυποι των ιικών δειγμάτων στην 5'-UTR και VP1 ταυτοποιήθηκαν ως: Sabin 1, ένα στέλεχος, ως Sabin 2, τέσσερα στελέχη και ως Sabin 3, τρία στελέχη. Από τα οκτώ στελέχη, στα δύο (II και 17) δεν υπάρχει ανασυνδυασμός ενώ τα υπόλοιπα (580, IF, ID, 730, 744, 8029) παρουσιάζουν απλό ανασυνδυασμό.

Ο τύπος ανασυνδυασμού των στελεχών 580, IF, ID και 730 είναι S2/S1 και η περιοχή ανασυνδυασμού των στελεχών IF και 730 βρίσκεται στην 3D περιοχή, του στελέχους ID στην 3C περιοχή και του στελέχους 580 στην 3A περιοχή. Τα δείγματα 744 και 8029 έχουν ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 και S3/S1 αντιστοίχως και η περιοχή ανασυνδυασμού βρίσκεται στην 2C περιοχή (Πίνακας 3.1).

Ιικό στέλεχος	5'-NTR γενότυπος	VP1 γενότυπος	Περιοχή ανασυνδυασμού	Τύπος ανασυνδυασμού	Θέση ανασυνδυασμού	Προέλευση
II	S1	S1	-	Μη ανασυνδυασμένο	-	-
580	S2	S2	3A	S2/S1	5314-5318/S2 ^a	Paximadi et al. 2006
IF	S2	S2	3D	S2/S1	6247-6281/S2	Karakasiliotis et al. 2004
ID	S2	S2	3C	S2/S1	5521-5526/S2	Karakasiliotis et al. 2004
730	S2	S2	3D	S2/S1	6337-6362/S2	Paximadi et al. 2006
744	S3	S3	2C	S3/S2	4892-4914/S3	Paximadi et al. 2006
8029	S3	S3	2C	S3/S1	4880-4887/S3	Paximadi et al. 2006
17	S3	S3	-	Μη ανασυνδυασμένο	-	-

^a Αρίθμηση σύμφωνα με τα Sabin 2 (AY184220) ή Sabin 3 (AY184221) εμβολιακά στελέχη.

Πίνακας 3.1: Τύπος και θέσεις ανασυνδυασμού των OPV στελεχών

3.2 Θερμοευαισθησία των OPV-στελεχών

Η δοκιμή Rct βασίζεται στη σύγκριση του πολλαπλασιασμού των θερμο-ευαίσθητων Sabin στελεχών πολιοϊών και των προς ανάλυση ιικών στελεχών. Το μη ανασυνδυασμένο Sabin1-στέλεχος II εμφάνισε μερική αναστροφή σε μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με μια RCT τιμή 2,0 μονάδων. Τρία από τα ανασυνδυασμένα Sabin2-στελέχη 580, IF και ID (S2/S1) παρουσίασαν έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με τιμές RCT να κυμαίνονται από 0,0 έως 0,75 μονάδες ενώ το στέλεχος 730 (S2/S1) παρουσίασε μερική αναστροφή σε μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με τιμή RCT 1,75 μονάδες. Και τα δυο ανασυνδυασμένα Sabin3-στελέχη, 744(S3/S2) και 8029(S3/S1), παρουσίασαν μερική αναστροφή σε μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με τιμές RCT 1,0 και 1,5 μονάδες αντίστοιχα. Το μη ανασυνδυασμένο Sabin3-στέλεχος 17 εμφάνισε θερμοευαίσθητο φαινότυπο με τιμή RCT 3,5 μονάδες.

Τα Sabin εμβολιακά στελέχη (Sabin1, Sabin2, Sabin3) παρουσίασαν, όπως ήταν αναμενόμενο, RCT τιμές μεγαλύτερες ή ίσες των 2.00 μονάδων (Πίνακας 3.2) .

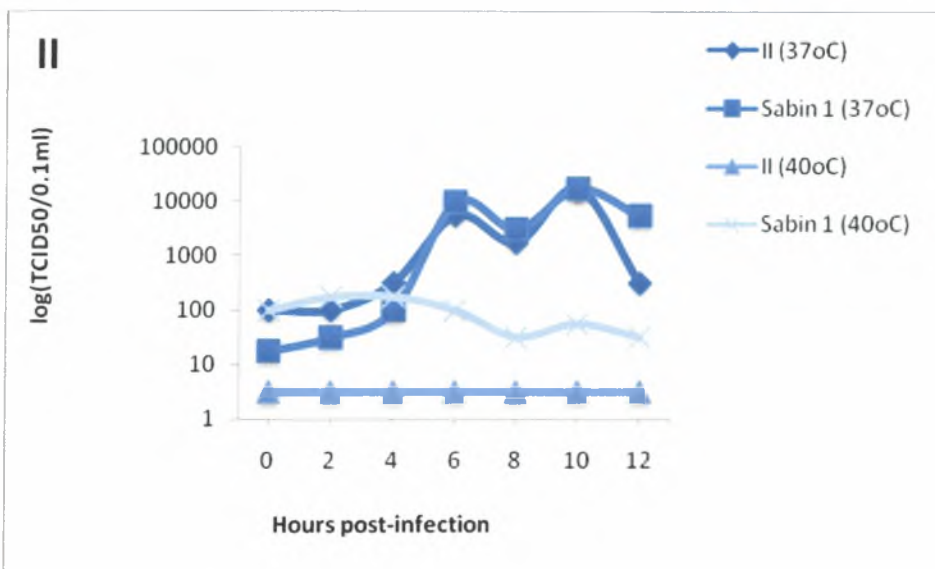
Γικό στέλεχος	Τίτλος (log TCID ₅₀ /0.1ml)		Rct (Δ log TCID ₅₀ /0.1ml)
	37°C	40°C	
II	3,5	1,5	2,0
580	4,5	3,75	0,75
IF	3,25	3,25	0,0
ID	3,5	3,5	0,0
730	3,5	1,75	1,75
744	4,25	3,25	1,0
8029	4,0	2,5	1,5
17	5,0	1,5	3,5
Sabin 1	6,0	2,5	3,5
Sabin 2	5,0	2,0	3,0
Sabin 3	6,0	2,5	3,5

Πίνακας 3.2: Αναπαραγωγική ικανότητα των OPV-παραγόμενων στελεχών και των Sabin εμβολιακών στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Rct marker).

3.3 Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου

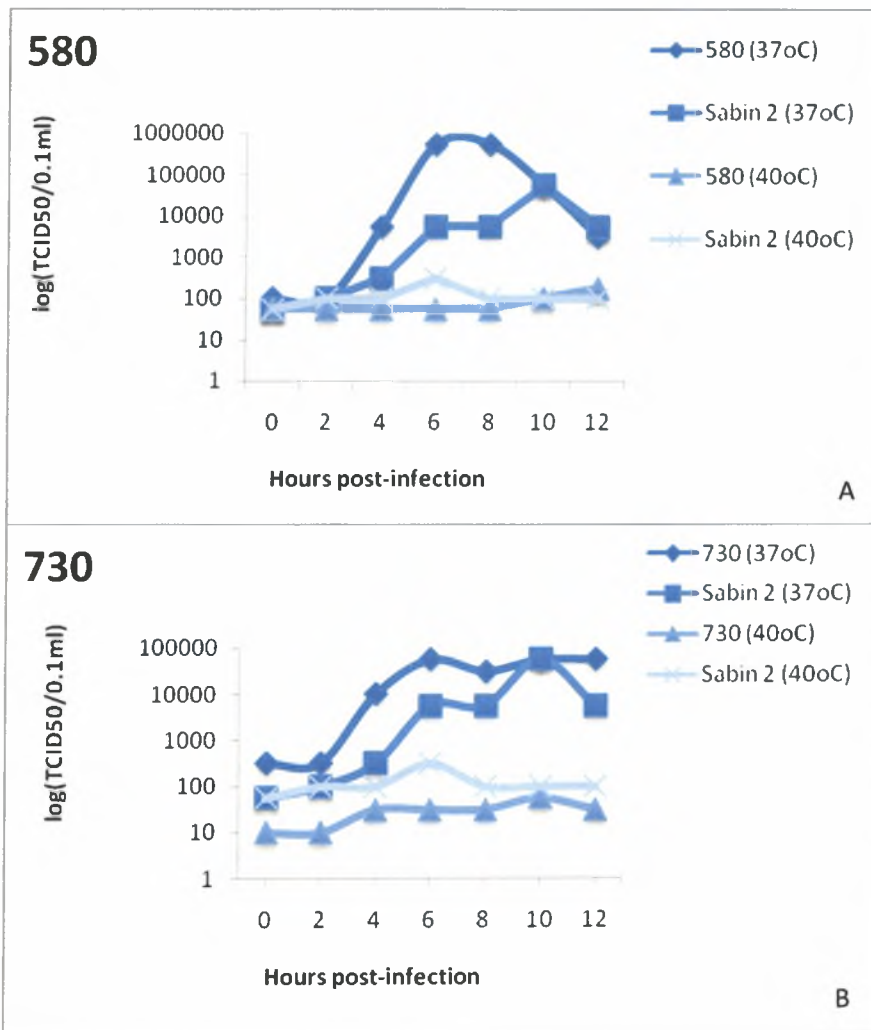
Για να ελέγξουμε αν ο θερμοευαίσθητος φαινότυπος, όπως προσδιορίστηκε από τη δοκιμή RCT, είναι ενδεικτικός αναπτυξιακών ελαττωμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου για κάθε δείγμα. Έγινε σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης και του ιϊκού φορτίου στους 37°C και 40°C κάθε δείγματος με αυτά των αντιστοίχων γενοτύπων των εμβολιακών Sabin στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 ή Sabin 3) σε πειράματα καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου σε Hep-2 cells.

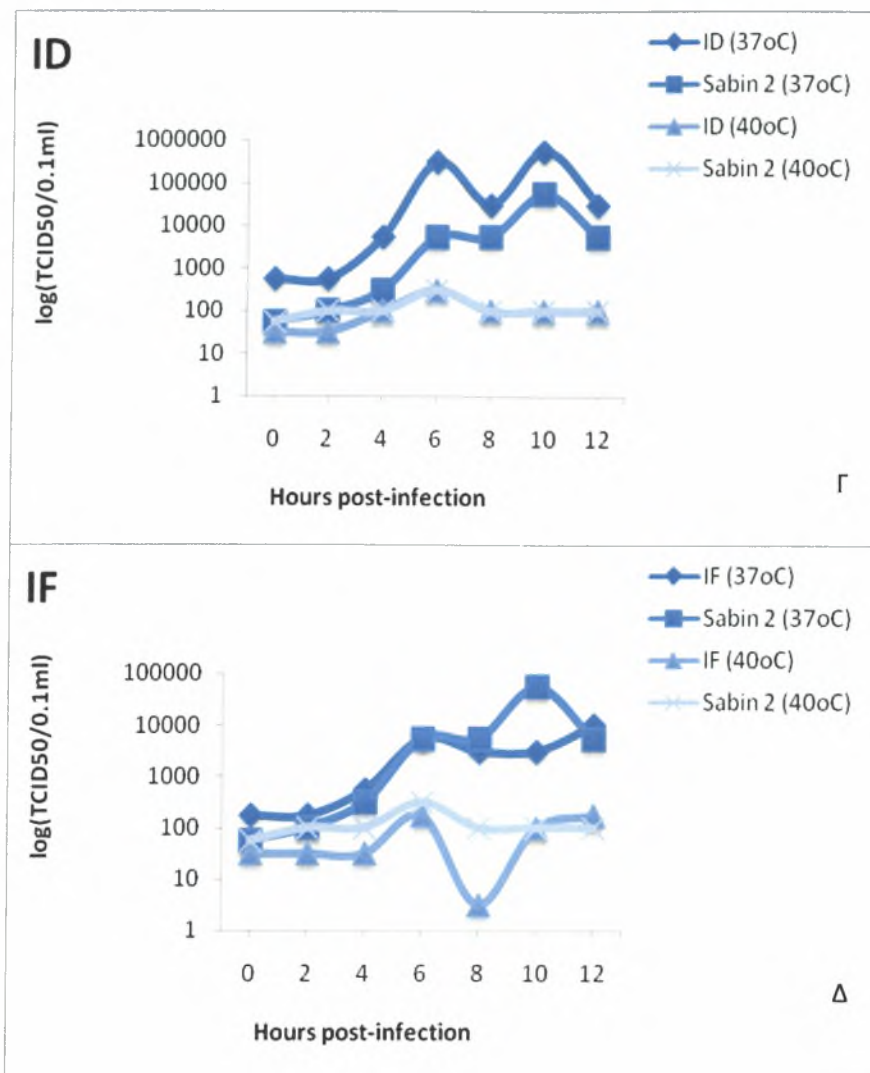
Το μη ανασυνδυασμένο στέλεχος II αντιγράφεται με κινητική όμοια με αυτή του προγόνου του Sabin 1 εμβολιακού στελεχούς. Στους 37°C, το II έδειξε μια πρώτη κορυφή 6 ώρες μετά τη μόλυνση και έφτασε στον μέγιστο τίτλο 10 ώρες μετά τη μόλυνση. Στους 40°C, η ανάπτυξή του εμποδίστηκε εντελώς. (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου του στελεχούς II Sabin1 γενοτύπου σε σύγκριση με το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος σε Hep2 κύτταρα. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με 10 MOI και επώαστηκαν στους 37°C και 40°C. Η συνολική ιική παραγωγή σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0-12 hours) μετά την μόλυνση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο τιτλοποίησης TCID₅₀ σε Hep2 κύτταρα.

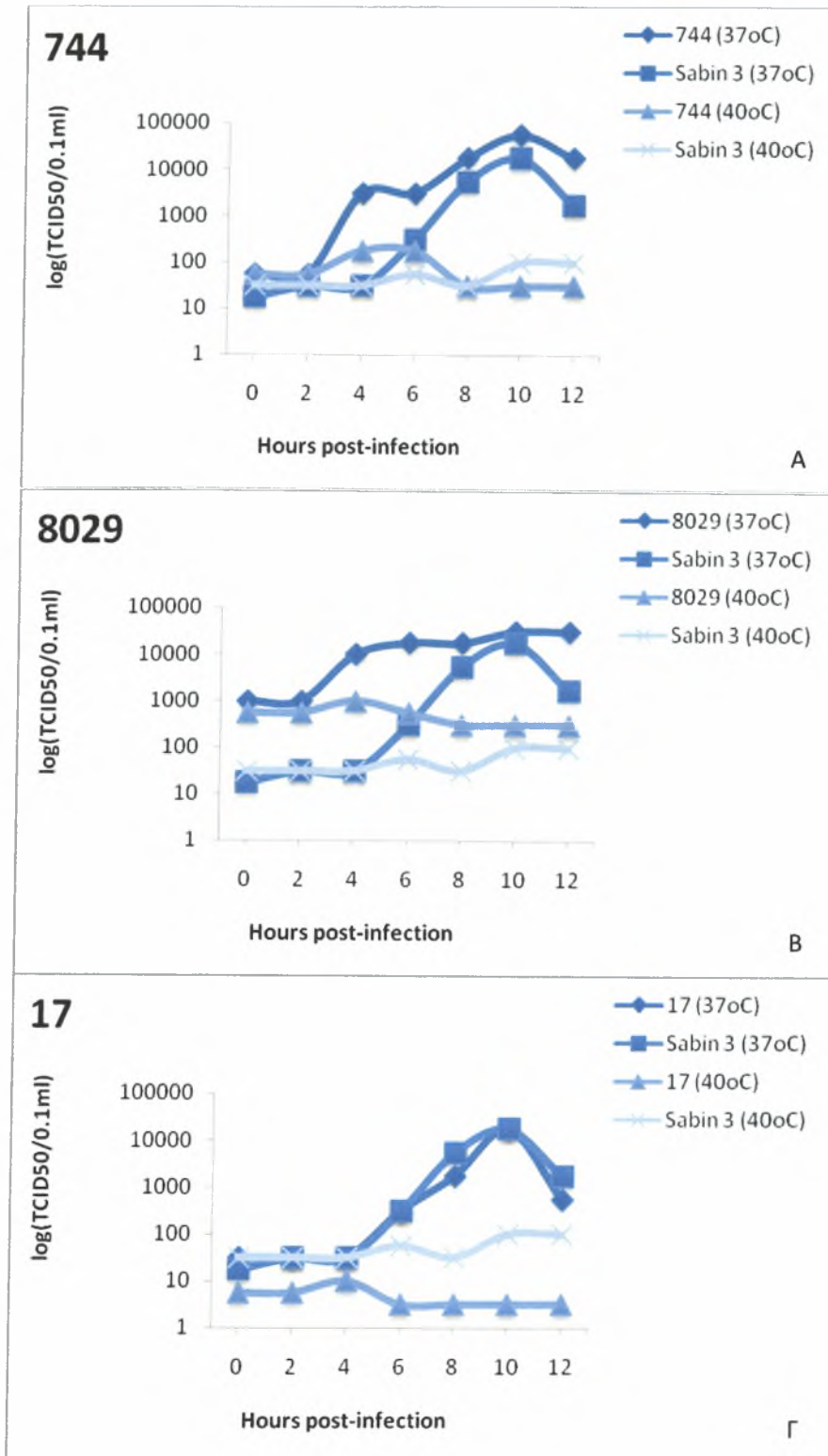
Στους 37°C, τα στελέχη Sabin 2 γενοτύπου (580, IF, ID, 730) παρουσίασαν διαφορετική κινητική ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, το 580 (Εικόνα 3.2.Α) and 730 (Εικόνα 3.2.Β) στελέχη έφτασαν σε μέγιστο τίτλο νωρίτερα (6 ώρες μετά τη μόλυνση) σε σχέση με το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος (10 ώρες μετά τη μόλυνση). Επιπλέον, παρουσίασαν 2-3 log₁₀ μονάδες υψηλότερο ιϊκό φορτίο από το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος σε 4, 6 και 8 ώρες μετά τη μόλυνση ενώ τα στελέχη ID (Εικόνα 3.2.Γ) και IF (Εικόνα 3.2.Δ) εμφάνισαν όμοια κινητική ανάπτυξης με το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος. Εντούτοις, το στέλεχος ID εμφάνισε υψηλότερο ιϊκό φορτίο σε σύγκριση με το αντίστοιχο πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin (Sabin 2) σε κάθε χρονικό σημείο μετά τη μόλυνση. Στους 40°C, η ανάπτυξη των 580, IF, ID και 730 εμποδίστηκε εντελώς όπως το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος.





Εικόνα 3.2 Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου των στελεχών Sabin 2 γενοτύπου, 580 (α), 730 (β), ID (γ) και IF (δ) σε σύγκριση με το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος σε Hep2 κύτταρα. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με 10 MOI και επώαστηκαν στους 37°C και 40°C. Η συνολική ιική παραγωγή σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0-12 hours) μετά την μόλυνση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο τιτλοποίησης TCID₅₀ σε Hep2 κύτταρα

Στους 37°C, τα στελέχη Sabin 3 γενοτύπου (744, 8029, και 17) εμφάνισαν διαφορετική κινητική ανάπτυξης, όμοια με την κινητική του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους, φτάνοντας τον μέγιστο τίτλο 10 ώρες μετά τη μόλυνση. Εντούτοις, το στέλεχος 744 παρουσίασε 2-3 log₁₀ μονάδες υψηλότερο ιικό φορτίο στις 4 έως 6 ώρες μετά τη μόλυνση και 2 log₁₀ μονάδες υψηλότερο τελικό φορτίο σε σχέση με το Sabin 3 εμβολιακό στέλεχος (Εικόνα 3.3.A). Επίσης, το στέλεχος 8029 εμφάνισε αυξημένη συγκέντρωση σε αρχικά χρονικά σημεία (Εικόνα 3.3.B), και αύξηση του τίτλου κατά 2-3 log₁₀ μονάδες σε σύγκριση με τον πρόγονό του στις 2, 4 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Αντίθετα, το μη ανασυνδυασμένο στέλεχος 17 αντιγράφηκε όπως ο πρόγονός του (Εικόνα 3.3.Γ), εμφανίζοντας τον ίδιο τίτλο σε κάθε χρονικό σημείο μετά τη μόλυνση. Στους 40°C, η ανάπτυξη και των τριών στελεχών (744, 8029, και 17) εμποδίστηκε εντελώς όπως επίσης και του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους.

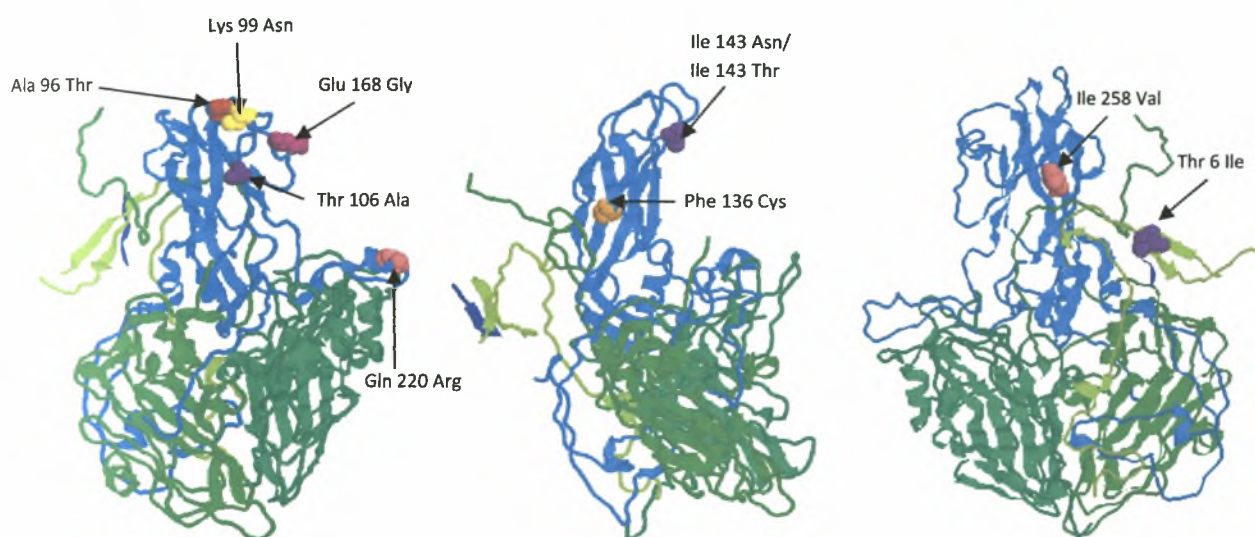


Εικόνα 3.3. Ανάλυση καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου των στελεχών Sabin 3 γενοτύπου, 744 (α), 8029 (β) και 17 (γ), σε σύγκριση με το Sabin 3 εμβολιακό στέλεχος σε Hep2 κύτταρα. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με 10 MOI και επωάστηκαν στους 37°C και 40°C. Η συνολική ιική παραγωγή σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0-12 hours) μετά την μόλυνση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο τιτλοποίησης TCID₅₀ σε Hep2 κύτταρα

3.4 Ανάλυση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Σε μία προσπάθεια συσχέτισης των φαινοτυπικών δεικτών των στελεχών με κάποιους μοριακούς δείκτες, ερευνήσαμε τις νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις στο γένωμα των στελεχών οι οποίες εμπλέκονται στον εξασθενημένο και θερμοευαίσθητο φαινότυπο των Sabin εμβολιακών στελεχών.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των 5'-NTR, VP1, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D γενωμικών περιοχών ερευνήθηκε με σκοπό να επαληθευτούν οι αντίστοιχες προβλεπόμενες αμινοξικές αλληλουχίες. Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στη VP1 περιοχή, απεικονίστηκαν πάνω στην τρισδιάστατη δομή του πρωτομερούς ((**Εικόνα 3.4**))



Εικόνα 3.4 : Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στη VP1 περιοχή των α) S1 παραγώγων, β) S2 παραγώγων, γ) S3 παραγώγων.

Οι πίνακες 3.3 και 3. 4 δείχνουν τις διαφορές στην αλληλουχία σε σχέση με τα Sabin εμβολιακά στελέχη. Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την απώλεια του φαινοτύπου εξασθένησης και θερμοευαίσθησίας των Sabin εμβολιακών στελεχών έχουν ταυτοποιηθεί στο γονιδίωμα όλων των στελεχών.

Προέλευση	Περιοχή	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin στέλεχος	OPV- παραγόμενο στέλεχος	Αμινοξική θέση	Sabin	Isolate	Accession numbers
Sabin 1	5'-NTR	II	525	T	C				EU598476
			583	C	G				
Sabin 2		580	398	T	C				EU598464
			437	T	C				
			481	A	G				
			584	C	G				
			576	C	T				
		IF	398	T	C				FJ609757
			481	A	G				
			584	C	G				
		ID	481	A	G				FJ609758
			567	T	A				
		730	481	A	G				EU598465
			597	T	A				
			584	C	G				
Sabin 3		744	472	T	C				EU598466
			586	C	G				
		8029	472	T	C				EU598468
			586	C	G				
		17	248	G	A				EU598477
			472	T	C				
			586	C	G				
Sabin 1	VP1	II	2605	G	A				FJ609769
			2765	G	A	96	Ala	Thr	
			2776	G	T	99	Lys	Asn	
			2795	A	G	106	Thr	Ala	
			2917	C	T	-			
			2982	A	G	168	Glu	Gly	
3138	A	G	220	Gln	Arg				
Sabin 2		580	2909	T	A	143	Ile	Asn	EU598478
			3252	C	T	-			
		IF	-	-	-	-	-	-	FJ609772
			-	-	-	-	-	-	
		ID	-	-	-	-	-	-	FJ609773
			-	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	-	
		730	2859	A	G	-			EU598479
			2888	T	G	136	Phe	Cys	
			2909	T	C	143	Ile	Thr	
Sabin 3		744	2493	C	T	6	Thr	Ile	FJ609775
			2608	A	G	-			
			3259	A	G	-			
		8029	2493	C	T	6	Thr	Ile	EU598480
			3248	A	G	258	Ile	Val	
			3352	A	G	-			
		17	2493	C	T	6	Thr	Ile	FJ609778
			2659	G	A	-			
			2716	A	G	-			

^a Αρίθμηση σύμφωνα με τα Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) ή Sabin 3 (AY184221) εμβολιακά στελέχη.

Πίνακας 3.3: Θέση των μεταλλάξεων στις 5'- UTR και VP1 αλληλουχίες των OPV-παραγόμενων στελεχών και σύγκριση με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις στα Sabin εμβολιακά στελέχη. Οι μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν σε περισσότερα του ενός στελέχη είναι υπογραμμισμένες.

Προέλευση	Περιοχή	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin στέλεχος	OPV- παραγόμενο στέλεχος	Αμινοξικ ή θέση	Sabin	Isolate	Accession numbers of 2C-3D sequences
S2	2C	580	4473	G	A				AY736178
S2		IF	4842	G	A				AY297764 (2C) AY297760 (3D) EU715814 AY736179
S2		ID	4456	G	A	112	Val	Ile	
S2		730	4773	C	T				
			4174	C	G	18	Leu	Val	
			4992	T	A				
S3/S2		744	-						AY736180
S3/S1		8029	-						AY736181
S2/S1	3A	580	5130/S2 ^a	T	C				
S2		IF	-						
S2		ID	-						
S2		730	-						
S2		744	-						
S1		8029	5191	A	G				
S1	3B	580	5389	A	T				
S2		IF	-						
S2		ID	-						
S2		730	-						
S2		744	-						
S1		8029	-						
S1	3C	580	5665	T	C				
			5698	A	C	87	Arg	Ser	
			5720	A	C	95	Thr	Pro	
			5760	A	G	108	Lys	Arg	
			5959	G	A				
S2		IF	-						
S2/S1		ID	-						
S2		730	-						
S2		744	-						
S1		8029	5791	T	C				
S1	3D	580	6203	C	T	73	His	Tyr	
			6217	A	G				
S2/S1		IF	-						
S1		ID	6203	C	T	73	His	Tyr	
			6373	T	C				
S2/S1		730	6781/S1 ^a	C	T				
S2		744	6219	G	A				
			6327	T	C				
S1		8029	6474	G	A	163	Arg	Lys	
			6484	A	T				

^a Αρίθμηση σύμφωνα με τα Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) ή Sabin 3 (AY184221) εμβολιακά στελέχη.

Πίνακας 3.4: Θέση των μεταλλάξεων στην 2C-3D γενωμική περιοχή των στελεχών 580, IF, ID, 730, 744, 8029 και σύγκριση με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις στα Sabin εμβολιακά στελέχη. Υπογραμμίζονται οι μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί σε περισσότερα του ενός στελέχη.

Στο στέλεχος II, ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη U525C (Πίνακας 3.3). Η μετάλλαξη U525C αποκαθιστά τη σταθερότητα ενός ζεύγους βάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων 480 και 525 (AU στο στέλεχος Mahoney, GU στο Sabin 1 στέλεχος και GC στο στέλεχος II) στην περιοχή V της 5'-UTR και έχει συσχετιστεί με την αναστροφή προς τη νευρομολυσματικότητα (Christodoulou et al., 1990, Rezarikin et al., 1994). Ταυτοποιήθηκε επίσης, στην VP1 κωδική περιοχή, η αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 2795 (A→G [Thr-106-Ala]), που είναι ένας γνωστός καθοριστής εξασθένησης (Christodoulou et al., 1990, Bouchard et al., 1995). Το αμινοξικό κατάλοιπο 106 τοποθετείται στο εξωτερικό του καψιδίου (Εικόνα 3.4.α), συγκεκριμένα στη VP1 BC θηλιά, και εμπλέκεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με ένα κατάλοιπο στη θέση 90 (Cherkasova et al., 2002).

Όλα τα στελέχη Sabin 2 γενότυπου (580, IF, ID και 730) παρουσίασαν τη μετάλλαξη A481G στην 5'-UTR (Πίνακας 3.3). Αυτή η αντικατάσταση αποτελεί αναστροφή προς τον γενότυπο αγρίου τύπου και έχει συνδεθεί με αυξημένη νευρομολυσματικότητα και θερμοανθεκτικότητα (Macadam et al., 1991, Georgescu et al., 1995, Muzychenko et al., 1991, Macadam et al., 1993, Minor et al., 1993, Guillot et al., 1994, Georgescu et al., 1994), πιθανώς με την παρεμπόδιση του σχηματισμού ενός νέου ζεύγους βάσεων μεταξύ των καταλοίπων 481 και 511, το οποίο θα προκαλούσε εξασθένηση στη δομή της 5'-UTR. Επιπλέον, η μετάλλαξη U398C ταυτοποιήθηκε σε δύο (580, IF) στελέχη και η μετάλλαξη U437C ταυτοποιήθηκε σε ένα (580) στέλεχος. Αυτές οι αντικαταστάσεις θα μπορούσαν επίσης να έχουν κάποια επίδραση στην εξασθένηση και την θερμοευαισθησία του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους αν και μικρότερη (Friedrich F, 1996). Και οι δύο αυτές μεταλλάξεις βρίσκονται σε ένα δίκλωνο τμήμα της δομής IV του IRES και ειδικότερα μετατρέπουν ένα ζεύγος βάσεων GU σε GC. Στη VP1 κωδική περιοχή, αμινοξικές αντικαταστάσεις στο κατάλοιπο 143 ταυτοποιήθηκαν σε δύο Sabin 2 παραγόμενα στελέχη (580, 730). Το κατάλοιπο 143 εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια του ιϊκού καψιδίου στην DE θηλιά (Εικόνα 3.4.β) και η αντικατάσταση της Ile από Val, Thr ή Asn έχει συσχετιστεί με αυξημένη νευρομολυσματικότητα (Macadam et al., 1991, Georgescu et al., 1995, Muzychenko et al., 1991, Macadam et al., 1993, Georgescu et al., 1994, Equestre et al., 1991).

Όλα τα στελέχη Sabin 3 γενότυπου (744, 8029, και 17) παρουσίασαν τη μετάλλαξη U472C στην 5'-UTR (Πίνακας 3). Αυτή η αντικατάσταση είναι μια αναστροφή προς τον αγρίου τύπου γενότυπο και έχει συνδεθεί με αυξανόμενη νευρομολυσματικότητα και θερμο-ανθεκτικότητα (Macadam et al., 1989, Westrop et al., 1989, La Monica et al., 1987, La Monica et al., 1989, Chumakov et al., 1991). Τα νουκλεοτίδια 472 και 537 δημιουργούν ζεύγος στην 5'-UTR σε μια προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή. Η παρουσία της U στο νουκλεοτίδιο 472 της 5'-UTR του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους οδήγησε στην αλλαγή του ζεύγους βάσεων C-G (nt 472-537) του νευρομολυσματικού αγρίου τύπου στελέχους P3/Leon/37 στο ζεύγος βάσεων U-G του εμβολιακού στελέχους Sabin 3, φανερώνοντας ότι ο φαινότυπος εξασθένησης είναι μερικώς συνδεδεμένος με την εξασθένηση του ζευγαρώματος σε μια ιδιαίτερα διατηρημένη δομή. Στην VP1 κωδική περιοχή, όλα τα Sabin 3 παραγόμενα στελέχη εμφάνισαν την αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 2493 (C→T [Thr-6-Ile] το οποίο είναι ένας καθοριστής εξασθένησης (Weeks-Levy et al., 1991, Tatem et al., 1992, Mento et al., 1993). Το κατάλοιπο 6 βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της VP1 στο εσωτερικό του καψιδίου (Εικόνα 3.4.γ) και η αντικατάσταση της Thr από Ile πιθανώς ενισχύει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της VP1

και ενδοσωμικές κυτταρικές μεμβράνες κατά τη διάρκεια της εισόδου του ιού στο κύτταρο (Tatem et al., 1992, Fricks et al., 1990).

Στην 2C-3D μη-δομική περιοχή του γενώματος των στελεχών, ταυτοποιήθηκαν επίσης νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αντικαταστάσεις (Πίνακας 3.4). Ωστόσο, μόνο η αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 6203 (C→U [His-73-Tyr] της κωδικής περιοχής της 3D πολυμεράσης έχει συσχετιστεί με τον εξασθενημένο και θερμοευαίσθητο φαινότυπο του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους [Christodoulou et al., 1990, Georgescu et al., 1995, Tardy-Panit et al., 1993, Georgescu et al., 1997, Martin et al., 1991, McGoldrick et al., 1995]. Η μετάλλαξη C6203U ταυτοποιήθηκε σε δύο Sabin 2 ανασυνδυασμένα στελέχη, τα 580 (S2/S1) και ID (S2/S1), σε Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο αλλά δεν ταυτοποιήθηκε στο ανασυνδυασμένο στέλεχος 8029 (S3/S1) το οποίο έχει επίσης Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο στην 3D περιοχή. Η 2C κωδική περιοχή είναι γνωστό ότι περιέχει μια διατηρημένη δομή κορμού-θηλιάς (nt 4443-4504 σε Πολιοϊό τύπου 2) λειτουργώντας ως ένα απαραίτητο cis-acting στοιχείο αντιγραφής (CRE) που εμπλέκεται στην ουριδιλίωση της πρωτεΐνης VPg [Paul et al., 2000, Rieder et al., 2000]. Η αντικατάσταση οποιουδήποτε από τα τρία νουκλεοτίδια A μιας συντηρημένης αλληλουχίας AAACA (σε Πολιοϊό τύπου 1 και 3) στη θηλιά του στοιχείου CRE μειώνει τόσο την ουριδιλίωση της VPg όσο και την ιική παραγωγή [49]. Η αντικατάσταση G4473A στο Sabin 2 παραγόμενο στέλεχος 580 (S2/S1), μετατρέπει την διατηρημένη αλληλουχία AAGCA του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους στη διατηρημένη αλληλουχία AAACA του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους. Έχει προταθεί ότι η παρουσία G στο νουκλεοτίδιο 4473 εμπλέκεται στον εξασθενημένο φαινότυπο του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους (Rieder et al., 2000).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σ' αυτή τη μελέτη, εξετάστηκαν 8 OPV-παραγόμενα ιικά στελέχη που απομονώθηκαν από υγιείς εμβολιασμένους και από περιπτώσεις VAPP κατά την χρονική περίοδο 1978-1985. Ειδικότερα, προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξης κάθε στελέχους και έγινε προσπάθεια συσχέτισης τους με γενωμικές τροποποιήσεις (μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς).

Τα εμβολιακά στελέχη Sabin διαφέρουν από τα αντίστοιχα στελέχη αγρίου τύπου και σε βιολογικές ιδιότητες εκτός της νευρομολυσματικότητας, κάποιες από τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* σαν δείκτες για τον έλεγχο της ποιότητας των νέων παρτίδων εμβολίων, πριν από τις δοκιμές μολυσματικότητας σε πιθήκους.

Η θερμοευαισθησία (RCT test) και το μέγεθος των πλακών (plaque assay), που χρησιμοποιήθηκαν ως φαινοτυπικοί δείκτες σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε να σχετίζονται με τη νευρομολυσματικότητα των πολιοϊών (Christodoulou et al., 1990, Macadam et al., 1989, Macadam et al., 1991, Bouchard et al., 1995, Georgescu et al., 1995, Tardy-Panit et al., 1993, Georgescu et al., 1997, Georgescu et al., 1994, McGoldrick et al., 1995, Martín et al., 2004). Το MAPREC test (Mutant Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage), το οποίο βασίζεται στην παρουσία μεταλλάξεων σε γνωστούς κύριους καθοριστές εξασθένησης επίσης σχετίστηκε με τη νευρομολυσματικότητα των πολιοϊών [51]. Η καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου επίσης χρησιμοποιείται ως δείκτης του ιικού πολλαπλασιασμού και θα μπορούσε να συσχετιστεί με την ιική μολυσματικότητα (Bouchard et al., 1995, Gutiérrez et al., 1997, Cello et al., 2008, Malnou et al., 2004, De Jesus et al., 2005).

Από την πραγματοποίηση του RCT test, προέκυψε ότι τα 7 από τα 8 OPV-παραγόμενα στελέχη εμφάνισαν έναν μη θερμοευαίσθητο φαινότυπο. Επιπλέον, προσδιορίστηκε ο φαινότυπος ανάπτυξης από κάθε στέλεχος (II, 580, IF, ID, 730, 744, 8029, 17) καθώς επίσης των Sabin εμβολιακών στελεχών σε Hep2 κυτταρική σειρά σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C and 40°C). Στο μη ανασυνδυασμένο Sabin-1 παραγόμενο στέλεχος II, η παρουσία μεταλλάξεων σε γνωστούς καθοριστές εξασθένησης και θερμοευαισθησίας (nt 525 της 5'-UTR και αμινοξύ 106 της VP1) δεν έχει επιπτώσεις στον φαινότυπο ανάπτυξης αλλά συμβάλλει στη μερική αναστροφή σε μη θερμοευαίσθητο φαινότυπο (Rct τιμή=2). Είναι ευρέως γνωστό ότι διάφορες άλλες μεταλλάξεις όπως αυτές στα νουκλεοτίδια 935, 1944, 2438 και 2741 συνεισφέρουν σημαντικά στον θερμοευαίσθητο φαινότυπο του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους [Bouchard et al., 1995].

Το μη ανασυνδυασμένο Sabin-3 παραγόμενο στέλεχος 17, παρουσίασε τον ίδιο φαινότυπο ανάπτυξης και την ίδια τιμή Rct με τον πρόγονό του, το Sabin 3 εμβολιακό στέλεχος, παρά την ύπαρξη μεταλλάξεων σε κύριους καθοριστές εξασθένησης και θερμοευαισθησίας (nt 472 της 5'-NTR και αμινοξύ 6 της VP1). Τα ανασυνδυασμένα 744(S3/S2) και 8029 (S3/S1) Sabin-3 παραγόμενα στελέχη, παρουσίασαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης στους 37°C με το στέλεχος 17 και το εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 αλλά υψηλότερη ιική συγκέντρωση (2-3 log₁₀ units) στα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Επιπλέον, τα στελέχη 744 και 8029 εμφάνισαν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο. Επίσης παρουσίασαν μεταλλάξεις στους ίδιους καθοριστές εξασθένησης (nt 472

της 5'-NTR και αμινοξύ 6 της VP1) με το μη ανασυνδυασμένο στέλεχος 17. Συνεπώς, είναι προφανές ότι οι διαφορετικοί φαινότυποι των στελεχών 744 και 8029 σε σύγκριση με το στέλεχος 17 συνδέεται με το γεγονός του ανασυνδυασμού. Αυτό έρχεται σε διαφωνία με μια προηγούμενη αναφορά (Macadam et al., 1989) που δείχνει ότι όμοιοι τύπου 3 ανασυνδυασμένοι ιοί ήταν ελαφρώς περισσότερο θερμοευαίσθητοι από τους αντίστοιχους μη-ανασυνδυασμένους που περιέχουν τις ίδιες μεταλλάξεις αναστροφής. Οι μη-θερμοευαίσθητοι φαινότυποι των στελεχών 744 και 8029 είναι σε αντίφαση με τους φαινοτύπους ανάπτυξης στους 40°C στο πείραμα καμπύλης ανάπτυξης ενός σταδίου. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση και των δύο στελεχών εμποδίστηκε εντελώς στους 40°C.

Στους 37°C, τα ανασυνδυασμένα Sabin-2 παραγόμενα στελέχη 580 και 730 (S2/S1) παρουσίασαν επιταχυνόμενο μολυσματικό κύκλο αλλά όχι τα ανασυνδυασμένα στελέχη IF και ID (S2/S1). Όλα τα Sabin-2 παραγόμενα στελέχη παρουσίασαν μετάλλαξη στο nt 481 στην 5'-NTR και δύο από αυτά (580, 730) έδειξαν επίσης μετάλλαξη στο αμινοξύ 143 της VP1 τα οποία είναι σημαντικοί καθοριστές εξασθένησης των Sabin 2 εμβολιακών στελεχών. Συνεπώς, ο επιταχυνόμενος φαινότυπος ανάπτυξης των στελεχών 580 και 730 συνδέεται με την παρουσία μετάλλαξης στο αμινοξύ 143 της VP1. Τα στελέχη IF και ID έδειξαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης με το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος αλλά το ID παρουσίασε υψηλότερη ιϊκή παραγωγή από αυτή του προγόνου του σε κάθε χρονικό σημείο μετά την μόλυνση. Επιπλέον, το στέλεχος 580 παρουσίασε υψηλότερη ιϊκή παραγωγή από το στέλεχος 730 στις 4, 6 και 8 ώρες μετά την μόλυνση. Κατά συνέπεια, η μετάλλαξη στο nt 6203 της 3D^{pol} στα στελέχη 580 και ID ίσως να έχει επίσης κάποια συμβολή στον φαινότυπο ανάπτυξης. Είναι πιθανό, ότι η μετάλλαξη στο nt 4473 της 2C του στελέχους 580 θα μπορούσε επίσης να συμβάλει στον φαινότυπο ανάπτυξης. Όλα τα Sabin-2 παραγόμενα στελέχη, παρουσίασαν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο στο RCT test ο οποίος έρχεται σε αντίφαση με τους φαινοτύπους ανάπτυξης στους 40°C στο πείραμα καμπύλης ανάπτυξης. Στους 40°C, η ανάπτυξη των 580, IF, ID και 730 εμποδίστηκε εντελώς όπως το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος.

Συνεπώς, στα Sabin-2 παραγόμενα στελέχη η μετάλλαξη στο αμινοξύ 143 της VP1 ευνοεί σημαντικά τον ιϊκό φαινότυπο ανάπτυξης και ίσως οδηγεί στην αναστροφή προς τη νευρομολυσματικότητα. Η αντικατάσταση στο κατάλοιπο 143 έχει παρατηρηθεί συχνά σε στελέχη απομονωμένα από περιπτώσεις με VAPP [Macadam et al., 1991, Georgescu et al., 1995, Muzychenko et al., 1991, Macadam et al., 1993, Georgescu et al., 1994, Equestre et al., 1991]. Στα Sabin-3 παραγόμενα στελέχη, ο ανασυνδυασμός του Sabin 3 ιϊκού στελέχους με Sabin 1 ή Sabin 2 και η απόκτηση της γενωμικής δομής S3/S1 ή S3/S2 ευνοεί τον φαινότυπο ανάπτυξης και την αναστροφή προς τη νευρομολυσματικότητα. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με το γεγονός ότι S3/S_x ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν απομονωθεί συχνά από περιπτώσεις VAPP [Georgoroulou et al., 2000, Karakasiliotis et al., 2004, Paximadi et al., 2006, Cuervo et al., 2001, Blomqvist et al., 2003, Martín et al., 2002, Paximadi et al., 2007].

Γενικά, η παρουσία των Sabin 1 ανασυνδυασμένων στελεχών είναι εξαιρετικά σπάνια ως S1/S_x (S1/S2 ή S1/S3). Επιπλέον, αλληλουχίες προέλευσης Sabin 1 βρίσκονται συνήθως σε S_x/S1 ανασυνδυασμένα στελέχη [Cuervo et al., 2001, Driesel et al., 1995, Gavrilin et al., 2000]. Εντούτοις, το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος είναι γενετικά πιο σταθερό από τα Sabin 2 και Sabin 3 εμβολιακά στελέχη, γεγονός το οποίο ίσως εξηγεί γιατί τα Sabin 3 και Sabin 2 απομονώνονται

συχνότερα από περιπτώσεις VAPP απ' ότι τα Sabin 1 (μόνο περίπου 12% των περιπτώσεων) [Strebel et al., 1992, Strebel et al., 1984-1992].

Συμπερασματικά, τόσο οι μεταλλάξεις όσο και οι ανασυνδυασμοί θα μπορούσαν να επηρεάσουν σημαντικά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των Sabin παραγόμενων στελεχών και να οδηγήσουν σε νευρομολυσματικά ιϊκά στελέχη. Επιπλέον, οι ανασυνδυασμοί επιτρέπουν είτε τη συσσώρευση μεταλλάξεων αναστροφής σε καθοριστές εξασθένησης και θερμοευαισθησίας στο ιϊκό γονιδίωμα ή την εξάλειψη κάποιων καθοριστών εξασθένησης και θερμοευαισθησίας από το ιϊκό γονιδίωμα.

Τέλος, τόσο η δοκιμή RCT όσο και το πείραμα καμπύλης ανάπτυξης είναι αποτελεσματικοί δείκτες για την εκτίμηση της νευρομολυσματικότητας των Sabin παραγώγων. Επιπλέον η χρήση του πειράματος καμπύλης ανάπτυξης μαζί με τη γενωμική ανάλυση ίσως ρίξουν επιπρόσθετο φως στους μοριακούς καθοριστές του ανεστραμμένου νευρομολυσματικού φαινοτύπου των Sabin παραγόμενων στελεχών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agirre A., A. Barco, L. Carrasco, and J. L. Nieva. 2002.** Viroporin-mediated membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* 277(43):40434-40441.
- Agol V.I., Paul A.V., Wimmer E. (1999).** Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res.* 62(2): 129-47. Review.
- 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.
- Ansardi, D. C., M. Luo, and C. D. Morrow. 1994.** Mutations in the poliovirus P1 capsid precursor at arginine residues VP4-ARG34, VP3 ARG223, and VP1-ARG129 affect virus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Virology.* 199:20-34
- Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- Back, S. H., Y. K. Kim, W. J. Kim, S. Cho, H. Rang Oh, J.E. Kim, and S. K. Jang. 2002.** Translation of Polioviral mRNA Is Inhibited by Cleavage of Polypyrimidine Tract-Binding Proteins Executed by Polioviral 3Cpro. *J. Virol.* 76:2529-2542.
- Balanant J, Guillot S, Candrea A, Delpeyroux F, Crainic R (1991).** The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* 184:645-654. **Banerjee, R., W. Tsai, W. Kim, and A. Dasgupta. 2001.** Interaction of Poliovirus-Encoded 2C/2BC Polypeptides with the 39 Terminus Negative-Strand Cloverleaf Requires an Intact Stem-Loop b. *Virology.* 280:41-51.
- Barco A. and L. Carrasco. 1998.** Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J. Virol.* 72(5):3560-3570.
- 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.
- 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.
- Belnap D.M., McDermott B.M. Jr, Filman D.J., Cheng N., Trus B.L., Zuccola H.J., Racaniello V.R., Hogle J.M., Steven A.C. (2000).** Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 73-8.

- Belov, G. A., N. A. Bonnet, G. Kovtunovych, C. L. Jackson, J. Lippincott-Schwartz, and E. Ehrenfeld.** 2007. Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J. Virol.* **81**:558-567
- 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.
- Blomqvist S., Bruu A. L., Stenvik M., Hovi T.** 2003. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* **84**(3):573-580.
- Bodian, D.,** 1955. Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science.* **12**:105–108.
- Bodian, D.,** 1972. Poliomyelitis. In *Pathology of the Nervous System Volume 3.* Edited by: Minckler J. New York, NY: McGraw-Hill. 2323-2344.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bubeck, D., D. J. Filman, N. Cheng, A. C. Steven, J. M. Hogle, and D. M. Belnap.** 2005. The Structure of the Poliovirus 135S Cell Entry Intermediate at 10-Angstrom Resolution Reveals the Location of an Externalized Polypeptide That Binds to Membranes. *J. Virol.* **79**:7745-7755.
- Calandria, C., A. Irurzun, Á. Barco, L. Carrasco.** 2004. Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Research* **104**: 39–49.
- Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., Crainic R. (2001).** Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **82**: 79-91.
- 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.
- Cello J, Toyoda H, Dejesus N, Dobrikova EY, Gromeier M, Wimmer E (2008).** Growth phenotypes and biosafety profiles in poliovirus-receptor transgenic mice of recombinant oncolytic polio/human rhinoviruses. *J Med Virol* **80**:352-9.

- Centers for Disease Control and Prevention (1997).** Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep* 46:1–25.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2006.** Update on vaccine derived polioviruses. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55:1093–1097.
- Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Chumakov KM, Agol VI (2002).** Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol* 76:6791-9.
- Cherkasova EA, Yakovenko ML, Rezapkin GV, Korotkova EA, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Krasnoproshina LI, Romanenkova NI, Rozaeva NR, Sirota L, Agol VI, Chumakov KM. (2005).** Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol* 79:1062-70.
- 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.
- Choe S. S. and K. Kirkegaard. 2004.** Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* 78(11): 5973-5982.
- Chow, M., J.F. Newman, and D. Filman. 1987.** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* 327:482-486.
- Christodoulou C, Colbere-Garapin F, Macadam A, Taffs LF, Marsden S, Minor P, Horaud F (1990)** Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J Virol* 64:4922–4929.
- Chumakov KM, Powers LB, Noonan KE, Roninson IB, Levenbook IS (1991).** Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:199-203.
- 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.
- Costa-Mattioli M., Svitkin Y., Sonenberg N. (2004).** La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* 24(15): 6861-70.
- Cuconati, A., W. Xiang, F. Lahser, T. Pfister, and E. Wimmer. 1998.** A Protein Linkage Map of the P2 Nonstructural Proteins of Poliovirus. *J. Virol.* 72: 1297-1307.

Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, Caro V, Crainic R, Delpyroux F (2001). Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol* 75:5740-51.

Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu-Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., Stuart D. (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* (12): 9743-52.

Dasgupta A., Yalamanchili P., Clark M., Kliewer S., Fradkin L., Rubinstein S., Das S., Shen Y., Weidman M.K., Banerjee R., Datta U., Igo M., Kundu P., Barat B. and Berk A.J. (2002). Effects of Picornavirus proteinases on host cell transcription. In: B.L. Semler and E. Wimmer, Editors, *Molecular Biology of Picornaviruses*, ASM Press, Washington.

Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. 2002. Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.

Dedepsidis E, Karakasiliotis I, Paximadi E, Kyriakopoulou Z, Komiotis D, Markoulatos P (2006) Detection of unusual mutation within the VP1 region of different re-isolates of poliovirus Sabin vaccine. *Virus Genes* 33:183-191.

De Jesus N, Franco D, Paul A, Wimmer E, Cello J (2005). Mutation of a single conserved nucleotide between the cloverleaf and internal ribosome entry site attenuates poliovirus neurovirulence. *J Virol* 79:14235-43.

DeStefano, J. J., and O. Titilope. 2006. Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities. *J. Virol.* **80**: 1662-1671.

Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., et al. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—a review. *Gene.* 40(1): 1-8. Review.

Dobrikova E., P. Florez, S. Bradrick, and M. Gromeier. 2003. Activity of a type 1 picornavirus internal ribosomal entry site is determined by sequences within the 3'nontranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:15125-15130.

Doedens, J. R., and K. Kirkegaard. 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* **14**:894–907.

Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.

Driesel G, Diedrich S, Kunkel U, Schreier E. (1995). Vaccine-associated cases of poliomyelitis over a 30 year period in East Germany. *Eur J Epidemiol* 11:647-654.

- 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.
- 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.
- Egger D., Bienz K. (2002).** Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.* 76(21): 10960 – 10971.
- Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E. and Bienz K.(2000).** Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74: 6570-6580.
- Ehrenfeld E. and Semler B.L. (1995).** Anatomy of the poliovirus internal ribosome entry site. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 203: 65-83.
- Equestre M, Genovese D, Cavalieri F, Fiore L, Santoro R, Perez Bercoff R (1991).** Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J Virol* 65:2707-10.
- Ferguson, M., D.J. Wood, and P.D, Minor. 1993.** Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *J. Gen. Virol.* 74:685-90
- Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J. Minor P.D. and Hogle JM. (1989).** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 8: 1567-79.
- Fogg M. H., N. L. Teterina, and E. Ehrenfeld. 2003.** Membrane requirements for uridylylation of the poliovirus VPg protein and viral RNA synthesis in vitro. *J. Virol.* 77(21): 11408-11416.
- Fricks CE, Hogle JM (1990).** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 64:1934-45.
- Friedrich F (1996).** Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virol* 40:157-70.
- Freistadt M.S., Racaniello V.R. (1991).** Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus. *J. Virol.* 65: 3873-6.
- Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, Crainic R (1993).** Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* 196:199-208.
- Gammack N.J., Phillips A., Dunn G., Patel V. and Minor P.D. (1989).** Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccines. *Virology.* 167: 505-514.

Gavrilin GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM, Agol VI. (2000). Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol* 74:7381-90.

Georgescu MM, Delpeyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combiescu M, Combiescu AA, Guillot S, Crainic R (1994). High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 68:8089-8101.

Georgescu MM., 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.

Georgescu MM, Tardy-Panit M, Guillot S, Crainic R, Delpeyroux F (1995). Mapping of mutations contributing to the temperature sensitivity of the Sabin 1 vaccine strain of poliovirus. *J Virol* 69:5278-5286.

Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, Crainic R, Delpeyroux F. (1997). Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 71:7758-7768.

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.

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.

Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., Agol A. I. (1999). Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. *J. Virol.* 73(11): 8958 – 8965.

Goldstaub D., Gradi A., Bercovitch Z., Grosmann Z., Nophar Y., Luria S., Sonenberg N., Kahana C. (2000). Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol. Cell Biol.* 20(4): 1271-7.

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.

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.

Guest S, Pilipenko E, Sharma K, Chumakov K, Roos RP (2004). Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J Virol* 78:11097-11107.

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.

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.

Gulevich A.Y., Yusupova R.A., Drygin Y.F. (2001). A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry (Mosc).* 66(3): 345-9.

Gutiérrez AL, Denova-Ocampo M, Racaniello VR, del Angel RM (1997). Attenuating mutations in the poliovirus 5' untranslated region alter its interaction with polypyrimidine tract-binding protein. *J Virol* 71:3826-3833.

Hansen J.L., A.M. Long, and S.C. Schultz. 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* 5: 1109–22.

Harber J., Bernhardt G., Lu H.H., Sgro J.Y. and Wimmer E. (1995). Canyon rim residues, including antigenic determinants modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* 214: 559-570.

He Y., S. Mueller, P. R. Chipman, C. M. Bator, X. Peng, V. D. Bowman, E. Wimmer, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann. 2003. Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J. Virol.* 77:4827–4835.

He Y., V. D. Bowman, S. Mueller, C. M. Bator, J. Bella, X. Peng, T. S. Baker, E. Wimmer, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann. 2000. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:79–84.

Herold J. and R. Andino. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.

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.

Hindiyeh, M., Q. H. Li, R. Basavappa, J. M. Hogle, and M. Chow. 1999. Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J Virol.* 73:9072–79.

Hirst G., (1962). Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 303 - 308.

Hogle, J. M. 2002. Poliovirus cell entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways. *Annu Rev Microbiol.* 56: 677–702.

Holland, J.J., J.C. De La Torre, and D.A. Steinhauer. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 176:1–20.

- Horie H, Yoshida H, Matsuura K, Miyazawa M, Wakabayashi K, Nomoto A, Hashizume S. (2002).** Isolation of vaccine-derived type 1 polioviruses displaying similar properties to virulent wild strain Mahoney from sewage in Japan. *J Med Virol* 68:445-451.
- Hovi T. (1986).** Immunization against poliomyelitis: still problems to solve in both developed and developing countries. *Ann. Clin. Res.* 18(3):119-20.
- Hyypia, T., T. Hovi, N. J. Knowles, and G. Stanway. 1997.** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78:1-11.
- Jacobson S. J., D. A. Konings, and P. Sarnow. 1993.** Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol.* 67:2961-2971.
- Janeway, C., Travers, P. Walport, M., Shlomchik, M. 2001.** Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, New York: Garland Publishing.
- Joachims M., K. S. Harris, and D. Etchison. 1995.** Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* 211:451-461.
- 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.
- 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.
- Kawamura N, Kohara M, Abe S, Komatsu T, Tago K, Arita M, Nomoto A (1989).** Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J Virol* 63:1302-1309.
- Kew, O. M., R. W. Sutter, E. M. de Gourville, W. R. Dowdle, and M. A. Pallansch. 2005.** Vaccine-derived poliovirus and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:587-635.
- 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.
- King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. (2000).** Picornaviridae. In "Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses" (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, E.B. Carsten, M.K Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A

Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego.

Kirkegaard K. Baltimore D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47: 433 – 443.

Kondratova, A.A., N. Neznanov, R. V. Kondratov, and A. V. Gudkov. 2005. Poliovirus Protein 3A Binds and Inactivates LIS1, Causing Block of Membrane Protein Trafficking and Deregulation of Cell Division. *Cell cycle* 10:1403-1410.

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.

Kuyumcu-Martinez, N. M., Joachims M. and Lloyd R. E.. (2002). Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J. Virol.* 76: 2062-2074.

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.

La Monica N, Almond JW, Racaniello VR (1987). A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuate the virus for humans. *J Virol* 61:2917-20.

La Monica N, Racaniello VR (1989). Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Virol* 63:2357-60.

Lai M.M. (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56(1): 61-79. Review.

Lamphear B.J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R.E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol Chem.* 270(37): 21975-83.

Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, Cox S, Buontempo P, Skelton A, Demartino J, Rozhon E, Schwartz J, Girjavallabhan 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.

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.

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.

- 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.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. (2003).** Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 77(19): 10423-31.
- Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, John A, Marsden S, Taffs F, Reeve P, Hamada N, Wareham K, Almond J, Cammack N, Minor PD (1989).** Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* 172:408-414.
- Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Dunn G, Skuce R, Almond JW, Minor PD (1991).** The 5' noncoding region of the type 2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. *Virology* 81:451-8.
- Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Skuce R, Wood D, Almond JW, Minor PD (1993).** Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology* 192:18-26.
- Madan, V., A. Castelló, and L.Carrasco. 2008.** Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cellular Microbiology* 10: 437–451
- Malnou CE, Pöyry TA, Jackson RJ, Kean KM (2002).** Poliovirus internal ribosome entry segment structure alterations that specifically affect function in neuronal cells: molecular genetic analysis. *J Virol* 76(21):10617-26.
- Malnou CE, Werner A, Borman AM, Westhof E, Kean KM (2004).** Effects of vaccine strain mutations in domain V of the internal ribosome entry segment compared in the wild type poliovirus type 1 context. *J Biol Chem* 279:10261-10269.
- Marcotte, L. L., A. B. Wass, D. W. Gohara, H. B. Pathak, J. J. Arnold, D. J. Filman, C.E. Cameron, and J.M. Hogle. 2007.** Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J.Virol.* 81:3583-3596.
- Martin A, Benichou D, Couderc T, Hogle JM, Wychowski C, Van der Werf S, Girard M (1991).** Use of type 1/type 2 chimeric polioviruses to study determinants of poliovirus type 1 neurovirulence in a mouse model. *Virology* 180:648-658.
- 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.

Martín J, Odoom K, Tuite G, Dunn G, Hopewell N, Cooper G, Fitzharris C, Butler K, Hall WW, Minor PD (2004). Long-term excretion of vaccine-derived poliovirus by a healthy child. *J Virol* 78:13839-13847.

McGoldrick A, Macadam AJ, Dunn G, Rowe A, Burlison J, Minor PD, Meredith J, Evans DJ, Almond JW (1995). Role of mutations G-480 and C-6203 in the attenuation phenotype of Sabin type 1 poliovirus. *J Virol* 69:7601-7605.

Melnick J.L. (1996). Current status of poliovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 293-300. Review.

Melnick J.L. (2001). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: *Fields virology*, 4rd ed. (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds). Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 723-776.

Mento SJ, Weeks-Levy C, Tatem JM, Gorgacz EJ, Waterfield WF (1993). Significance of a newly identified attenuating mutation in Sabin 3 oral poliovirus vaccine. *Dev Biol Stand* 78:93-100.

Minor, P. D., M. Ferguson, D. M. A. Evans, J. W. Almond, and J. P. Icenogle. 1986. Antigenic structures of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* 67: 1283-1291

Minor PD, Dunn G, Evans DM, Magrath DI, John A, Howlett J, Phillips A, Westrop G, Wareham K, Almond JW, Hogle JM (1989). The temperature sensitivity of the Sabin type 3 vaccine strain of poliovirus: molecular and structural effects of a mutation in the capsid protein VP3. *J Gen Virol* 70:1117-1123.

Minor PD, Macadam AJ, Stone DM, Almond JW (1993). Genetic basis of attenuation of the Sabin oral poliovirus vaccines. *Biologicals* 21:357-363.

Minor DP. 1999. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.

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.

Moss E. G., V. R. Racaniello. 1991. Host range determinants located on the interior of the poliovirus capsid. *EMBO J.* 10: 1067-1074.

Mulders MN, Reimerink JH, Stenvik M, Alaeddinoglu I, van der Avoort HG, Hovi T, Koopmans MP (1999). A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J Gen Virol* 80:907-916.

Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M, van Loon A.M. (1998). Molecular typing of enteroviruses: current status and future

requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202-27.

Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J. (2001). Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* 7: 1126-1141.

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.

Muzychenko AR, Lipskaya GYu , Maslova SV, Svitkin YV, Pilipenko EV, Nottay BK, Kew OM, Agol VI (1991). Coupled mutations in the 5'-untranslated region of the Sabin poliovirus strains during in vivo passages: structural and functional implications. *Virus Res* 21:111-122.

Nakano JH, Hatch MH, Thieme W, Nottay B (1978) Parameters for differentiating vaccine-derived and wild poliovirus strains. *Prog Med Virol* 24:178-206

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.

Oberste M.S., Nix W.A., Maher K., Pallansch M.A. (2003). Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* 26(3): 375-7.

Ochs K., L. Saleh, G. Bassili, V. H. Sonntag, A. Zeller, and M. Niepmann. 2002. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.* 76(5): 2113-2122.

Ochs K., A. Zeller, L. Saleh, G. Bassili, Y. Song, A. Sonntag, and Michael Niepmann. 2003. Impaired Binding of Standard Initiation Factors Mediates Poliovirus Translation Attenuation. *J. Virol.* 77(1): 115-122

Omata T, Kohara M, Kuge S, Komatsu T, Abe S, Semler BL, Kameda A, Itoh H, Arita M, Wimmer E, Nomoto A (1986) Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J Virol* 58:348-358

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.

Paul AV, Rieder E, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 74:10359-10370.

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

Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P (2006) Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* 32:203-210.

Paximadi E, Karakasiliotis I, Bolanaki E, Krikelis A, Markoulatos P. (2007). Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* 35:541-548.

Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N (1988) Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol* 8:1103-1112.

Perera, R., S. Daijogo, B. L. Walter, J. H. C. Nguyen, and B.L. Semler. 2007. Cellular Protein Modification by Poliovirus: the Two Faces of Poly(rC)-Binding Protein. *J.Virol.* 81:8919-8932.

Pérez Luis Sarmiento, Pedro Más Lago, Rosa Palomera Puentes, Luis Morier Díaz, Magile Fonseca Quintana y, Sonia Resik Aguirre (2007). Evidence for nonpoliovirus enterovirus multiplication in L20B cells. *Rev Cubana Med Trop* 2007;59(2)

Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E. (1999). **Molecular biology.** In "*Encyclopedia of Virology*", second edition (A. Granoff & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.

Pfister T., and Wimmer E., (1999). Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001.

Pilipenko EV, Blinov VM, Romanova LI, Sinyakov AN, Maslova SV, Agol VI (1989) Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology* 168:201-209.

Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 23(11): 1870 – 1875.

Pilipenko, E. V., K. V. Poperechny, S. V. Maslova, W. J. Melchers, H. J. Bruins Slot, and V. I. Agol. 1996. Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *EMBO J.* 15: 5428–5436.

Prevots D.R., Ciofi degli Atti M.L., Sallabanda A., Diamante E., Aylward R.B., Kakariqqi E., Fiore L., Ylli A., van der Avoort H., Sutter R.W., Tozzi A.E., Panei P., Schinaia N., Genovese D., Oblapenko G., Greco D., Wassilak S.G. (1998). Outbreak of paralytic poliomyelitis in Albania, 1996: high attack rate among adults and apparent interruption of transmission following nationwide mass vaccination. *Clin. Infect. Dis.* 26(2) :419-25.

- 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 eIF4G critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal* 22(8): 1909-1921.
- Racaniello V.R. (1996).** Early events in poliovirus infection: virus-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 11378-81. Review.
- Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E (2000).** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 74:10371-10380.
- Rezapkin GV, Chumakov KM, Lu Z, Ran Y, Dragunsky EM, Levenbook IS (1994).** Microevolution of Sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine. *Virology* 202:370-378.
- Rodriguez Wells, V., J. Stephen, and J. J. DeStefano. 2001.** Determination of the mutation rate of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Research* 74:119-132.
- Rohli J.B., Moon D.H., Evans D.J., Almond J.W. (1995).** The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.* 69: 7835-44.
- Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. (1986).** The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*. 155: 202 – 213.
- Rust, R. C., L. Landmann, R. Gosert, B. L. Tang, W. Hong, H. P. Hauri, D. Egger, and K. Bienz. 2001.** Cellular COPII Proteins Are Involved in Production of the Vesicles That Form the Poliovirus Replication Complex. *J. Virol.* 75: 9808-9818
- Sabin, A.B., 1956.** Pathogenesis of poliomyelitis: reappraisal in light of new data. *Science* 123: 1151-1157.
- Sabin, A. B., M. Ramos-Alvarez, J. Alvarez-Amezquita, W. Pelon, and R.H. Michaels. 1960.** Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *AMA* 173:1521-26
- Sabin AB, Boulger LR (1973)** History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J Biol Stand* 1:115-118.
- Sabin, A. B. 1985.** Oral poliovirus vaccine: history of its development and use, and current strategies to eliminate poliomyelitis from the world. *J. Infect. Dis.* 151:420-36.
- Schein, C. H., N. Oezguen, D. E. Volk, R. Garimella, A. Paul, and W. Braun. 2006.** NMR structure of the viral peptide linked to the genome (VPg) of poliovirus. *Peptides*. 27: 1676-1684.
- Selinka H.C., Zibert A., Wimmer E. (1991).** Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 3598-602.

- Shen Y., Igo M., Yalamanchili P., Berk A.J., Dasgupta A. (1996).** DNA binding domain and subunit interactions of transcription factor IIIc revealed by dissection with poliovirus 3C protease. *Mol. Cell. Biol.* 16(8): 4163-71.
- Shulman L.M., Manor Y., Azar R., Handsher R., Vonsover A., Mendelson E., Rothman S., Hassin D., Halmut T., Abramovitz B., Varsano N. (1997).** Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 35(8): 2145-9.
- 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.
- Siafakas N., Markoulatos P., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J. (2002).** A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Mol. Cell. Probes.* 16(3): 209-16.
- Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J. (2003).** Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes.* 17(2-3): 113-23.
- Silvestri, L. S., J. M. Parilla, B. J. Morasco, A. O. Sushma, and J. B. Flanagan. 2006.** Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the poly(A) tail. *Virology.* 345:509-519.
- Skinner MA, Racaniello VR, Dunn G, Cooper J, Minor PD, Almond JW (1989).** New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J Mol Biol* 207:379-392.
- Slater P.E., Orenstein W.A., Morag A., Avni A., Handsher R., Green M.S., Costin C., Yarrow A., Rishpon S., Havkin O., et al. (1990).** Poliomyelitis outbreak in Israel in 1988: a report with two commentaries. *Lancet.* 19;335(8699): 1192-8.
- 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.
- Sommergruber, W., M. Zorn, D. Blaas, F. Fessl, P. Volkmann, I. Maurer-Fogy, P. Pallai, V. Merluzzi, M. Matteo, and T. Skern. 1989.** Polypeptide 2A of human rhinovirus type 2: identification as a protease and characterization by mutational analysis. *Virology* 169: 68– 77.
- Stanway G. (1990).** Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71: 2483-2501. Review.

Strauss, D.M., L.W. Giustrom, and D.S. Wuttke. 2003. Towards an Understanding of the Poliovirus Replication Complex : The Solution Structure of the Soluble Domain of the Poliovirus 3A Protein. *J.Mol.Biol.***330**: 225-234

Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, Biellik RJ, Brink EW, Kew OM, Pallansch MA, Orenstein WA, Hinman AR. (1992). Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin Infect Dis* 14:568-579.

Strebel PM, Aubert-Combiescu A, Ion-Nedelcu N, Biberi-Moroeanu S, Combiescu M, Sutter RW, Kew OM, Pallansch MA, Patriarca PA, Cochi SL. (1994). Paralytic poliomyelitis in Romania, 1984-1992. Evidence for a high risk of vaccine-associated disease and reintroduction of wild-virus infection. *Am J Epidemiol* 140:1111-1124.

Sutter R.W., Patriarca P.A., Brogan S., Malankar P.G., Pallansch M.A., Kew O.M., Bass A.G., Cochi S.L., Alexander J.P., Hall D.B., et al. (1991). Outbreak of paralytic poliomyelitis in Oman: evidence for widespread transmission among fully vaccinated children. *Lancet.* 21;338(8769): 715-20.

Tardy-Panit M, Blondel B, Martin A, Tekaia F, Horaud F, Delpeyroux F (1993). A mutation in the RNA polymerase of poliovirus type 1 contributes to attenuation in mice. *J Virol* 67:4630-4638.

Tatem JM, Weeks-Levy C, Georgiu A, DiMichele SJ, Gorgacz EJ, Racaniello VR, Cano FR, Mento SJ (1992). A mutation present in the amino terminus of Sabin 3 poliovirus VP1 protein is attenuating. *J Virol* 66:3194-3197.

Todd S., Nguyen J.H., Semler B.L. (1995). RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* 69(6): 3605-14.

Toyoda H., Nicklin M.J., Murray M.G., Anderson C.W., Dunn J.J., Studier F.W. and Wimmer E. (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell.* 45: 761-70.

Towner, J. S., D. M. Brown, J. H.C. Nguyen, and B. L. Semler. 2003. Functional conservation of the hydrophobic domain of polypeptide 3AB between human rhinovirus and poliovirus. *Virology.***314**:432-442.

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.

Ventoso, I., E. S. MacMillanb, J. W. B. Hersheyb, and L Carrasco. 1998. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS letters.* **435**: 79-83.

Verlinden Y., Cuconati A., Wimmer E., Rombaut B. (2000). Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J. Gen. Virol.* 81(Pt 11): 2751-4.

- Ward C.D., Flanagan J.B. (1992).** Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66(6): 3784-93.
- Weidman M.K., Yalamanchili P., Tsai B. Ng, W. and Dasgupta A. (2001).** Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology* 291: 260–271.
- Weidman M. K., 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.
- Weeks-Levy C, Tatem JM, DiMichele SJ, Waterfield W, Georgiu AF, Mento SJ (1991).** Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. *Virology* 185:934-7.
- Westrop GD, Wareham KA, Evans DM, Dunn G, Minor PD, Magrath DI, Taffs F, Marsden S, Skinner MA, Schild GC, et al (1989).** Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J Virol* 63:1338-1344.
- Wimmer E, Hellen CUT, Cao X (1993)** Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* 27:353-436
- Wimmer E., Harber J.J., Bibb J.A., Gromeier M., Lu H.H. and Bernhardt G. (1994).** in *Cellular Receptors for Animal Viruses*, ed. Wimmer E.(Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp 101-127.
- Yalamanchili P., Banerjee R. and Dasgupta A. (1997).** Poliovirus-encoded protease 2A^{pro} cleaves the TATA-binding protein but does not inhibit host cell RNA polymerase II transcription in vitro. *J. Virol.* 71: 6881–6886.
- Yalamanchili P., Datta U. and Dasgupta A. (1997).** Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3C^{pro}. *J. Virol.* 71: 120–1226.
- Yalamanchili P., Harris K., Wimmer E. and Dasgupta A. (1996).** Inhibition of basal transcription by poliovirus: a virus-encoded protease (3C^{pro}) inhibits formation of TBP–TATA box complex in vitro. *J. Virol.* 70: 2922–2929.
- 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.

