

Ευάγγελος Β. Δεδεψίδης

**ΕΜΒΟΛΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ - ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ
ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ**

2008

**ΕΜΒΟΛΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ - ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ
ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ ΔΟΜΕΣ RNA**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Z. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Z. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

N. ΚΑΤΗΣ

Καθηγητής Ιολογίας Φυτών
Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

M. ΑΡΣΕΝΑΚΗΣ

Καθηγητής Μικροβιολογίας εκτός Ιατρικής Μικροβιολογίας
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Ευάγγελος Β. Δεδεψίδης

ΕΜΒΟΛΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ - ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ
ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ

Ευάγγελος Β. Δεδεψίδης

2008

ΕΜΒΟΛΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ - ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ
ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 11

Συνολικός αριθμός σελίδων: 135

Αριθμός πινάκων: 20

Αριθμός σχημάτων: 53

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 122

ΣΥΝΟΨΗ

Αρχικά, στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής, επιχειρήθηκε η ανίχνευση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών στη VP1 γενωμική περιοχή, εμβολιακής προέλευσης, στελεχών πολιοϊών. Συμπερασματικά, κάποια στελέχη από αυτά που μελετήθηκαν, παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο εξέλιξης στην VP1 περιοχή, από το αναμενόμενο. Στα συγκεκριμένα στελέχη φαίνεται να προτιμούνται οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις, οι οποίες θα οδηγήσουν σε αμινοξικές αλλαγές σε δομικά στοιχεία της VP1 (αντιγονικές θέσεις, αύλακα), καθώς και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αύξηση της νευρομολυσματικότητας των συγκεκριμένων στελεχών, έναντι των συνώνυμων οι οποίες δεν οδηγούν σε αύξηση της αρμοστικότητας. Το συγκεκριμένο πρότυπο μεταλλάξεων επιτρέπει στον ιό να πολλαπλασιάζεται και να εξελίσσεται για περισσότερο χρόνο, αποφεύγοντας την άνοση απόκριση του ξενιστή.

Παράλληλα, ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση του γενώματος δύο ανασυνδυασμένων στελεχών που παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το πρώτο στέλεχος, 7/b/97, ταυτοποιήθηκε ως cVDPV τύπου 1 και ήταν προϊόν ανασυνδιασμού μεταξύ εμβολιακού στελέχους Sabin 1 και εντεροϊού που ανήκει στην ομάδα C. Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε απόκλιση (1,87%) από το πρότυπο εμβολιακό στην VP1 καψιδιακή περιοχή, γεγονός που μαρτυρά ότι το συγκεκριμένο στέλεχος κυκλοφορούσε σε περιοχή ελεύθερη από πολιοϊούς για περίπου 2 χρόνια. Παρόμοια στελέχη στο παρελθόν ευθύνονταν για αρκετές επιδημίες εξαιτίας της νευρομολυσματικότητάς τους και της αυξημένης ικανότητάς τους για μετάδοση μεταξύ ξενιστών.

Το δεύτερο στέλεχος που αλληλουχήθηκε σε όλο το γονιδίωμα του (K/2002), παρουσίασε ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 στην καψιδιακή περιοχή VP1, γεγονός πολύ σπάνιο, καθώς είναι μόλις το τρίτο στέλεχος που απομονώνεται. Το ιδιαίτερο στην δική μας περίπτωση ήταν ότι η ηλικία του ιικού στελέχους K/2002 ήταν μεγαλύτερη από την ηλικία του ασθενή από τον οποίο απομονώθηκε. Συγκεκριμένα το ιικό στέλεχος ήταν 11 μηνών, ενώ ο ασθενής μόλις 4 μηνών. Αυτό το γεγονός καταδεικνύει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος έχει κυκλοφορήσει στον πληθυσμό και εγείρονται ερωτήματα για την ασφάλεια του εμβολίου OPV.

Προκειμένου να καθοριστεί η σχέση που μπορεί να συνδέει την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ανασυνδυασμών τύπων Sabin 3/ Sabin x (x : Sabin 2 ή Sabin 1) και Sabin 2/Sabin x (x : Sabin 1 ή Sabin 3) στις 2C και 3D περιοχές αντίστοιχα,

επιχειρήθηκε η κατασκευή των μοντέλων των δευτεροταγών δομών των περιοχών 2C και 3D των θετικής και αρνητικής πολικότητας κλώνων και των τριών προτύπων εμβολιακών στελεχών, Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3. Ακολούθησε παράθεση των σημείων ανασυνδυασμού, τα οποία ανιχνεύθηκαν σε κλινικά δείγματα τόσο της συγκεκριμένης διατριβής όσο και σε κλινικά δείγματα προηγούμενων εργασιών, στα μοντέλα των δευτεροταγών RNA δομών. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε ένα *in vitro* μοντέλο παραγωγής ανασυνδυασμένων εμβολιακών στελεχών πολιοϊών με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που θα προέκυπταν από αυτό, τα οποία σχετίζονταν με την σχέση ανασυνδυασμών και δευτεροταγών RNA δομών, με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που θα προέκυπταν από τα κλινικά στελεχη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του *in vitro* μοντέλου, βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συσχέτιση δευτεροταγών RNA δομών και ανασυνδυασμών στα κλινικά δείγματα. Έτσι στη μεγάλη πλειοψηφία τους, τα σημεία ανασυνδυασμού σχετίζονται με RNA δομικά στοιχεία, τα οποία είναι όμοια μεταξύ των εκάστοτε προτύπων στελεχών και εκτός αυτού, τα ζευγαρώματα βάσεων τα οποία οδηγούν στη δημιουργία των δομικών αυτών στοιχείων παρουσιάζουν από υψηλές μέχρι πολύ υψηλές πιθανότητες. Επίσης, αρκετά από αυτά τα δομικά στοιχεία, εκτός από την υψηλή πιθανότητα που παρουσιάζουν, συμπεριλαμβάνονται και στη δομή με τη χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια, με αποτέλεσμα η θετική προγνωστική αξία των στοιχείων δευτεροταγών δομών, στα οποία εδράζονται οι ανασυνδυασμοί, να είναι αρκετά υψηλή. Επομένως, η κατανομή των ανασυνδυασμών στα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών δεν είναι τυχαία και συνάδει με στοιχεία παρόμοιας δευτεροταγής διαμόρφωσης μεταξύ των δύο συμβαλλόμενων μορίων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ζήση Μαμούρη, καθώς και τον επίκουρο καθηγητή Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, οι οποίοι με τίμησαν δεχόμενοι να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αυτής της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτριο Κουρέτα, τον καθηγητή Νίκο Κατή, τον καθηγητή Μηνά Αρσενάκη και τον επίκουρο καθηγητή Δημήτριο Κομιώτη για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Λιλίκα Σαραφίδου, καθώς και τις Κωνσταντίνα Τσουμάνη και Εύη Κακάνη, για τις γνώσεις τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στα πειράματα της κλωνοποίησης.

Ένα ευχαριστώ θα ήταν πολύ λίγο για τις Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου (ιδιαίτερα) και Βίκυ Πλιάγκα που με «ανέχτηκαν» τόσα χρόνια. Τις ευχαριστώ πολύ για την συνεργασία τους και για τη βοήθειά τους καθόλο το διάστημα εκπόνησης αυτής της διατριβής. Όπως επίσης, ευχαριστώ πολύ όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν όλα αυτά τα χρόνια από το εργαστήριο, καθώς έδωσαν έναν πιο ευχάριστο τόνο στην καθημερινή εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους που απέκτησα στη διάρκεια της παραμονής μου στην Λάρισα και ιδιαίτερα τους Κώστα Γεωργούλα και Γεδεών Λουλε για τη συμπαράστασή τους και τη στήριξή τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Ευγενία Μπολανάκη, Χριστίνα Κοτταρίδη, Γιάννη Καρακασιλιώτη, Ελένη Παξιμάδη και Ελίνα Χορευτή, στο Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, για την βοήθεια τους και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε στο ξεκίνημά μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο για το πραγματικό ενδιαφέρον του, την καθοδήγησή του και κυρίως επειδή αποτέλεσε και πάντα θα αποτελεί πηγή έμπνευσης για μένα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνθρωπο Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καλοσύνη του και πάνω από όλα για την κατανόηση που επέδειξε σε δύσκολες στιγμές μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου για την στήριξη και την ασφάλεια που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια, γιατί χωρίς αυτές δεν θα έφτανα στο σημείο να γράψω αυτές τις γραμμές.

Στο Μήτσο για το κουράγιο του

Και στην Ελένη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1

Γενική Εισαγωγή

1.1 ΡΟΛΙΟVIRUS, ΠΟΛΙΟΪΟΣ.....	11
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ PICORNA ΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	11
1.3 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	12
1.4 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CD155 ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	26
1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	26
1.6 ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ.....	31
1.7 Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	36
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	40

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	41
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	45
2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΚΟΥ RNA.....	51
2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	52
2.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ.....	52
2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	53
2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ RT-PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	59
2.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (R.F.L.P).....	60
2.9 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ RT-PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	61
2.10 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΙΝ VITRO ΜΟΝΤΕΛΟΥ.....	61
2.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	66
2.12 ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ.....	67

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	71
3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97.....	76
3.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Κ/2002.....	81
3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΤΙΣ 2C ΚΑΙ 3D ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	86
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΝ VITRO ΜΟΝΤΕΛΟΥ.....	89
3.6 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ.....	90
3.7 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ.....	107
3.8 ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ.....	122

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΩΝ ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	123
4.2 ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97.....	126
4.3 ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97.....	130
4.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	132

Abstract.....	137
---------------	-----

Βιβλιογραφία.....	139
-------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 POLIOVIRUS, ΠΟΛΙΟΪΟΣ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Picornaviridae

ΓΕΝΟΣ: Enterovirus

Οι πολιοϊοί χωρίζονται σε τρεις οροτύπους (πολιοϊούς τύπου 1, 2 και 3) και ανήκουν στο γένος των εντεροϊών, οι οποίοι, με τη σειρά τους κατατάσσονται στην οικογένεια Picornaviridae. Το γενετικό υλικό των Picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας μόριο RNA το οποίο περιβάλλεται από καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το όνομα της συγκεκριμένης οικογένειας ιών προέρχεται από την λατινική λέξη Pico (πολύ μικρό) και τη λέξη RNA η οποία περιγράφει το γενετικό τους υλικό.

Η αρχαιότερη μαρτυρία που αφορά την πολιομυελίτιδα προέρχεται από την αρχαία Αίγυπτο το 1400 π.χ.. Ο πολιοϊός, αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας της πολιομυελίτιδας, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1909 από τους Landsteiner και Popper, σε μια εποχή που πολλές περιοχές του κόσμου μαστίζονταν από επιδημίες πολιομυελίτιδας. Η ανάπτυξη του πολιοϊού σε κυτταροκαλλιέργειες επετεύχθη το 1949 από τον Enders (Enders et al., 1949), θέτοντας παράλληλα τις βάσεις για την δημιουργία εμβολίων κατά της ασθένειας της πολιομυελίτιδας. Το 1955 δημιουργήθηκε το IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine) και το 1962 το OPV (Oral Poliovirus Vaccine). Το OPV αποδείχτηκε εξαιρετικά αποτελεσματικό εμβόλιο, καθώς οδήγησε στις μέρες μας στην σχεδόν οριστική εξάλειψη της πολιομυελίτιδας.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ PICORNA ΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ

Η ταξινόμηση στην οικογένεια των Picorna ιών έχει γίνει με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα αντιγονικά χαρακτηριστικά των μελών της. Η οικογένεια των Picorna ιών περιέχει περίπου 230 διαφορετικούς οροτύπους και χωρίζεται σε 9 γένη. Ανθρώπινη παθογένεια παρουσιάζουν τα γένη των Εντεροϊών (Enterovirus), των Ρινοϊών (Rhinovirus), των Καρδιοϊών (Cardiovirus), των ιών Ηπατίτιδας Α (Hepatovirus) των Parechovirus και των Kobovirus, ενώ τα υπόλοιπα τρία γένη των

Erbovirus, Arphthovirus και Teschovirus δεν παρουσιάζουν παθογένεια σε ζωικούς οργανισμούς (King et al., 2000).

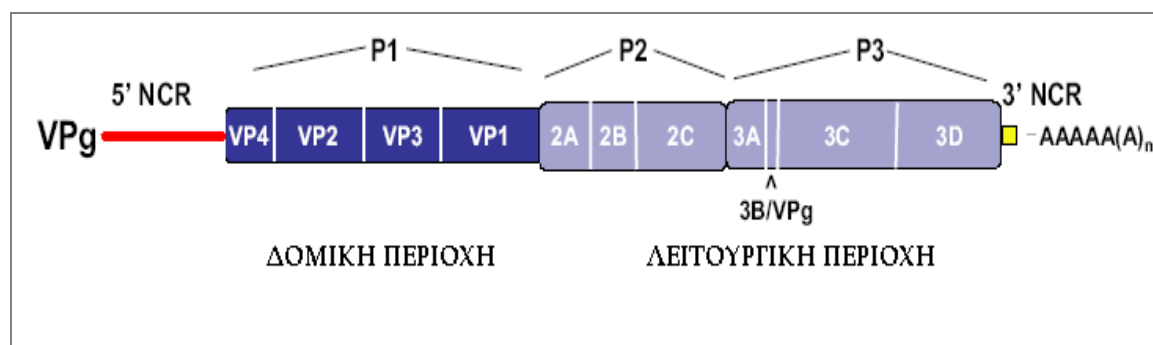
Το γένος των εντεροϊών αποτελείται από περισσότερους από 80 διαφορετικούς οροτύπους οι περισσότεροι από τους οποίους παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Σύμφωνα με την ισχύουσα ταξινόμηση οι εντεροϊοί που παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια χωρίζονται σε πέντε είδη: στο είδος A (HEVA) που περιλαμβάνει τους Coxsackie ιούς A2-A8, A10, A12, A14, A16 και τον εντεροϊό 71. Στο είδος B (HEVB) το οποίο περιλαμβάνει όλους του Coxsackie B ιούς (CBV1-6), όλους τους Echo ιούς (E1-E9, E11-E21, E24-27, E29-33), τον Coxsackie A9 και τους εντεροϊούς 69 και 73. Στο είδος C που περιέχονται αποκλειστικά Coxsackie A ιοί και συγκεκριμένα οι A1, A11, A13, A15, A17-22 και A24. Στο είδος D που περιλαμβάνει τους EV68 και EV70 και τέλος στο είδος των πολιοϊών που περιέχονται οι πολιοϊοί τύπου 1,2 και 3 (Fauquet et al., 2005). Ωστόσο, πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες συστήνουν ότι οι πολιοϊοί θα πρέπει να συμπεριληφθούν στο είδος C των εντεροϊών (Brown et al., 2003).

1.3 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Το γονιδίωμα των πολιοϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας μόριο RNA με μήκος περίπου 7500 βάσεις. Στο 5' άκρο του γονιδιώματος είναι προσδεσμένη η ιική πρωτεΐνη VPg (3B). Το γονιδίωμα των πολιοϊών χωρίζεται στις εξής τέσσερις περιοχές: 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR), ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) και πολυαδενιλωμένη ουρά (poly(A) tract) (Εικόνα 1.1).

Η 5' UTR αποτελείται από 742 νουκλεοτίδια και περιέχει συντηρημένα στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της μετάφρασης και αντιγραφής του ιού. Η περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη 247 kDa, η οποία αποτελείται από 2 περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική. Ύστερα από πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης θα προκύψουν οι τελικές δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και ενδιάμεσες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Fields Virology, 2007). Η 3' UTR αποτελείται από 62 νουκλεοτίδια και στη συγκεκριμένη περιοχή εδράζεται μια χαρακτηριστική RNA δευτεροταγή δομή θηλιάς, η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιικού γενώματος (Jacobson et al., 1993). Η poly(A)tract έχει κατά μέσο όρο μήκος

περίπου 60 νουκλεοτίδια και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και μετάφρασης του ιικού γενώματος (Fields Virology, 2007).



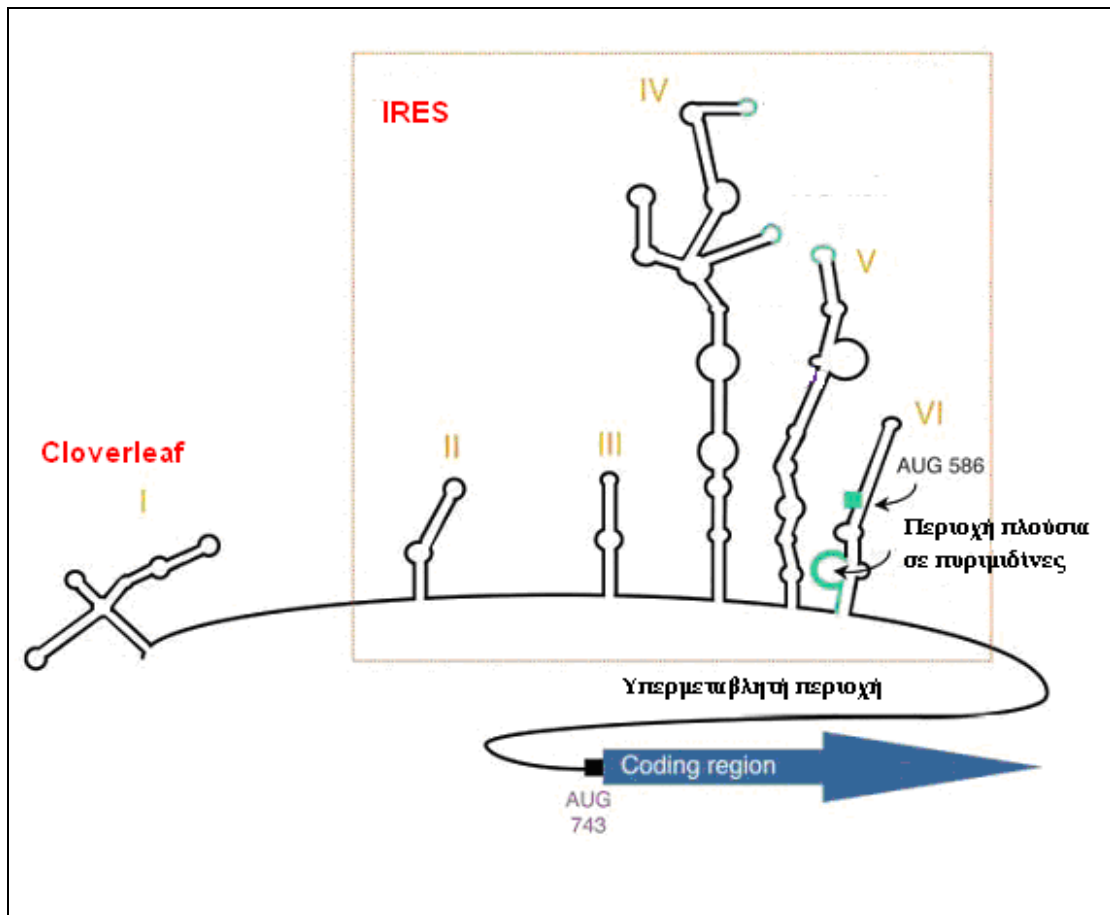
Εικόνα 1.1. Οργάνωση του γονιδιώματος των πολιοϊών.

1.3.1 Η 5' ΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΖΟΜΕΝΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (5' UTR)

Στους πολιοϊούς η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR) αποτελείται από 742 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει 6 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VI). Η 5' UTR χωρίζεται σε 2 περιοχές: στο cloverleaf (δομικό στοιχείο I) και στο Internal ribosome entry site (IRES) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI (Εικόνα 1.2).

Το cloverleaf αποτελείται από 88 νουκλεοτίδια και αποτελείται από 4 δομές μίσχου - θηλιάς τις a, b, c και d. Το cloverleaf διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του ιού σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε με ικές είτε με κοτταρικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, μέσω της πρόσδεσης της κοτταρικής πρωτεΐνης Poly(rC) binding protein 2 (PCBP 2) στο cloverleaf, το ικό RNA σταθεροποιείται. Επίσης επιτυγχάνεται η κυκλοποίηση του ιικού γενώματος, που είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και την αντιγραφή του ιού, μέσω της αλληλεπίδρασης των PCBP2 (προσδεσμένη σε cloverleaf) και της Poly (A) binding protein (PABP) η οποία είναι προσδεσμένη στην poly(A)tract (Herold & Andino, 2001). Το cloverleaf δρα και σαν μοριακός διακόπτης συντονίζοντας τη μετάβαση από τη μετάφραση του ιικού γενώματος στην αντιγραφή. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση μόνο της PCBP2 στο cloverleaf ευνοεί τη μετάφραση του ιικού γενώματος. Ωστόσο η πρόσδεση της ικής πρωτεΐνης 3CD μαζί με την PCBP2 στο cloverleaf, οδηγεί στο σταμάτημα της μετάφρασης και στην έναρξη της αντιγραφής (Gamarnic & Andino, 1998).

Το IRES απαρτίζεται από 5 διακριτά δομικά RNA στοιχεία (II-VI), μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, ένα κωδικόνιο έναρξης AUG, το οποίο είναι σιωπηλό και μία υπερμεταβλητή περιοχή. Η βασική λειτουργία του IRES είναι η προαγωγή της μετάφρασης. Η συγκεκριμένη λειτουργία επιτελείται μέσω της πρόσδεσης των ριβοσωμάτων και των κανονικών παραγόντων μετάφρασης στο εσωτερικό του IRES και της μετακίνησής τους μέχρι το κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης. Εκτός των κανονικών παραγόντων μετάφρασης, στο IRES προσδένονται και αρκετές άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες διεγείρουν την ιική μετάφραση. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εδράζονται στον πυρήνα όπου και εκτελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Ύστερα από την είσοδο του ιού στο κύτταρο παρατηρείται ανακατανομή των πρωτεϊνών αυτών από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, η μετάφραση διεγείρεται από τις La, unρ, PCBP2 και Polyuridylic Tract-Binding protein (PTB). Η PCBP2 προσδένεται στη δομή IV του IRES, ενώ στη συνέχεια προσδένεται στην PCBP2 και ο μεταφραστικός παράγοντας SRp20, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ριβοσώματα. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την «στρατολόγηση» των ριβοσωμάτων στο IRES (Sharma et al., 2004). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες πιστεύεται ότι έχουν ιδιότητα συνοδού μορίου (chaperon) και προσδενόμενες στο IRES το καθοδηγούν να λάβει την διαμόρφωση εκείνη που είναι η ευνοικότερη για την πρόσδεση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (Jackson & Kaminski, 1995).



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής.

1.3.2 ΑΝΟΙΧΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ - ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

Η δομική περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του ιού VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό του ιικού καψιδίου.

1.3.2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΨΙΔΙΟΥ

Το καψίδιο των πολιοϊών είναι σχετικά μικρό ~28nm και είναι ανθεκτικό σε όξινο pH (~3), ιδιότητα που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ιού στο έντερο όπου κυριαρχεί το όξινο περιβάλλον. Το καψίδιο παρουσιάζει εικοσαεδρική συμμετρία και αποτελείται από 60 ασύμμετρα πρωτομερή. Κάθε πρωτομερές αποτελείται από ένα αντίγραφο των καψιδιακών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4. Οι VP1, VP2 και VP3 πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η VP4 στην

εσωτερική (Fields Virology, 2007). Τα πρωτομερή συνδέονται μεταξύ τους γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας και δημιουργούν τα πενταμερή. Μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται οι τριμερείς και διμερείς άξονες συμμετρίας. Δώδεκα πενταμερή συνιστούν ολόκληρο το καψίδιο (Pfister et al., 1999) (Εικόνα 1.3).

1.3.2.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι καψιδιακές πρωτεΐνες διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία. Ωστόσο, οι καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση. Συγκεκριμένα, το κοινό δομικό μοτίβο που παρουσιάζουν είναι ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες καψιδιακές πρωτεΐνες η VP4 φαίνεται να υιοθετεί μια όχι αυστηρά καθορισμένη, περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση (Hogle, 2002).

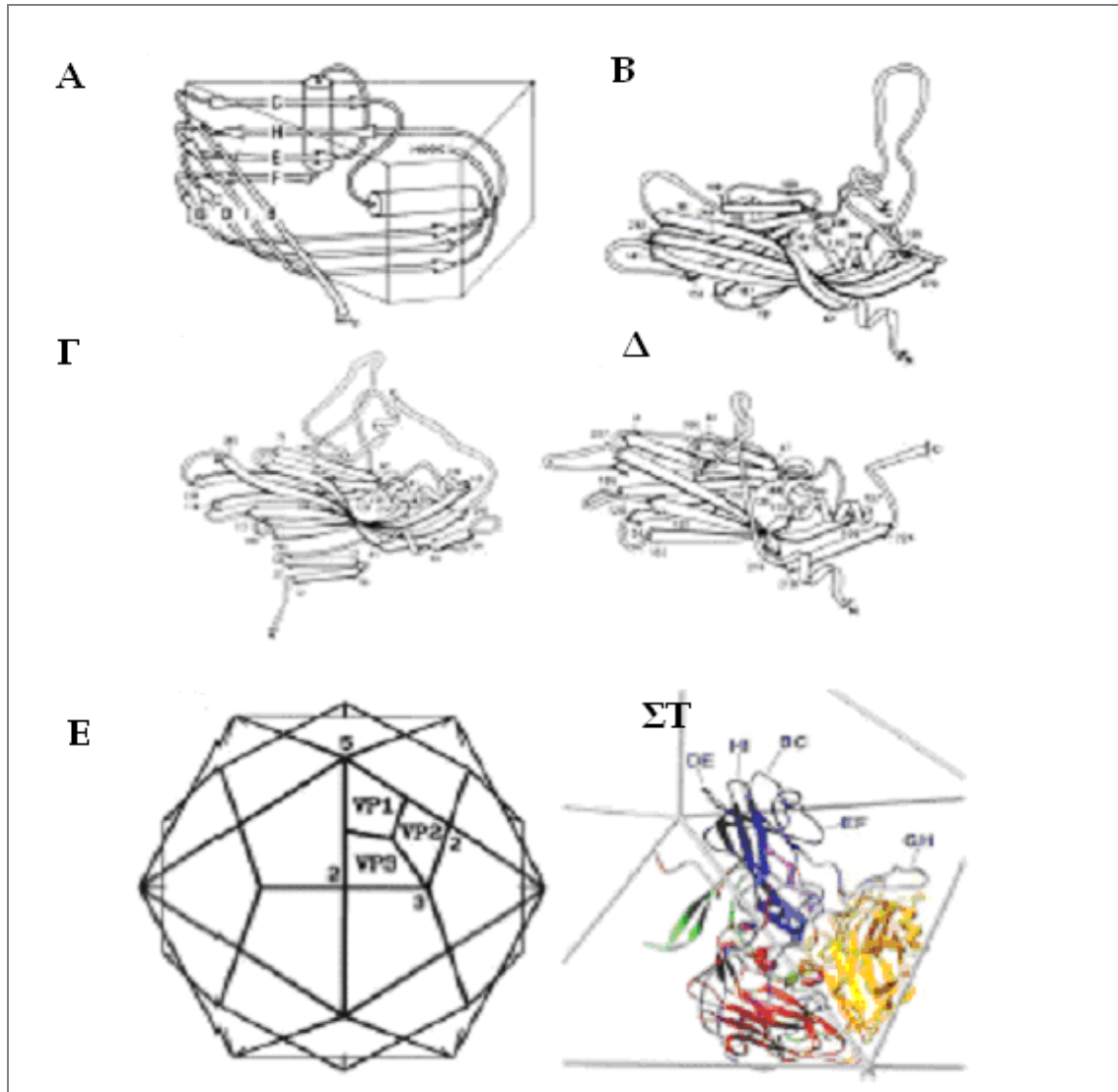
Οι κλώνοι των β-βαρελιών συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε πρωτεΐνη και προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου. Αυτές οι αμινοξικές θηλιές αποτελούν τις κύριες δομές των αντιγονικών θέσεων του ιού (N-Ags). Στους πολιοϊούς έχουν αναγνωριστεί 4 θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων (N-Ags). Συγκεκριμένα στους πολιοϊούς τύπου 1 και 2 η N-AgI αποτελείται από τα αμινοξέα 91-106 της VP1, η N-AgII από τα αμινοξέα 164-168, 168-170, 270 της VP2 και από τα αμινοξέα 221-224 και 226 της VP1, η N-AgIIIa αποτελείται από τα κατάλοιπα 58-60, 71 και 73 της VP3 και η N-AgIIIb από τα αμινοξέα 72 της VP2 και 76 της VP3. Στους πολιοϊούς τύπου 3, η N-AgI αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 89-100 της VP1, η N-AgII από τα αμινοξέα 164, 166-167, 172 της VP2 και από τα αμινοξέα 221-224 και 226 της VP1, η N-AgIIIa περιέχει τα κατάλοιπα 58-60, 71 και 73 της VP3 και 286-290 της VP1, ενώ η N-AgIIIb από τα αμινοξέα 72, 76 της VP2 και 77-79 της VP3 (Minor et al., 1986).

Στο εξωτερικό του καψιδίου γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας εδράζεται μια εκτεταμένη διαμόρφωση αύλακας γνωστή και ως canyon. Η αύλακα σχηματίζεται από αμινοξέα των VP1, VP2 και VP3. Συγκεκριμένα το βόρειο τμήμα της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 91-107 και 166-169 της VP1. Το νότιο τμήμα της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 138-142 και 172 της VP2 και 223-226 της VP1. Το «πάτωμα» της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 228-235 της VP1 και 180 της VP3. Η αύλακα πιστεύεται πως αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του

κυτταρικού υποδοχέα CD155 των πολιοϊών (Colston & Racaniello 1994; Belnap et al., 2000; He et al., 2000).

Στη βάση της αύλακας, στο εσωτερικό του β-βαρελιού της VP1 βρίσκεται ένα λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης, το οποίο πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου (Filman et al., 1989).

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). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται μέσω της δομής ενός β-βαρελιού 7 κλώνων το οποίο συντίθεται από 4 β-κλώνους της δομής β-βαρελιού 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 ιικού RNA (Kirkegaard, 1990).



Εικόνα 1.3. Δομή του καψιδίου του πολιοϊού. Α) Αναπαράσταση του μοτίβου β-sandwich του πυρήνα των VP1, VP2 και VP3. Β-Δ) Αναπαράσταση των VP1, VP2 και VP3 αντίστοιχα όπου φαίνεται ο πυρήνας τους και οι διαφορετικές για κάθε πρωτεΐνη αμινοξικές θηλιές μεταξύ των β- κλώνων. Ε) Διάταξη των VP1, VP2 και VP3 σε σχέση με τους καψιδιακούς άξονες συμμετρίας. ΣΤ) Το ικό πρωτομέρες. Με μπλε η VP1, με κόκκινο η VP3, με κίτρινο η VP2 και με πράσινο η VP4

1.3.3 ΑΝΟΙΧΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

Η λειτουργική περιοχή του γονιδιώματος των πολιοϊών κωδικοποιεί πρωτεΐνες (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) καθώς και λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD), που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές λειτουργίες του ιού. Συγκεκριμένα, εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, στην επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης, στο σταμάτημα των κυτταρικών λειτουργιών, στην αλλαγή διαμόρφωσης των κυτταρικών μεμβρανών και στη δημιουργία κυστιδίων.

1.3.3.1 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 2A

Η ιική πρωτεΐνη 2A ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών της κυστεΐνης, υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ τυροσίνης (Tyr) και γλυκίνης (Gly) και το ενεργό της κέντρο απαρτίζεται από τα κατάλοιπα, ιστιδίνη 20 (His 20), ασπαραγινικό 38 (Asp 38) και κυστεΐνη 109 (Cys 109). Η πρωτεΐνη 2A καταλύει το πρωτεολυτικό κόψιμο μεταξύ των περιοχών P1 και P23 της ιικής πολυπρωτεΐνης (Sommergruber et al., 1989).

Πιστεύεται ότι η 2A τροποποιεί πρωτεολυτικά κάποια κυτταρική πρωτεΐνη η οποία προσδένεται απευθείας στο cloverleaf του ιικού RNA αποτρέποντας την αποδόμηση του από τις ριβονουκλεάσες. Η αύξηση της σταθερότητας του ιικού RNA, με αυτόν τον τρόπο από την 2A, προκαλεί και περαιτέρω διέγερση της ιικής μετάφρασης. Επίσης, το κατάλοιπο 109 και τέσσερα αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (P2-P5) είναι σημαντικά για την ιική αντιγραφή (Jurgens et al., 2006). Επιπροσθέτως, οι Jurgens et al. (2006) παρατήρησαν διέγερση της σύνθεσης του αρνητικού RNA κλώνου από την 2A.

Η 2A αποκόπτει το αμινοτελικό άκρο των παραγόντων eIF4GI και eIF4GII, καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο της PABP (Ventoso et al., 1998) με αποτέλεσμα τη διακοπή της κυτταρικής μετάφρασης. Η διακοπή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης από την 2A έχει ως αποτέλεσμα την μη έκφραση πρωτεϊνών απαραίτητων για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της κασπάσης 3 (Calandria et al., 2004).

1.3.3.2 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 2B

Η πρωτεΐνη 2B αποτελείται από 97 αμινοξέα και δρα σαν πολυμερές. Η υδροφοβική περιοχή που αποτελείται από τα αμινοξέα 46-56 πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό του μορίου που είναι απαραίτητος για την ική αντιγραφή (Cucconati et al., 1998). Η 2B εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi. Η 2B σταματάει τη μεταφορά των γλυκοπρωτεϊνών από το σύμπλεγμα Golgi στην κυτταρική επιφάνεια, προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση των μεμβρανών, τόσο των ενδοκυττάρων όσο και της πλασματικής και αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} και άλλων διοθενών ιόντων. Οι ανωτέρω δράσεις της 2B πιστεύεται ότι οφείλονται στην ικανότητα της να αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών (Madan et al., 2008).

Η πρωτεΐνη 2B μπορεί να ενεργοποιήσει τον αποπτωτικό μηχανισμό με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Η ικανότητα της 2B να αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών οδηγεί στην αύξηση ιόντων Ca^{2+} στο κυταρόπλασμα. Η διατάραξη της ιονικής ισορροπίας του κυττάρου έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης. Επίσης, η 2B προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Τέλος η 2B πρωτεΐνη έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (van Kuppeveld, 1997).

1.3.3.3 ΤΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 2BC

Το λειτουργικό ενδιάμεσο 2BC παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα αύξησης της διαπερατότητας των μεμβρανών σε σχέση με τη 2B. Το 2BC εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και η σημαντικότερή του ιδιότητα είναι ότι προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων στα οποία επιτελείται η ική αντιγραφή. Το 2BC δρα σαν εκκινητικό μόριο, το οποίο προκαλεί αρχικά την πρόσδεση των COPII πρωτεϊνών στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν την κυστιδιοποίηση των μεμβρανών (Rust et al., 2001). Τα κυστιδία που δημιουργούνται δεν συγχωνεύονται με το σύμπλεγμα Golgi όπως τα φυσιολογικά, αλλά συσσωρεύονται στο κυταρόπλασμα και αποτελούν τις τοποθεσίες όπου η ική αντιγραφή λαμβάνει χώρα (Doedens & Kirkegaard 1995).

1.3.3.4 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 2C

Η 2C είναι μια πρωτεΐνη 329 αμινοξέων και 37,5 KDa. Στην κεντρική της περιοχή βρίσκεται ένα μοτίβο πρόσδεσης νουκλεοτιδίου συντηρημένο στην οικογένεια των Picorna ιών καθώς και ένα μοτίβο ελικάσης. Η 2C παρουσιάζει δραστηριότητες υδρόλυσης ATP και GTP. Η 2C βρίσκεται προσδεσμένη σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και η πρόσδεση αυτή διενεργείται κυρίως μέσω της αμινοτελικής (κατάλοιπα 21-54, αμφιπαθική α-έλικα), αλλά και της καρβοξυτελικής περιοχής της σε μικρότερο βαθμό (Teterina et al., 1997; Teterina et al., 2006). Πιστεύεται ότι είτε η πρωτεΐνη 2C είτε η γενωμική περιοχή 2C κατέχουν σημαντικό ρόλο στην καψιδίωση του ιικού RNA. Επίσης η 2C έχει την ικανότητα να 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).

1.3.3.5 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 3A

Η πρωτεΐνη 3A αποτελείται από 87 αμινοξέα και δρα σαν διμερές. Η 3A προσδέεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του υδρόφοβου αμινοτελικού άκρου της που αποτελείται από 22 αμινοξέα (Strauss et al., 2003). Η 3A «στρατολογεί» στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου το σύμπλεγμα πρωτεϊνών GBF1/Arf1 το οποίο επάγει αλλαγές στις μεμβράνες και τον σχηματισμό κυστιδίων αντιγραφής του ιού (Belon et al., 2007). Η 3A σταματάει την πρωτεϊνική κυκλοφορία ενδοπλασματικού δικτύου - Golgi προσδεδεμένη στα LIS1 σύμπλοκα μεταφοράς πρωτεϊνών και καθιλώνοντάς τα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Kondratova 05). Η συγκεκριμένη δράση της 3A έχει και αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα για το κύτταρο καθώς πρωτεϊνικά μόρια όπως οι υποδοχείς των TNF, TRAIL και ιντερφερονών που σχετίζονται με την απόπτωση, δεν φτάνουν ποτέ στην κυτταρική επιφάνεια (Kondratova et al., 2005). Τέλος η αμινοτελική περιοχή της 3A εκτός από τον ρόλο της πρόσδεσης σε μεμβράνες είναι σημαντική και για τη σύνθεση του θετικής πολικότητας κλώνου καθώς και για τη σωστή επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης (Towner et al., 2003).

1.3.3.6 ΤΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 3AB

Η 3AB είναι μια πρωτεΐνη 12 KDa η οποία δρά σαν διμερές. Στο διμερισμό αυτό παίζει σημαντικό ρόλο το αμινοτελικό της άκρο. Η 3AB προσδένεται στις μεμβράνες μέσω της ίδιας υδρόφοβης περιοχής που προσδένεται και η 3A (Strauss et al., 2003). Η 3AB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμογή του αντιγραφικού συμπλέγματος του ιού καθώς αλληλεπιδρά τόσο με την 2BC (2BC, 3AB προσδεδεμένες στα κυστίδια αντιγραφής) όσο και με την ιική πολυμεράση 3D, «στρατολογώντας» την τελευταία στα σύμπλοκα αντιγραφής. Η 3AB διαθέτει ειδικές (σε σύμπλοκο με την 3CD) αλλά και μη ειδικές ικανότητες πρόσδεσης στο RNA (Fujita et al., 2007). Η 3AB προσδένει το λειτουργικό ενδιάμεσο 3CD και διεγείρει την αυτοκατάλυσή του σε 3C και 3D. Ακόμα, η 3AB προσδένει την ιική πολυμεράση 3D μέσω των 101-104 αμινοξέων της, διεγείροντας με αυτόν τον τρόπο τη δραστικότητα επιμήκυνσης της 3D (Fujita et al., 2007). Τέλος, μια ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα της 3AB είναι αυτή του συνοδού μορίου (chaperon). Συγκεκριμένα, η 3AB 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 ενδιαμέσου. Επίσης προάγει και τον ανασυνδυασμό τοποθετώντας ατελώς νεοσυντιθέμενα μόρια σε διαφορετικό καλούπι προκειμένου να ολοκληρωθεί η σύνθεσή τους (DeStefano et al., 2006).

1.3.3.7 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 3B(VPg)

Η πρωτεΐνη VPg αποτελείται από 22 αμινοξέα και βρίσκεται προσδεδεμένη στο 5' άκρο του ιικού γενώματος. Η VPg προσδένεται στο 5' άκρο μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του υδροξυλίου του καταλοιπίου τυροσίνης στη θέση 3 και της φωσφορικής ομάδας της ουρακίλης του ιικού γενώματος. Επίσης η VPg συναντάται με την μορφή VPg_pUpU στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Η ουριδιλιωμένη αυτή μορφή χρησιμοποιείται σαν εκκινητικό μόριο κατά την ιική αντιγραφή (Lyle et al., 2002). Τα αμινοξέα 14, 17 και 20 της VPg παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ουριδιλιώσή της από την 3D ιική πολυμεράση (Schein et al., 2006).

1.3.3.8 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 3C

Η 3C είναι πρωτεάση της κυστεΐνης και υδρολύει δεσμούς μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης. Η 3C αποτελείται από 2 εξακλώνα β-βαρέλια, 4 α-έλικες και ένα εόκαμπτο πεπτιδίο που ενώνει τα 2 β-βαρέλια. Το ενεργό της κέντρο απαρτίζεται από τα αμινοξέα ιστιδίνη 40, γλουταμινικό 71 και κυστεΐνη 147. Η 3C μαζί με το πρόδρομό της μόριο 3CD, είναι υπεύθυνες για την πρωτεολυτική επεξεργασία της ιικής 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 La 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 Polyuridylation Tract Binding Protein (PTB) η οποία προάγει την ιική μετάφραση, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για την εκκίνηση της ιικής αντιγραφής (Back et al., 2002).

1.3.3.9 ΤΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 3CD

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/Arf στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Belov et al., 2007). Επίσης, μέσω του κοψίματος του καρβοξυτελικού άκρου της PCBP2 προκαλεί το τέλος της ιικής μετάφρασης και σηματοδοτεί την εκκίνηση της ιικής 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).

1.3.3.10 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 3D

Η 3D πολυμεράση δομικά μοιάζει με δεξί χέρι και αποτελείται από τις περιοχές του αντίχειρα, της παλάμης και των τεσσάρων δακτύλων (δείκτης, μέσος, παράμεσος και μικρός). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των καταλοίπων φαινυλαλανινών 30 και 34 του δείκτη και των υδροφοβικών περιοχών του αντίχειρα, σταθεροποιούν τη 3D (Hansen et al., 1997). Η 3D δρα σαν πολυμερές και ο ολιγομερισμός της προάγεται από 2 διαφορετικά δίκτυα αλληλεπιδράσεων μεταξύ 2 μορίων 3D, των interface I και II. Το interface I δημιουργείται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πίσω μέρους του αντίχειρα του ενός μορίου και του πίσω μέρους της παλάμης του άλλου μορίου. Το interface I αποτελεί θέση πρόσδεσης για το σύμπλοκο RNA-εκκινητικό μόριο. Το interface II δημιουργείται μεταξύ της κορυφής του αντίχειρα του ενός μορίου και της βάσης των δακτύλων του άλλου μορίου και είναι σημαντικό για την επιμήκυνση (Lyle et al., 2002). Το ενεργό κέντρο της 3D βρίσκεται στην περιοχή της παλάμης και αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 327, ασπαραγινικό 328 και ασπαραγινικό 329. Η πρόσδεση του συμπλόκου 1 (νουκλεοτιδίου- Mg^{2+}) στο σύμπλοκο 2 (3D-εκκινητή) οφείλεται στο τριφωσφορικό τμήμα του νουκλεοτιδίου στο οποίο είναι προσδεδεμένο το Mg^{2+} . Όταν προσδεθεί το σύμπλοκο 1 στο σύμπλοκο 2, το Mg^{2+} αντιδρά με το καταλυτικό κέντρο της 3D και το αναδιοργανώνει για την πρόσδεση ενός ακόμα Mg^{2+} . Με την πρόσδεση του δεύτερου Mg^{2+} συμβαίνει και η κατάλυση (Arnold et al., 2004).

1.3.4 3' ΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΖΟΜΕΝΗ ΠΕΡΙΟΧΗ- ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΚΗ ΟΥΡΑ

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 K περιοχής (Pilipenko et al., 1996) (Εικόνα 1.4). Η αλληλεπίδραση της 3' UTR με το IRES πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιικής μετάφρασης. Έχει αποδειχθεί ότι η 3CD σε σύμπλοκο με την 3AB αλληλεπιδρά με την 3'UTR, ωστόσο ο βιολογικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι γνωστός. Η πρόσδεση κυτταρικών παραγόντων στην 3' UTR φέρνει την poly(A)tail κοντά στην 3D διεγείροντας με αυτόν τον τρόπο την εκκίνηση του κλώνου αρνητικής πολικότητας κατά την ιική αντιγραφή. Ωστόσο, η 3' UTR δεν είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικού

1.4 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CD155 ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο υποδοχέας CD155 των πολιοϊών ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και αποτελείται από τρεις περιοχές, οι οποίες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία καρβοξυτελική κυτταροπλασματική ουρά. Η αμινοτελική εξωτερική περιοχή D1 του υποδοχέα παρουσιάζει δίπλωμα παρόμοιο με αυτό της μεταβλητής περιοχής ανοσοσφαιρινών, ενώ οι υπόλοιπες 2 εξωτερικές περιοχές D2 και D3, παρουσιάζουν δίπλωμα σταθερών περιοχών ανοσοσφαιρίνης. Η αμινοτελική περιοχή του υποδοχέα προσδέεται στην ιική αύλακα κατά την αλληλεπίδραση ιού - υποδοχέα και «προδοτεί» την απελευθέρωση του ιικού RNA. Υπάρχουν 4 ισομορφές του υποδοχέα που είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος από τις οποίες οι 2 είναι προσδεμένες σε μεμβράνες, ενώ οι άλλες 2 είναι εκκρινόμενες από το κύτταρο (Pfister et al., 1999).

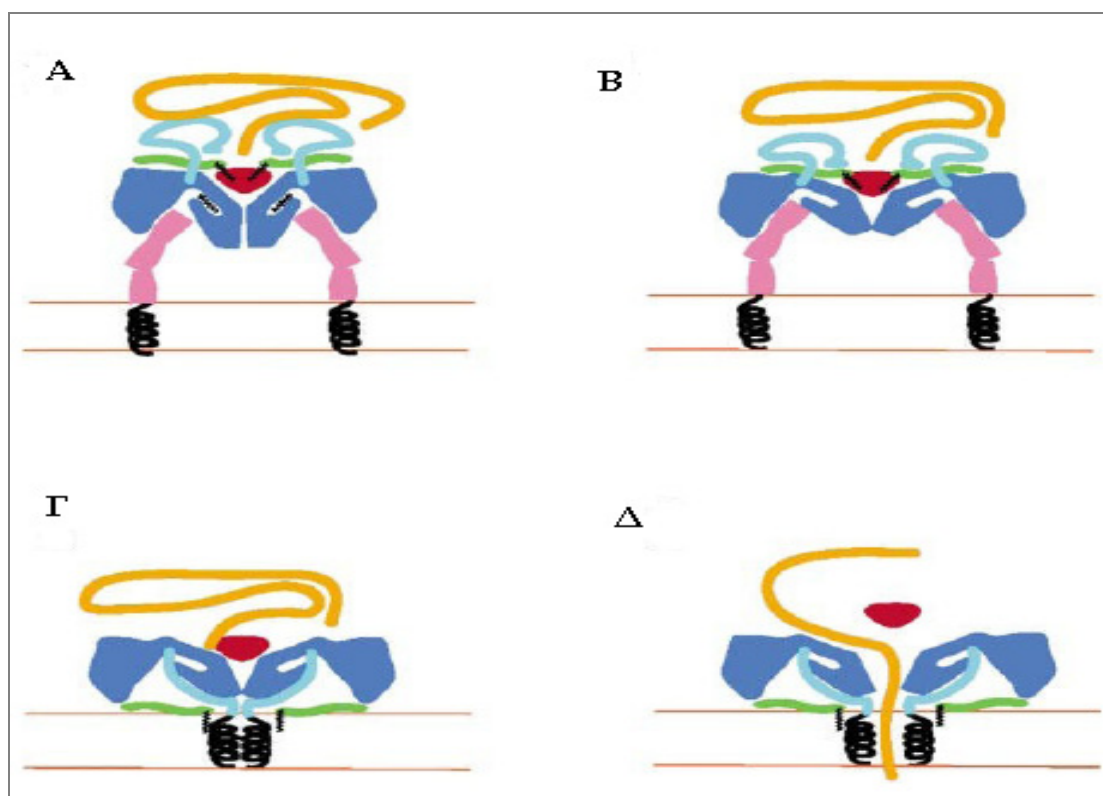
1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών αρχικά περιλαμβάνει την πρόσδεση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα CD155 και την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κύτταρο, τη μετάφραση του ιικού RNA, την αντιγραφή του ιικού RNA και την καψιδίωση που οδηγεί στη δημιουργία νέων ιικών σωματιδίων.

1.5.1 ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΑΙ ΕΙΣΟΔΟΣ ΙΙΚΟΥ RNA ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Η περιοχή D1 του CD155, όπως όλες οι μεταβλητές περιοχές ανοσοσφαιρινών, αποτελείται από 8 β-φύλλα (A έως G) και 2 πρόσθετα β-φύλλα C' και C'', τα οποία βρίσκονται ανάμεσα στα φύλλα C και D (He et al., 2000). Κατά την πρόσδεση του με τον ιό, ο CD155 μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, έρχεται σε επαφή με το νότιο και το βόριο τμήμα, καθώς και με το πάτωμα της αύλακας. Συγκεκριμένα, ο C'' κλώνος του υποδοχέα έρχεται σε επαφή με το νότιο τμήμα της αύλακας, μέσω αλληλεπίδρασης η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του υποδοχέα από τον ιό. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 126 - 135 της FG θηλιάς του υποδοχέα έρχονται σε επαφή με το πάτωμα της αύλακας, ενώ η επιφάνεια C-C'-C'' του CD155 αλληλεπιδρά

με τα αμινοξέα 58-62 της VP3 και τα 294-301 της VP1, υδρόφοβες επαφές οι οποίες σταθεροποιούνται και από ηλεκτροστατικής φύσεως δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων 71 και 90 του υποδοχέα και 62 της VP3 και 298 της VP1 αντίστοιχα. Τέλος, με τη βόρεια πλευρά της αύλακας αλληλεπιδρούν τα D1 κατάλοιπα: 29-31 του βΑ κλώνου, 54 και 55 της BC θηλιάς και το κατάλοιπο 135 του G κλώνου (Colston & Racianello 1994; Harber et al., 1995; Belnap et al., 2000). Η αλληλεπίδραση του CD155 με το βόρειο μέρος της αύλακας οδηγεί στην απελευθέρωση του μορίου σφιγγοσίνης και «προοδοτεί» την είσοδο του ιικού RNA στο κύτταρο (He et al., 2003). Συγκεκριμένα, τα 31 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της VP1 (θεωρείται ότι σχηματίζουν μια αμφιπαθική έλικα) σε συνδιασμό με την VP4, εξέρχονται από την εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου και προσδένονται στις λιποσωμικές μεμβράνες των κυττάρων ξενιστών. Η πρόσδεσή τους στις λιποσωμικές μεμβράνες των κυττάρων οδηγεί στη δημιουργία ενός πόρου-καναλιού, μέσω του οποίου εισέρχεται το ιικό RNA στο κύτταρο (Bubeck et al., 2005) (Εικόνα 1.5).



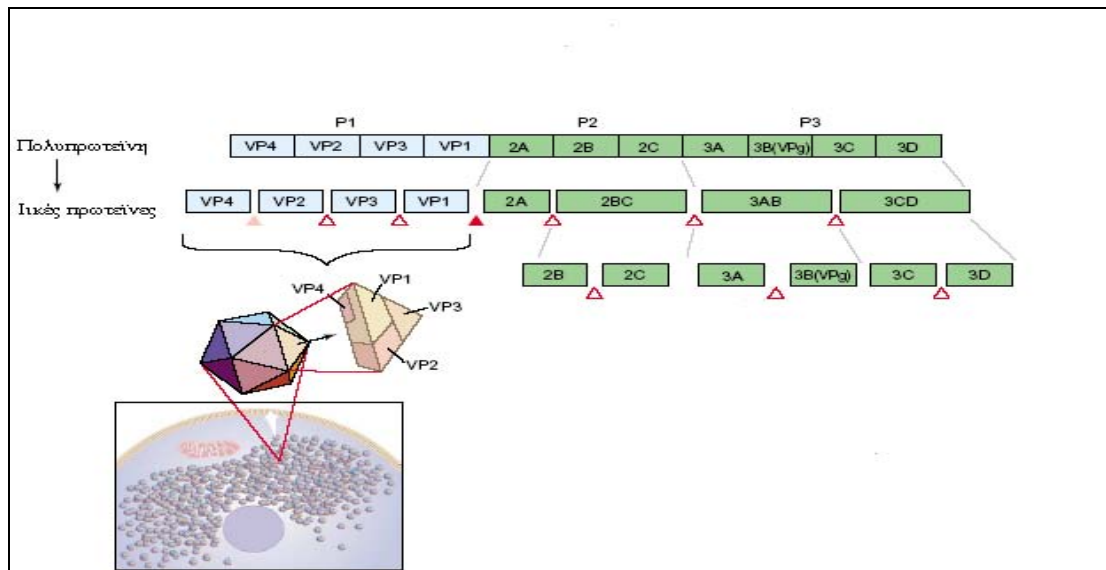
Εικόνα 1.5. Αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα και είσοδος ιικού RNA στο κύτταρο. Ο CD155 απεικονίζεται με ροζ χρώμα, το ιικό πρωτομερές με μπλε, το N-τελικό άκρο της VP1 με κίτρινο, η VP4 με πράσινο, η σφιγγοσίνη με μαύρο και το ιικό RNA με κόκκινο. Α) Αλληλεπίδραση υποδοχέα με την ιική αύλακα. Β) Απελευθέρωση μορίου σφιγγοσίνης. Γ) Έξοδος N-τελικού άκρου VP1 και VP4 και πρόσδεσή τους σε κυτταρικές μεμβράνες. Δ) Δημιουργία καναλιού, είσοδος ιικού RNA στο κύτταρο.

1.5.2 ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA

Για την μετάφραση του ιικού RNA απαιτείται η κυκλοποίηση του ιικού RNA, η οποία επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των PCBP2 και PABP, οι οποίες είναι προσδεμένες στο cloverleaf και στη poly(A)tail αντίστοιχα (Lyons et al., 2001). Επίσης χρειάζονται όλοι οι παράγοντες που συμμετέχουν στην μετάφραση των ευκαρυωτικών mRNA εκτός από τον eIF4E. Αρχικά το C- τελικό τμήμα του eIF4GI (το αμινοτελικό άκρο έχει αφαιρεθεί πρωτεολυτικά από την 2A ιική πρωτεΐνη) προσδένεται στο ιικό RNA και δρα σαν υπόβαθρο για την πρόσδεση των eIF4B και eIF4A μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου eIF4F. Στη συνέχεια η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (40S) σε σύμπλοκο με τους παράγοντες eIF1A, eIF3 και eIF2-GTP-mettRNA προσδένεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F - ιικό RNA, δημιουργώντας το 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο. Το προεναρκτήριο σύμπλοκο κινείται κατά μήκος του IRES μέχρι να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης. Τέλος, προσδένεται η μεγάλη υπομονάδα (60S) του ριβοσώματος δημιουργώντας το ολοκληρωμένο ριβόσωμα που φέρει εις πέρας τη μετάφραση (Prevot et al., 2003).

1.5.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΙΚΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Μετά το πέρας της μετάφρασης παράγεται η ιική πολυπρωτεΐνη η οποία είναι ασταθές μόριο και περιέχει όλες τις ικές πρωτεΐνες. Η πρωτεόλυσή της για την παραγωγή όλων των ικών πρωτεϊνών χωρίζεται σε 3 στάδια. Αρχικά, η 2A αποκόπτει *in cis* μεταξύ των πεπτιδίων P1 και P23, στη συνέχεια η 3C ή το λειτουργικό της ενδιάμεσο 3CD, απελευθερώνουν με πρωτεόλυση όλες τις υπόλοιπες ικές πρωτεΐνες και τέλος η VP0 αποκόπτεται αυτοκαταλυτικά δίνοντας τις VP4 και VP2 (Pfister et al., 1999) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Πρωτεόλυση ιικής πολυπρωτεΐνης. Το γεμάτο κόκκινο τρίγωνο αντιπροσωπεύει το πρωτεολυτικό κόψιμο της 2A, τα χωρίς γέμισμα τρίγωνα αντιπροσωπεύουν τα κοψίματα των 3C, 3CD Τέλος το ροζ τρίγωνο αντιπροσωπεύει το αυτοκαταλυτικό κόψιμο της VP0.

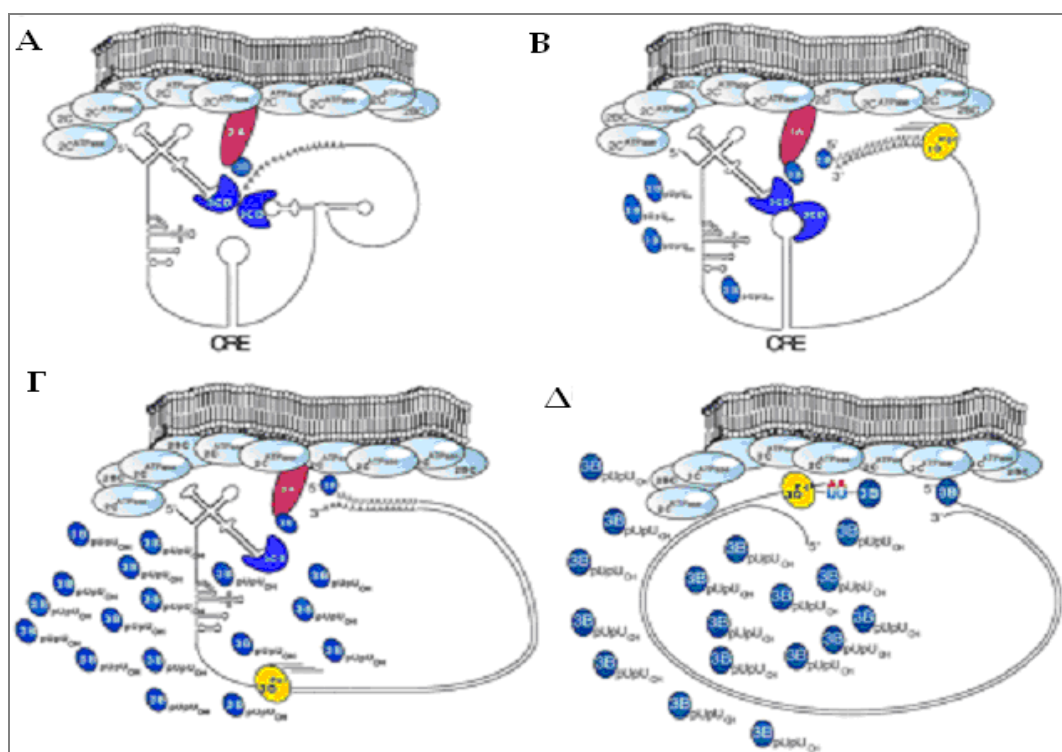
1.5.4 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΙΙΚΟΥ RNA

Οι πολιοϊοί αντιγράφουν το γενετικό τους υλικό όπως όλοι οι RNA ιοί θετικής πολικότητας. Το θετικής πολικότητας γένωμά τους χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση του συμπληρωματικού, αρνητικής πολικότητας κλώνου ο οποίος με τη σειρά του θα χρησιμοποιηθεί σαν καλούπι για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας.

Η ιική αντιγραφή λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Τα σύμπλοκα αντιγραφής δημιουργούνται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των κυστιδίων και περιλαμβάνουν προσδεσμένες στα κυστίδια ιικές πρωτεΐνες (2BC, 2C, 3A, 3AB) οι οποίες λειτουργούν σαν υπόβαθρο για την πρόσδεση της ιικής πολυμεράσης 3D, του ιικού RNA και κυτταρικών παραγόντων, στα σύμπλοκα αντιγραφής (Egger et al., 2002).

Για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου απαιτείται κυκλοποίηση του γενώματος, που επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των PCBP2 και 3CD που είναι προσδεσμένες στο cloverleaf και των PABP, 3CD που είναι συνδεσμένες σε poly(A)tail και 3' UTR αντίστοιχα (Lyons et al., 2001). 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⁺ προσδένονται σε κατάλληλη διαμόρφωση, τέτοια ώστε τα κατάλοιπα 17 και 20 της VPg να καταλύσουν την ουριδιλίωση της VPg σε VPgpU (Schein et al., 2006). Το μόριο VPgpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητήριο μόριο από την 3D για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Μετά το τέλος της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου δημιουργείται ένα δίκλωνο μόριο RNA γνωστό ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου λαμβάνει χώρα η ουριδιλίωση της VPg σε VPgpUpU. Η συγκεκριμένη αντίδραση απαιτεί την πρόσδεση 2 μορίων 3CD στην περιοχή μίσχου του CRE (δομικό RNA στοιχείο στη 2C περιοχή) και την πρόσδεση στο σύμπλοκο της VPg και της 3D. Η 3D χρησιμοποιεί την αλληλουχία 5' AAAC 3' στη θηλιά του CRE σαν καλούπι και ουριδιλώνει την VPg σε VPgpUpU. Το VPgpUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητής για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας (Murray & Barton, 2003) (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7. Ιική αντιγραφή. Α) Οι 3AB και 2 μόρια 3CD βρίσκονται σε επαφή με αποτέλεσμα την αποκοπή της 3B (από 3AB) και την ουριδιλίωσή της ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν εκκινητής στη σύνθεση του αρνητικού κλώνου. Β) Εκκίνηση σύνθεσης αρνητικού κλώνου και ουριδιλίωση 3B από 3D, με καλούπι το CRE, για χρήση της 3B σαν εκκινητή θετικού κλώνου. Γ) Σύνθεση αρνητικού κλώνου. Δ) Εκκίνηση σύνθεσης θετικού κλώνου.

1.5.5 ΚΑΨΙΔΙΩΣΗ ΠΙΚΟΥ RNA

Υστερα από την πρωτεόλυση του δομικού πεπτιδίου P1 από τις 2A και 3C, που οδηγεί στην δημιουργία των VP1, VP3 και VP0, ξεκινάει η διαδικασία δημιουργίας ιικού καψιδίου.

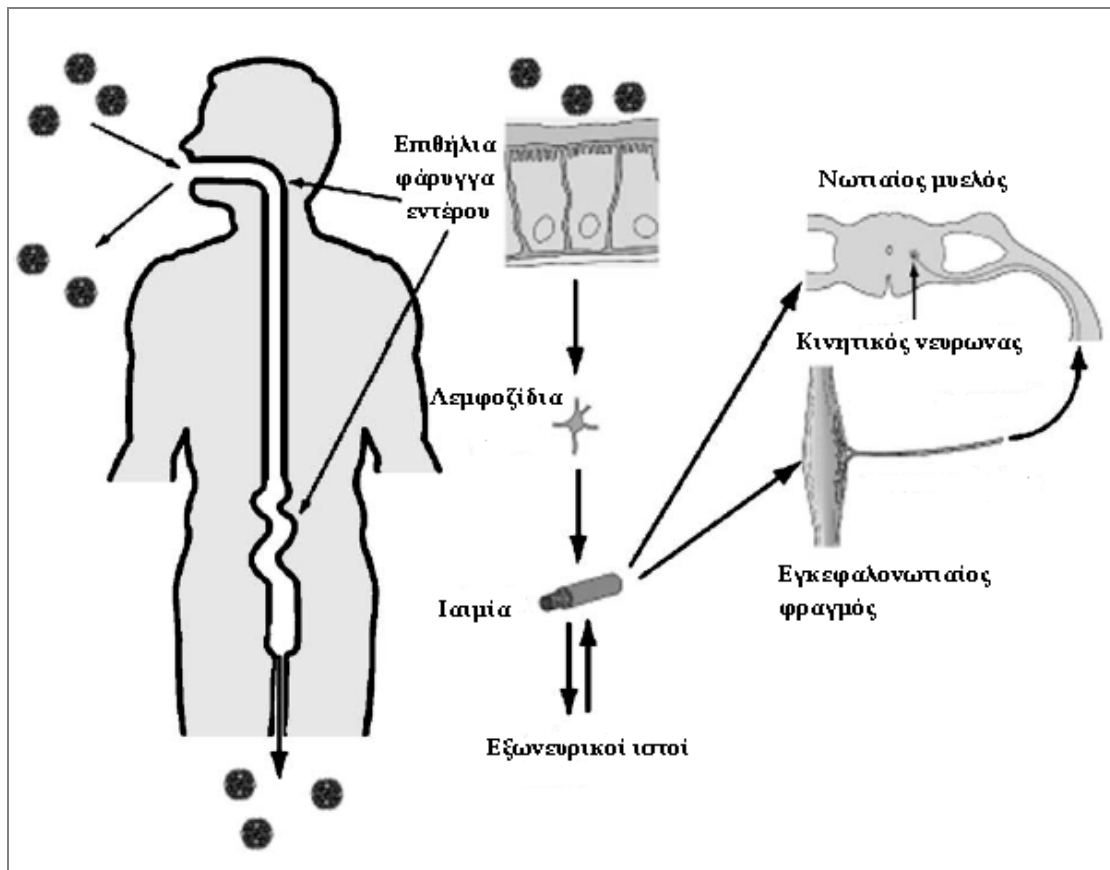
Οι VP1, VP3 και VP0 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν το καψιδιακό 5S πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους οδηγώντας στη δημιουργία του 14S καψιδιακού πενταμερούς (VP0-3-1)₅. Στη συνέχεια δώδεκα πενταμερή αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους οδηγούν στη δημιουργία του 75S άδειου καψιδίου, το οποίο με την είσοδο του RNA μετατρέπεται σε προϊικό σωματίδιο (Ansardi et al., 1994).

Το ιικό σωματίδιο δεν είναι σταθερός σχηματισμός εξαιτίας της έλλειψης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών στο εσωτερικό του καψιδίου. 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).

1.6 ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ

1.6.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ

Αρχικά ο πολιοϊός εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της στοματικής οδού και πολλαπλασιάζεται στα επιθήλια της στοματοφαρυγγικής και εντερικής κοιλότητας. Σε αυτό το στάδιο της μόλυνσης, ο ιός απεκκρίνεται και στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων, γεγονός που είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνο για τη μετάδοσή του. Στη συνέχεια, ο ιός εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται στα λεμφοζύδια του μέσου εντέρου και εισέρχεται στο αίμα προκαλώντας ελαφριάς μορφής αιμία. Η συνέχιση του ιικού πολλαπλασιασμού σε σημεία που δεν ανήκουν στον νευρικό ιστό, όπως λεμφοζύδια και μύες, προκαλεί διατήρηση του επιπέδου αιμίας και αυξάνει 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 (Bodian, 1955; Sabin, 1956) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Παθογένεια πολιομυελίτιδας.

1.6.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Περίπου το 95% των μολύνσεων από πολιοϊούς είναι ασυμπτωματικές. Στο 4-8% των μολύνσεων την αρχική ελαφριά ιαμία θα ακολουθήσει μια μεγαλύτερη ιαμία η οποία είναι χαρακτηριστικό της ανεπιτυχούς πολιομυελίτιδας (abortive poliomyelitis). Αυτή η ασθένεια περιλαμβάνει συμπτώματα όπως πονόλαιμο, πυρετό, διάρροια, μυαλγία, πονοκέφαλο και γενικευμένη κόπωση. Παραλυτική πολιομυελίτιδα θα εμφανιστεί στο 0,1-1% των μολύνσεων. Ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα η ασθένεια χωρίζεται σε 3 κατηγορίες: στη νωτιαία, στη βολβοειδή και στη νωτιαιοβολβοειδή πολιομυελίτιδα. Η νωτιαία πολιομυελίτιδα χαρακτηρίζεται από καταστροφή των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Η βολβοειδής πολιομυελίτιδα χαρακτηρίζεται από παράλυση νευρώνων που ελέγχουν τους μύες των πνευμόνων και η νωτιαιοβολβοειδή χαρακτηρίζεται από συνδυασμό συμπτωμάτων και των δύο ανωτέρω μορφών (Bodian, 1972).

1.6.3 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

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 κοπρο-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).

1.6.4 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Στα μέσα του εικοστού αιώνα οι προσπάθειες για την αντιμετώπιση των επιδημιών πολιομυελίτιδας στράφηκαν προς την παραγωγή εμβολίων εναντίον της ασθένειας. Το πρώτο εμβόλιο που ανακαλύφθηκε το 1955 ήταν το Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV), το οποίο περιείχε αδρανοποιημένα άγριου τύπου ιικά σωματίδια και των τριών οροτύπων των πολιοϊών. Το δεύτερο εμβόλιο που αναπτύχθηκε ήταν το Oral Poliovirus Vaccine (OPV), που περιείχε ζωντανά εξασθενημένα ιικά σωματίδια και των τριών οροτύπων των πολιοϊών (Sabin et al., 1960).

1.6.4.1 ΤΟ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΕΜΒΟΛΙΟ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (IPV)

Το IPV παράγεται ύστερα από αδρανοποίηση με τη χρήση φορμαλδεΰδης και των τριών, άγριου τύπου, στελεχών πολιοϊών. Αρχικά, τα στελέχη Mahoney (πολιοϊός τύπου 1), MEF-1 (πολιοϊός τύπου 2) και Saukett (πολιοϊός τύπου 3) αναπτύσσονται σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από νεφρά πράσινου πιθήκου (T- Vero cells) και στη συνέχεια οι αντιγονικές τους θέσεις τροποποιούνται με φορμαλδεΰδη. Παρά την τροποποίηση τους με φορμαλδεΰδη, οι αντιγονικές θέσεις παραμένουν λειτουργικές με αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσίας στον εμβολιασμένο, αποτρέποντας την προσβολή του ΚΝΣ από τον ιό. Επιπλέον, το IPV είναι ασφαλές εμβόλιο το οποίο είναι κατάλληλο και για άτομα με ανοσοανεπάρκειες. Στα μειονεκτήματα του IPV συγκαταλέγονται η ακριβή τιμή του και το σημαντικότερο, η μη πρόκληση ανοσίας στην περιοχή του εντέρου η οποία αποτελεί και το κύριο σημείο πολλαπλασιασμού

των πολιοϊών. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι ο εμβολιασμένος με IPV δεν διατρέχει κίνδυνο ασθένειας από πολιοϊό, αλλά υπάρχει κίνδυνος πολλαπλασιασμού του ιού για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα στην περιοχή του εντέρου του εμβολιασμένου, με ταυτόχρονη αύξηση της πιθανότητας μετάδοσης του ιού σε μη εμβολιασμένα άτομα (Ferguson et al., 1993).

1.6.4.2 ΤΟ ΕΞΑΣΘΕΝΗΜΕΝΟ ΕΜΒΟΛΙΟ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (OPV)

Το OPV περιέχει 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 στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 προέρχονται από τα νευρομολυσματικά LS-c, P712 και Leon 12 στελέχη αντίστοιχα, τα οποία ύστερα από αρκετά περάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες και λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, απώλεσαν τον νευρομολυσματικό τους φαινότυπο (Kew et al., 2005). 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 άνοσες αποκρίσεις: την χυμική άνοση απόκριση, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον και των τριών οροτύπων του ιού και την επιθηλιακή άνοση απόκριση, που περιλαμβάνει 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 μπορεί να προκαλέσει και ανοσοποίηση μη εμβολιασμένων ατόμων λόγω της έκκρισής του στο περιβάλλον από τα ήδη εμβολιασμένα άτομα.

Το 1988 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ) ξεκίνησε το πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, το οποίο αποσκοπούσε στην εξάλειψη των άγριων στελεχών πολιοϊών παγκοσμίως. Το εμβόλιο που επιλέχθηκε ήταν το OPV λόγω της ισχυρής άνοσης απόκρισης που προκαλεί και λόγω του χαμηλού του κόστους. Η πρωτοβουλία της Π.Ο.Υ είχε θεαματικά αποτελέσματα μειώνοντας τα περιστατικά μόλυνσης από πολιοϊούς από τα 350.000 το 1988 σε 1.874 το 2006 (Kew et al., 2005).

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

1.6.5 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗ ΠΑΡΑΛΥΤΙΚΗ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (V.A.P.P)

Η γενετική αστάθεια αποτελεί το μεγαλύτερο μειονέκτημα του εξασθενημένου εμβολίου OPV. Σε σπάνιες περιπτώσεις κατά τον πολλαπλασιασμό των στελεχών Sabin στο εντερικό επιθήλιο των εμβολιασμένων ατόμων, μπορεί να σημειωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα στελέχη Sabin, οι οποίες σχετίζονται με αναστροφή του εξασθενημένου φαινοτύπου τους και μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της νευρομολυσματικότητάς τους. Τα συγκεκριμένα στελέχη Sabin είναι ικανά να προκαλέσουν εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP).

Για τα Sabin 1 στελέχη, οι καθοριστές εξασθένησης εδράζονται στα νουκλεοτίδια: 480, 935, 2438, 2795 και 2879, ενώ οι καθοριστές θερμοευαισθησίας (ικανότητας του ιού να πολλαπλασιάζεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τη βέλτιστη) στα κατάλοιπα 6203 και 7441. Στα στελέχη Sabin 2 και Sabin 3 οι καθοριστές εξασθένησης εδράζονται στα νουκλεοτίδια: 481, 2908 και 472, 2034, 2493 αντίστοιχα (Bouchard et al., 1995).

1.6.6 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (V.D.P.V)

Ένα εμβολιακό OPV στέλεχος θεωρείται VDPV αν φέρει απόκλιση $\geq 1\%$ στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του από την νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του αντίστοιχου προτύπου OPV στελέχους. Τα VDPV στελέχη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα VDPV στελέχη που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPV), τα κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (cVDPV) και τα αμφιλεγόμενα VDPV (aVDPV). Τα iVDPV προέρχονται από ασθενείς με ανοσοανεπάρκειες Β-κυττάρων και μπορούν να προκαλέσουν παραλυτική νόσο στον ασθενή (Centers for Disease Control and prevention, 2006).

Η αυξημένη ικανότητα μετάδοσης και η αυξημένη ικανότητά τους να προκαλούν πολιομυελίτιδα είναι οι σημαντικότερες ιδιότητες των cVDPV. Η πλειοψηφία των

cVDPV που έχουν απομονωθεί από ασθενείς, έχουν βρεθεί ανασυνδυασμένα με εντεροϊούς της ομάδας C στη μη δομική περιοχή του γενώματός τους. cVDPV στελέχη είναι υπεύθυνα για πολλές επιδημίες πολιομυελίτιδας τα τελευταία χρόνια. Τέτοιες επιδημίες σημειώθηκαν στις Φιλιπίνες το 2000-2001, στην Αϊτή το 2001, στη Μαγαδασκάρη το 2002 και στην Κίνα το 2004 (Kew et al., 2002; Rousset et al., 2003; Shimizu et al., 2004; Liang et al., 2006). Τα aVDPV στελέχη απομονώνονται είτε από ασθενείς χωρίς ανοσοανεπάρκειες είτε από τα περιβάλλον, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η προέλευσή τους (Centers for Disease Control and prevention, 2006).

1.7 Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Οι πολιοϊοί συγκαταλέγονται στους περισσότερο ταχέως εξελισσόμενους ιούς. Οι υψηλοί ρυθμοί εξέλιξής τους αποτυπώνονται μέσω του όρου *quasispecies* (σχεδόν είδη), ο οποίος αναφέρεται στους ταχέως εξελισσόμενους πληθυσμούς πολιοϊών. Συγκεκριμένα, 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 ικός πληθυσμός και όχι το ιικό στέλεχος. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη των πολιοϊών είναι οι μεταλλάξεις και οι ανασυνδυασμοί (Holland et al., 1992).

1.7.1 ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥΣ

Οι μεταλλάξεις είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στους πολιοϊούς και οφείλονται στην έλλειψη επιδιορθωτικής ικανότητας της ιικής πολυμεράσης. Ειδικότερα, ο ρυθμός λάθους της ιικής πολυμεράσης είναι $4,5 \times 10^{-4}$, κάτι που πρακτικά οδηγεί στην ενσωμάτωση 1 λάθους νουκλεοτιδίου ανά 2222 βάσεις (Rodriguez-Wells et al., 2001).

Ο Gavrilin (2000) ανέπτυξε ένα μοντέλο σχετικά με την καθιέρωση των μεταλλάξεων στους πληθυσμούς των πολιοϊών. Αρχικά στα λεμφοζύδια του εντέρου όπου συμβαίνει ο ικός πολλαπλασιασμός, σε μικρού μεγέθους ιικούς 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).

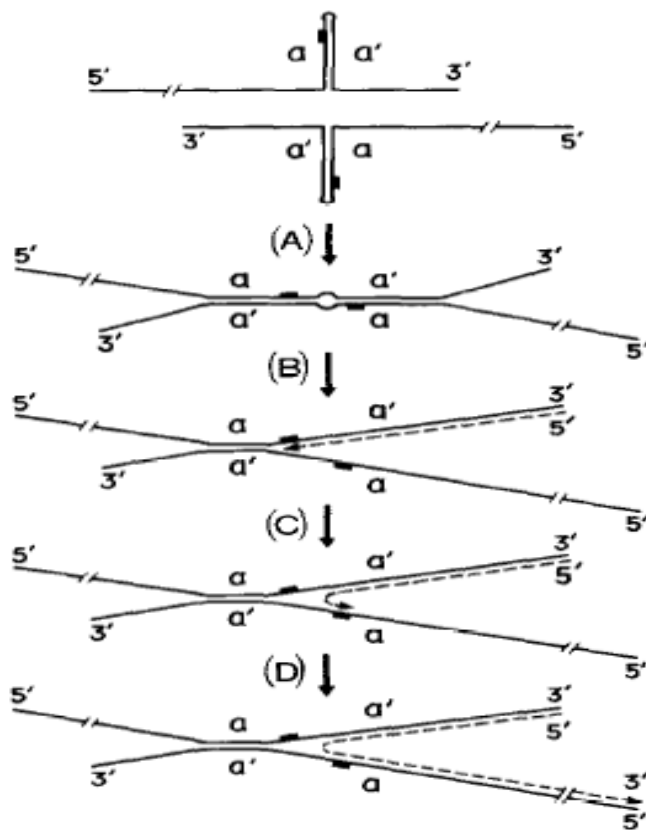
1.7.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥΣ

Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί μηχανισμοί ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard & Baltimore 1986) και 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. Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς (Εικόνα 1.9) (Romanova et al., 1986, King et al., 1988).

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 H₂O 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 ανασυνδιαζόμενο 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).



Εικόνα 1.9 Ο μηχανισμός ανασυνδιασμού στους πολιοϊούς κατά Romanova et al., 1986

1.7.3 ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΙ ΜΕΤΑΞΥ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

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 αντιγραφής, 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). Ανασυνδυασμένα εμβολιακά στελέχη έχουν απομονωθεί τόσο από υγιείς εμβολιασμένους όσο και από ασθενείς με V.A.P.P. Ο διατυπικός ανασυνδυασμός παρατηρείται με μεγάλη συχνότητα στο μη δομικό μέρος του γονιδιώματος των εμβολιακών στελεχών και συγκεκριμένα στις περιοχές 2C και 3D (Georgoroulou & Markoulatos, 2000; Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006; Paximadi et al., 2007). Οι διατυπικοί ανασυνδυασμοί στην καψιδιακή περιοχή είναι ένα πολύ σπάνιο γεγονός και έχουν αναφερθεί ελάχιστες περιπτώσεις (Martin et al., 2002; Blomqvist et al., 2003; Dedepsidis et al., 2008). Έχει παρατηρηθεί ότι στη 2C γενωμική περιοχή συναντώνται, 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).

Ωστόσο το γεγονός της εντόπισης συγκεκριμένων τύπων ανασυνδυασμών σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος παραμένει ανεξήγητο. Έχει προταθεί ότι δευτεροταγείς RNA δομές στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές είναι υπεύθυνες για την προαγωγή του συγκεκριμένου φαινομένου (Georgoroulou & Markoulatos, 2000; Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006).

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διαλεύκανση της σχέσης που μπορεί να συνδέει την εντόπιση συγκεκριμένων τύπων ανασυνδυασμών σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος (περιοχές 2C και 3D), με τις δευτεροταγείς RNA δομές που εδράζονται στις εν λόγω περιοχές των εμβολιακών στελεχών πολιοϊών.

Αρχικά θα μελετηθούν κλινικά δείγματα στις γενωμικές περιοχές 2C και 3D για την ύπαρξη ανασυνδυασμών. Επίσης, θα μελετηθεί η VP1 περιοχή κλινικών δειγμάτων τόσο για την ύπαρξη ανασυνδυασμών όσο και για την ύπαρξη μεταλλάξεων.

Στη συνέχεια με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής θα επιχειρηθεί η δημιουργία μοντέλων για τις δευτεροταγείς RNA δομές των 2C και 3D περιοχών. Η κατασκευή των δευτεροταγών δομών θα συνδράμει στην κατανόηση της σχέσης που μπορεί να συνδέει τη μεγάλη συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων ανασυνδυασμών στις συγκεκριμένες περιοχές του ιικού γονιδιώματος, με τις δευτεροταγείς δομές που εδράζονται σε αυτές τις περιοχές.

Τέλος θα επιχειρηθεί η δημιουργία ενός *in vitro* μοντέλου παραγωγής ανασυνδυασμένων εμβολιακών στελεχών πολιοϊών. Με αυτόν τον τρόπο θα γίνει προσπάθεια σύγκρισης των αποτελεσμάτων που αφορούν τη σχέση ανασυνδυασμών και δευτεροταγών δομών στα κλινικά δείγματα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που θα προκύψουν από το *in vitro* μοντέλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 ελήφθησαν από το NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom). Τα πρότυπα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Οι αλληλουχίες των Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3, πρότυπων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία, έχουν κωδικούς καταχώρησης στην παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών (GenBank) AY184219, AY184220 και AY184221 αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες των προτύπων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση μεταλλάξεων και ανασυνδιασμών, καθώς και για την κατασκευή των μοντέλων των δευτεροταγών RNA δομών.

2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διατριβή χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (α) στα στελέχη που μελετήθηκαν για μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς στη VP1 περιοχή (Πίνακας 2.1), (β) στα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν για ανασυνδυασμούς στις 2C και 3D περιοχές (Πίνακας 2.2) και (γ) στα στελέχη που προέρχονται από προηγούμενες εργασίες και χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των σημείων ανασυνδυασμών τους, στα μοντέλα των δευτεροταγών RNA δομών (Πίνακας 2.3).

Τα στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για ανίχνευση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών στη VP1 περιοχή καθώς και τα στελέχη που μελετήθηκαν για ανασυνδυασμούς στις 2C και 3D περιοχές τους, προέρχονται από το τμήμα Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur και απομονώθηκαν κατά την περίοδο 1978-2002, είτε από κόπρανα εμβολιασμένων απόμων, είτε από το περιβάλλον. Τα στελέχη 7/b/97 και K/2002 εξαιτίας των εξαιρετικά ενδιαφερόντων ευρημάτων στη VP1 περιοχή τους, αλληλουχήθηκαν σε ολόκληρο το γένωμά τους. Τα στελέχη που

χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των σημείων ανασυνδυασμού τους, στα μοντέλα δευτεροταγών δομών RNA των περιοχών 2C και 3D, προέρχονται από προηγούμενες δημοσιεύσεις (Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Karakasiliotis et al., 2005; Paximadi et al., 2006; Paximadi et al., 2007a; Paximadi et al., 2007b) και έχουν απομονωθεί από κόπρανά εμβολιασμένων ατόμων και από το περιβάλλον.

Στους πίνακες που παραθέτονται περιλαμβάνονται πληροφορίες που αφορούν τον ορότυπο των στελεχών, την προέλευση των στελεχών, τις κλινικές εκδηλώσεις που παρουσίαζαν τα άτομα από τα κόπρανά των οποίων απομονώθηκαν τα στελέχη, την χρονολογία απομόνωσής τους, καθώς και τον αριθμό καταχώρησής τους στην παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών.

Πίνακας 2.1. Δείγματα που μελετήθηκαν για ανασυνδυασμούς και μεταλλάξεις στη VP1 περιοχή. Για τα δείγματα B1-B15 οι κωδικοί καταχώρησης στην Genbank αναφέρονται στην VP1 περιοχή, ενώ για τα δείγματα 7/b/97 και K/2002 οι κωδικοί καταχώρησης στην GenBank αναφέρονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα

Στέλεχος	Ορότυπος εμβολιακού στελέχους	Κλινικές εκδηλώσεις	Πηγή προέλευσης	Έτος απομόνωσης	Κωδικός καταχώρησης GenBank
B1	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945784
B2	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945785
B3	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945786
B4	Polio 1	Λευχαιμία	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	2001	AY945787
B5	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1985	AY945788
B6	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1981	AY945789
B7	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1986	AY945790
B8	Polio 2	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1986	AY945791
B9	Polio 2	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1994	AY945792
B10	Polio 2	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945793
B11	Polio 2	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1986	AY945794
B12	Polio 2	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1985	AY945795
B13	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945796
B14	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945797
B15	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	AY945798
7/b/97	Polio 1	-	Λύματα - Αττική	1997	EF456706
K/2002	Polio 3	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	2002	EF456707

Πίνακας 2.2. Δείγματα που μελετήθηκαν για ανασυνδυασμούς στις 2C και 3D περιοχές. Κωδικοί καταχώρησης υπάρχουν μόνο για τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν ανασυνδυασμοί

Δείγμα	Ορότυπος εμβολιακού στελέχους	Κλινικές εκδηλώσεις	Πηγή προέλευσης	Έτος απομόνωσης	Κωδικός καταχώρησης Genbank
C1	Polio 2	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	-
C2	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	-
C3	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	-
C4	Polio 1	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	-
C5	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	-
C6	Polio 3	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	EU598487
C7	Polio 1	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	EU598488
C8	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	-
C9	Polio 3	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978- 1985	EU598486

Πίνακας 2.3. Ανασυνδυασμένα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των σημείων ανασυνδυασμών τους στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών στις 2C και 3D περιοχές. Για τα στελέχη D1- D23 δεν υπάρχουν αριθμοί καταχώρησης στη GenBank καθώς το 2001 δεν ήταν απαραίτητοι για τη δημοσίευση των αλληλουχιών

Δείγμα	Ορότυπος εμβολιακού στελέχους	Κλινικές εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδιασμού/ Σημείο ανασυνδιασμού	Δημοσίευση	Κωδικός πρόσβασης GenBank
6579 (IF)	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6246-6281	Karakasiliotis et al. 2004	AY297764, AY297760
(IM)	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S2 4511-4527, 3D S2/S1 6229-6236	Karakasiliotis et al. 2004	AY297758, AY297759
5749 (I34)	Polio 2	V.A.P.P	2C S2/S1 4985-5000, 3D S1/S2 5995-6004 3D S2/S1 6388-6389	Karakasiliotis et al. 2005	AY830709, AY830710
415 (EP6)	Polio 2	V.A.P.P	3D S2/S1 6363- 6372	Paximadi et al. 2006	AY736177
730 (EP12)	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6338-6363	Paximadi et al. 2006	AY736179
744 (EP16)	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4892-4914	Paximadi et al. 2006	AY736180
8029 (EP23)	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S1 4878-4887	Paximadi et al. 2006	AY736181
581 (EPA)	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6589-6598	Paximadi et al. 2007a	AY738635
590 (EPB)	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6589-6598	Paximadi et al. 2007a	AY738636
591 (EPC)	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6526-6550	Paximadi et al. 2007a	AY738637
(LK3)	Polio 3	- / (Λύματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4766-4791 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2007b	DQ150697
(LK6)	Polio 3	- / (Λύματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2007b	DQ150698
(LK10)	Polio 3	- / (Λύματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2007b	DQ150699
(ENP5)	Polio 2	- / (Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6679-6692	Paximadi et al. 2007b	AY820970
(ENP6)	Polio 2	- / (Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6337-6362	Paximadi et al. 2007b	AY820971
(ENP7)	Polio 2	- / (Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S3 6549-6553	Paximadi et al. 2007b	AY820972
(ENP8)	Polio 2	- / (Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6790-6794	Paximadi et al. 2007b	AY820973
D1	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4505-4509	Cuervo et al. 2001	-
D2	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4511-4527	Cuervo et al. 2001	-
D3	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4511-4527	Cuervo et al. 2001	-
D4	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4532-4533	Cuervo et al. 2001	-
D5	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4556-4575	Cuervo et al. 2001	-
D6	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4715-4719	Cuervo et al. 2001	-
D7	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4766-4791	Cuervo et al. 2001	-
D8	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4859-4863	Cuervo et al. 2001	-
D9	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4892-4914	Cuervo et al. 2001	-
D10	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6337-6362	Cuervo et al. 2001	-
D11	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6388-6389	Cuervo et al. 2001	-
D12	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6463-6470	Cuervo et al. 2001	-
D13	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6658-6671	Cuervo et al. 2001	-
D14	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6658-6671	Cuervo et al. 2001	-
D15	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6673-6677	Cuervo et al. 2001	-
D16	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6736-6743	Cuervo et al. 2001	-
D17	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6853-6863	Cuervo et al. 2001	-
D18	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6865-6893	Cuervo et al. 2001	-
D19	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6952-6995	Cuervo et al. 2001	-
D20	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S3 6529-6533	Cuervo et al. 2001	-
D21	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S3 6598-6607	Cuervo et al. 2001	-
D22	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S3 6835-6857	Cuervo et al. 2001	-
D23	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S3 6859-6863	Cuervo et al. 2001	-

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

2.2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΚΟΠΡΑΝΑ

Η πλειοψηφία των δειγμάτων στους πίνακες 2.1 και 2.2 προέρχεται από κόπρανα εμβολιασμένων ατόμων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επεξεργασία των κοπράνων, πριν ενοφθαλμιστούν σε κυτταροκαλλιέργειες, ήταν η προτεινόμενη από την Π.Ο.Υ..

Η επεξεργασία των κοπράνων πραγματοποιείται σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2). Αρχικά, σε κάθε πλαστικό σωλήνα των 15 ml (τύπου falcon) προστίθενται 10 ml πλήρους PBS με αντιβιοτικά, 1 ml χλωροφόρμιο, 1 gr γυάλινα σφαιρίδια και περίπου 2 gr κόπρανα (σε κάθε σωλήνα εισάγεται διαφορετικό δείγμα κοπράνων). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για περίπου 20 min, μέχρι να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο του σωλήνα. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωλήνων για 20 min, στις 1500 g, στους 20°C. Το υπερκείμενο μοιράζεται σε 2 σωλήνες από τους οποίους ο ένας αποθηκεύεται στους -20°C, ενώ ο άλλος στους +4°C για ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργειες (WHO polio laboratory manual, 2004).

Διαλύματα :

Το πλήρες PBS με αντιβιοτικά αποτελείται από τα διαλύματα Α, Β, Γ και αντιβιοτικά.

Διάλυμα Α (ατελές PBS): 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,91 gr Na₂HPO₄ (άνυδρο) και 0,12 gr KH₂PO₄ (Merck, Germany), διαλύονται σε 600-800ml αποιονισμένου νερού. Ακολουθεί προσθήκη αποιονισμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 1000ml. Το μείγμα αποστειρώνεται σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

Διάλυμα Β: 0,1 gr MgCl₂.6H₂O (Merck, Germany) διαλύεται σε 100 ml αποιονισμένο νερό. Το μείγμα αποστειρώνεται σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

Διάλυμα Γ: 0,1 gr CaCl₂ (Merck, Germany) διαλύονται σε 100 ml αποιονισμένο νερό. Το μείγμα αποστειρώνεται σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

Στη συνέχεια τα διαλύματα Α, Β, Γ αναμειγνύονται σε αναλογία 8:1:1 αντίστοιχα ώστε να προκύψει πλήρες PBS. Με προσθήκη 1x10⁵ units πενικιλίνης (Gibco, USA) και 0,1 gr στρεπτομυκίνης (Gibco, USA) σε 1000 ml πλήρους PBS, προκύπτει πλήρες PBS με τελική συγκέντρωση πενικιλίνης 100units/ml και στρεπτομυκίνης 100μg/ml.

2.2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Για την επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος διαχωρισμού 2 φάσεων. 1000 ml δειγματος φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 g για 10 min. Το ίζημα κρατήθηκε στους 4 °C και το pH του υπερκείμενου προσαρμόστηκε στο 7,2. Σε 500 ml υπερκείμενου προστέθηκαν 39,5 ml 22% (w/v) dextran, 287 ml 29% (w/v) PEG6000 και 35 ml NaCl 5N (Sigma, USA). Το μείγμα αναδεύτηκε για 1 h στους 4°C και στη συνέχεια εισήχθη σε φιάλη διαχωρισμού, όπου και επώαστηκε στους 4°C για 18 h. Η κάτω φάση συλλέχθηκε σε πλαστικό σωλήνα των 50 ml στον οποίο ήδη βρισκόταν το ίζημα από το αρχικό στάδιο. Ακολούθησε προσθήκη χλωροφορμίου 20% v/v, ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 1500 g για 20 min. Η πάνω φάση συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε άλλο πλαστικό σωλήνα, στον οποίο προστέθηκαν πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/ml και 100μg/ml (WHO environmental guidelines for polio surveillance, 2004).

2.2.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την απομόνωση των ιικών στελεχών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Hep-2 (Human epidermoid carcinoma) η οποία είναι μια από τις προτεινόμενες από την Π.Ο.Υ. κυτταρικές σειρές. Όλες οι διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο βιολογικής προστασίας επιπέδου 2. Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το μέσο καλλιέργειας για ανάπτυξη (Growth Medium, GM), ενώ για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το μέσο καλλιέργειας για διατήρηση (Maintenance medium, MM). Η ανάπτυξη των Hep-2 κυττάρων επιτυγχάνεται στους 37°C σε ειδικό κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών. Τα Hep-2 κύτταρα αναπτύσσονται προσκολλώμενα στην εσωτερική επιφάνεια ειδικών πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιέργειας.

Για τον αναδιπλασιασμό των κυττάρων πραγματοποιούνται 2 διαδοχικές επώσεις διάρκειας 30 sec με διάλυμα τρυψίνης-EDTA και επώαση 2 min στους 37°C. Αφού διαπιστωθεί, μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου, η αποκόλληση των κυττάρων προστίθενται στην πλαστική φιάλη 21 ml μέσου καλλιέργειας και ακολουθεί το μοίρασμα των κυττάρων σε 3 πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται για ανάπτυξη στους 37°C.

Διαλύματα :

Ερυθρό της φαινόλης (Phenol red) : Αποτελεί δείκτη pH. Δημιουργία διαλύματος 0,4% w/v (Merck, Germany) σε απιονισμένο νερό. Αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

NaHCO₃ 7,5% : Προσθήκη 7,5 gr NaHCO₃ (Sigma, USA) σε 50 ml απιονισμένο νερό. Προστίθενται 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4% w/v και απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης : 1x10⁶ units πενικιλίνης και 1 gr στρεπτομυκίνης διαλύονται σε 100 ml PBS. Αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος.

Growth Medium (Eagle's), GM : Για 100 ml Eagle's Growth Medium χρειάζονται 83,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earl's salts base, no bicarbonate) (Sigma, USA), 1 ml L-glutamine (200mM) (Gibco, USA), 10 ml Fetal Calf Serum (Sigma, USA), 3,5 ml διάλυμα NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M (Merck, Germany), 1 ml διάλυμα πενικιλίνης στρεπτομυκίνης, 0,2 ml διαλύματος 0,4% ερυθρό της φαινόλης.

Maintenance Medium (Eagle's), MM : Για 100 ml Eagle's Maintenance Medium χρειάζονται 90,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earl's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine (200mM), 2 ml Fetal Calf Serum, 4,5 ml διάλυμα NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1 ml διάλυμα πενικιλίνης στρεπτομυκίνης, 0,2 ml διαλύματος 0,4% ερυθρό της φαινόλης.

Διάλυμα τρυψίνης : 1 gr Difco 1:250 trypsin διαλύεται σε 400 ml ατελούς PBS και ακολουθεί ήπια ανάδευση στους 36°C για 30 min. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος.

Διάλυμα EDTA : 0,1 gr EDTA (Sigma, Germany) διαλύονται σε 10 ml απιονισμένο νερό. Αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi για 15 min. Κατά τη χρήση, 0,4 ml του διαλύματος προστίθενται σε 20 ml ατελούς PBS προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 0,02%.

2.2.4 ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

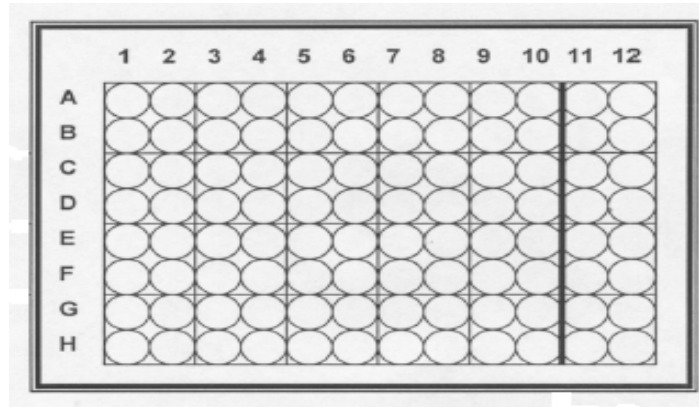
Περίπου 200 μl είτε από το υπερκείμενο που προέκυψε κατά την επεξεργασία των κοπράνων, είτε από την πάνω φάση, η οποία συλλέχθηκε κατά την επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων, ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες Hep-2 κυττάρων οι οποίες περιείχαν 5 ml MM (maintenance medium). Οι πλαστικές φιάλες

μεταφέρθηκαν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C όπου παρέμειναν για 2-3 μέρες. Οι πλαστικές φιάλες εξετάζονταν καθημερινά, μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου, για την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Αφού παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση οι πλαστικές φιάλες αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα πρότυπα στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.

2.2.5 ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Μετά τον ενοφθαλμισμό των ιικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες ενδεχομένως να υπάρχουν μείγματα διαφορετικών ιικών γονότυπων. Προκειμένου να διαχωριστούν τα εν λόγω μείγματα και να απομονωθεί το στέλεχος εκείνο που βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση μέσα στα μείγματα, ακολουθήσαμε την διαδικασία των σειριακών αραιώσεων.

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) σε κάθε θέση. Για κάθε δείγμα, σε 9 πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (erpendorf) τοποθετήθηκαν 900μl MM. Στη συνέχεια, 100 μl από κάθε ιικό δείγμα ενοφθαλμίστηκαν στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10⁻¹ αραιώση του ιικού δείγματος. 100 μl από την 10⁻¹ αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10⁻² αραιώση του ιικού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι να δημιουργηθεί η 10⁻¹⁰ αραιώση του ιικού δείγματος. Στη συνέχεια, 100 μl από τους πλαστικούς σωλήνες που αντιπροσωπεύουν τις αραιώσεις από 10⁻¹ μέχρι 10⁻¹⁰ ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις A1 με A10 αντίστοιχα. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις 8 ιικών δειγμάτων. Οι στήλες 11 και 12 αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 37°C για επώαση. Η χαμηλότερη αραιώση κάθε δείγματος στην οποία παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση ενοφθαλμίστηκε σε πλαστική φιάλη κυττάρων Hep-2. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε το απόθεμα (stock) των ιικών στελεχών.



Εικόνα 2.1. Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων.

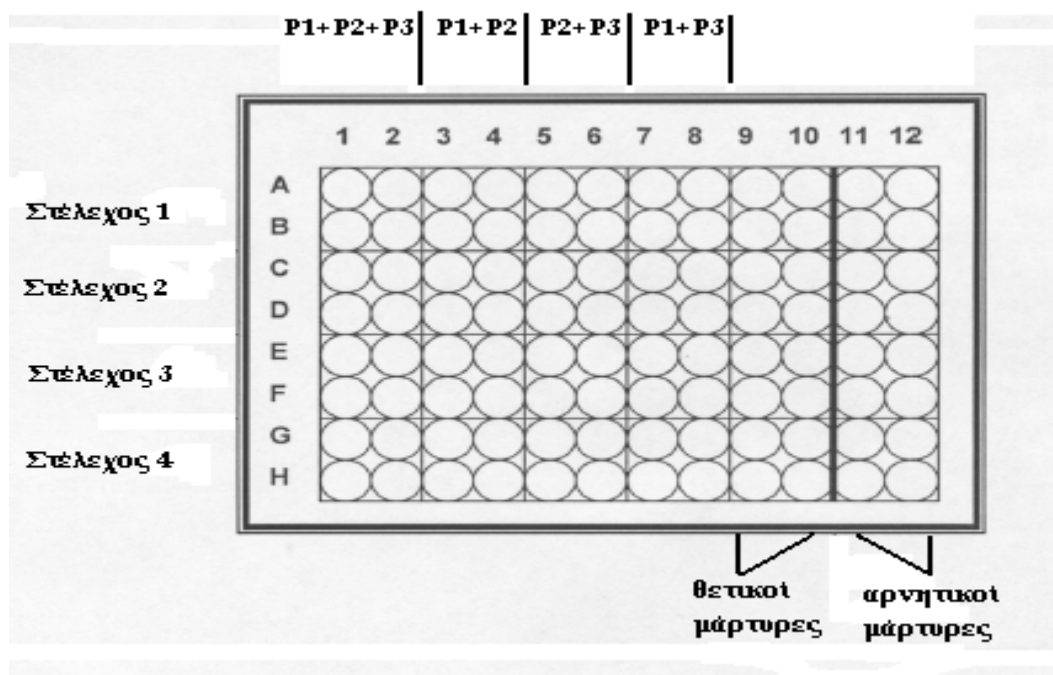
2.2.6 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ

Ο αριθμός των ικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100 μl του ικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ικός τίτλος υπολογίστηκε για όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και για τα πρότυπα Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπολογίστηκε ο τίτλος 2 διαφορετικών ικών στελεχών. Για κάθε ικό στέλεχος, σε 8 πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (τύπου erpendorf) τοποθετήθηκαν 900 μl MM. Στη συνέχεια, 100 μl από το απόθεμα κάθε ικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10^{-1} αραιώση του ικού δείγματος. 100 μl από την 10^{-1} αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10^{-2} αραιώση του ικού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι τη δημιουργία της 10^{-8} αραιώσης. Στη συνέχεια, 500 μl της 10^{-1} αραιώσης του πρώτου ικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις A1-A5 (100 μl/θέση), ενώ 500 μl της 10^{-1} αραιώσης του δεύτερου ικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις A6-A10 (100 μl/θέση). Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι και τον ενοφθαλμισμό της 10^{-8} αραιώσης στην πλάκα. Στις στήλες 11 και 12 δεν προστέθηκε ικό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Η πλάκα τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C και η παρακολούθησή της για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκησε 5 μέρες. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ικός τίτλος είναι: $\log\text{TCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$. L: η μικρότερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση, d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων και S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

2.2.7 ΟΡΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η οροταυτοποίηση των ιικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων P1, P2 και P3, ειδικών έναντι των πολιοϊών τύπου 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Τα αντισώματα προέρχονται από το National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands. Η διαδικασία της οροταυτοποίησης έλαβε χώρα σε πλάκα μικροτιτλοποίησης και σε κάθε πλάκα ταυτοποιήθηκαν 4 στελέχη. Αρχικά, κάθε αμπούλα αντισωμάτων αραιώθηκε 1:128 φορές μέσω προσθήκης MM και δημιουργήθηκαν τα μείγματα αντισωμάτων 1: P1+P2+P3, 2: P1+P2, 3: P2+P3 και 4: P1+P3, από τα οποία 50 µl τοποθετήθηκαν στις θέσεις που φαίνονται στην εικόνα 2.2. Στις θέσεις που εδράζονται οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες προστέθηκαν 50 µl MM. Στις θέσεις A1-A10 και B1-B10 προστέθηκαν 50 µl, που περιέχουν 100 TCID₅₀ του πρώτου ικού στελέχους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα στελέχη. Η πλάκα επώαστηκε για περίπου 2 h στους 37°C για πρόσδεση ιού-αντισώματος. Στη συνέχεια σε όλες τις θέσεις προστέθηκαν 100 µl κυττάρων (10.000 κύτταρα/θέση) και η πλάκα τοποθετήθηκε στους 37°C. Η πλάκα εξεταζόταν καθημερινά για κυτταροπαθολογικό δράση για 3-5 μέρες. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τον πίνακα 2.4.



Εικόνα 2.2. Πλάκα οροταυτοποίησης.

Πίνακας 2.4. Ερμηνεία αποτελεσμάτων οροταυτοποίησης

Μείγμα 1: P1+P2+P3	Μείγμα 2: P1+P2	Μείγμα 3: P2+P3	Μείγμα 4: P1+P3	Αποτέλεσμα Οροταυτοποίησης
0	0	+	0	Πολιοϊός τύπου 1
0	0	0	+	Πολιοϊός τύπου 2
0	+	0	0	Πολιοϊός τύπου 3
0	0	+	+	Μείγμα πολιοϊών τύπου 1 και 2
0	+	+	0	Μείγμα πολιοϊών τύπου 1 και 3
0	+	0	+	Μείγμα πολιοϊών τύπου 2 και 3
0	+	+	+	Μείγμα πολιοϊών τύπου 1, 2 και 3
+	+	+	+	Μείγμα εντεροϊών
+ : Κυτταροπαθογόνος δράση			0 : Όχι κυτταροπαθογόνος δράση	

2.2.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΓΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Ο διαχωρισμός μεταξύ άγριων και εμβολιακών όλων των οροταυτοποιημένων στελεχών πολιοϊών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διατριβή, έγινε βάσει της δημοσίευσης των Georgoroulou & Markoulatos, 2000.

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΙΚΟΥ RNA

Η εκχύλιση του ιικού RNA των ιικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml εισήχθησαν 200 µl από το απόθεμα κάθε ιικού στελέχους, 600 µl GuSCN και 10 µl γλυκογόνο (100 mg/ml). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των πρωτεϊνικών καψιδίων, ώστε να απελευθερωθεί το ιικό RNA. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 800 µl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και ύστερα από ισχυρή ανάδευση, οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για 30 min στους -20°C. Οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 g για 10 min. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης (-20°C), ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 14.000 g για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 µl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα RNA των ιικών στελεχών αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Διαλύματα :

Διάλυμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης : 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Για την μετατροπή του ιικού RNA σε cDNA (complementary DNA) ακολουθήθηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής.

Σχεδόν για όλα τα RNA δείγματα, 5 μl ιικού RNA και 2 μl τυχαίων εκκινητικών μορίων (Random primers, d(N9) Takara, Japan), προστέθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 600μl και επώστηκαν στους 70°C για 5 min. Μετά το πέρας της επώασης, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 min και στη συνέχεια προστέθηκε το μείγμα της αντίδρασης που για κάθε δείγμα αποτελείται από 5 μl 5x M-MLV RT buffer, 5 μl dNTPs (1mM), 0,5 μl (40units/μl) Ribonuclease Inhibitor, 1 μl (200 units/μl) MMLV Reverse Transcriptase και 6,5 μl ddH₂O ελεύθερου ριβονουκλεασών. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την Promega Corporation, Madison WI, USA. Ακολούθησε επώαση 1 h στους 37°C για τη σύνθεση cDNA και επώαση για 15 min στους 70°C για απενεργοποίηση του ενζύμου.

Στις περιπτώσεις όπου τα εκκινητικά μόρια 71935-EUC2 θα χρησιμοποιούνταν μετέπειτα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ακολουθήσαμε εναλλακτικό πρωτόκολλο στο οποίο αντί για τυχαία εκκινητικά μόρια προσθέσαμε 10pmol από κάθε έναν από τους EUC2a και EUC2b εκκινητές και η επώαση της 1 h έγινε στους 42°C και όχι στους 37°C.

2.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται είτε από προηγούμενες εργασίες είτε έχουν σχεδιαστεί για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διατριβής. Για τον σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer 3 (<http://www.genome.wi.-mit.edu/genomesoftware/other>) και οι αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221). Όπως προαναφέρθηκε, τα στελέχη που περιλαμβάνονται στον πίνακα 2.1 μελετήθηκαν στην VP1 γενωμική περιοχή για ανασυνδυασμούς και μεταλλάξεις. Τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση, μέσω της

αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), της VP1 γενωμικής περιοχής των συγκεκριμένων στελεχών, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.5.

Λόγω των εξαιρετικά σημαντικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη της VP1 περιοχής των στελεχών 7/b/97 και K/2002, επιχειρήθηκε η αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος των στελεχών αυτών. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιώματος των στελεχών 7/b/97 και K/2002 παρουσιάζονται στους πίνακες 2.6 και 2.7 αντίστοιχα.

Τα στελέχη του πίνακα 2.2 μελετήθηκαν για ανασυνδυασμούς στις γενωμικές περιοχές 2C και 3D. Αρχικά, οι περιοχές αυτές ενισχύθηκαν με τη χρήση των εκκινητικών μορίων που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.8 και ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR με ένζυμα περιορισμού. Στη συνέχεια αλληλουχήθηκε το τμήμα του γονιδιώματος από την 2C μέχρι και την 3' UTR όσων δειγμάτων θεωρήθηκαν «ύποπτα» για ανασυνδυασμό. Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για αυτόν τον σκοπό παρουσιάζονται στον πίνακα 2.9.

2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι δυνατή η ενίσχυση *in vitro* ενός τμήματος cDNA, το οποίο οριοθετείται από τα εκάστοτε εκκινητικά μόρια. Η PCR αποτελείται από τρία στάδια, το στάδιο της αποδιάταξης του δίκλωνου μορίου DNA ή cDNA, το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητικών μορίων στις περιοχές πρόσδεσής τους στο μόριο στόχο και το στάδιο της επιμήκυνσης-σύνθεσης του αντιγράφου του μορίου στόχου.

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το μείγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 3 μl του εκάστοτε cDNA δείγματος, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2 μl MgCl₂ (50mM), 2 units Taq DNA πολυμεράσης (Biotaq, Moscow, Russia) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 5 min και ακολούθησε η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης για 35 κύκλους (Πίνακες 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλάμβανε επώαση για 10 min στους 74°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Πίνακας 2.5. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της VP1 περιοχής. Για τους εκκινητές UG1, 222 με κόκκινο οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 1 (AY184219), με μπλε οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 2 (AY184220) και με πράσινο οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 3 (AY184221). κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
UG1 κ.	2402- TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2421 2404- TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2423 2399- TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2418	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 45°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Balanant et al., 1991
222 α.	2982- CICCIGGIGGIAYRWACA-3000 2984- CICCIGGIGGIAYRWACA-3002 2979- CICCIGGIGGIAYRWACA-2997		Oberste et al., 2000
S ₁ 37 κ.	2837- AGGAAATTGGAGTTCITCACC-2857	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2006
S ₁ 688 α.	3488- ACATGACGTTCACTGCGTTTT -3468		Dedepsidis et al., 2006
S ₂ 30 κ.	2830- CAACTGAGACGCAAACTGGA -2849	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2006
S ₂ 688 α.	3488- CACATGACACTCACGGCATT -3469		Dedepsidis et al., 2006
S ₃ 26 κ.	2826- GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC -2847	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2006
S ₃ 651 α.	3451- CTCCTTAGTGGCGAGATGGTAG -3430		Dedepsidis et al., 2006

Πίνακας 2.6. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ολόκληρου του γενώματος του στελέχους 7/b/97. Οι θέσεις όλων των εκκινητών αναφέρονται στο πρότυπο στέλεχος Sabin 1 (AY184219), εκτός από το ζεύγος CVD1-CVD2 που σχεδιάστηκε με βάση την αλληλουχία του 7/b/97 για να καλυφθεί ένα κενό περίπου 50 βάσεων. κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
72437 κ.	001-TTAAAACAGCTCTGGGGTTG-020	Αποδ.: 95°C 20sec	Mulders et al., 1999
216616 α.	545-GAAACACGGACACCCAAAGTA-565	Υβριδ.: 45°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Blomqvist et al., 1999
S ₁ 23 κ.	323-GAGTCTGGACATCCCTCAC-342	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 976 α.	957-TACCCGCAAGCCTCTATGTT-976	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 82 κ.	882-CTCAAGACCCTTCCAAGTTCA-902	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 542 α.	1523-ATTATCTGGTGC GGGAACAC-1542	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 350 κ.	1350-GGGATAGCAACACCACTACCA-1370	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 693 α.	1675-TGGAATCTCTGGGGAGGAC-1693	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 476 κ.	1476-CGGTGGATTACCTCTTTGGA-1495	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 154 α.	2136-AGTTTGCCAGTTGCCATCA-2154	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 013 κ.	2013-TCTGCCTGTCACTCTCTCCA-2032	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 669 α.	2648-TGGTTTGCACTGTATCAGAAGG-2669	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
71935 κ.	3206-GTCAATGATCACAACCC-3222	Αποδ.: 95°C 30sec	Mulders et al., 1995
EUC2 α.	4454-TTIGCACTTGAAGTGTATGTA-4474	Υβριδ.: 45°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	Caro et al., 2001
UG23 κ.	4169-AAGGGATTGGAGTGGGIGTC-4188	Αποδ.: 95°C 20sec	Guillot et al., 2000
UC15 α.	4948-CATCTCTGAAGTTTGCT-4965	Υβριδ.: 45°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Guillot et al., 2000
CVD1 κ.	ACGACCTGAACCAAAATCCA	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
CVD2 α.	CAATCCACCCCTTCTTCTCAC	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2007
S ₁ 42 κ.	4962-GATGCTGTCCCTTAGTGTTGG-4984	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 952 α.	5853-GATGCTGTCCCTTAGTGTTGG-5873	Υβριδ.: 50°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 70 κ.	5769-TATGTATGTTCTGTCCGGTCT-5791	Αποδ.: 95°C 30sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 450 α.	6851-ATTGAAGTGCCTGAGCAACC-6871	Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 60sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 198 κ.	6728-GCACTAAAGATGGTGTGAGAAA -6752	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 885 α.	7391-CTACAACAGTATGACCCAATCCAA7415	Υβριδ.: 50°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006

Πίνακας 2.7. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ολόκληρου του γενώματος του στελέχους Κ/2002. Οι θέσεις όλων των εκκινητών αναφέρονται στο πρότυπο στέλεχος Sabin 3 (AY184221), εκτός από αυτά τα ζεύγη που φέρουν αστερίσκο των οποίων οι θέσεις αναφέρονται στο πρότυπο στέλεχος Sabin 2 (AY184220). κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια Εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
72437 κ.	001-TTAAACAGCTCTGGGGTTG-020	Αποδ.: 95°C 20sec	Mulders et al., 1999
216616 α.	545-GAAACACGGACACCCAAAGTA-565	Υβριδ.: 45°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Blomqvist et al., 1999
S ₃ 309 κ.	309-GTAGCTTGGGCCGATGAGT-327	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 044 α.	1025-ACTGAATTTGCTGCCCTCCTG-1044	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 936 κ.	936-CTCCAGCACTCAATTCACCA-955	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 510 α.	1491-TCCCAGTAACACCCACATC-1510	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 78 κ.	1378-TTATGCAAATGCGAATCCAG-1397	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 864 α.	1844-AATAGGCGGAGTGACATCAA-1864	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 709 κ.	1709-CCCAATGTGTAGCGAGTTCA-1728	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 218 α.	2200-GTGCCCAACATAGCCTCCT-2218	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 40 κ.	2140-TACGGGGAAAATCCTAGTGG-2159	Αποδ.: 95°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
S ₃ 659 α.	2640-CGTTTGAAGTGTGTCGGATG-2659	Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2008
71935 κ.	3205-GTCAATGATCACAACCC-3221	Αποδ.: 95°C 30sec	Mulders et al., 1995
EUC2 α.	4453-TTGCACCTGAACTGTATGTA-4473	Υβριδ.: 45°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	Caro et al., 2001
UG23 κ.	4168-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4187	Αποδ.: 95°C 20sec	Guillot et al., 2000
UC15 α.	4947-CATCTCTGAAGTTTGTCT-4964	Υβριδ.: 45°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Guillot et al., 2000
S ₂ 97* κ.	4717-TTAGCCTCCACCACCTCCAG-4737	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 598* α.	5195-TGATGTTCTCTCTGTTTGAACC-5218	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 48* κ.	4968-TCCTTAGTGTGTGGCAAGG-4988	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 911* α.	5812-GTTTGTCTCCACCGAGATT-5832	Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 40sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 70* κ.	5769-TATGTATGTTCCCTGTGCGGTGCT-5791	Αποδ.: 95°C 30sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 450* α.	6851-ATTGAAGTGCTGAGCAACC-6871	Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 60sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 107* κ.	6647-TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA-6668	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 872* α.	7393-ACAACAGCATGACCCAATCC-7413	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 30sec	Paximadi et al., 2006

Πίνακας 2.8. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων των 2C και 3D. Για όλους τους εκκινητές με κόκκινο οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 1 (AY184219), με μπλε οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 2 (AY184220) και με πράσινο οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 3 (AY184221). κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια Εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
UG23 κ.	4169-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4188 4168-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4187 4160-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4179	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 45°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Guillot et al., 2000
UC15 α.	4965-CATCTCTTGAAGTTTGTCTGG-4946 4964-CATCTCTTGAAGTTTGTCTGG-4945 4956-CATCTCTTGAAGTTTGTCTGG-4937		Guillot et al., 2000
UG16 κ.	5921-GTTGGTGGGAACGGTTCACA-5940 5920-GTTGGTGGGAACGGTTCACA-5939 5912-GTTGGTGGGAACGGTTCACA-5931	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 45°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Guillot et al., 2000
UC12 α.	6516-TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG-6494 6515-TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG-6493 6507-TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG-6485		Guillot et al., 2000

Πίνακας 2.9. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής 2C-3'UTR σε όσα δείγματα του πίνακα 2.2 θεωρήθηκαν «όποια» για ανασυνδυασμό. Πρόθεμα S₁ : θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 1 (AY184219), πρόθεμα S₂ : θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 2 (AY184220), πρόθεμα S₃ : θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 3 (AY184221). κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
S ₂ 97 κ.	4717-TTAGCCTCCACCAACTCCAG-4737	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 598 α.	5218-TGATGTTCCCTCTCTGTTTGAACC-5195	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₃ 141 κ.	4741-AGGCATTCTGTTCACATCCAAC-4763	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₃ 368 α.	5239-ATGTTGACGATCCATCCCTTCT-5217	Υβριδ.: 60°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 42 κ.	4962-GATGCTGTCCTTTAGTGTGG-4984	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 952 α.	5873-TCCTGCTCTGGTTGGAAAGT-5853	Υβριδ.: 50°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 48 κ.	4968-TCCITTAGTGTGTGGCAAGG-4988	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 911 α.	5832-GTTTGTCTCCACCGAGATT-5812	Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 40sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 70 κ.	5769-TATGTATGTTCCGTGCGGTGCT-5791	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 299 α.	5999-ACTGGATTTACCTTGACTCTG-5977	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₃ 64 κ.	5763-GTATGTTCCGTGCGGTGCTG-5784	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₃ 290 α.	5990-ACTGGATTTACCTTGCTCT-5969	Υβριδ.: 60°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 7 κ.	6427-ATATGGAATCAACCTCCCCT-6448	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 450 α.	6851-ATTGAAGTGCCGTGAGCAACC-6871	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 60 κ.	6480-AACTAAGGTGGAGCAGGGAAA-6501	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 380 α.	6800-TGGGAATGGTTGAGGTAATC-6780	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₃ 25 κ.	6445-ATATGTCAAGGACGAGCTGAGG-6468	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₃ 273 α.	6694-GCGTCGTATCCTGTGTAATCAA-6672	Υβριδ.: 60°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 198 κ.	6728-GCACTAAAGATGGTGTGAGAAA-6752	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₁ 885 α.	7391-CTACAACAGTATGACCCAATCCAA-7415	Υβριδ.: 50°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 107 κ.	6647-TCCAGTGCTAATGGAAGAGA-6668	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2006
S ₂ 872 α.	7393-ACAACAGCATGACCCAATCC-7413	Υβριδ.: 55°C 10sec Επιμ.: 74°C 30sec	Paximadi et al., 2006

2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ RT-PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την ηλεκτροφόρηση των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στην πηκτή ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο ΦΧ174 HaeIII (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 1 h. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε με Olympus digital camera.

Διαλύματα :

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

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

2.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (R.F.L.P)

Τα RT-PCR προϊόντα των 2C και 3D γενωμικών περιοχών των ιικών στελεχών που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2 υποβλήθηκαν σε πέψη με συγκεκριμένα, για κάθε περιοχή, ένζυμα περιορισμού προκειμένου να ανιχνευθούν πιθανοί ανασυνδυασμοί. Αναλυτικότερα, οι πέψεις των RT-PCR προϊόντων των ζευγών εκκινητών UG23-UC15 (2C περιοχή) (πίνακας 2.10) και UG16-UC12 (3D περιοχή) (πίνακας 2.11) καταλήγουν σε διαφορετικά πρότυπα πέψεων ως προς το μήκος των γενωμικών τμημάτων ανάλογα με τον γενότυπο (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) του εκάστοτε ιικού στελέχους. Σε περίπτωση ανασυνδυασμού εμφανίζεται, στην συγκεκριμένη περιοχή του στελέχους, διαφορετικό πρότυπο από το αναμενόμενο (βάσει γενοτύπου). Τα προϊόντα των αντιδράσεων πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% τύπου Metaphor (Invitrogen, USA) όπως παραπάνω.

Πίνακας 2.10. Αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών και συνθήκες αντιδράσεων

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Αλληλουχία αναγνώρισης	Συνθήκες αντίδρασης
Hae III	GG/CC	3μl DNA, 2μl 10x M buffer, 1μl (8u) HaeIII, 14μl ddH ₂ O Επώαση 37°C 2h
Afa I	GT/AC	3μl DNA, 2μl 10x T buffer, 1μl (10u) AfaI, 2μl 0,1% BSA, 12μl ddH ₂ O Επώαση 37°C 2h
Hinf I	G/ANTC	3μl DNA, 2μl 10x H buffer, 1μl (8u) Hinf I, 14μl ddH ₂ O Επώαση 37°C 2h
BstO I	CC/(A ή T)GG	3μl DNA, 2μl 10x buffer, 1μl (10u) BstO I, 14μl ddH ₂ O Επώαση 60°C 2h
DpnII	/GATC	3μl DNA, 2μl 10x buffer, 1μl (10u) Dpn II, 14μl ddH ₂ O Επώαση 37°C 2h

Πίνακας 2.11. Πρότυπα πέψης των στελεχών Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3 στις 2C και 3D περιοχές

Πρότυπο στελεχος	UG23-UC15 (μήκος: 797 βάσεις) 2C περιοχή			UG16-UC12 (μήκος: 596 βάσεις) 3D περιοχή			
	Hae III	Afa I	Hinf I	HaeIII	Hinfl	DpnII	Bsto I
Sabin 1	742,55	379, 335,83	489,213,95	282,280 ,34	452,84, 60	349,161, 43,43	386 ,210
Sabin 2	565,127, 105	380,290, 82,45	422,255,120	280,213 ,69,34	422,102 ,60,12	296,110, 94,59, 37	211, 210, 175
Sabin 3	318,247, 127,105	364,194, 116,82, 41	576,95,67,59	562,34	300,212 ,84	204,200, 133,59	-

2.9 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ RT-PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Ο καθαρισμός των RT-PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε, όπου χρειάστηκε, με το PCR clean up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Συγκεκριμένα, με τη χρήση του συγκεκριμένου προϊόντος επιτυγχάνεται η διάλυση της αγαρόζης και η δέσμευση του επιθυμητού RT-PCR προϊόντος σε ειδική στήλη, από την οποία λαμβάνεται με προσθήκη διαλύματος χαμηλής ιονικής ισχύος.

Η αλληλούχιση των RT-PCR προϊόντων πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις PCR. Για κάθε RT-PCR προϊόν η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις.

2.10 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ IN VITRO ΜΟΝΤΕΛΟΥ

Στο τελευταίο σκέλος της συγκεκριμένης διατριβής επιχειρήθηκε η δημιουργία ενός in vitro μοντέλου προκειμένου να διερευνήσουμε τη σχέση που μπορεί να συνδέει ανασυνδυασμούς και δευτεροταγείς δομές κατά την ανάπτυξη των εμβολιακών στελεχών Sabin σε κυτταροκαλλιέργειες.

Η κεντρική ιδέα του συγκεκριμένου μοντέλου είναι η ταυτόχρονη μόλυνση κυτταροκαλλιεργειών με δύο διαφορετικά κάθε φορά πρότυπα εμβολιακά στελέχη και η ανίχνευση τυχόν ανασυνδυασμένων RT-PCR προϊόντων στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές. Στις παραγράφους 2.10.1 με 2.10.3 θα παρουσιαστούν τα επιμέρους βήματα του συγκεκριμένου μοντέλου.

2.10.1 ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Σε πλάκα 6 θέσεων εισήχθησαν, ανά θέση, 2×10^6 κύτταρα Hep-2 και επώαστηκαν σε GM (Growth medium) στους 37°C για περίπου 18 h, μέχρι να προσκολληθούν και να δημιουργήσουν μονόστοιβο επιθήλιο. Ακολούθησε απομάκρυνση του GM και σε κάθε θέση (5 από τις 6 θέσεις) ενοφθαλμίστηκαν 5×10^5 TCID₅₀ στελέχους Sabin (Sabin 1 ή Sabin 2 ή Sabin 3) και 5×10^5 ιικά σωματίδια στελέχους Sabin διαφορετικού από το πρώτο. Πραγματοποιήθηκαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί μολύνσεων (S2 με S1, S3 με S2 και S3 με S1). Η έκτη θέση αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα. Ακολούθησε επώαση για 3 h στους 37°C για είσοδο του ιού στα κύτταρα. Στη συνέχεια, το υλικό που περιείχε αδέσμευτα ιικά σωματίδια απομακρύνθηκε και σε κάθε θέση προστέθηκε 1ml MM. Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C για 24 h, μέχρι να εμφανιστεί πλήρης κυτταροπαθολογικός δράση. Όταν εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθολογικός δράση, το 1 ml που υπήρχε σε κάθε θέση ενοφθαλμίστηκε σε δέκα θέσεις (100 μl/θέση) πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Σε κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλοποίησης υπήρχαν 100 μl (περίπου 10.000) κύτταρα Hep-2. Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C για 24 h, μέχρι να εμφανιστεί πλήρης κυτταροπαθολογικός δράση.

2.10.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ IN VITRO ΜΟΝΤΕΛΟΥ

Σε κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλοποίησης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά εκχύλιση και αντίστροφη μεταγραφή όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Εκκινητικά μόρια σχεδιασμένα σε πολυμορφικές θέσεις μεταξύ των Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR προκειμένου να ανιχνευθούν όλοι οι πιθανοί τύποι ανασυνδυασμών στις 2C και 3D περιοχές. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν όπως και παραπάνω. Πληροφορίες σχετικά με τα εκκινητικά μόρια, καθώς και για τις συνθήκες των αντιδράσεων PCR για τις 2C και 3D περιοχές παραθέτονται στους πίνακες 2.12 και 2.13.

Τα θετικά για ανασυνδυασμούς RT-PCR προϊόντα, ενισχύθηκαν μέσω μίας επιπλέον αντίδρασης PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση, η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα στα προϊόντα της αντίδρασης. Αναλυτικότερα, το μείγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από τα εξής: 2 μl προϊόντος RT-PCR, 5 μl 10x Reaction

buffer (το Reaction buffer εμπεριείχε MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 2mM στα 50 μl αντίδρασης), 5 μl 10mM dNTPs (Invitrogen, USA), 2 μl εκκινητές (25pmol), 0,5 μl Herculase II fusion DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) και 35,5μl ddH₂O.

Πίνακας 2.12. Εκκινητικά μόρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση όλων των πιθανών τύπων ανασυνδυασμού στη 2C γενωμική περιοχή. κ.: κωδικός εκκινητής, α.: αντικωδικός εκκινητής

2C			
Ζευγάρια εκκινητών	Αλληλουχία-Θέση	Συνθήκες PCR	Ανιχνεύσιμος τύπος ανασυνδυασμού
S1sC2a κ.	4076-TAGAAAGAAAGCATGCGATGTT-4097	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 58°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S1/S2
Sa21C2 α.	5130-GGTCTTAACATCTATTTTAGA-5151		
S2sC2 κ.	4037-CCCTCCTTGGGTGCGACATC-4056	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 58°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S2/S1
Sa12C2 α.	5131-CGTCTTGATGTCAATCTTCAAG-5152		
S3sC2a κ.	4066-GAAGAAGAAAGCATGTGACACTT-4088	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 60°C 20sec Επιμ.: 74°C 60sec	S3/S2
Sa23C2 α.	5295-AAAGTAGTTACTGCTTGTAGG-5315		
S2sC2 κ.	4037-CCCTCCTTGGGTGCGACATC-4056	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 58°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S2/S3
Sa32C2 α.	5287-AAAGTTGTCACCTGCCTGCAAA-5307		
S3sC2a κ.	4066-GAAGAAGAAAGCATGTGACACTT-4088	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 57°C 20sec Επιμ.: 74°C 60sec	S3/S1
Sa13C2 α.	5349-GTGTCCAGCAAACAGTTTA-5368		
S1sC2a κ.	4076-TAGAAAGAAAGCATGCGATGTT-4097	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 58°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S1/S3
Sa31C2 α.	5340-GTGTCCAGCGAATAACTTG-5359		

Πίνακας 2.13. Εκκινητικά μόρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση όλων των πιθανών τύπων ανασυνδυασμού στη 3D γενωμική περιοχή. κ.: κωδικός εκκινητή, α.: αντικωδικός εκκινητής

3D			
Ζευγάρια Εκκινητών	Αλληλουχία-Θέση	Συνθήκες PCR	Ανιχνεύσιμος τύπος ανασυνδυασμού
S12sD3 κ.	6400-TAAGGAAATGCAAAAAGCTGCTC-6421	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 58°C 20sec Επιμ.: 74°C 40sec	S1/S2
S21aD3 α.	7134-TGGATGTATGAGGAAGGGATAC-7155		
S21sD3 κ.	6399-CAAGGAAATGCGGAGACTCTTA-6420	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 60°C 30sec Επιμ.: 74°C 50sec	S2/S1
S12aD3 α.	7135-TGGATGAATAAGAAATGGGTAT-7156		
S32sD3 κ.	5997-GACCATCAAAGGAGGCAGGG-6016	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 55°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S3/S2
S23aD3 α.	7206-CGTGATCCIGTGTGTTCTG-7225		
S23sD3 κ.	6005-AACCATCAAAGAAGTGGGA-6024	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 55°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S2/S3
S32aD3 α.	7198-CATGGTCTGCGTATTCCGA-7217		
S31sD3 κ.	5997-GACCATCAAAGGAGGCAGGG-6016	Αποδ.: 95°C 40sec Υβριδ.: 60°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S3/S1
S13aD3 α.	7223-GGCACAGAGAGCGAACGTGA-7242		
S13sD3 κ.	6006-GACCTTCGAAGGAAGTGGGA-6025	Αποδ.: 95°C 40sec Υβριδ.: 60°C 30sec Επιμ.: 74°C 60sec	S1/S3
S31aD3 α.	7214-GACACAAGGAGCGTACATGG-7233		

2.10.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ RT-PCR

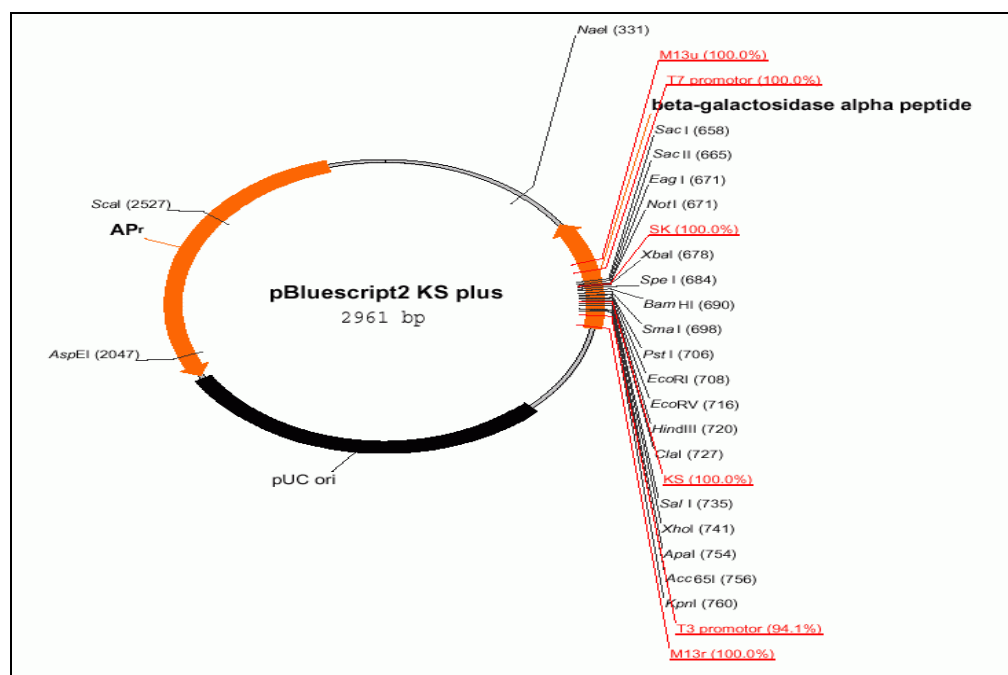
Το επόμενο βήμα του *in vitro* μοντέλου περιελάμβανε κλωνοποίηση των PCR προϊόντων που προέκυψαν από τα προηγούμενα στάδια.

Σαν φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμιδίο pBluescript2 KS+ (Stratagene, La Jolla, USA) (Εικόνα 2.1), το οποίο είχε υποβληθεί σε πέψη με SmaI ώστε να αποκτήσει τυφλά άκρα. Η ανάπτυξη του πλασμιδίου έγινε σε κύτταρα DH5a. Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 3 h. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε : 17 ng φορέα, 100 ng προϊόν PCR, 1 μl 10x ligase buffer, 1 u Ligase (Promega, USA) και 3 μl ddH₂O.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επώαση των DH5a κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια 5 ml LB Broth για 16 h στους 37°C. Τα μητρικά κύτταρα διατηρούνταν σε αποθέματα γλυκερόλης στους -80°C. Στη συνέχεια, ανανεώθηκε η καλλιέργεια και πραγματοποιήθηκε λήψη 200 μl κυττάρων στην εκθετική φάση αύξησης τους, μετά από 3-4 h επώασης, τα οποία εισήχθησαν σε 5 ml LB Broth στους 37°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min στους 4°C. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε όγκο ίσο με το 1/2 της καλλιέργειας με CaCl₂ 0,1M και διατηρήθηκαν για 30 min στους

0-4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min στους 4°C. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε όγκο ίσο με το 1/10 της καλλιέργειας με CaCl₂ 0,1M και διατηρήθηκαν για 1 h στους 0-4°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 200 μl κυττάρων με 10 μl φορέα που περιείχε το προς κλωνοποίηση τμήμα και διατηρήθηκαν για 35 min στους 0-4°C. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για 1,5 min και τοποθέτησή τους στους 0-4°C για 2 min. Στη συνέχεια ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία που περιέχουν LB Agar (Sigma, USA), 80 μg/ml X-Gal (Promega, USA) και 50 μg/ml αμπικιλίνη και επώαση για 16 h στους 37°C. Τα επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα δεν παράγουν τη β-γαλακτοσιδάση με αποτέλεσμα να μην αντιδρούν με την άχρωμη ουσία X-Gal δίνοντας λευκές αποικίες, έναντι κυανών που δίνουν τα κύτταρα τα οποία δεν περιέχουν τον ανασυνδυασμένο φορέα. Ακολούθησε, επιλογή των λευκών κυτταρικών αποικιών και επώαση των κυττάρων σε 5 ml LB Broth περιεκτικότητας 50 μg/ml σε αμπικιλίνη για 16 h στους 37°C για την παρασκευή των αντίστοιχων για κάθε κλώνο minipreps.

Με τη χρήση του FastPlasmid Mini kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) απομονώθηκε ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση στην εταιρεία Macrogen Inc. (Seoul, Korea).



Εικόνα 2.1. Ο φορέας κλωνοποίησης pBluescript2 KS+. Φαίνονται οι θέσεις περιορισμού καθώς και τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης, καθώς επίσης και οι θέσεις κοπής των ενζύμων περιορισμού.

2.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Τα προγράμματα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν για την νουκλεοτιδική ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν τα εξής:

ClustalW: Με το πρόγραμμα Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) πραγματοποιήθηκαν οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ικών στελεχών που μελετήθηκαν, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY18420) και Sabin 3 (AY184221). Μέσω των στοιχίσεων ανιχνεύτηκαν νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί στα ικά στελέχη. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και στοιχίσεις μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των ικών στελεχών που μελετήθηκαν και των πρότυπων στελεχών, με αποτέλεσμα την ανίχνευση αμινοξικών μεταλλάξεων.

GeneRunner V. 3.05: Μέσω του προγράμματος GeneRunner ανακτήθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες των ικών στελεχών που μελετήθηκαν. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιήθηκαν, στο γένωμα των πρότυπων στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.

Rasmol V. 2.7.1.1: Το Rasmol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol>) είναι πρόγραμμα γραφικής απεικόνισης τριτοταγών δομών πρωτεϊνικών μορίων. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των αμινοξικών μεταλλαγών στην καψιδιακή περιοχή των ικών στελεχών που μελετήθηκαν.

Για την απεικόνιση χρησιμοποιήθηκαν οι κατατεθειμένες στην Protein Data Bank (pdb) δομές, των καψιδιακών πρωτομερών των Sabin 1 και Sabin 3, οι οποίες έχουν κωδικούς καταχώρησης στην pdb 1ASJ.pdb (Wien et al., 1997) και 1VBE.pdb (Grant et al., 1994) αντίστοιχα.

Simplot V. 2.5: Το Simplot (<http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/Simplot>) είναι ένα πρόγραμμα ανάλυσης ομοιογένειας-ετερογένειας μεταξύ αλληλουχιών. Στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των ανασυνδυασμών, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν στα ικά στελέχη που μελετήθηκαν. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα υπολογίζει την εκατοστιαία αναλογία ομοιότητας μεταξύ μιας πρότυπης αλληλουχίας και της προς μελέτη αλληλουχίας.

Για την ανάλυση του στελέχους 7/b/97 χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες CAV15 G-9 (AF465512), CAV17 G12 (AF499639), CAV18 G-13 (AF465513) και EGY93_034 (AF448783).

Τέλος, για τον καθορισμό της ηλικίας του στελέχους K/2002 υπολογίστηκε το ποσοστό των μεταλλαγμένων συνώνυμων θέσεων μεταξύ όλων των συνώνυμων θέσεων (Ks), τόσο στην VP1 γενωμική περιοχή όσο και σε όλη την καψιδιακή περιοχή, σύμφωνα με τη μέθοδο των Li et al., 1985. Η ιική ηλικία προσδιορίστηκε ύστερα από σύγκριση της VP1 Ks του K/2002, με τη δημοσιευμένη VP1 Ks (Gavrilin et al., 2000) και της Ks της καψιδιακής περιοχής του K/2002, με τη δημοσιευμένη Ks για την καψιδιακή περιοχή (Martin et al., 2000).

2.12 ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ

Για την δημιουργία των μοντέλων των RNA δευτεροταγών δομών στις γενωμικές περιοχές 2C και 3D των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3, χρησιμοποιήθηκαν οι κατατεθειμένες στην GenBank νουκλεοτιδικές αλληλουχίες AY184219, AY184220 και AY184221 αντίστοιχα. Δημιουργήθηκαν μοντέλα RNA δευτεροταγών δομών στις περιοχές αυτές, για τους θετικής και αρνητικής πολικότητας κλώνους RNA.

2.12.1 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ

Τα προγράμματα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Mfold Version 3.0 (Zuker, 2003) και το RNAfold (Hofacker, 2003).

Mfold V. 3.0: Ο βασικός δυναμικός αλγόριθμος που περιλαμβάνεται στο πρόγραμμα Mfold επιτρέπει την πρόβλεψη εκείνης της δευτεροταγούς δομής ενός RNA μορίου, η οποία φέρει τη χαμηλότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας (minimum free energy structure, m.f.e). Επίσης, υπολογίζεται και το σύνολο των λιγότερο ευνοϊκότερων ενεργειακά RNA δευτεροταγών δομών του συγκεκριμένου μορίου, μέσα σε ένα, καθοριζόμενο από το χρήστη, όριο αύξησης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Ένας διαφορετικός δυναμικός αλγόριθμος υπολογίζει όλα τα **δυνατά** ζευγαρώματα των βάσεων του RNA μορίου εντός του ίδιου, καθοριζόμενου από το χρήστη, ορίου αύξησης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Η πληροφορία του συγκεκριμένου υπολογισμού απεικονίζεται σε διάγραμμα dotplot.

Από τον συνδυασμό του συνόλου των λιγότερο ευνοϊκότερων RNA δευτεροταγών δομών και του dotplot, προκύπτουν παράμετροι που ορίζουν το πόσο καλά

καθορισμένη είναι η «κατάσταση» (ζευγαρωμένες ή μονόκλωνες) των βάσεων του RNA μορίου.

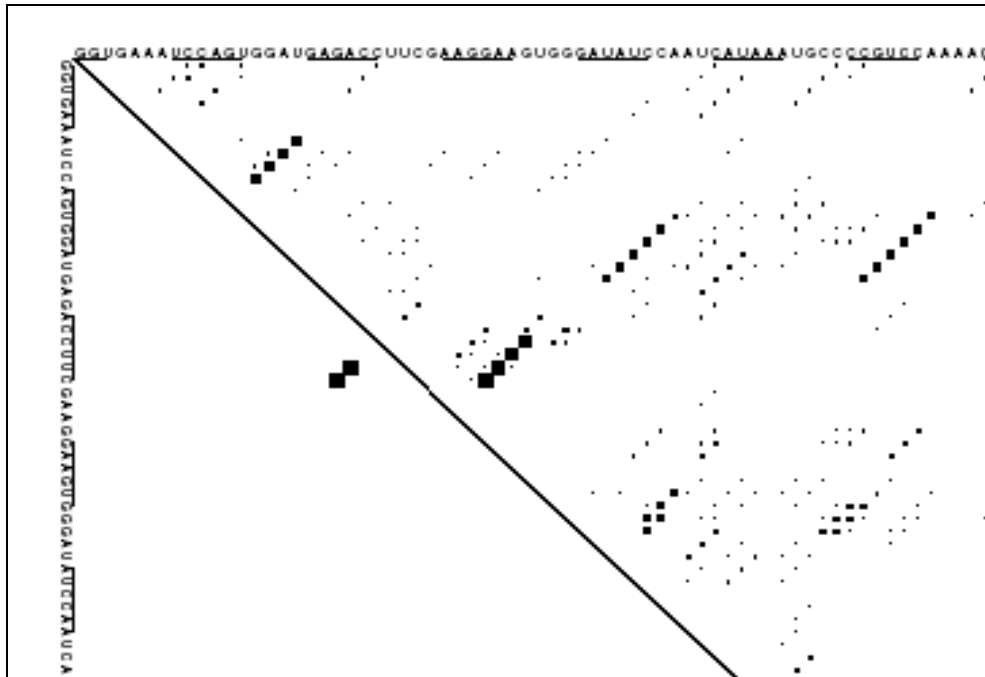
Pnum: Είναι ο συνολικός αριθμός των διαφορετικών ζευγών βάσεων στα οποία μπορεί να συμμετέχει μια συγκεκριμένη RNA βάση, μέσα στο σύνολο όλων των δευτεροταγών δομών που περιλαμβάνονται εντός του ορίου αύξησης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος.

Snum: Σε ένα σύνολο m δευτεροταγών δομών, το S_{num} μιας συγκεκριμένης βάσης είναι ο αριθμός των δομών στις οποίες η συγκεκριμένη βάση είναι μονόκλωνη διαιρούμενος με το σύνολο m των δομών.

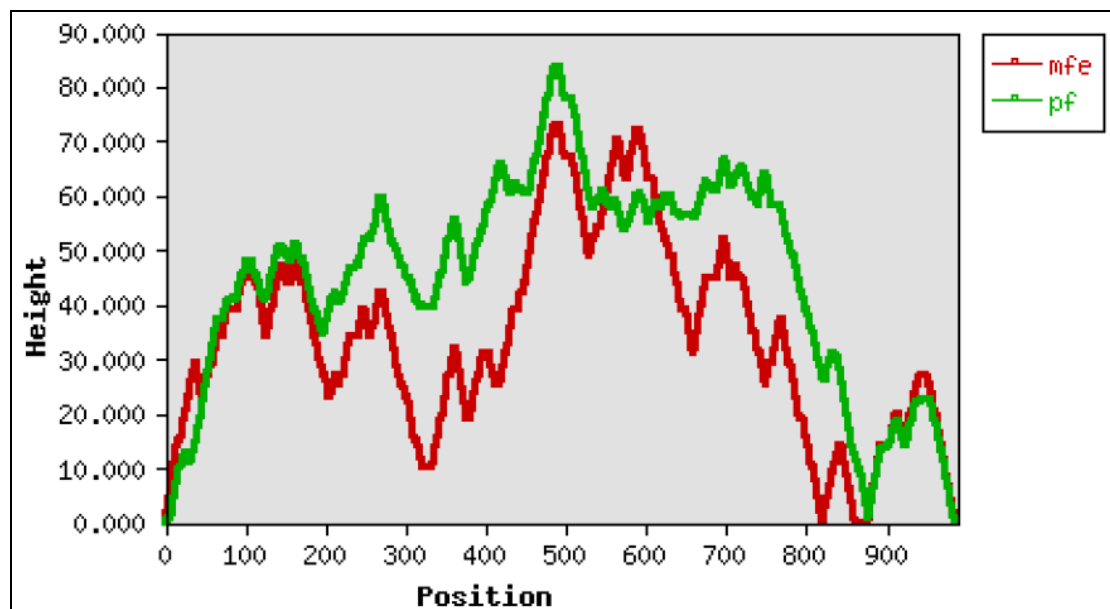
Ο διακομιστής του προγράμματος Mfold V. 3.0 βρίσκεται στη διεύθυνση <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold> και ο υπολογισμός των δευτεροταγών RNA δομών γίνεται μέσω διαδικτύου.

Το πρόγραμμα επιτρέπει στον χρήστη καθορισμό αρκετών παραμέτρου υπολογισμού, όπως το όριο αύξησης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος, τη θερμοκρασία, το όριο απόστασης μεταξύ των δυνατών ζευγαρωμάτων μέσα σε ένα μόριο RNA κ.α.

RNAfold: Στο πρόγραμμα RNAfold περιλαμβάνεται ο δυναμικός αλγόριθμος του Zuker (1981), ο οποίος περιλαμβάνεται και στο Mfold και επιτρέπει την πρόβλεψη εκείνης της δευτεροταγούς δομής ενός RNA μορίου, η οποία φέρει τη χαμηλότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας. Επιπλέον, το RNAfold περιλαμβάνει και τον δυναμικό αλγόριθμο του McCaskill (1990) ο οποίος στην ουσία είναι η εφαρμογή του βασικού νόμου της στατιστικής μηχανικής, νόμου του Boltzmann, στον υπολογισμό των RNA δευτεροταγών δομών. Ο δυναμικός αλγόριθμος του McCaskill μέσα από την εύρεση της συνάρτησης κατανομής του συστήματος το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία, στην προκειμένη περίπτωση το RNA μόριο, υπολογίζει την **πιθανότητα** κάθε δυνατού ζευγαρώματος των βάσεων του RNA μορίου. Η πληροφορία αυτή απεικονίζεται σε διάγραμμα boxplot (Εικόνα 2.3) και αποδίδει ολοκληρωμένη εικόνα τόσο για τις εναλλακτικές RNA δομές της αλληλουχίας, όσο και για τη μη στατική φύση των RNA μορίων. Επιπροσθέτως, το RNAfold παράγει διάγραμμα τύπου mountain plot (Εικόνα 2.4) στο οποίο απεικονίζεται και ο μέσος όρος της πιθανότητας της δευτεροταγούς RNA δομής με τη χαμηλότερη ενέργεια αλλά και τα υψηλότερης πιθανότητας ζευγάρια βάσεων. Ο διακομιστής του προγράμματος RNAfold βρίσκεται στη διεύθυνση <http://rna.tbi.univie.ac.at> και ο υπολογισμός των πιθανοτήτων των ζευγών βάσεων γίνεται μέσω διαδικτύου.



Εικόνα 2.3 Διάγραμμα boxplot παραγόμενο από το RNAfold. Στο πάνω-δεξιό μέρος με τετράγωνο κρυσταλλοειδούς πάχους απεικονίζεται η πιθανότητα κάθε ζευγαρώματος μεταξύ 2 βάσεων του μορίου. Στο κάτω-αριστερά μέρος με τετράγωνα σταθερού πάχους απεικονίζονται τα ζευγάρια βάσεων που περιλαμβάνονται στην RNA δευτεροταγή δομή με την μικρότερη ελεύθερη ενέργεια.



Εικόνα 2.4. Διάγραμμα mountain plot παραγόμενο από το RNAfold. Απεικόνιση με κόκκινο της πιθανότητας του κάθε ζεύγους βάσεων της δευτεροταγούς RNA δομής με την υψηλότερη ενέργεια. Απεικόνιση με πράσινο των ζευγών βάσεων με την υψηλότερη πιθανότητα.

2.12.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ

Αρχικά μέσω του προγράμματος RNAfold δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα boxplot για τις 2C και 3D περιοχές των Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 στελεχών για τους θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA κλώνους. Στη συνέχεια, καταγράφηκαν και βαθμονομήθηκαν οι πιθανότητες των παραγόμενων RNA ζευγών βάσεων σε κάθε περίπτωση. Ακολούθησε η παραγωγή όλων των πιθανών δευτεροταγών RNA δομών (ευνοϊκότερων και λιγότερο ευνοϊκότερων, όσον αφορά την ελεύθερη ενέργεια) με το πρόγραμμα Mfold. Αρχικά, δημιουργήθηκαν όλες οι πιθανές δομές χωρίς όριο απόστασης μεταξύ των ζευγών βάσεων, στη συνέχεια δημιουργήθηκαν όλες οι πιθανές δομές μέσα σε καθορισμένα, κάθε φορά, όρια απόστασης μεταξύ των ζευγών βάσεων. Τα διαδοχικά όρια απόστασης που τέθηκαν ήταν οι 350, οι 250, οι 150 και οι 100 βάσεις RNA για την 2C περιοχή. Για την 3D περιοχή τα διαδοχικά όρια απόστασης τέθηκαν στις 500, στις 350, στις 250 και στις 200 βάσεις. Στη συνέχεια, όλες οι παραγόμενες δευτεροταγείς δομές αξιολογήθηκαν, κατά περιοχές, με βάση την «περιεκτικότητά» τους σε βαθμονομημένης πιθανότητας ζευγάρια βάσεων του boxplot. Τέλος μέσω του mountain plot επιλέχθηκε η προτεινόμενη δομή-μοντέλο σε κάθε περίπτωση. Εξαιτίας της δυναμικής και όχι στατικής φύσης των RNA μορίων, επιλέχθηκαν σε κάποιες περιπτώσεις και ορισμένες (2-3) εναλλακτικές δομές, οι οποίες παρουσίαζαν παρόμοια πιθανότητα με την προτεινόμενη δομή-μοντέλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΩΝ ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν για την παρουσία ανασυνδιασμών και μεταλλάξεων στην VP1 γενωμική περιοχή, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Στη συγκεκριμένη ενότητα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τα στελέχη B1-B15. Τα αποτελέσματα που αφορούν τα στελέχη 7/b/97 και K/2002 παρουσιάζονται στις ενότητες 3.2 και 3.3 αντίστοιχα.

3.1.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ ΑΓΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο διαχωρισμός μεταξύ των άγριων και εμβολιακών στελεχών πολιοϊών πραγματοποιήθηκε βάσει της δημοσίευσης των Georgoroulou & Markoulatos, 2000. Όλα τα στελέχη (B1-B15) ήταν εμβολιακής προέλευσης. Συγκεκριμένα, η εμβολιακή προέλευση των στελεχών B1-B7 είναι τύπου Sabin 1, η εμβολιακή προέλευση των στελεχών B8-B12 είναι τύπου Sabin 2 και η εμβολιακή προέλευση των στελεχών B13-B15 είναι τύπου Sabin 3.

3.1.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ SABIN 1

Συνολικά 15 μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε όλα τα ιικά στελέχη εμβολιακής προέλευσης Sabin 1. Στα στελέχη B1, B2, B5, B6 και B7 εντοπίστηκε μόνο η μετάπτωση A 2623 G, η οποία δεν οδήγησε σε αμινοξική αλλαγή. Στο στέλεχος B3 εκτός από τη μετάπτωση A 2623 G, ανιχνεύθηκαν και 2 ακόμα μεταλλάξεις, οι A 2749 G και A 3248 G, οι οποίες οδήγησαν στις αμινοξικές αλλαγές Ile 90 Met και Ile 257 Val. Στο ικό στέλεχος B4, 5 από τις 7 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν, οδήγησαν σε αμινοξική αλλαγή.

Συγκεκριμένα, οι G 2765 A, G 2776 T, A 2795 G, A 2982 G και A 3138 G κατέληξαν στις Ala 96 Thr, Lys 99 Asn, Thr 106 Ala, Glu 168 Gly και Gln 220 Arg, αμινοξικές αλλαγές αντιστοιχα. Οι μεταπτώσεις G 2605 A και C 2917 T, δεν οδήγησαν σε αμινοξική αλλαγή (Πίνακας 3.1).

Τα αμινοξέα 90 (Ile 90 Met), 96 (Ala 96 Thr) και 99 (Lys 99 Asn) εδράζονται στην N-AgI. Επιπροσθέτως, τα αμινοξέα 96 και 99 ανήκουν και στην VP1 BC θηλιά, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του βόριου τμήματος της αύλακας πρόσδεσης του υποδοχέα (Minor et al., 1986; Harber et al., 1995; He et al., 2000). Στη BC θηλιά της VP1 εδράζεται επίσης και το αμινοξύ 106 (Thr 106 Ala), το οποίο εμπλέκεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με το αμινοξύ 90 (Cherkasova et al., 2002). Το κατάλοιπο 168 (Glu 168 Gly) εντοπίζεται στη θηλιά EF και συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με υδροφοβική επιφάνεια του υποδοχέα CD155, κατά την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο (Harber et al., 1995). Το αμινοξύ 220 (Gln 220 Arg) ανήκει στην N-AgIII, ενώ το αμινοξύ 257 (Ile 257 Val) βρίσκεται στο εξωτερικό του καψιδίου, γειτονικά του καταλοίπου 90, με το οποίο ενώνεται μέσω δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 3.1).

Πίνακας 3.1. Μεταλλάξεις των Sabin 1 στελεχών. Με * οι μεταλλάξεις που οδήγησαν σε αμινοξική αλλαγή. Το ποσοστό απόκλισης υπολογίστηκε με βάση το πρότυπο στέλεχος Sabin 1 (AY184219)

Εμβολιακή προέλευση	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	% Απόκλιση από VP1 Sabin 1	
Sabin 1	B1	A2623G		0.11%	
	B2	A2623G		0.11%	
	B3	A2623G		0.33%	
	B4		A2749G*	Ile 90 Met	0.77%
			A3248G*	Ile 257 Val	
			G2605A		
			G2765A*	Ala 96 Thr	
			G2776T*	Lys 99 Asn	
			A2795G*	Thr 106 Ala	
			C2917T		
		A2982G*	Glu 168 Gly		
		A3138G*	Gln 220 Arg		
	B5	A2623G		0.11%	
B6	A2623G		0.11%		
B7	A2623G		0.11%		



Εικόνα 3.1. Απεικόνιση αμινοξικών αλλαγών των Sabin 1 στελεχών στο καψιδιακό πρωτομερές. Η δομή 1ASJ.pdb χρησιμοποιήθηκε (Wien et al., 1997). Αρίθμηση σύμφωνα με AY184219.

3.1.3 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ SABIN 2

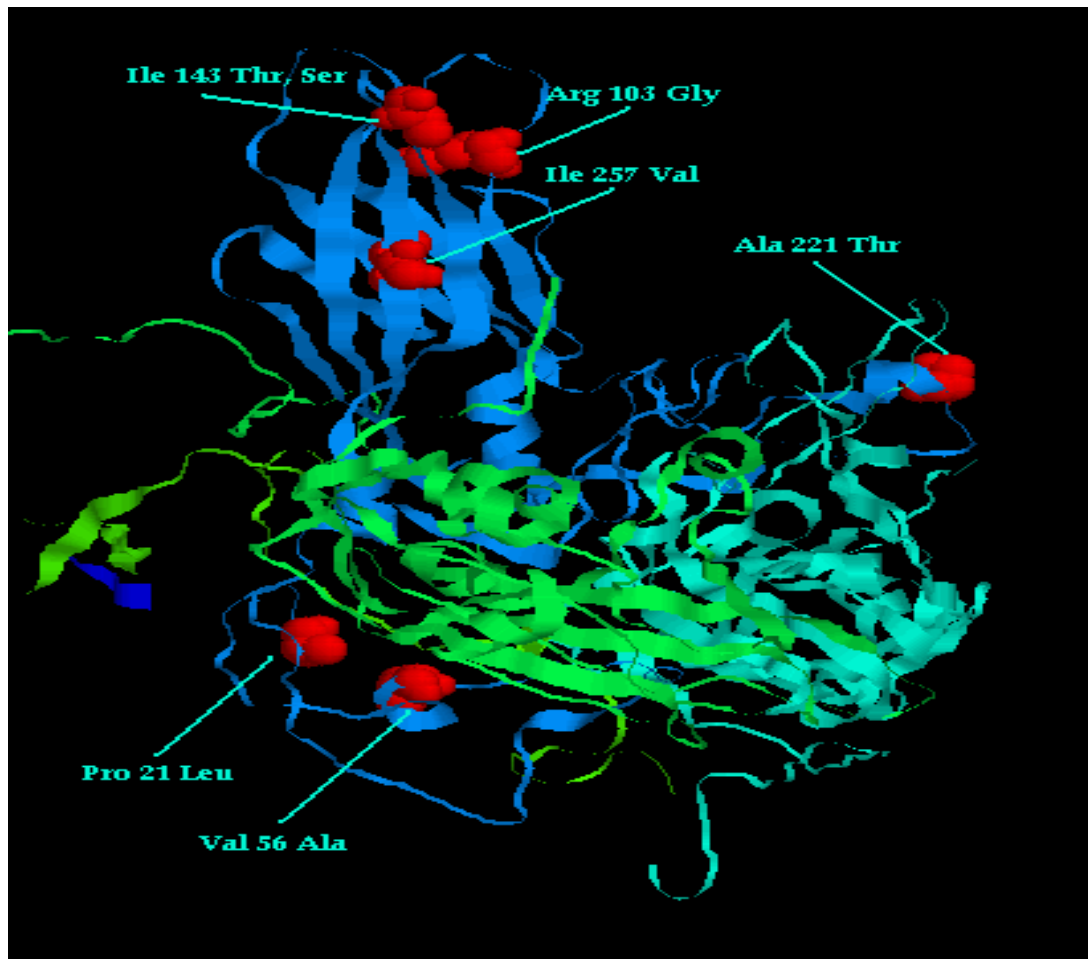
Τα στελέχη Sabin 2 εμβολιακής προέλευσης χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό ποσοστό μη συνώνυμων μεταλλάξεων σε σχέση με τις συνώνυμες. Στο B9 στέλεχος όλες οι μεταλλάξεις οδήγησαν σε αμινοξικές αλλαγές. Στο στέλεχος B10 και η μεταστροφή T 2909 G και η μετάπτωση G 3142 A, είχαν ως αποτέλεσμα τις αμινοξικές αλλαγές Ile 143 Ser και Ala 221 Thr αντίστοιχα. Στο στέλεχος B11 οι τρεις από τις τέσσερις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν ήταν μη συνώνυμες. Συγκεκριμένα, οι C 2543 T, T 2909 C και A 3248 G κατέληξαν στις αμινοξικές αλλαγές Pro 21 Leu, Ile 143 Thr και Ile 257 Val αντίστοιχα. Τέλος, στα στελέχη B8 και B12 δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις (Πίνακας 3.2).

Τα κατάλοιπα 21 (Pro 21 Leu) και 56 (Val 56 Ala) εδράζονται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου. Το αμινοξύ 21 βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της VP1 και το αμινοξύ 56 πιστεύεται ότι συμμετέχει σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

VP1 και VP3 πρωτεϊνών (Cherkasova et al., 2002). Το κατάλογο 103 (Arg 103 Gly) εδράζεται στη VP1 BC θηλιά. Το αμινοξύ 143 (Ile 143 Thr, Ile 143 Ser) όπως και το 257 (Ile 257 Val) βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ τέλος το κατάλογο 221 (Ala 221 Thr) εδράζεται στη N-AgIIa θέση (Εικόνα 3.2).

Πίνακας 3.2. Μεταλλάξεις των Sabin 2 στελεχών. Με * οι μεταλλάξεις που οδήγησαν σε αμινοξική αλλαγή. Το ποσοστό απόκλισης υπολογίστηκε με βάση το πρότυπο στέλεχος Sabin 2 (AY184220)

Εμβολιακή προέλευση	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	% Απόκλιση από VP1 Sabin 2
Sabin 2	B8	-	-	0%
	B9	C2543T*	Pro 21 Leu	0.44%
		T2648C*	Val 56 Ala	
		A2788G*	Arg 103 Gly	
		T2909C*	Ile 143 Thr	
	B10	T2909G*	Ile 143 Ser	0.22%
		G3142A*	Ala 221 Thr	0.44%
	B11	C2543T*	Pro 21 Leu	
		T2909C*	Ile 143 Thr	
			C3240T	
		A3250G*	Ile 257 Val	
B12	-	-	-	0%



Εικόνα 3.2. Απεικόνιση αμινοξικών αλλαγών των Sabin 2 στελεχών στο καρδιδιακό πρωτομερές. Η δομή 1ASJ.pdb χρησιμοποιήθηκε (Wien et al., 1997). Αρίθμηση σύμφωνα με AY184220.

3.1.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ SABIN 3

Η μετάπτωση C 2493 T, η οποία οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή Thr 6 Ile ανιχνεύθηκε σε όλα τα στελέχη Sabin 3 εμβολιακής προέλευσης. Η μετάλλαξη C 2493 T ήταν η μόνη που ανιχνεύθηκε για το B13, ωστόσο για κάθε ένα εκ των B14 και B15, δύο επιπλέον μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν (Πίνακας 3.3).

Σε όλα τα στελέχη εμβολιακής προέλευσης Sabin 3, ανιχνεύθηκε η ίδια αμινοξική αλλαγή στο αμινοξύ 6, Thr 6 Ile. Το κατάλοιπο 6 εδράζεται στο εσωτερικό του καριδίου, στο αμινοτελικό άκρο της VP1.

Πίνακας 3.3. Μεταλλάξεις των Sabin 3 στελεχών. Με * οι μεταλλάξεις που οδήγησαν σε αμινοξική αλλαγή. Το ποσοστό απόκλισης υπολογίστηκε με βάση το πρότυπο στέλεχος Sabin 3 (AY184221)

Εμβολιακή προέλευση	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	% Απόκλιση από VP1 Sabin 3	
Sabin 3	B13	C2493T*	Thr 6 Ile	0.11%	
	B14	C2493T*	Thr 6 Ile	0.33%	
	B15	G2659A			
		A2716G			
		C2493T*	Thr 6 Ile	0.33%	
	A2608G				
	A3259G				

3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97

3.2.1 ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97

Βάσει της δημοσίευσης των Georgoroulou & Markoulatos, 2000 διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος 7/b/97 ήταν Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης. Η αλληλούχηση της VP1 γενωμικής περιοχής του στελέχους, αποκάλυψε συνολικά 17 μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα η VP1 περιοχή του 7/b/97, να παρουσιάζει 1,87% γενωμική απόκλιση από τη VP1 περιοχή του πρότυπου στελέχους Sabin 1. Σύμφωνα με τα κριτήρια της Π.Ο.Υ το στέλεχος 7/b/97 χαρακτηρίζεται σαν VDPV τύπου 1. Για αυτό το λόγο ακολούθησε πλήρης γενωμικός χαρακτηρισμός του εν λόγω στελέχους.

3.2.2 ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97

Σχεδόν ολόκληρο το γένωμα (από τη βάση 48 μέχρι τη βάση 7406) του στελέχους 7/b/97 αλληλουχήθηκε και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση με το γένωμα του πρότυπου στελέχους Sabin 1. Αρκετές μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στην 5' UTR και στην καψιδιακή περιοχή, ενώ ανιχνεύθηκε και ανασυνδιασμός στην 2A περιοχή (Πίνακας 3.4). Στην 5'UTR ανιχνεύθηκαν 2 μεταλλάξεις, η μετάπτωση C 471 T και η μεταστροφή C 583 G.

Στην καψιδιακή περιοχή η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν ήταν συνώνυμες. Συγκεκριμένα, από τις 34 συνολικά μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν οι 27 ήταν συνώνυμες (80%) και οι 7 μη συνώνυμες. Οι καψιδιακές αμινοξικές αλλαγές

παρουσιάζονται στην εικόνα 3.3.

Στις περιοχές VP4 και VP2, συνολικά ανιχνεύθηκαν 10 μεταλλάξεις. Στην VP3 γενωμική περιοχή από τις 7 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν, μόνο οι 2 κατέληξαν σε αμινοξική αλλαγή. Συγκεκριμένα, η μετάπτωση A 1944 C οδήγησε στην αμινοξική αλλαγή Lys 60 Thr, ενώ η μεταστροφή A 2438 T οδήγησε στην Met 225 Leu αμινοξική αλλαγή.

Το αμινοξύ 60 (Lys 60 Thr) της VP3, εδράζεται στο εξωτερικό του καψιδίου, στην αντιγονική θέση III του ιού. Το κατάλοιπο 225 (Met 225 Leu) της VP3, εδράζεται στο εσωτερικό μέρος του καψιδίου, στην επιφάνεια μεταξύ των πρωτομερών, σε μια περιοχή που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά την συναρμογή των νέων ικών σωματίων, όσο και κατά την αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα (Macadam et al., 1991; Colston & Racionello, 1994).

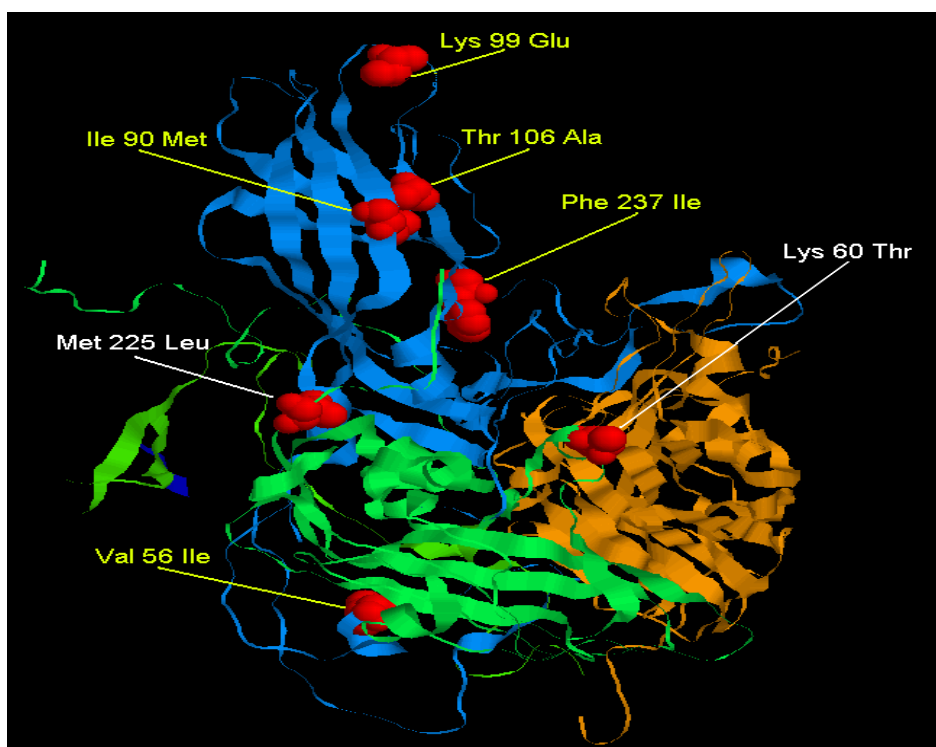
Στην VP1 γενωμική περιοχή οι 5 από τις συνολικά 17 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν οδήγησαν σε αμινοξικές αλλαγές. Οι μεταπτώσεις G 2645 A, A 2749 G, A 2774 G και A 2795 G οδήγησαν στις αμινοξικές αλλαγές Val 56 Ile, Ile 90 Met, Lys 99 Glu και Thr 106 Ala αντίστοιχα. Τέλος, η μεταστροφή T 3188 A κατέληξε στην αλλαγή Phe 237 Ile. Το κατάλοιπο 237 (Phe 237 Ile) βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου και εδράζεται δίπλα στην θηλιά GH της VP1, περιοχή η οποία συμμετέχει στη δημιουργία του «πατώματος» της αύλακας πρόσδεσης του CD155. Η τοπολογία όλων των υπόλοιπων αμινοξικών αλλαγών έχει αναλυθεί στις ενότητες 3.1.2 και 3.1.3.

Πίνακας 3.4. Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις και αμινοξικές αλλαγές του στελέχους 7/b/97

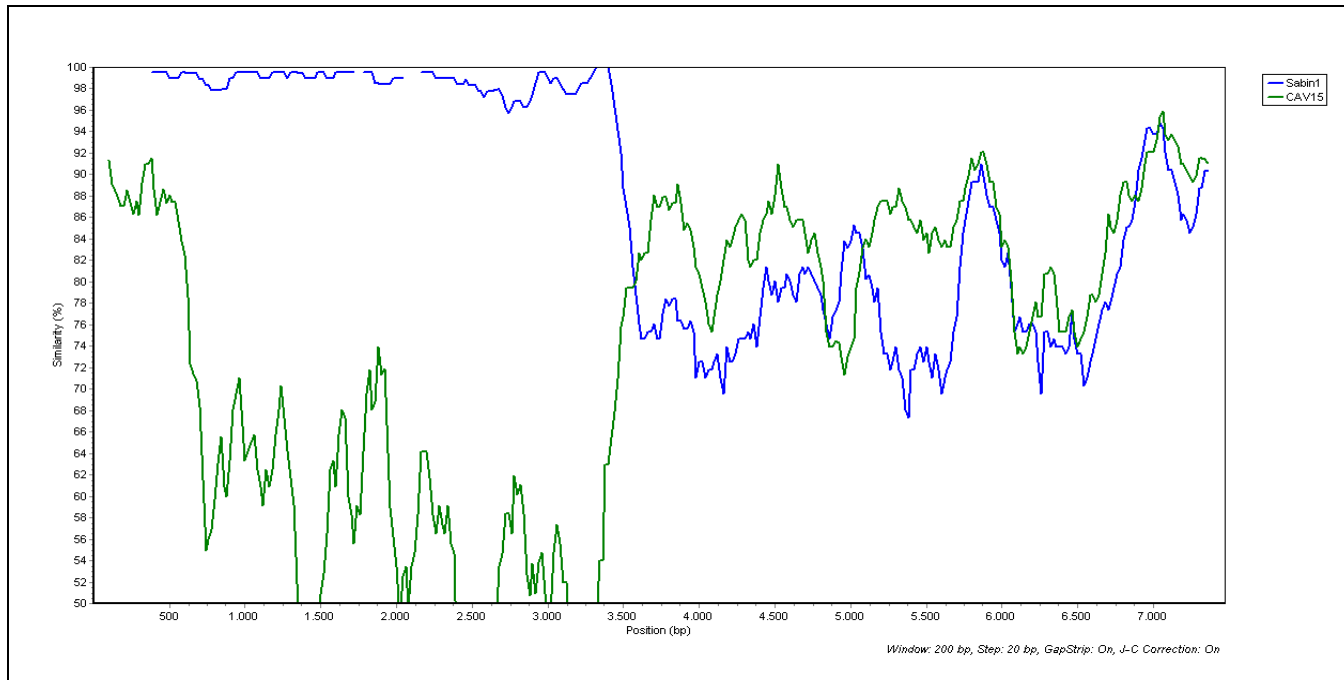
Περιοχή	Νουκλεοτιδίο			Αμινοξύ		
	Θέση	Sabin1	7/b/97	Θέση	Sabin 1	7/b/97
5' UTR	471	C	T			
	583	C	G			
VP4	790	A	G			
	793	T	C			
	814	C	T			
VP2	856	T	C			
	1060	T	C			
	1174	G	A			
	1354	T	C			
	1357	C	T			
	1477	G	A			
	1624	T	C			
VP3	1864	T	C			
	1942	A	G			
	1944	A	C	60	Lys	Thr
	2243	C	T			
	2332	C	T			
	2438	A	T	225	Met	Leu
VP1	2476	A	G			
	2542	A	G			
	2617	A	G			
	2623	A	G			
	2645	G	A	56	Val	Ile
	2749	A	G	90	Ile	Met
	2767	T	C			
	2774	A	G	99	Lys	Glu
	2779	T	C			
	2789	C	T			
	2795	A	G	106	Thr	Ala
	2905	C	T			
	3067	A	G			
	3070	G	A			
	3133	G	A			
3157	C	T				
3188	T	A	237	Phe	Ile	
3349	G	A				

Επιπροσθέτως, η αλληλούχιση του γενώματος του 7/b/97 αποκάλυψε ανασυνδιασμό στην 2A γενωμική περιοχή. Το στέλεχος 7/b/97 είναι προϊόν ανασυνδιασμού μεταξύ ενός στελέχους τύπου Sabin 1 και ενός μη Sabin ιικού στελέχους.

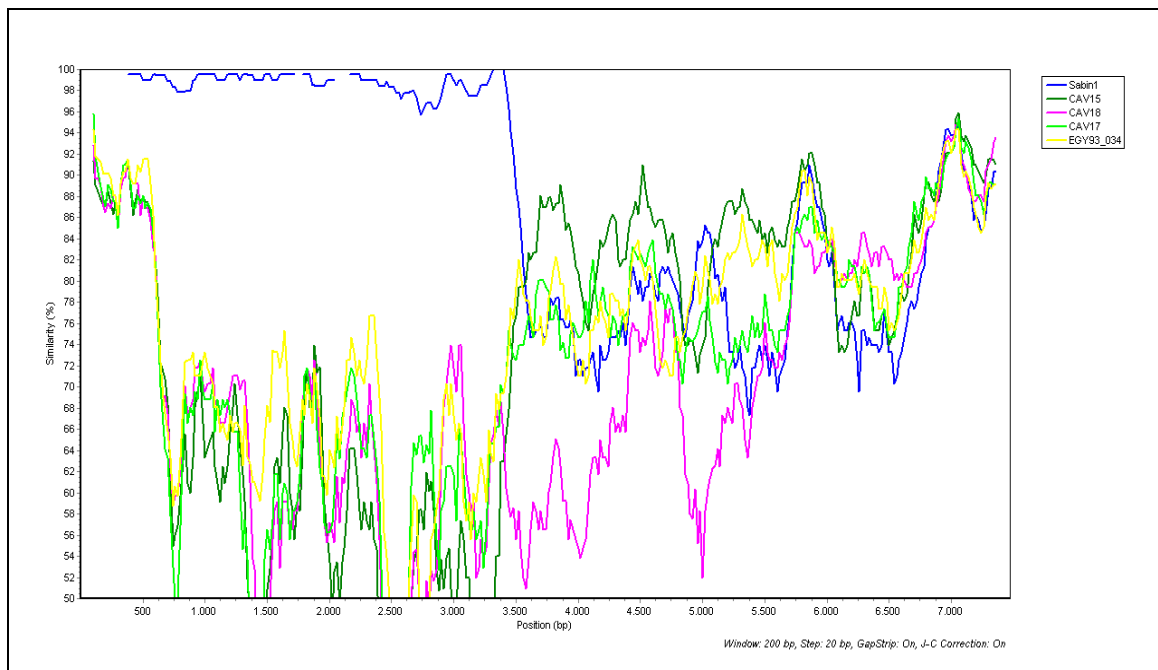
Υστερα από εκτεταμένη έρευνα στην GenBank δεν βρέθηκε κάποιο ταυτοποιημένο στέλεχος με ποσοστό ομοιότητας μεγαλύτερο ή ίσο του 95%. Η ανάλυση μέσω του προγράμματος Simplot έδειξε ότι στις περισσότερες περιοχές, το στέλεχος με τη μεγαλύτερη ομοιότητα (κυμαινόμενη από 72% μέχρι 92%) ήταν το πρότυπο στέλεχος CAV15 (Εικόνα 3.4). Τα πρότυπα στελέχη Sabin 1 και CAV18 παρουσίασαν υψηλές ομοιότητες (~ 80%) σε τμήματα των 2C και 3D περιοχών αντίστοιχα (Εικόνα 3.5). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι πιθανότατα το στέλεχος δότης των μη καψιδιακών περιοχών ανήκει στο είδος C των εντεροϊών.



Εικόνα 3.3. Καψιδιακές αμινοξικές αλλαγές του στελέχους 7/b/97. Για την απεικόνιση χρησιμοποιήθηκε η δομή 1ASJ.pdb (Wien et al., 1997).



Εικόνα 3.4α. Ανάλυση μέσω Simplot ολόκληρου του γενώματος του στελέχους 7/b/97. Με μπλε και πράσινο απεικονίζονται τα ποσοστά ομοιότητας του 7/b/97 με το πρότυπο Sabin 1 (AY184219) και με το πρότυπο CAV15 (AF465512) αντίστοιχα. Στον οριζόντιο άξονα εδράζεται ο αριθμός βάσεων, ενώ στον κάθετο το % ποσοστό ομοιότητας.



Εικόνα 3.4β. Ανάλυση μέσω Simplot ολόκληρου του γενώματος του στελέχους 7/b/97. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Sabin 1 (AY184219), CAV15 (AF465512), CAV17 (AF499639), CAV18 (AF465513) και EGY93_034 (AF448783). Τα στελέχη CAV15, CAV17 και CAV18 ανήκουν στο είδος C των

εντεροϊών, ενώ το EGY93-034 είναι άγριο στέλεχος πολιοϊού τύπου 2.

3.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Κ/2002

3.3.1 ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Κ/2002

Η Sabin 3 εμβολιακή προέλευση του στελέχους Κ/2002 αποκαλύφθηκε βάσει της δημοσίευσης των Georgoroulou & Markoulatos, 2000.

Η αλληλούχιση ολόκληρης της VP1 καψιδιακής περιοχής, οδήγησε στην ανίχνευση ανασυνδιασμού στο 3' άκρο της. Εξαιτίας της σπανιότητας εύρεσης ανασυνδιασμού στη συγκεκριμένη περιοχή, ακολούθησε αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος του Κ/2002, προκειμένου να αναλυθούν περαιτέρω οι ιδιότητες του συγκεκριμένου στελέχους.

3.3.2 ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Κ/2002

Αλληλουχίστηκε σχεδόν ολόκληρο (από τη βάση 41 μέχρι τη βάση 7403) το γονιδίωμα του στελέχους Κ/2002 και στη συνέχεια ακολούθησε στοιχισμός μεταξύ των στελεχών Κ/2002, Sabin 3 και Sabin 2. Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύθηκαν αρκετές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του Κ/2002, ενώ δεν ανιχνεύθηκε άλλος ανασυνδιασμός. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο γένωμα του Κ/2002 παρουσιάζονται στον πίνακα 3.5.

Στην 5' UTR ανιχνεύθηκαν συνολικά 4 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι 3 εδράζονται σε συντηρημένα στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών, ενώ η μία βρίσκεται στην υπερμεταβλητή περιοχή του IRES. Συγκεκριμένα, τα νουκλεοτίδια 114 και 190 στα οποία ανιχνεύθηκε η μετάπτωση C→T εδράζονται στα δομικά στοιχεία II και III αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, το νουκλεοτίδιο 472 (T 472 C) βρίσκεται στη δίκλωνη περιοχή του δομικού στοιχείου V και η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει συσχετιστεί με την απόκτηση νευρομολυσματικού φαινοτύπου στα στελέχη Sabin 3 (Pilibenko et al., 1989).

Στην καψιδιακή περιοχή οι 11 από τις 12 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν ήταν συνώνυμες. Συγκεκριμένα, στις VP2 και VP3 ανιχνεύθηκαν από 2 συνώνυμες μεταλλάξεις, ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των μεταλλάξεων ανιχνεύθηκε στην VP1

περιοχή.

Στην VP1 περιοχή μόνο μία από τις 8 μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν οδήγησε σε αμινοξική αλλαγή. Ειδικότερα, η μετάπτωση C 2493 T οδήγησε στην αμινοξική αλλαγή Thr 6 Ile. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κατάλοιπο 6 εδράζεται στο εσωτερικό του καψιδίου στο αμινοτελικό άκρο της VP1.

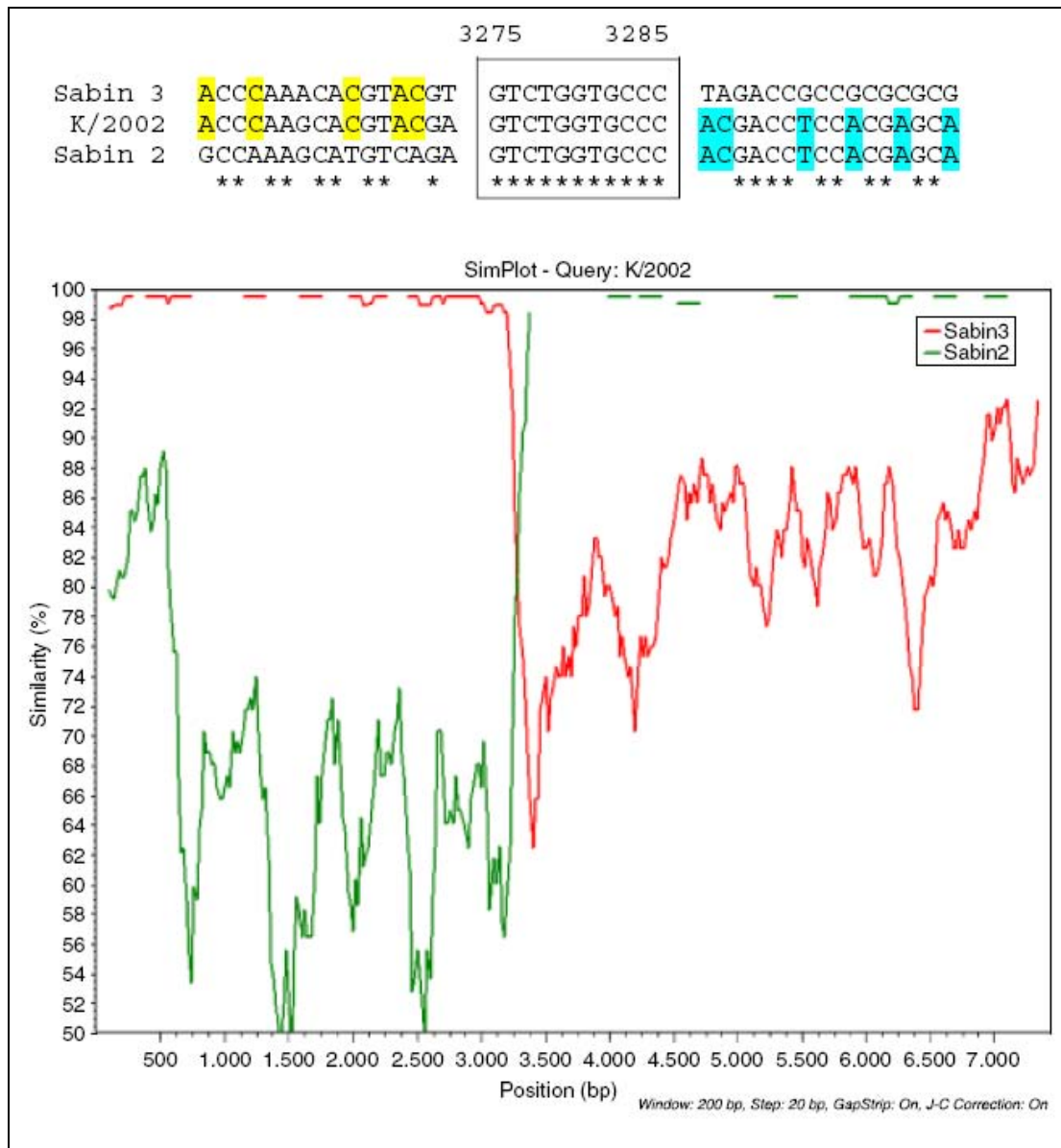
Επιπροσθέτως, στο 3' άκρο της VP1 και στην περιοχή που οριοθετείται από τα νουκλεοτίδια 3275-3285, ανιχνεύθηκε ανασυνδιασμός τύπου Sabin 3/ Sabin 2 (Εικόνα 3.5). Ο ανασυνδιασμός, οδήγησε στην εισαγωγή 6 Sabin 2 αμινοξέων, στις αντίστοιχες θέσεις της VP1 περιοχής ενός Sabin 3 στελέχους (Εικόνα 3.6). Οι αμινοξικές αλλαγές εδράζονται στις θέσεις 279 (Phe 279 Tyr), 286 (Arg 286 Lys), 287 (Asn 287 Asp), 288 (Asn 288 Gly), 290 (Asp 290 Thr) και 293 (Ser 293 Pro).

Τα κατάλοιπα 286, 287, 288 και 290 βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος του καψιδίου και συνιστούν την αντιγονική θέση IIIa (Minor et al., 1986). Το αμινοξύ 293 εδράζεται στην περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα CD155. Συγκεκριμένα, το κατάλοιπο 293 αποτελεί μέρος της περιοχής της αύλακας, η οποία κατά την πρόσδεση ιού- υποδοχέα έρχεται σε επαφή με την αμινοτελικό άκρο της D1 περιοχής του CD155 (Belnap et al., 2000). Τέλος, το κατάλοιπο 279 εδράζεται στο εξωτερικό του καψιδίου και γειτνιάζει με το κατάλοιπο 290.

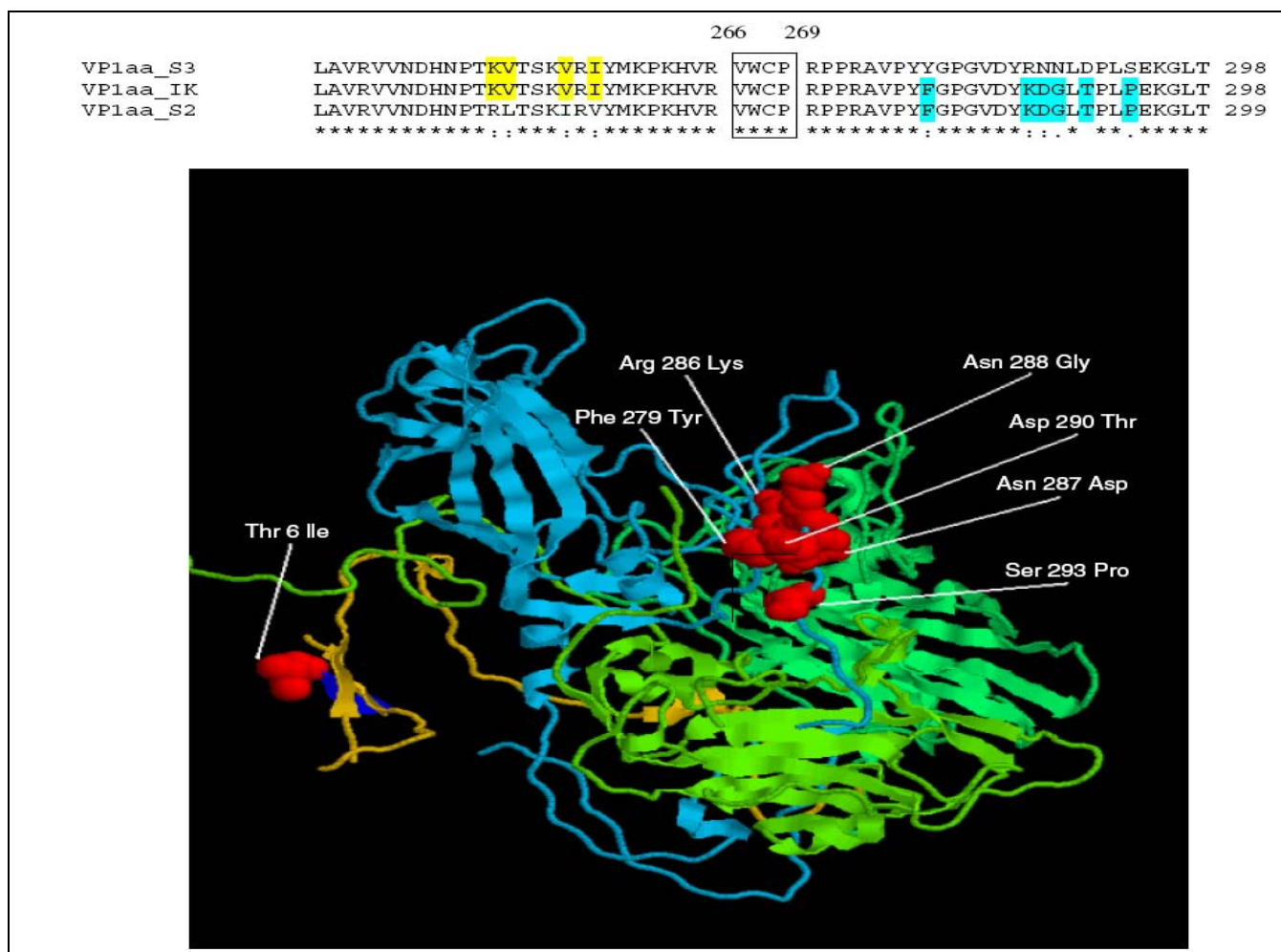
Στο μη δομικό Sabin 2 μέρος του γονιδιώματος οι περισσότερες μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν ήταν συνώνυμες. Δύο μεταλλάξεις κατέληξαν σε αμινοξικές αλλαγές, η μεταστροφή T 4613 A και η μετάπτωση A 6257 G, οι οποίες οδήγησαν στις αλλαγές Phe 164 Tyr (2C περιοχή) και Asn 91 Ser (3D περιοχή) αντίστοιχα.

Εμβολιακή προέλευση	Περιοχή	Νουκλεοτιδίο			Αμινοξύ		
		Θέση	Sabin	K/2002	Θέση	Sabin	K/2002
Sabin 3	5'UTR	114	C	T			
		190	C	T			
		472	T	C			
		658	A	G			
	VP2	1228	A	C			
		1672	T	C			
	VP3	2047	G	A			
		2153	C	T			
	VP1	2493	C	T	6	Thr	Ile
		2593	A	G			
		2770	G	T			
		2977	A	G			
		3073	A	G			
		3118	A	G			
		3265	A	G			
		3274	T	A			
Sabin 2	2B	4056	C	T			
	2C	4308	C	T			
		4611	C	T			
		4613	T	A	164	Phe	Tyr
	3A	5364	G	A			
	3C	5949	G	A			
	3D	6144	C	T			
		6257	A	G	91	Asn	Ser
		6609	T	C			
		7002	T	C			

Πίνακας 3.5. Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις και αμινοξικές αλλαγές του στελέχους K/2002



Εικόνα 3.5. Στο πάνω μέρος απεικονίζεται το σημείο ανασυνδιασμού. Με κίτρινο παρουσιάζονται οι ομοιότητες του K/2002 με το Sabin 3, ενώ με γαλάζιο οι ομοιότητες του K/2002 με το Sabin 2. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η εκατοστιαία ομοιότητα του K/2002 με το Sabin 3 (κόκκινο) και το Sabin 2 (πράσινο).



Εικόνα 3.6. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλουχία στο σημείο ανασυνδιασμού. Με κίτρινο οι ομοιότητες ανάμεσα στο K/2002 και στο Sabin 3, με γαλάζιο οι ομοιότητες ανάμεσα στο K/2002 και στο Sabin 2. Στο κάτω μέρος απεικονίζονται οι καψιδιακές αμινοξικές αλλαγές του στελέχους K/2002. Για την απεικόνιση χρησιμοποιήθηκε η δομή 1VBE.pdb (Grant et al., 1994).

3.3.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ K/2002

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; Gavrilin et al., 2000; Martin et al., 2000), ο ρυθμός συσσώρευσης συνώνυμων μεταλλάξεων στους πολιοϊούς, παρουσιάζει γραμμικό χαρακτήρα. Επίσης, ένας αξιόπιστος προσδιορισμός της ηλικίας ενός στελέχους είναι δυνατός, εάν οι υπολογισμοί βασιστούν σε συνώνυμες μεταλλάξεις στη VP1 περιοχή (Cherkasova et al., 2002).

Το ποσοστό των μεταλλαγμένων συνώνυμων νουκλεοτιδικών θέσεων ως προς το σύνολο των συνώνυμων νουκλεοτιδικών θέσεων, ανά χρόνο (Ks), για την VP1 περιοχή των στελεχών Sabin 1 είναι 3,28% (Gavrilin et al., 2000).

Η τιμή Ks για τη VP1 γενωμική περιοχή του K/2002 είναι 3,02%. Αυτό σημαίνει ότι η ηλικία του K/2002 είναι περίπου 11 μήνες, αν οι υπολογισμοί βασιστούν στη VP1. Η τιμή Ks για ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή των Sabin 3 στελεχών είναι 3,4% (Martin et al., 2000). Η τιμή Ks για ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή του K/2002 είναι 0,8%. Σαν αποτέλεσμα, αν ο υπολογισμός της ηλικίας βασιστεί σε ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή, η ηλικία του K/2002 είναι περίπου 12 εβδομάδες.

3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΩΝ ΣΤΙΣ 2C ΚΑΙ 3D ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

3.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Ο προσδιορισμός της άγριας ή εμβολιακής προέλευσης των κλινικών στελεχών του πίνακα 2.2, επιτεύχθηκε βάσει της δημοσίευσης των Georgoroulou & Markoulatos, 2000. Όλα τα στελέχη, C1-C9, ήταν εμβολιακής προέλευσης. Συγκεκριμένα, τα στελέχη C3, C4, C7 ήταν Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης, το στέλεχος C1 ήταν Sabin 2 εμβολιακής προέλευσης, ενώ τα στελέχη C2, C5, C6, C8 και C9 ήταν Sabin 3 εμβολιακής προέλευσης.

3.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ R.F.L.P ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Για την ανίχνευση ανασυνδιασμών μεταξύ εμβολιακών στελεχών πολιοϊών, σχεδιάστηκε ανάλυση μέσω RFLP σε δύο περιοχές, μακρινές μεταξύ τους, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα ανασυνδιασμών, στις 2C και 3D.

Από όλα τα στελέχη που αναλύθηκαν, τρία παρουσίασαν διαφορετικά από τα αναμενόμενα πρότυπα πέψων (Πίνακας 3.6). Συγκεκριμένα, το στέλεχος C7, το οποίο ήταν ταυτοποιημένο ως Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης, παρουσίασε στην 2C πρότυπο πέψης Sabin 3 και στην 3D πρότυπο πέψης Sabin 2. Το στέλεχος C6, το οποίο ταυτοποιήθηκε σαν Sabin 3, παρουσίασε στη 3D πρότυπο πέψης Sabin 2, ενώ επίσης, το στέλεχος C9, το οποίο ταυτοποιήθηκε σαν Sabin 3, παρουσίασε στην 3D πρότυπο πέψης Sabin 2.

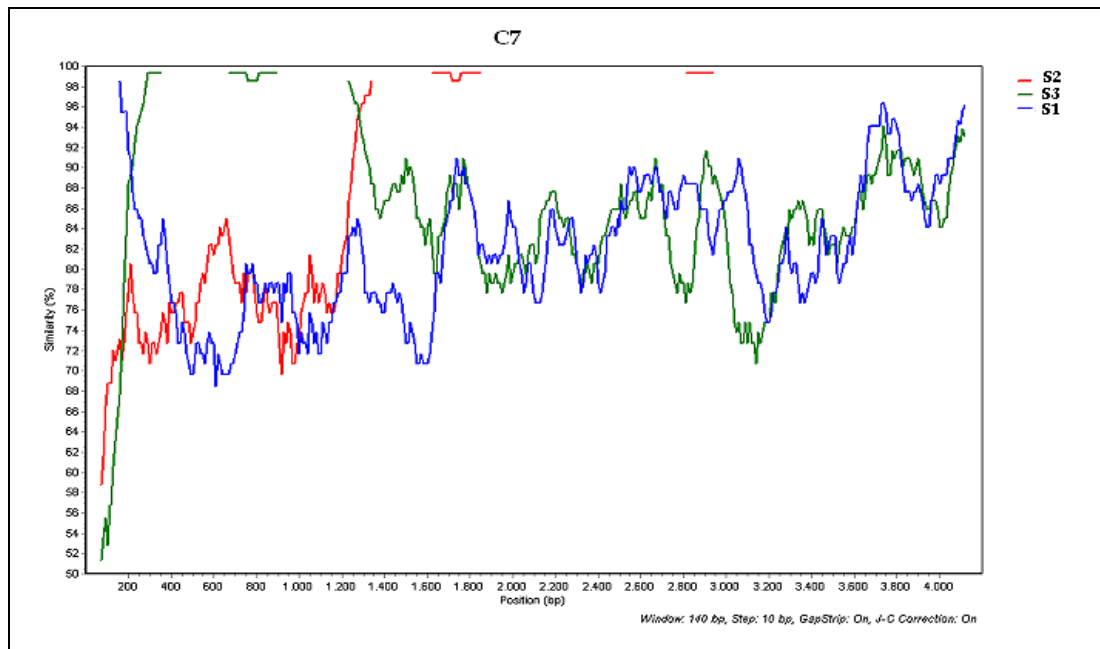
Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα RFLP των εμβολιακής προέλευσης κλινικών στελεχών, στις 2C και 3D περιοχές

Στέλεχος	Εμβολιακή προέλευση	Περιοχή 2C (πρότυπο πέψης)	Περιοχή 3D (πρότυπο πέψης)
C1	Sabin 2	Sabin 2	Sabin 2
C2	Sabin 3	Sabin 3	Sabin 3
C3	Sabin 1	Sabin 1	Sabin 1
C4	Sabin 1	Sabin 1	Sabin 1
C5	Sabin 3	Sabin 3	Sabin 3
C6	Sabin 3	Sabin 3	Sabin 2
C7	Sabin 1	Sabin 3	Sabin 2
C8	Sabin 3	Sabin 3	Sabin 3
C9	Sabin 3	Sabin 3	Sabin 2

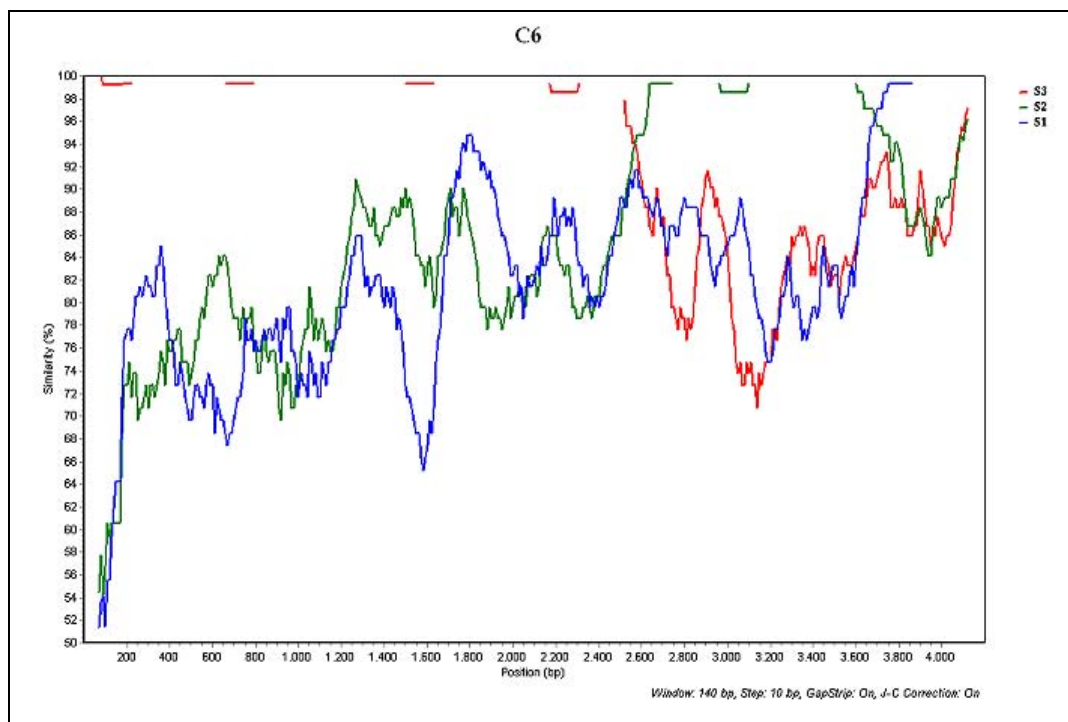
3.4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα στελέχη C6, C7 και C9, τα οποία έδειξαν διαφορετικό πρότυπο πέψων από το αναμενόμενο, αλληλουχήθηκαν από το 3' άκρο της VP1 μέχρι και την 3'UTR περιοχή.

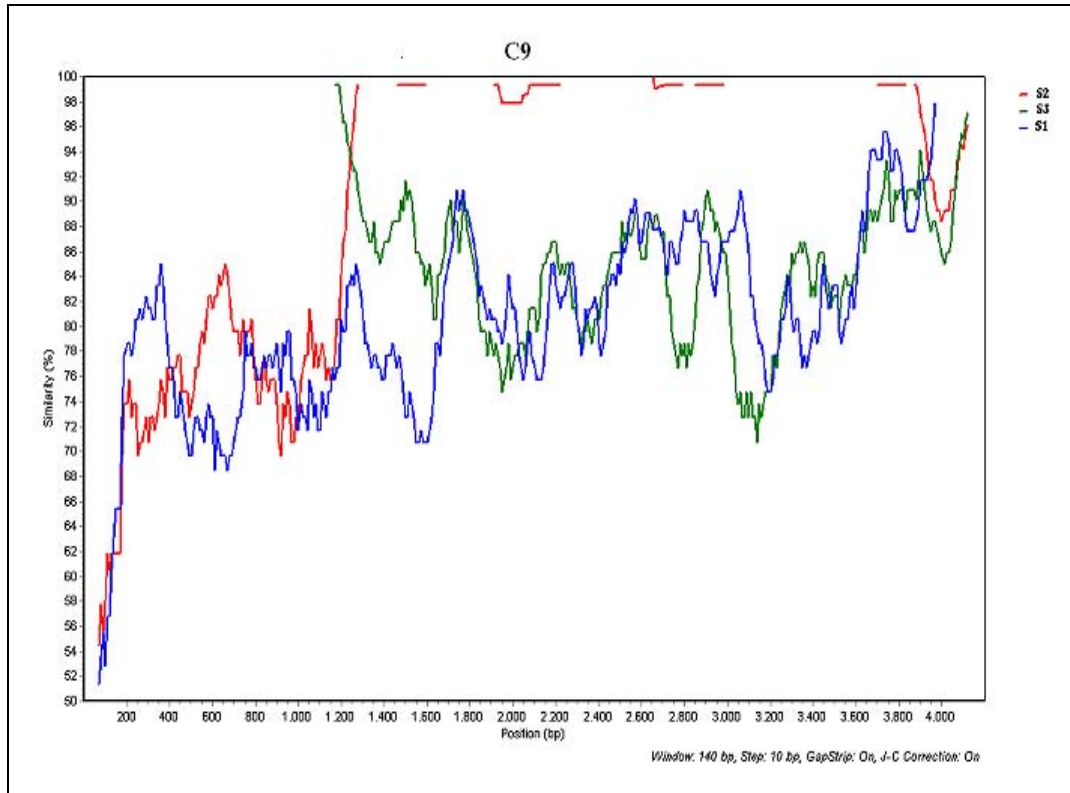
Σε κάθε ένα από τα στελέχη C6, C7 και C9 ανιχνεύθηκαν 2 σημεία ανασυνδιασμού. Συγκεκριμένα, στο στέλεχος C7 το πρώτο σημείο ανασυνδιασμού εντοπίστηκε μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3461-3465 της 2A περιοχής και ήταν τύπου Sabin 1/Sabin 3, ενώ το δεύτερο μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4517-4533 της 2C περιοχής (τύπου Sabin 3/Sabin 2). (Εικόνα 3.7). Στο στέλεχος C6, το πρώτο σημείο ανασυνδιασμού εδράζεται στην περιοχή 5804-5814 (τύπου Sabin 3/ Sabin 2), στο τέλος της 3C, ενώ το δεύτερο σημείο, στην περιοχή 6893-6901 (τύπου Sabin 2/Sabin 1), στο τέλος της 3D (Εικόνα 3.8). Τέλος, στο στέλεχος C9 το πρώτο σημείο ανασυνδιασμού ανιχνεύτηκε στην περιοχή 4449-4464 (τύπου Sabin 3/Sabin 2) της 2C και το δεύτερο στην περιοχή 7142-7164 (τύπου Sabin 2/Sabin 1) στο τέλος της 3D (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.7. Ανάλυση μέσω Simplot του στελέχους C7. Με κόκκινο, πράσινο, μπλε αντιπροσωπεύονται τα ποσοστά εκατοστιαίας ομοιότητας του C7 με τα Sabin 2, Sabin 3 και Sabin 1 αντίστοιχα.



Εικόνα 3.8. Ανάλυση μέσω Simplot του στελέχους C6. Με κόκκινο, πράσινο, μπλε αντιπροσωπεύονται τα ποσοστά εκατοστιαίας ομοιότητας του C6 με τα Sabin 3, Sabin 2 και Sabin 1 αντίστοιχα.



Εικόνα 3.9. Ανάλυση μέσω Simplot του στελέχους C9. Με κόκκινο, πράσινο, μπλε αντιπροσωπεύονται τα ποσοστά εκατοστιαίας ομοιότητας του C9 με τα Sabin 2, Sabin 3 και Sabin 1 αντίστοιχα.

3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IN VITRO ΜΟΝΤΕΛΟΥ

Συνολικά ανιχνεύθηκαν 6 ανασυνδιασμένα στελέχη (V1-V6) και όλα με το ζεύγος εκκινητών S12sD3-S21aD3. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.10.2 και συγκεκριμένα, στον πίνακα 2.13, το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ανασυνδιασμών τύπου Sabin 1/Sabin 2 στη 3D γενωμική περιοχή. Στη συνέχεια τα RT-PCR προϊόντα κλωνοποιήθηκαν και κάθε κλώνος αλληλουχίστηκε 5 φορές και προς τις 2 κατευθύνσεις.

Στα στελέχη V1, V2 και V3 ανιχνεύθηκε ανασυνδιασμός τύπου Sabin 1/Sabin 2 στο ίδιο σημείο (7073-7110). Επίσης, μεταξύ των στελεχών V5 και V6, ανιχνεύθηκε ακριβώς στο ίδιο σημείο (6837-6841), ανασυνδιασμός τύπου Sabin 1/Sabin 2. Τέλος, στο στέλεχος V4 ανιχνεύθηκαν τρία διαφορετικά σημεία ανασυνδιασμού, το πρώτο στην περιοχή 6837-6841 (τύπου Sabin 1/Sabin2), το δεύτερο στην περιοχή 6867-6895 (τύπου Sabin2/Sabin1) και το τρίτο στην περιοχή 6903-6911 (τύπου Sabin 1/Sabin2). Στον πίνακα 3.7 παραθέτονται τα αποτελέσματα του in vitro μοντέλου.

Πίνακας 3.7. Αποτελέσματα in vitro μοντέλου. Με μπλε απεικονίζονται τα σημεία των Sabin 1/Sabin 2 ανασυνδιασμών, ενώ με κόκκινο τα σημεία των Sabin 2/Sabin 1 ανασυνδιασμών

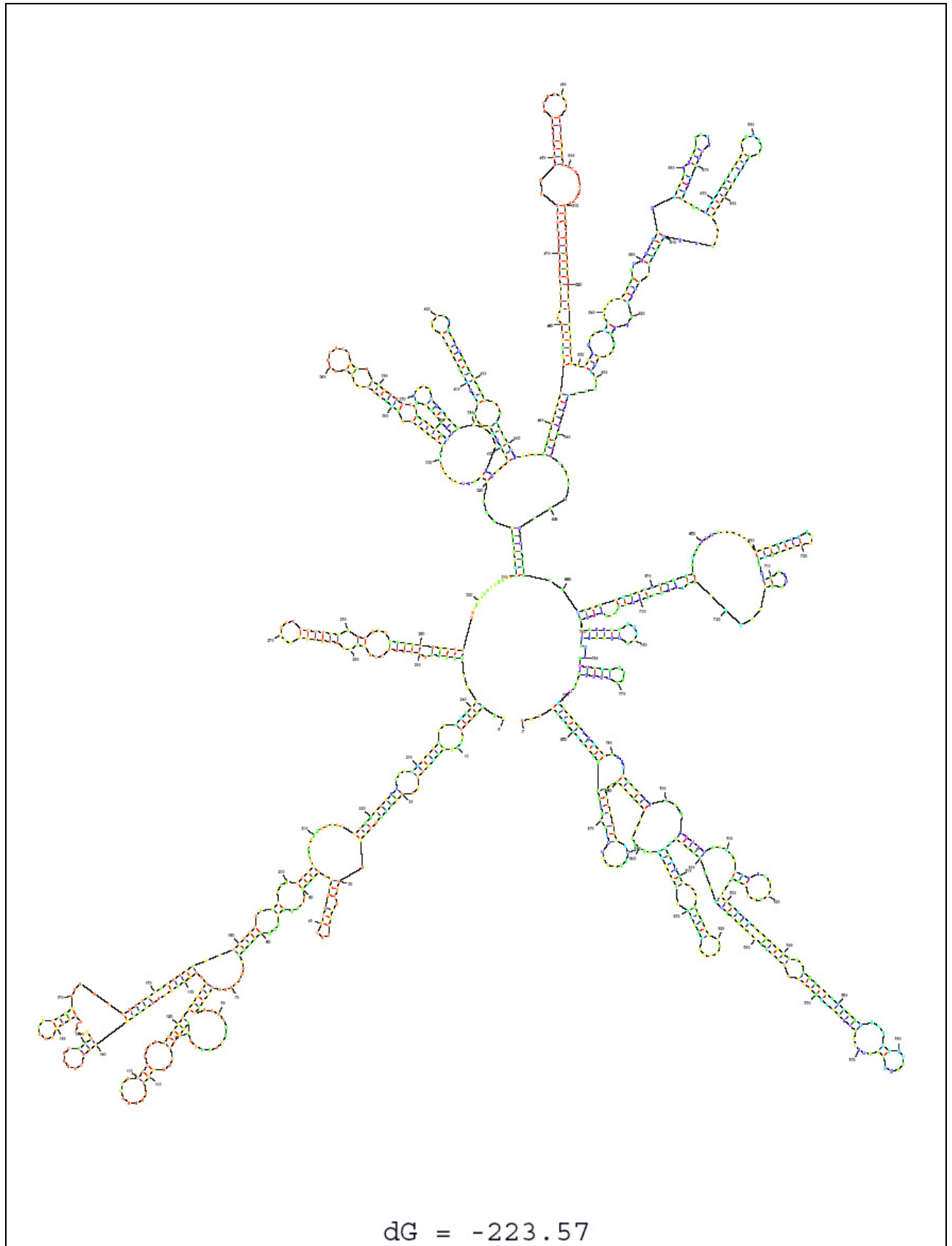
Στέλεχος	Τύπος ανασυνδιασμού	Περιοχή	Σημείο ανασυνδιασμού
V1	S1/S2	3D	7073-7110
V2	S1/S2	3D	7073-7110
V3	S1/S2	3D	7073-7110
V4	S1/S2, S2/S1, S1/S2	3D	6837-6841, 6867-6895, 6903-6911
V5	S1/S2	3D	6837-6841
V6	S1/S2	3D	6837-6841

3.6 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ

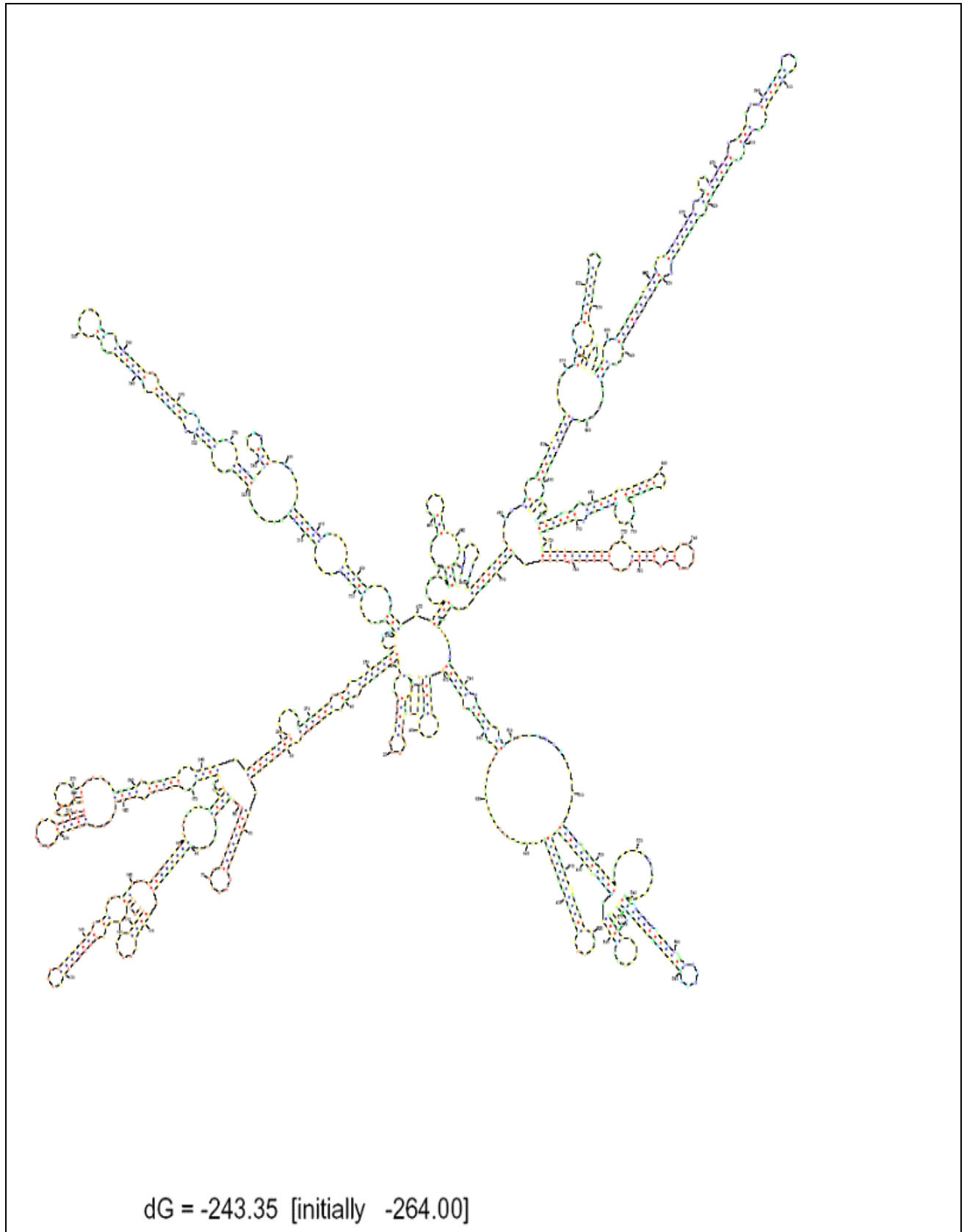
Στις επόμενες ενότητες (3.6.1 - 3.6.4) παρουσιάζονται τα μοντέλα των δευτεροταγών RNA δομών των γενωμικών περιοχών 2C και 3D, των τριών προτύπων εμβολιακών στελεχών, Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3. Μοντέλα δευτεροταγών δομών δημιουργήθηκαν για τους RNA κλώνους θετικής και αρνητικής πολικότητας των περιοχών αυτών. Εκτός από τις προτεινόμενες RNA δομές θα παρουσιαστούν και κάποιες εναλλακτικές RNA δομές, οι οποίες παρουσιάζουν σχεδόν παρόμοια πιθανότητα με την εκάστοτε προτεινόμενη.

3.6.1 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 2C ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ SABIN 1, SABIN 2 ΚΑΙ SABIN 3.

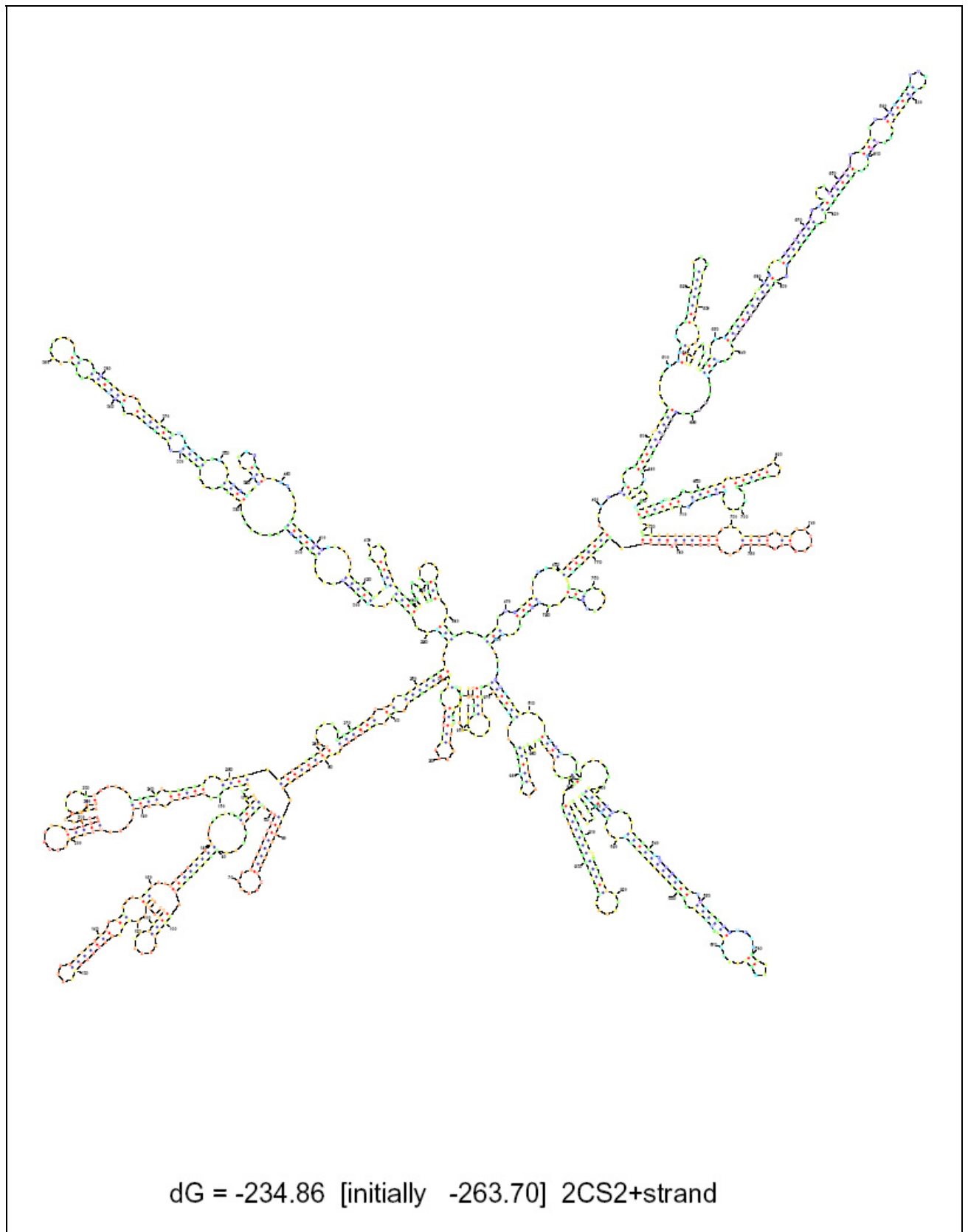
Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται οι προτεινόμενες δομές της 2C περιοχής, του κλώνου θετικής πολικότητας των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.



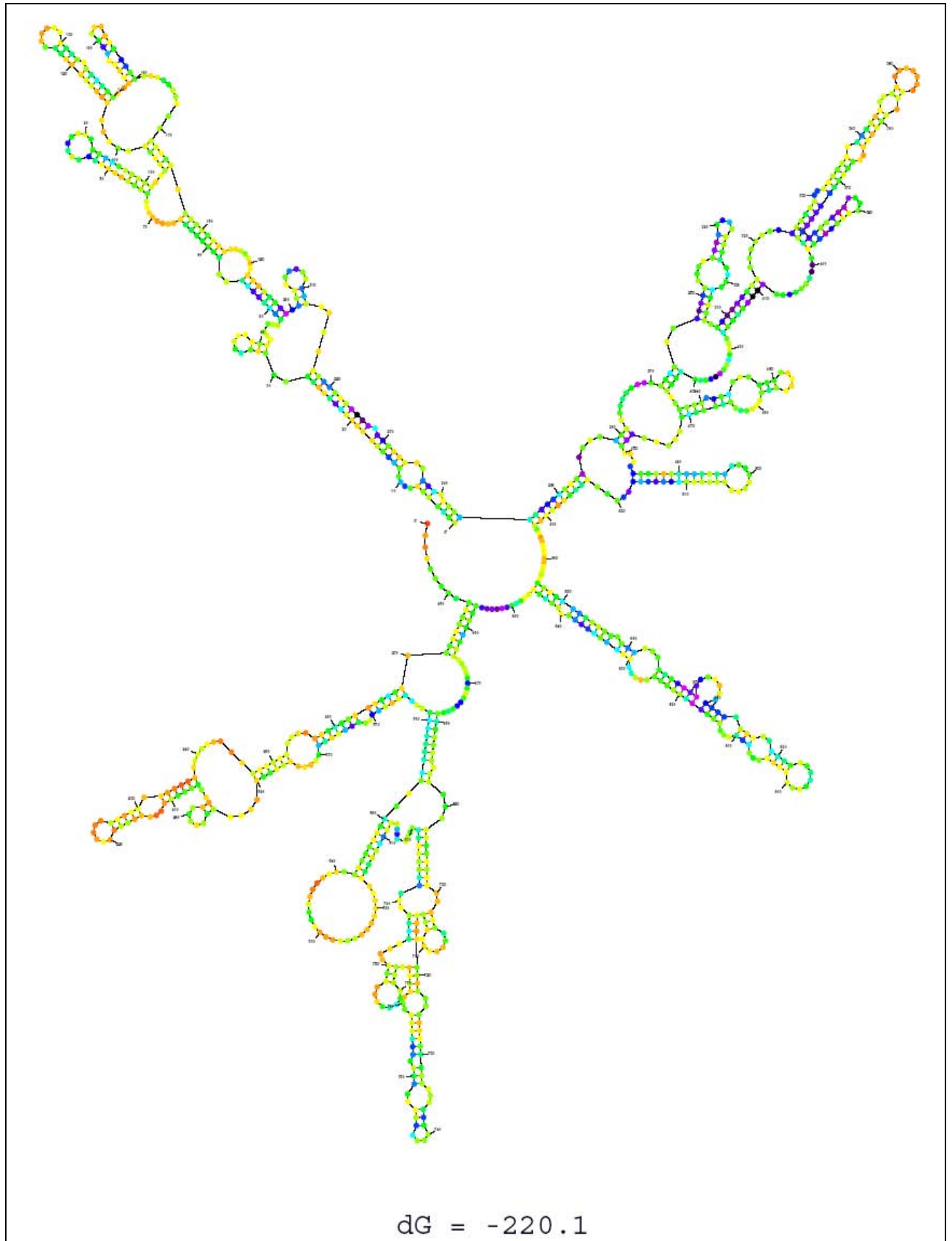
Σχήμα 3.1. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 1**.



Σχήμα 3.2. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 2**.



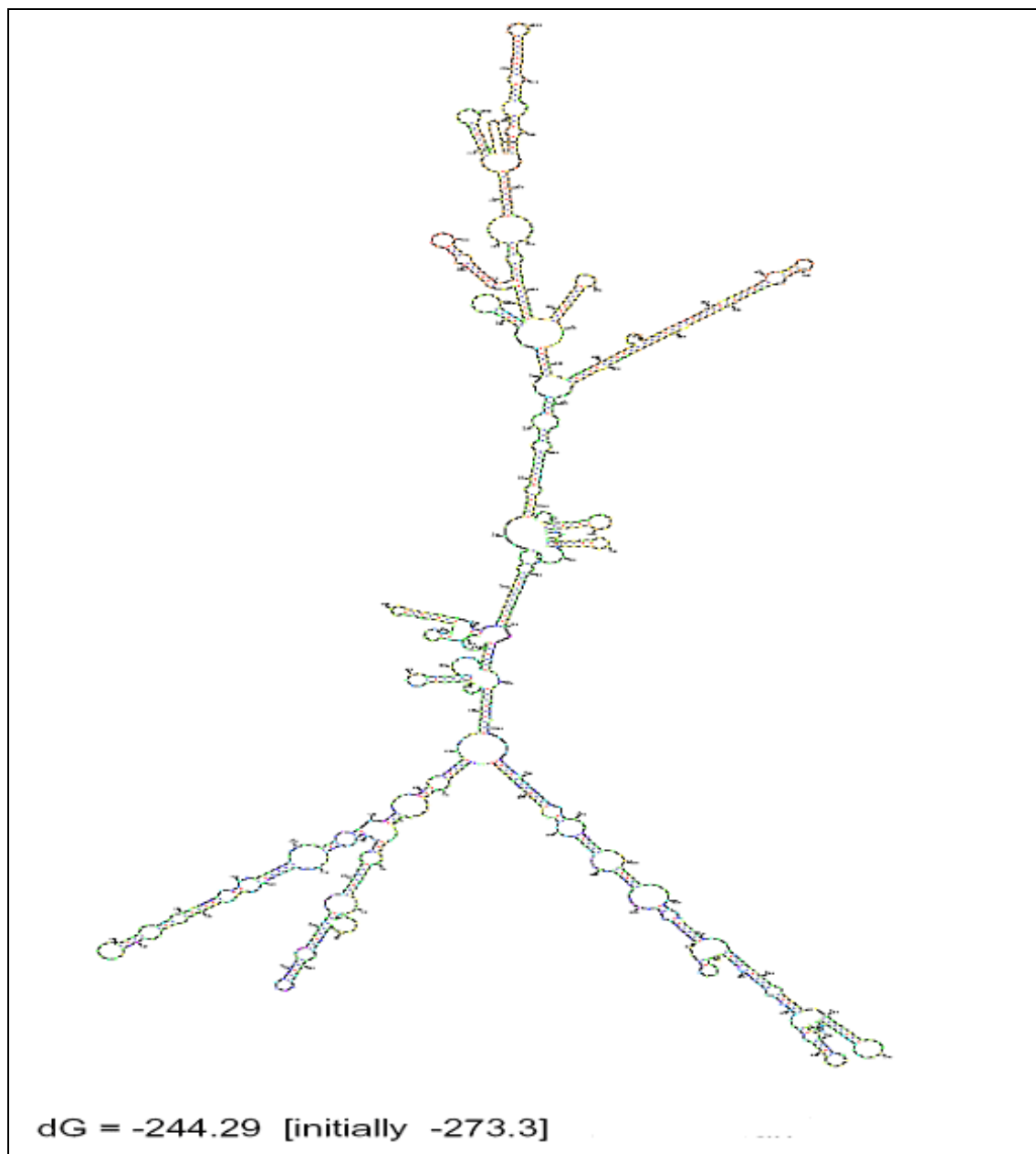
Σχήμα 3.3. Εναλλακτικό μοντέλο A, δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 2**.



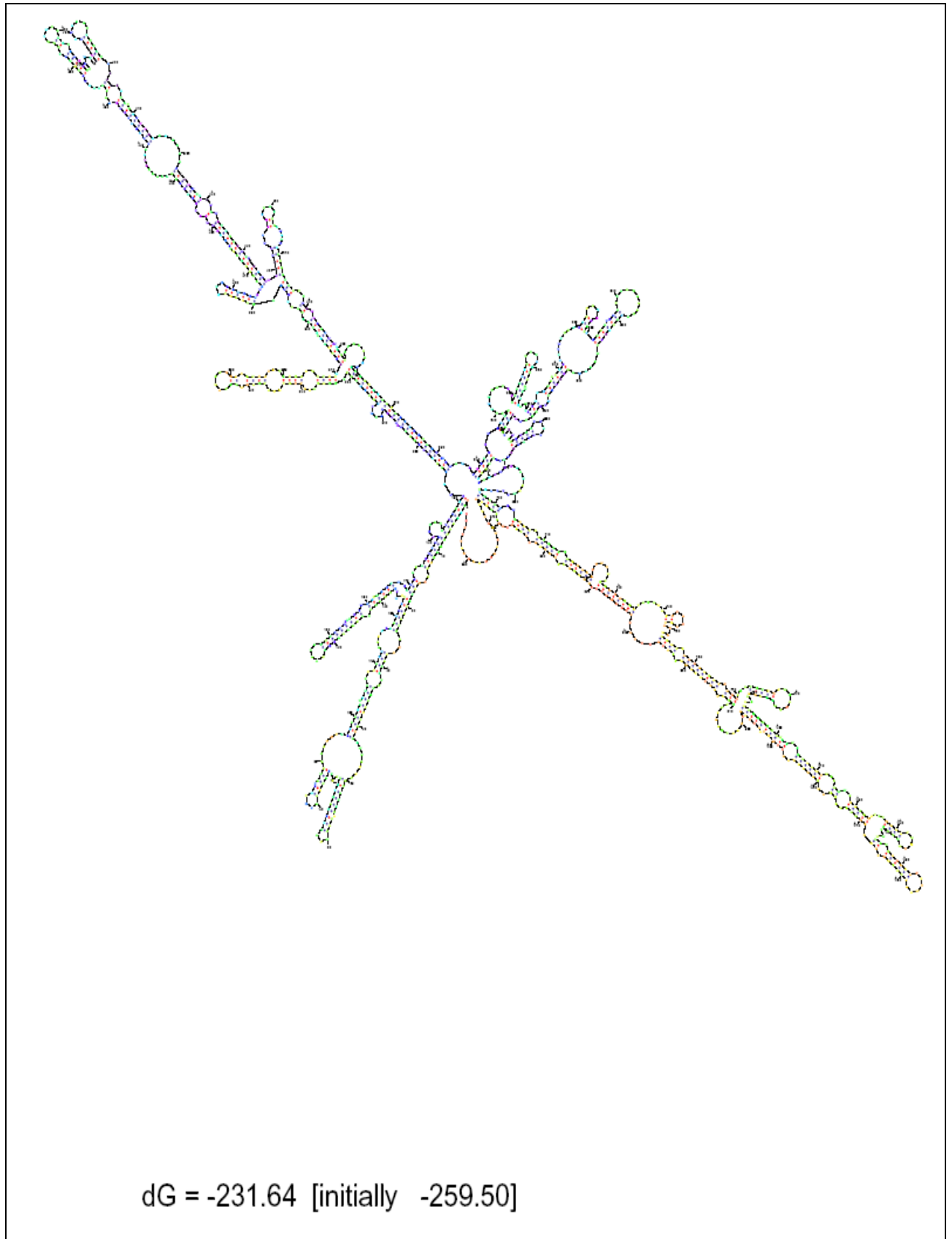
Σχήμα 3.4. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 3**.

3.6.2 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 2C ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ SABIN 1, SABIN 2 ΚΑΙ SABIN 3.

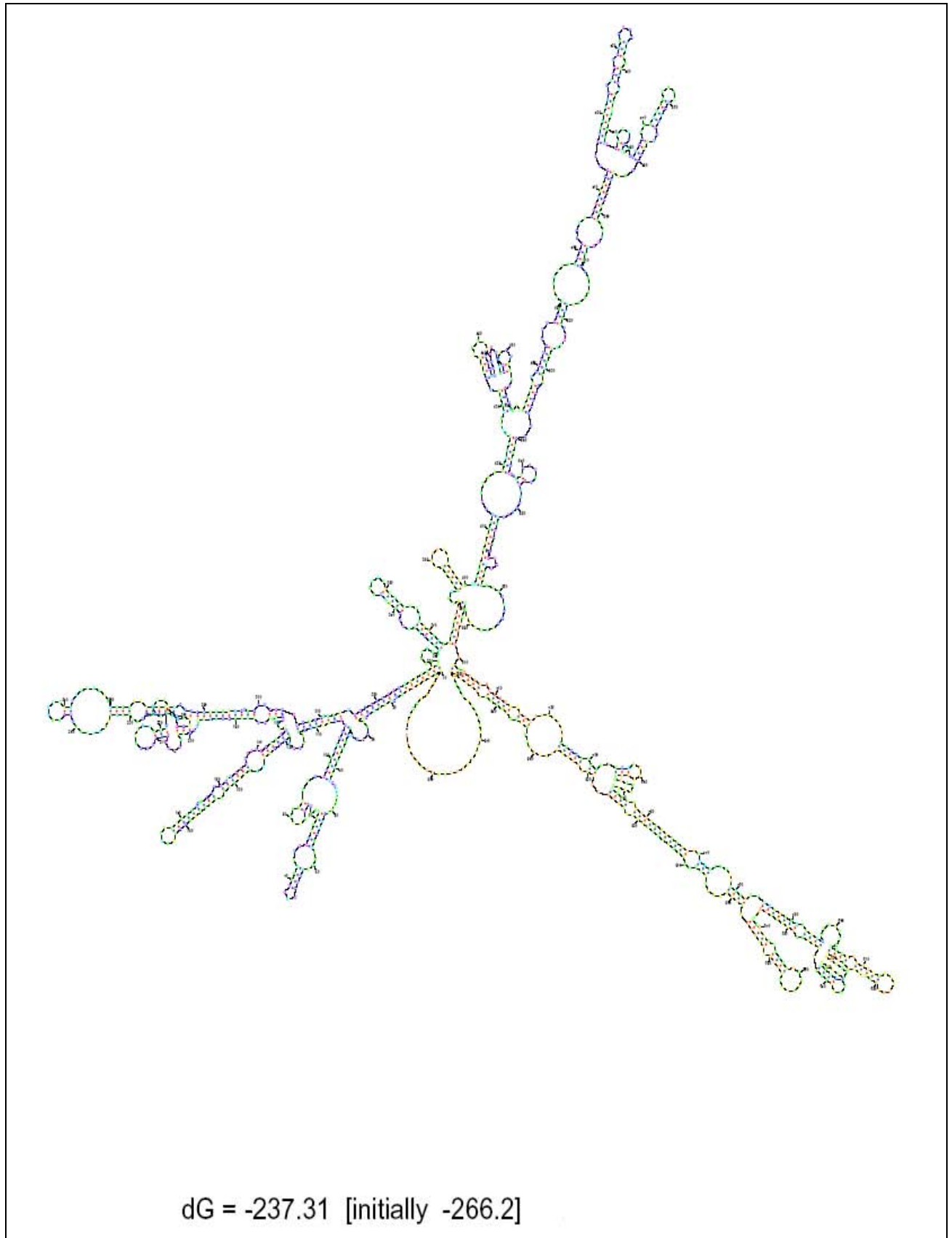
Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται οι προτεινόμενες δομές της 2C περιοχής, του κλώνου αρνητικής πολικότητας των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.



Σχήμα 3.5. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 1**.



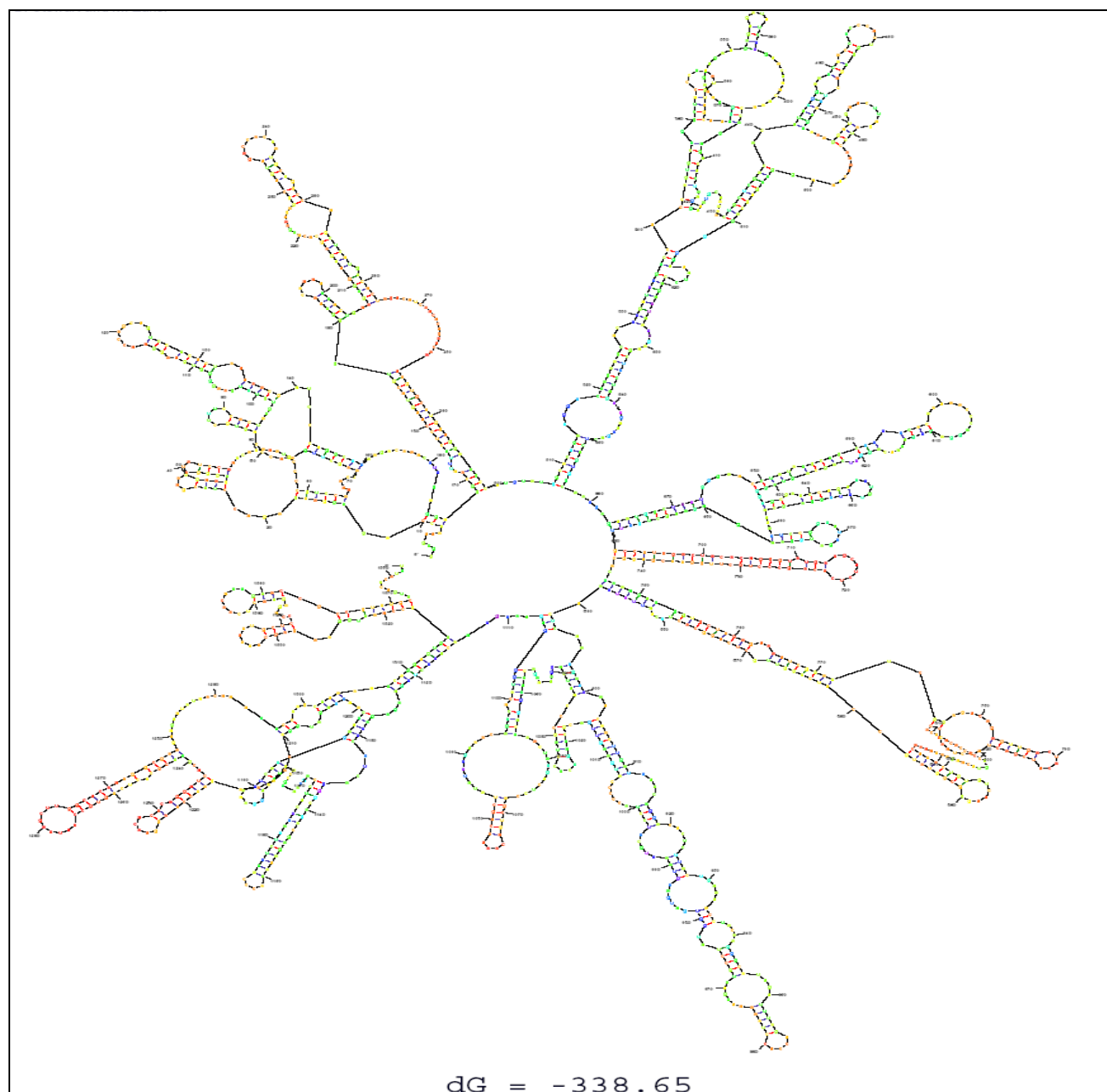
Σχήμα 3.6. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 2**.



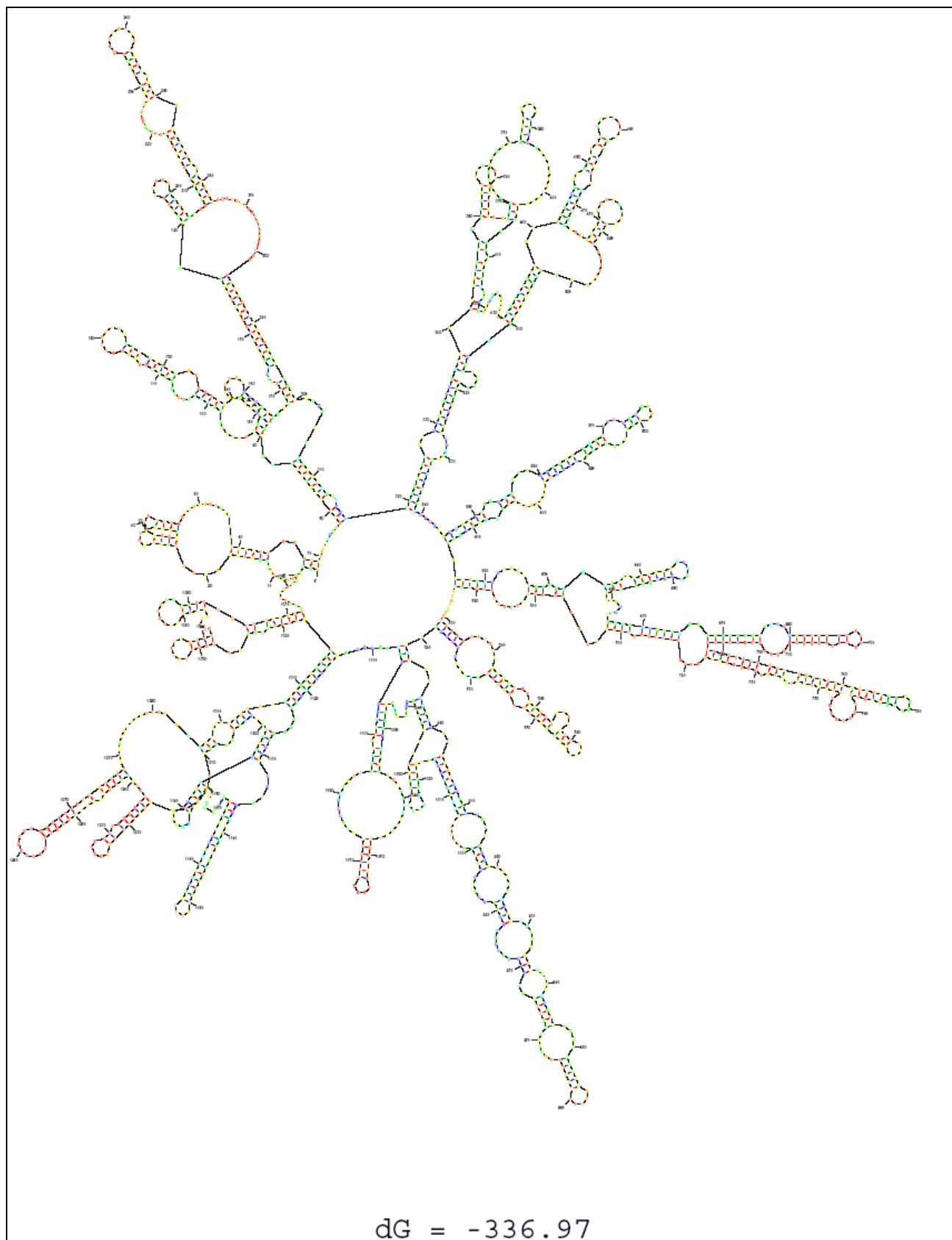
Σχήμα 3.7. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 2C περιοχής του κλώνου αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 3**.

3.6.3 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 3D ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ SABIN 1, SABIN 2 ΚΑΙ SABIN 3.

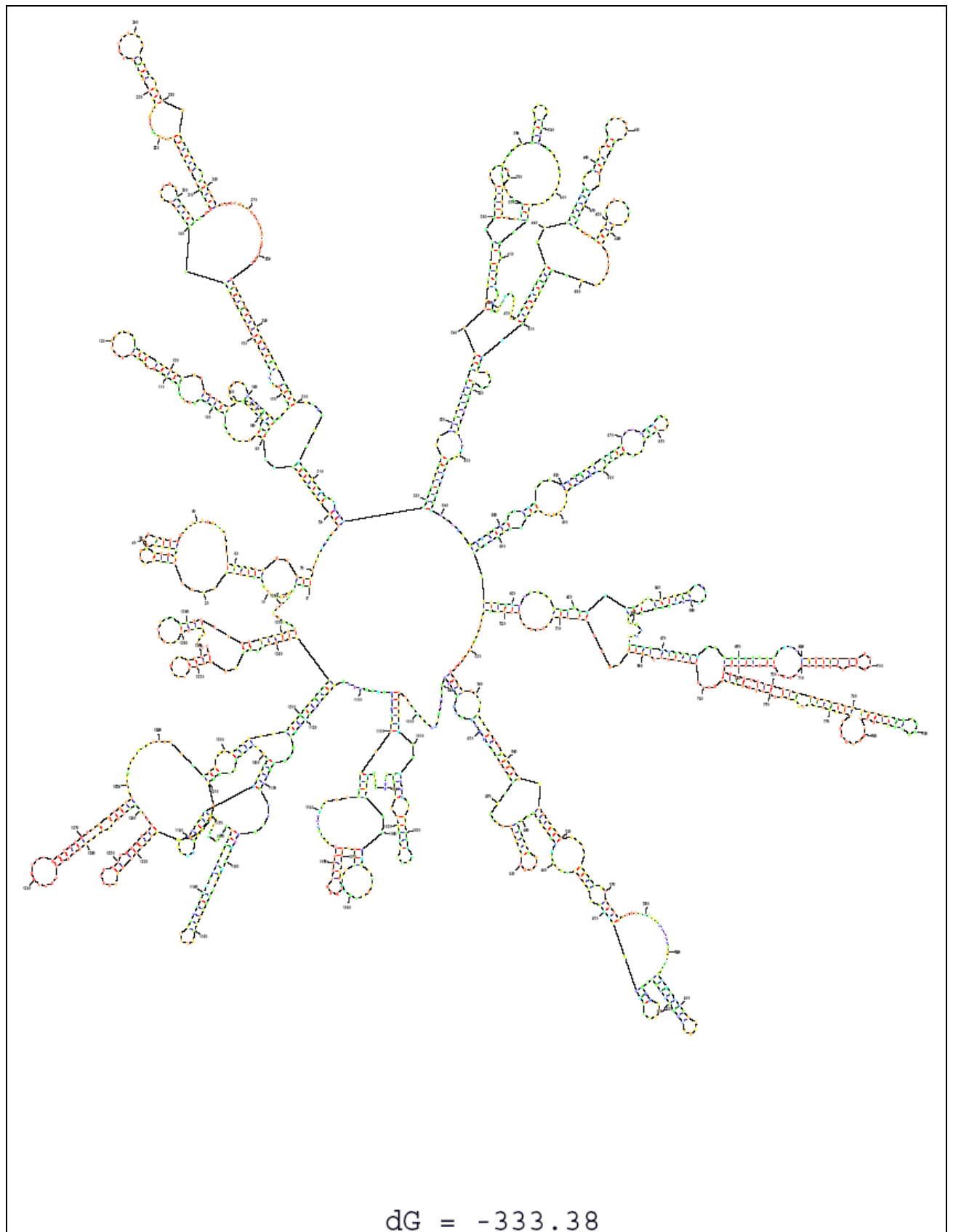
Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται οι προτεινόμενες δομές της 3D περιοχής, του κλώνου θετικής πολικότητας των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.



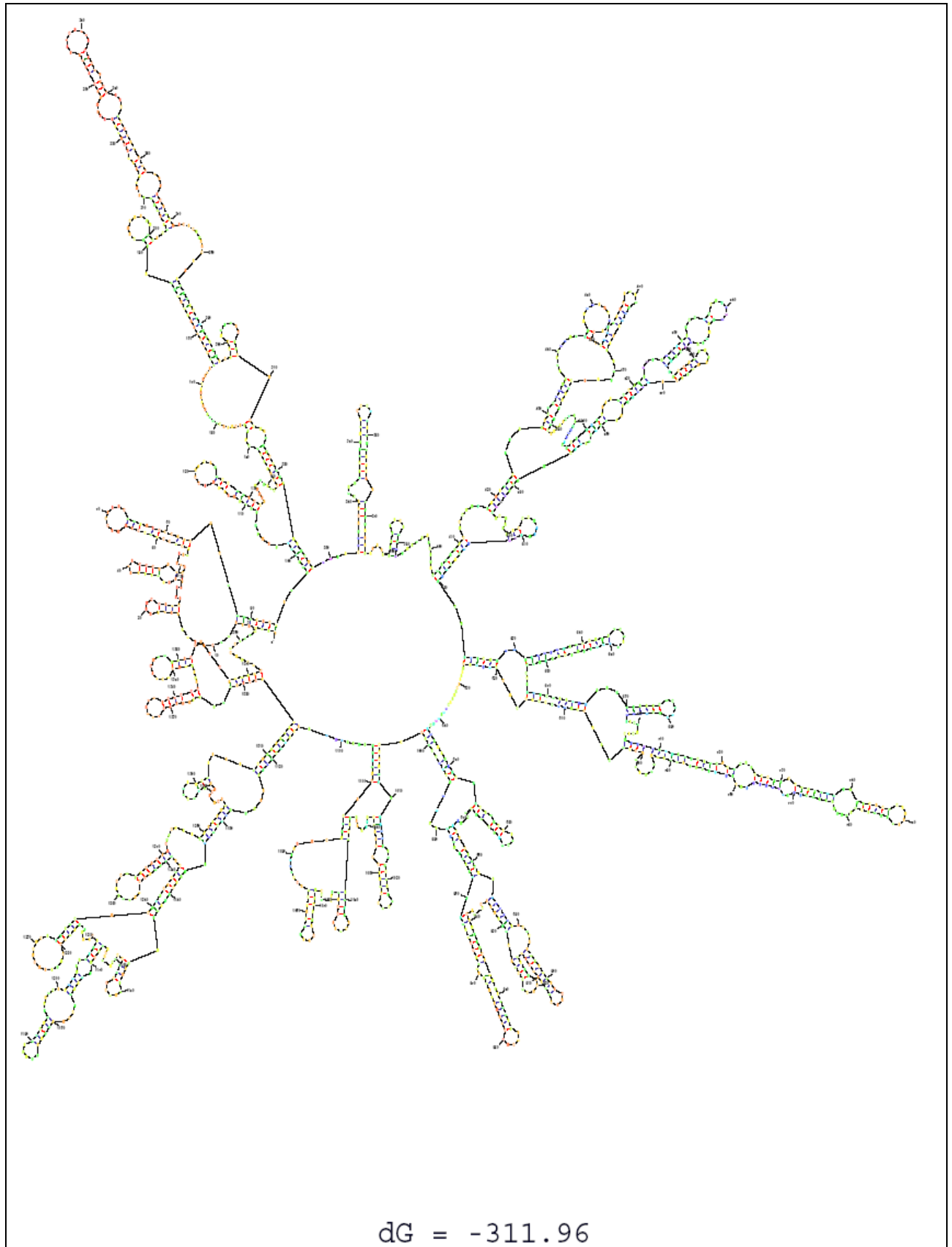
Σχήμα 3.8. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 1**.



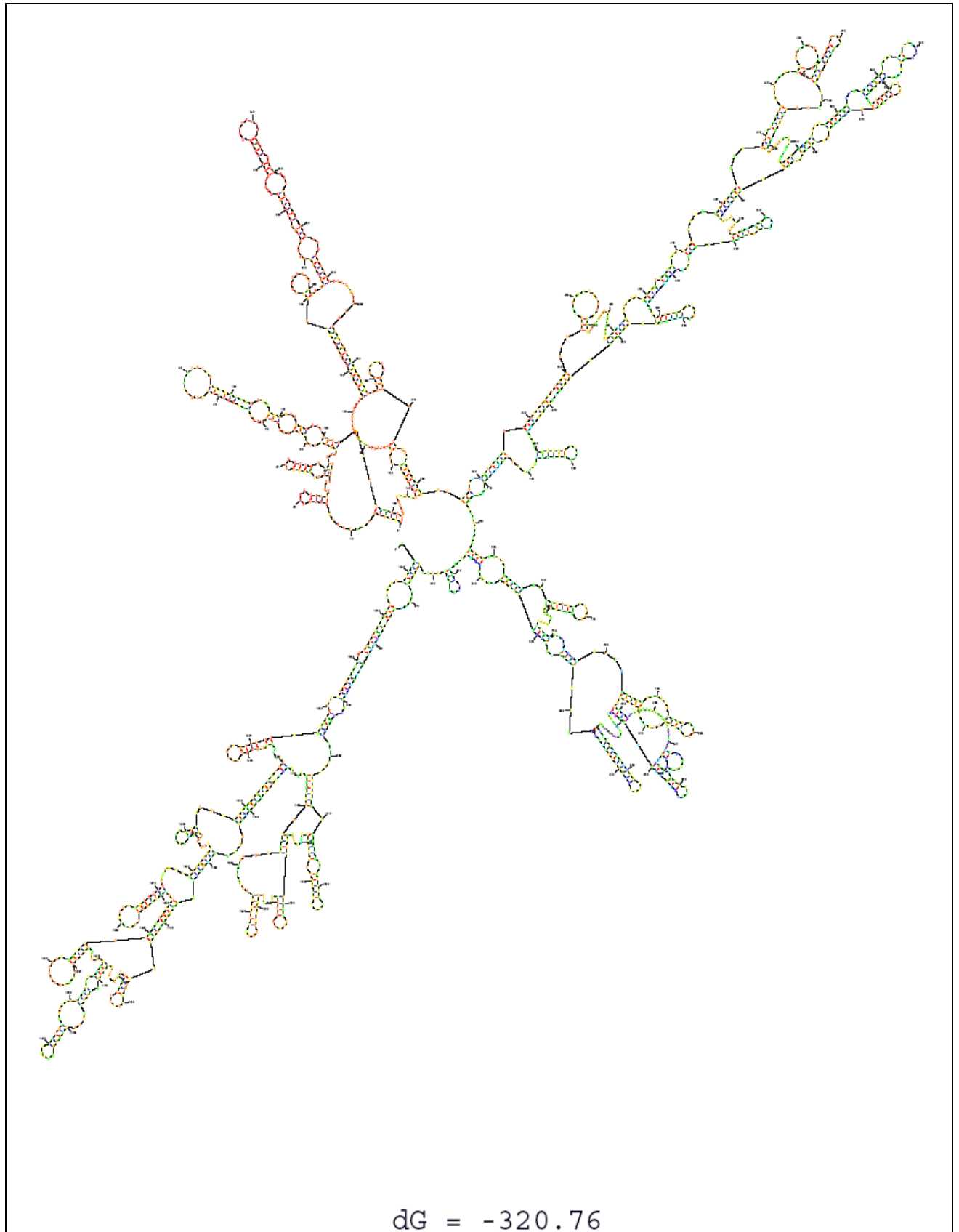
Σχήμα 3.9. Εναλλακτικό μοντέλο B, δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 1**.



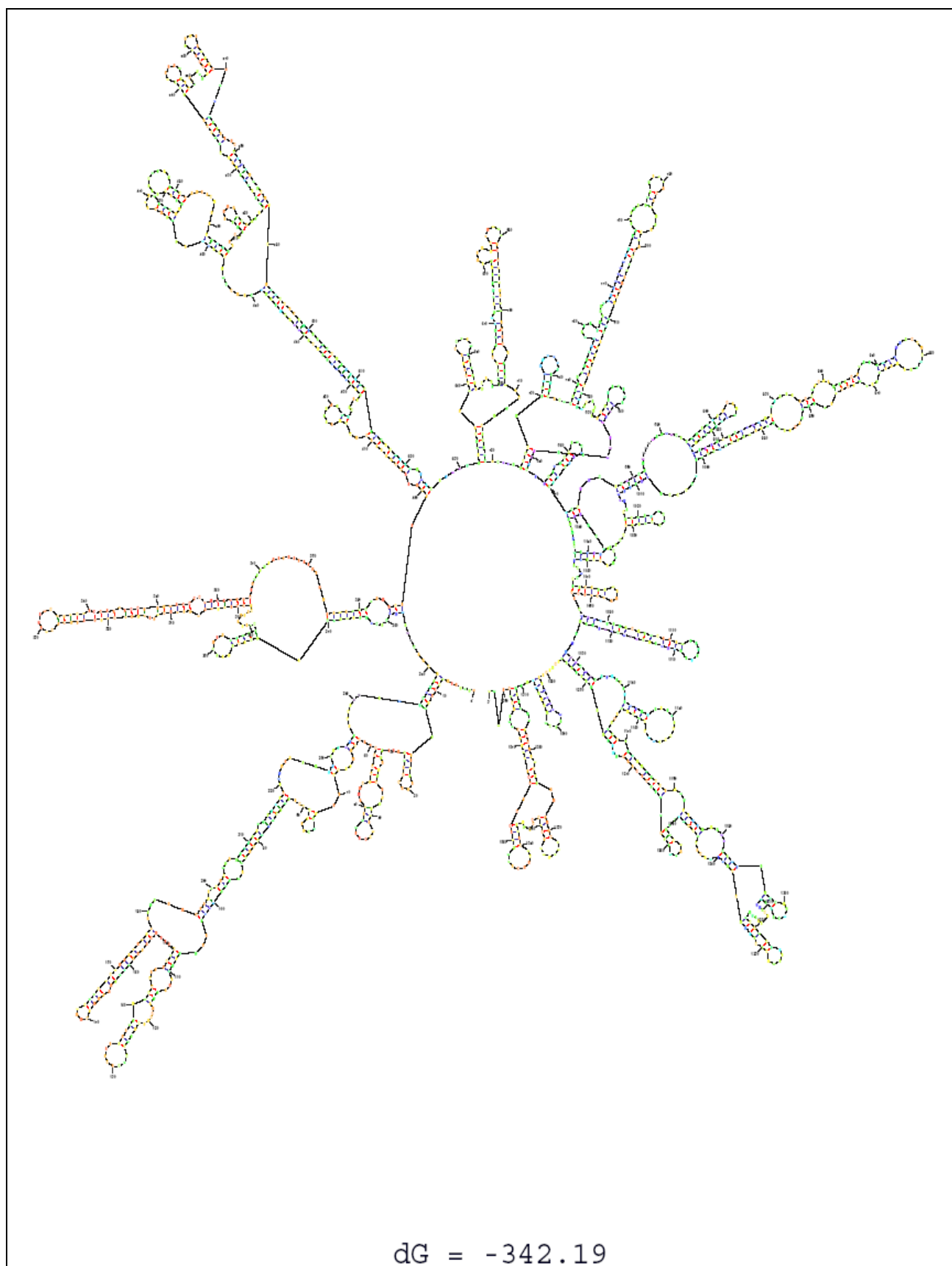
Σχήμα 3.10. Εναλλακτικό μοντέλο Γ, δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 1**.



Σχήμα 3.11. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 2**.



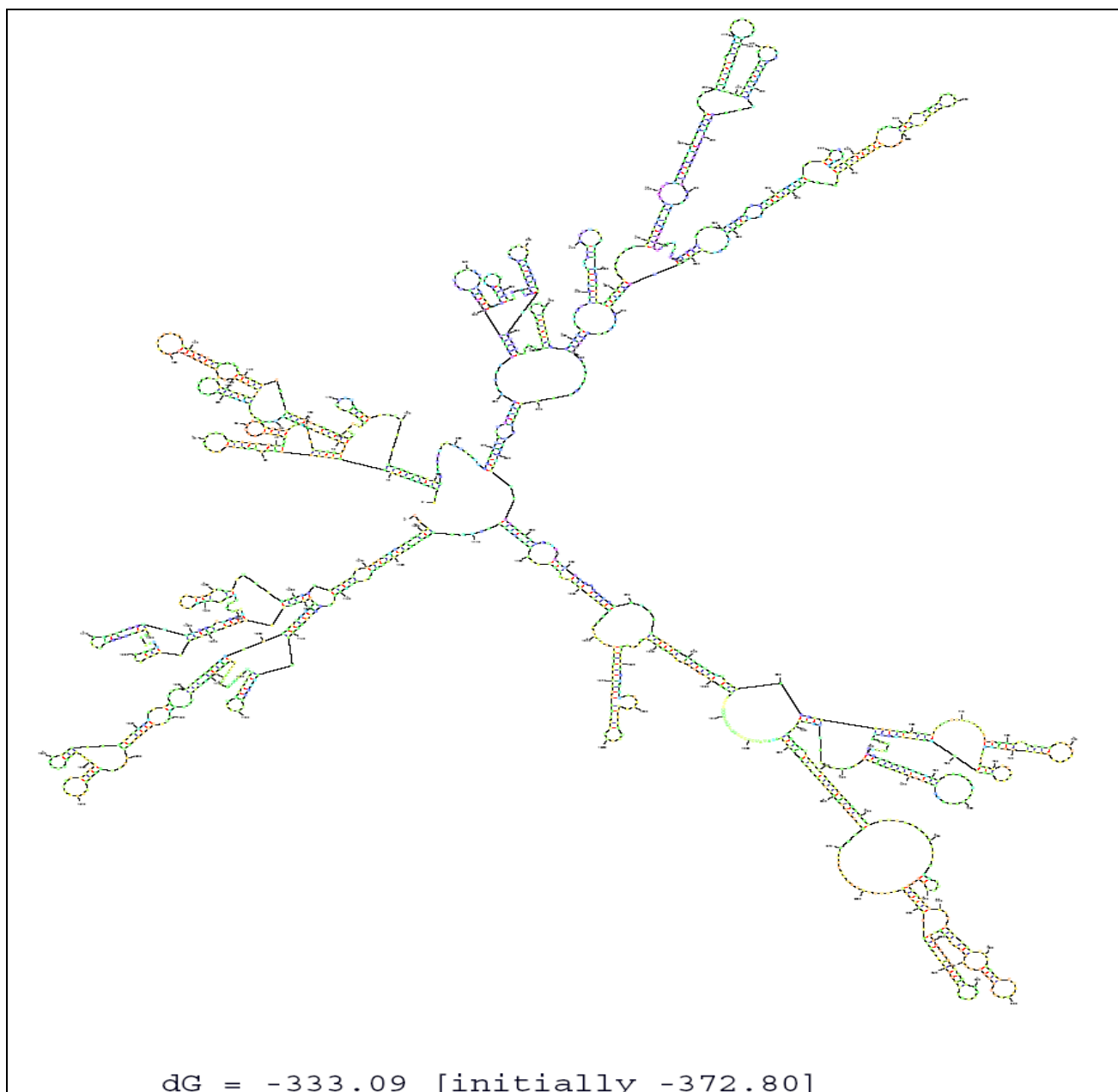
Σχήμα 3.12. Εναλλακτικό μοντέλο B, δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 2**.



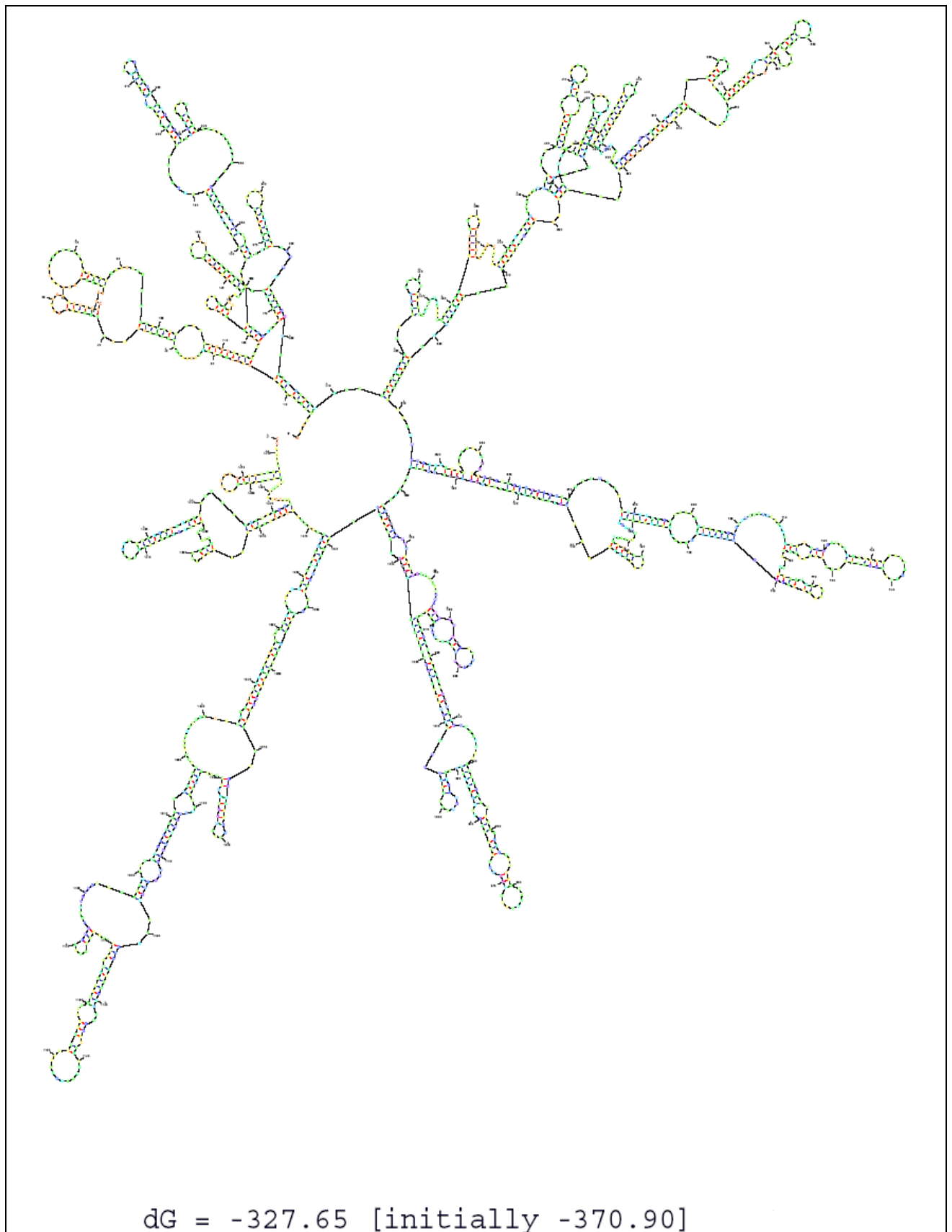
Σχήμα 3.13. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου θετικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 3**.

3.6.4 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 3D ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ SABIN 1, SABIN 2 ΚΑΙ SABIN 3.

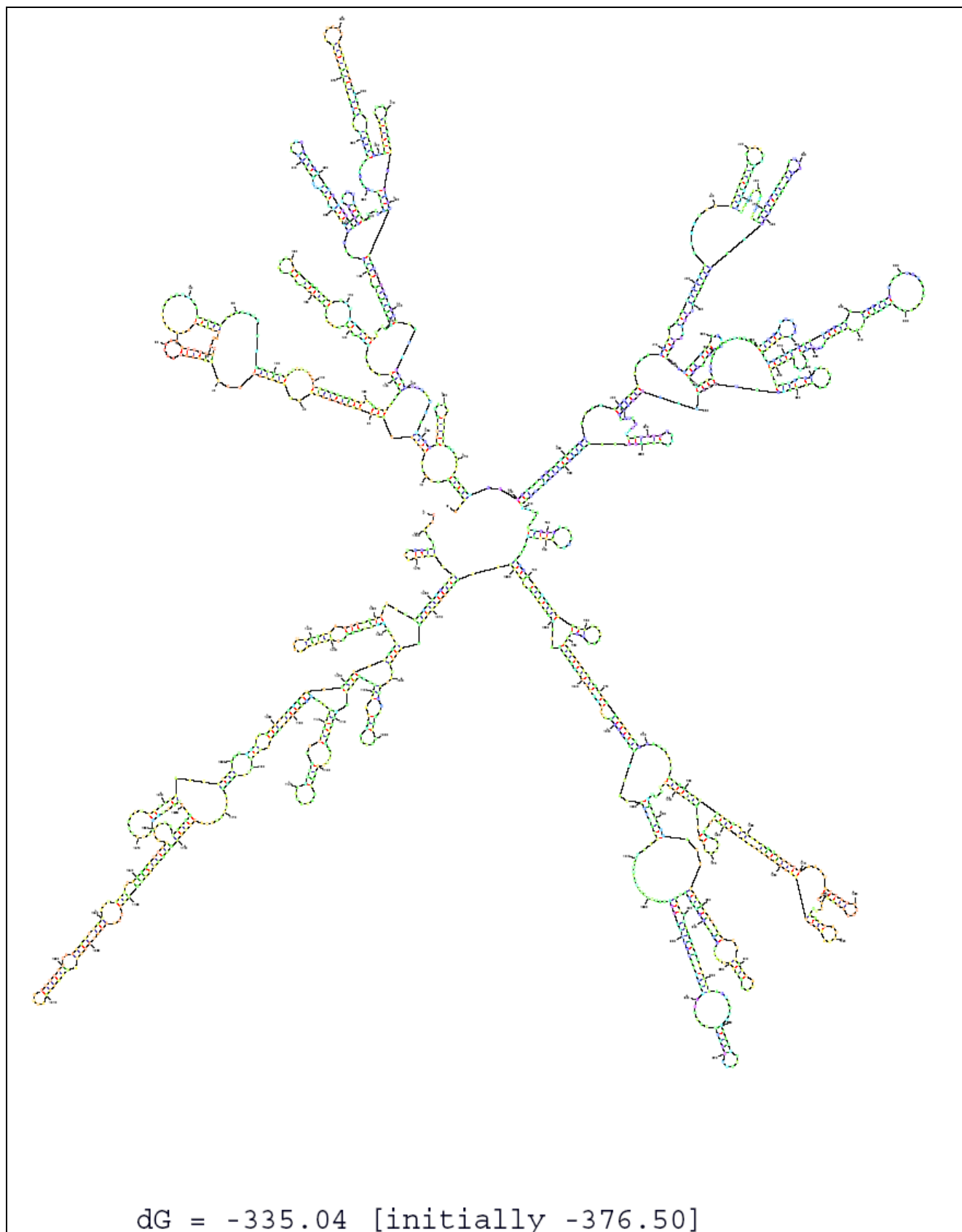
Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται οι προτεινόμενες δομές της 3D περιοχής, του κλώνου αρνητικής πολικότητας των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.



Σχήμα 3.14. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 1**.



Σχήμα 3.15. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 2**.



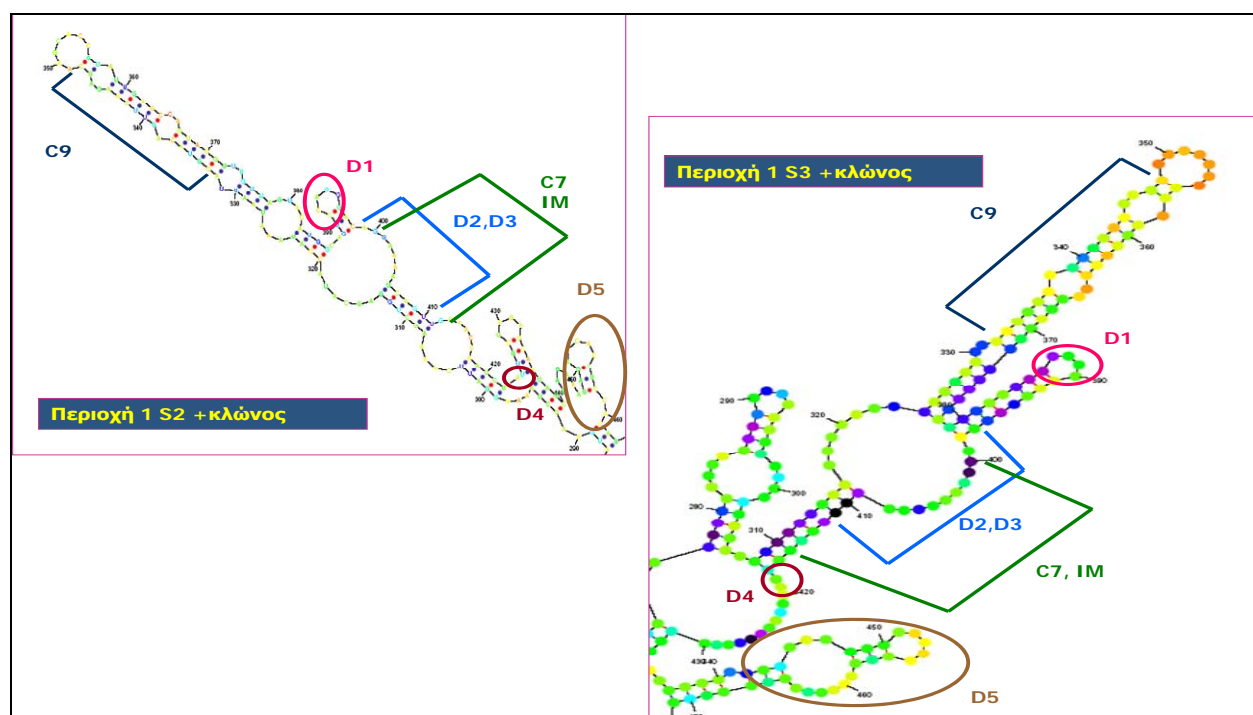
Σχήμα 3.16. Προτεινόμενο μοντέλο δευτεροταγούς RNA δομής της 3D περιοχής του κλώνου αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους **Sabin 3**.

3.7 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ

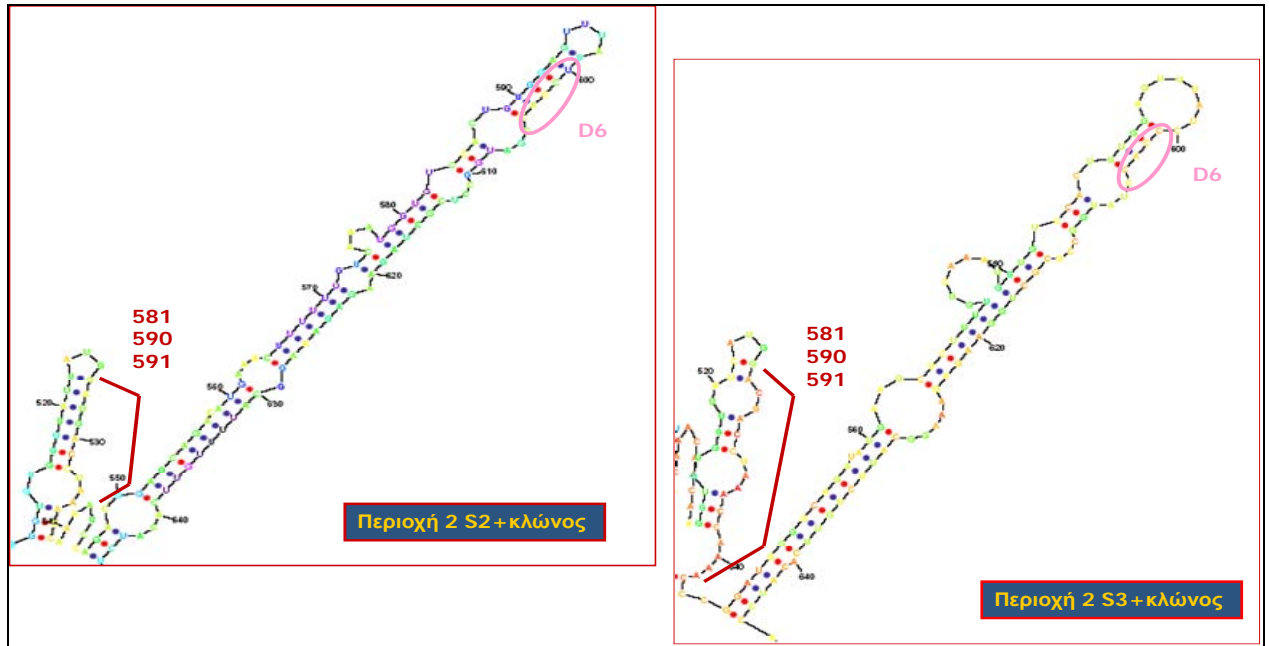
Στις επόμενες ενότητες (3.7.1 και 3.7.2) παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των σημείων ανασυνδιασμού των κλινικών στελεχών (πίνακας 2.3), καθώς και των σημείων ανασυνδιασμού των στελεχών του *in vitro* μοντέλου (πίνακας 3.7), στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών των 2C και 3D περιοχών, των προτύπων στελεχών Sabin.

3.7.1 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 2C ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

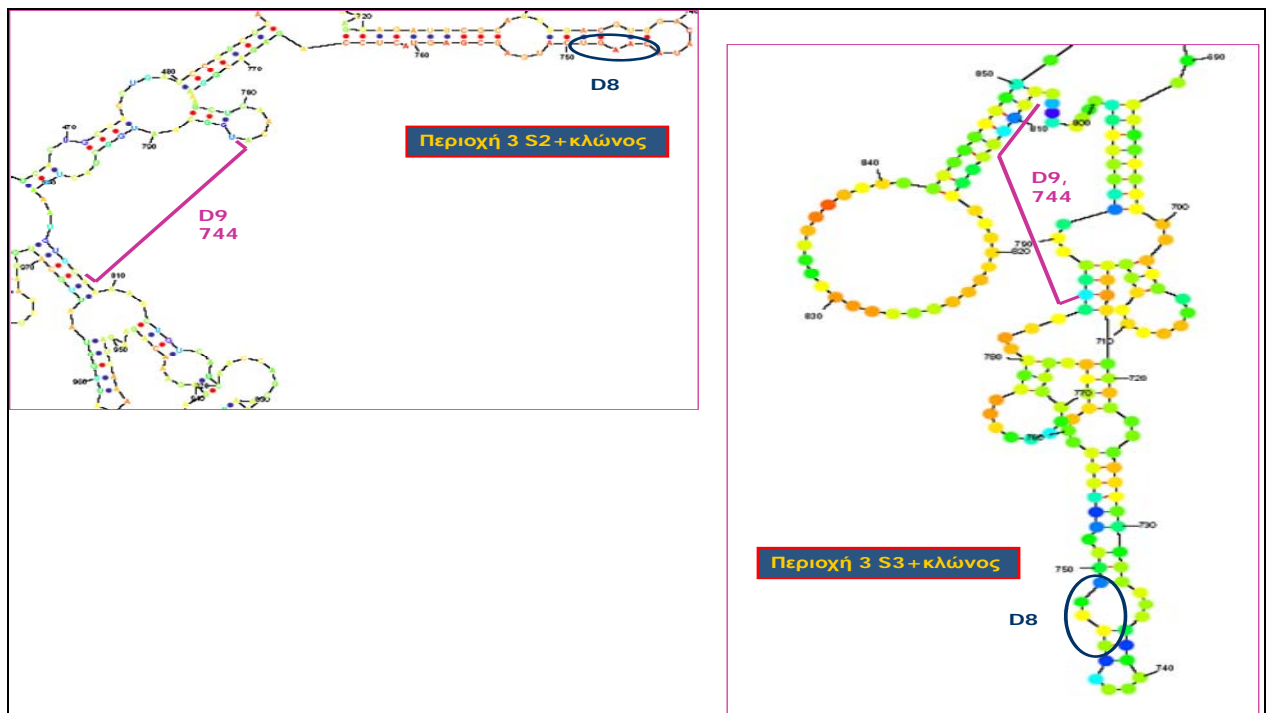
Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 2 των κλινικών στελεχών (πίνακας 2.3), τα οποία εδράζονται στη 2C περιοχή, στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών των πρότυπων στελεχών Sabin 3 και Sabin 2, στην συγκεκριμένη περιοχή.



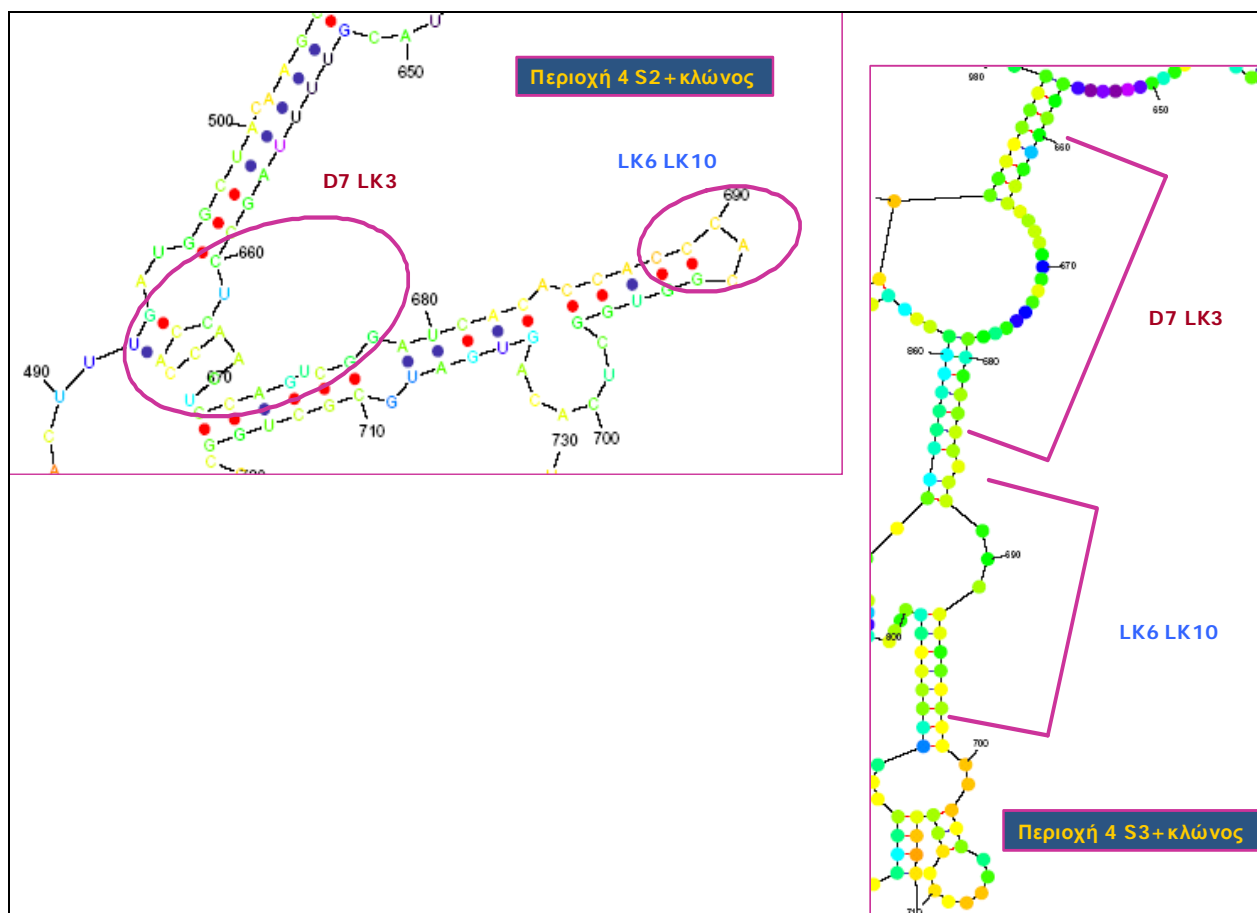
Εικόνα 3.10. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 2 (περιοχή 1) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 2C περιοχής, των Sabin 2 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η προτεινόμενη δομή για το Sabin 3 και η A εναλλακτική δομή για το Sabin 2.



Εικόνα 3.11. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 2 (περιοχή 2) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 2C περιοχής, των Sabin 2 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για το Sabin 3 και για το Sabin 2.

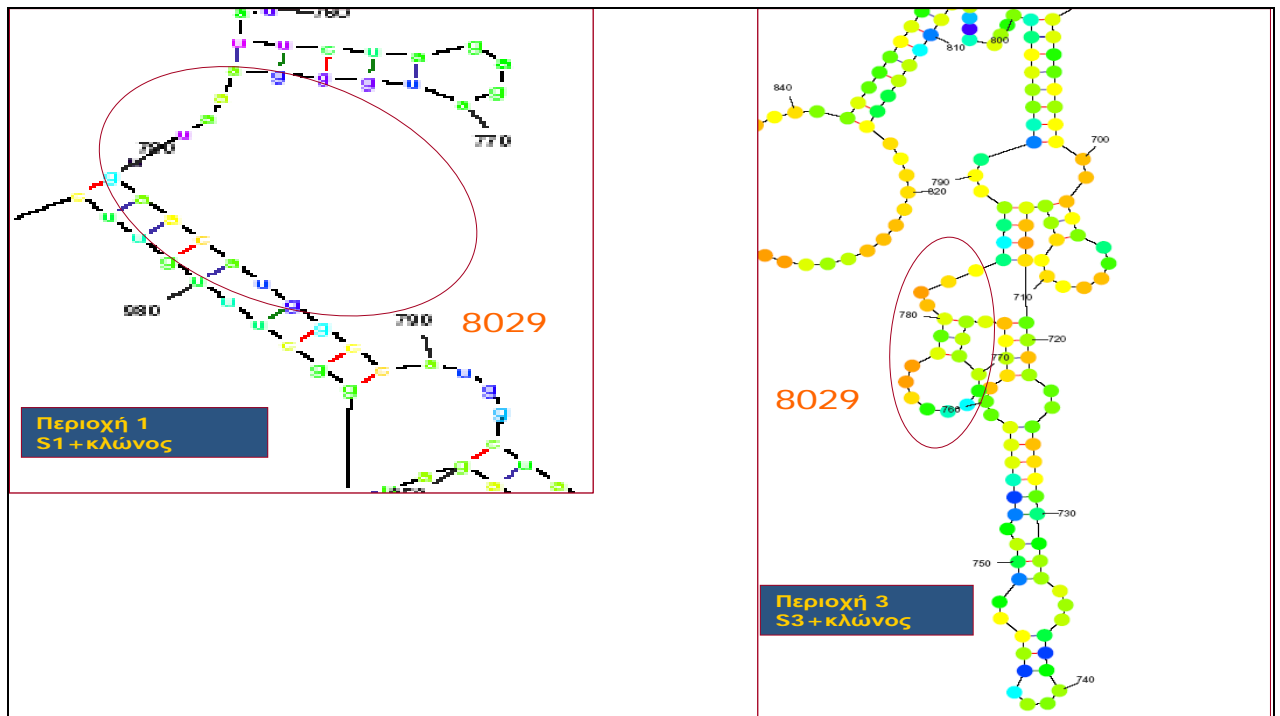


Εικόνα 3.12. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 2 (περιοχή 3) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 2C περιοχής, των Sabin 2 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η προτεινόμενη δομή για το Sabin 3 και η A εναλλακτική δομή για το Sabin 2.

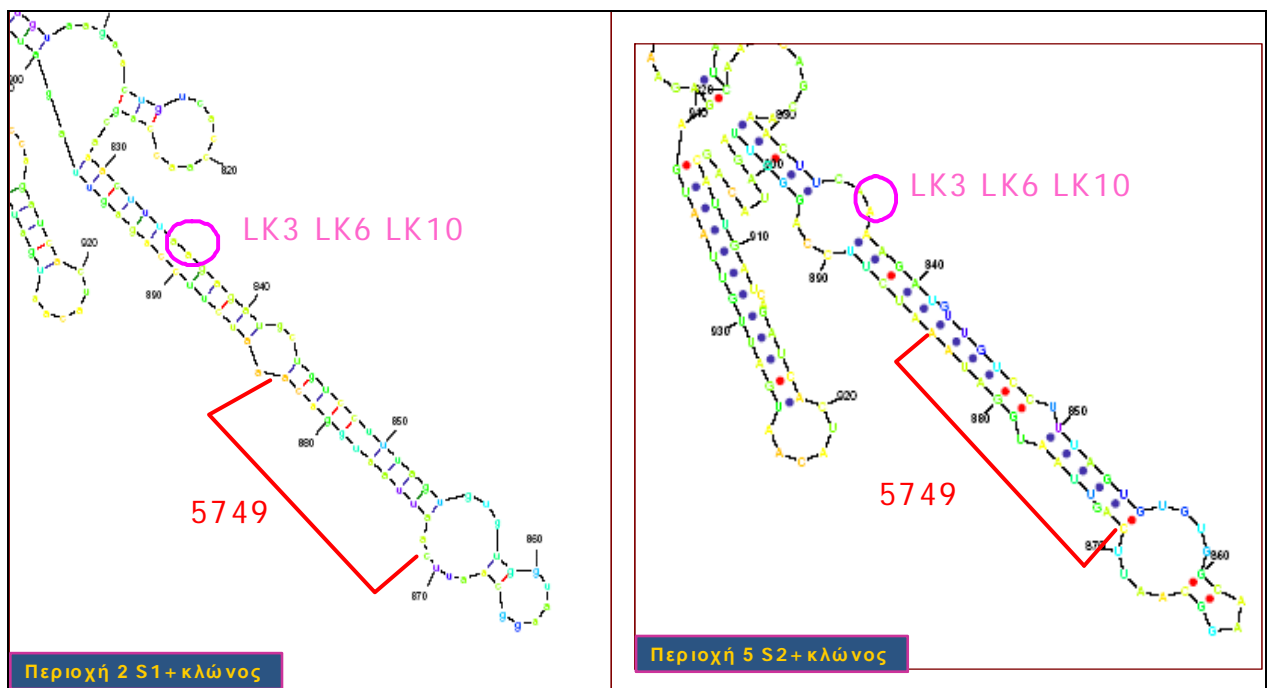


Εικόνα 3.13. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 2 (περιοχή 4) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 2C περιοχής, των Sabin 2 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για το Sabin 3 και για το Sabin 2.

Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 1 και Sabin 2/Sabin 1 των κλινικών στελεχών (πίνακας 2.3), τα οποία εδράζονται στη 2C περιοχή, στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών των πρότυπων στελεχών Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3, στην συγκεκριμένη περιοχή.



Εικόνα 3.14. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 3/Sabin 1 (περιοχές 1 και 3) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 2C περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για το Sabin 3 και για το Sabin 1.



Εικόνα 3.15. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχές 2 και 5) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 2C περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η προτεινόμενη δομή για το Sabin 1 και η A εναλλακτική δομή για το Sabin 2.

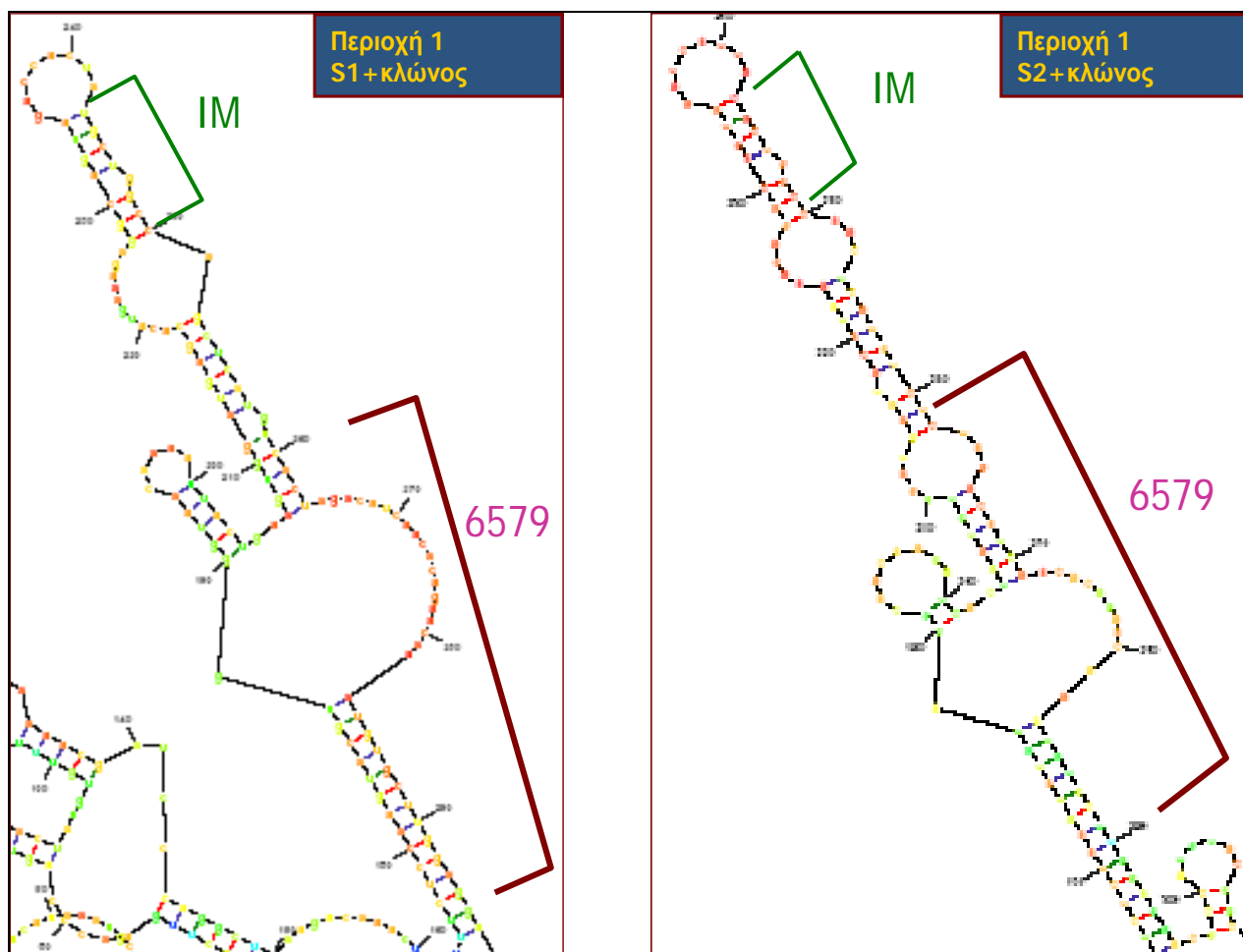
Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες (3.10-3.15), στην 2C γενωμική περιοχή, τα

περισσότερα σημεία ανασυνδιασμού εδράζονται σε περιοχές με παρόμοια δευτεροταγή RNA διαμόρφωση, μεταξύ των πρότυπων στελεχών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) που συμμετέχουν κάθε φορά στον ανασυνδιασμό.

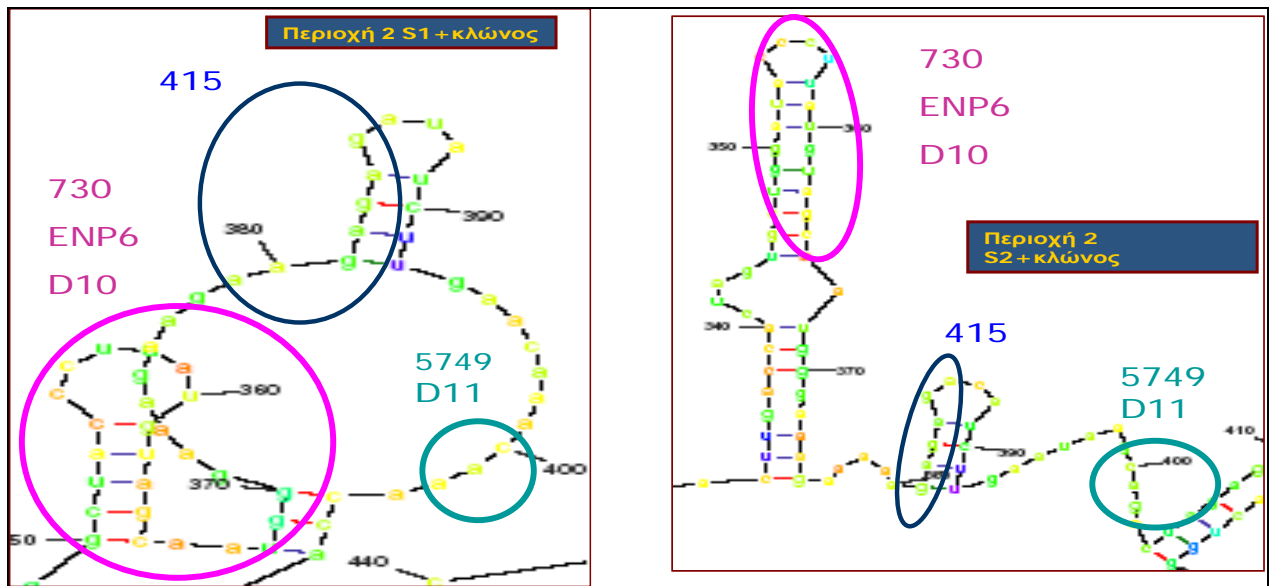
Αρκετά σημεία ανασυνδιασμού βρίσκονται στην δίκλωνη περιοχή (μίσχος), αμέσως πριν τη θηλιά, του εκάστοτε, κοινού μεταξύ των ανασυνδιαζόμενων προτύπων στελεχών, RNA δομικού στοιχείου (δομή μίσχου-θηλιάς). Τα σημεία ανασυνδιασμού, τα οποία παρουσιάζουν τη συγκεκριμένη τοπολογία, ανήκουν στα D6, 581,590,591, 5749 και D8 στελέχη (Εικόνες 3.11, 3.12 και 3.15). Επίσης, το σημείο ανασυνδιασμού, που ανήκει στο στέλεχος C9 εδράζεται στην δίκλωνη περιοχή του μίσχου, αμέσως μετά τη θηλιά του RNA δομικού στοιχείου, το οποίο είναι κοινό μεταξύ των Sabin 2 και Sabin 3 (Εικόνα 3.10). Επιπροσθέτως, ένα σημείο ανασυνδιασμού (στέλεχος D1) εντοπίζεται σε θηλιά RNA δομικού στοιχείου, το σημείο ανασυνδιασμού του D4 στελέχους εδράζεται σε μονόκλωνη περιοχή πριν από δομικό RNA στοιχείο, ενώ το σημείο ανασυνδιασμού του D5 στελέχους εδράζεται σε ολόκληρο το RNA δομικό στοιχείο (Εικόνα 3.10). Τα συγκεκριμένα δομικά στοιχεία είναι κοινά μεταξύ των Sabin 2 και Sabin 3 στελεχών. Ακόμη, στη 2C περιοχή, σημεία ανασυνδιασμού εδράζονται σε περιοχές, που αποτελούνται από μονόκλιωνα και δίκλιωνα τμήματα RNA και οι οποίες βρίσκονται ανάμεσα σε RNA δομικά στοιχεία, παρόμοια μεταξύ των εκάστοτε προτύπων στελεχών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) που συμμετάσχουν στον ανασυνδιασμό. Τέτοια σημεία ανασυνδιασμού ανήκουν στα D2, D3, IM και C7 (Εικόνα 3.10).

3.7.2 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 3D ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

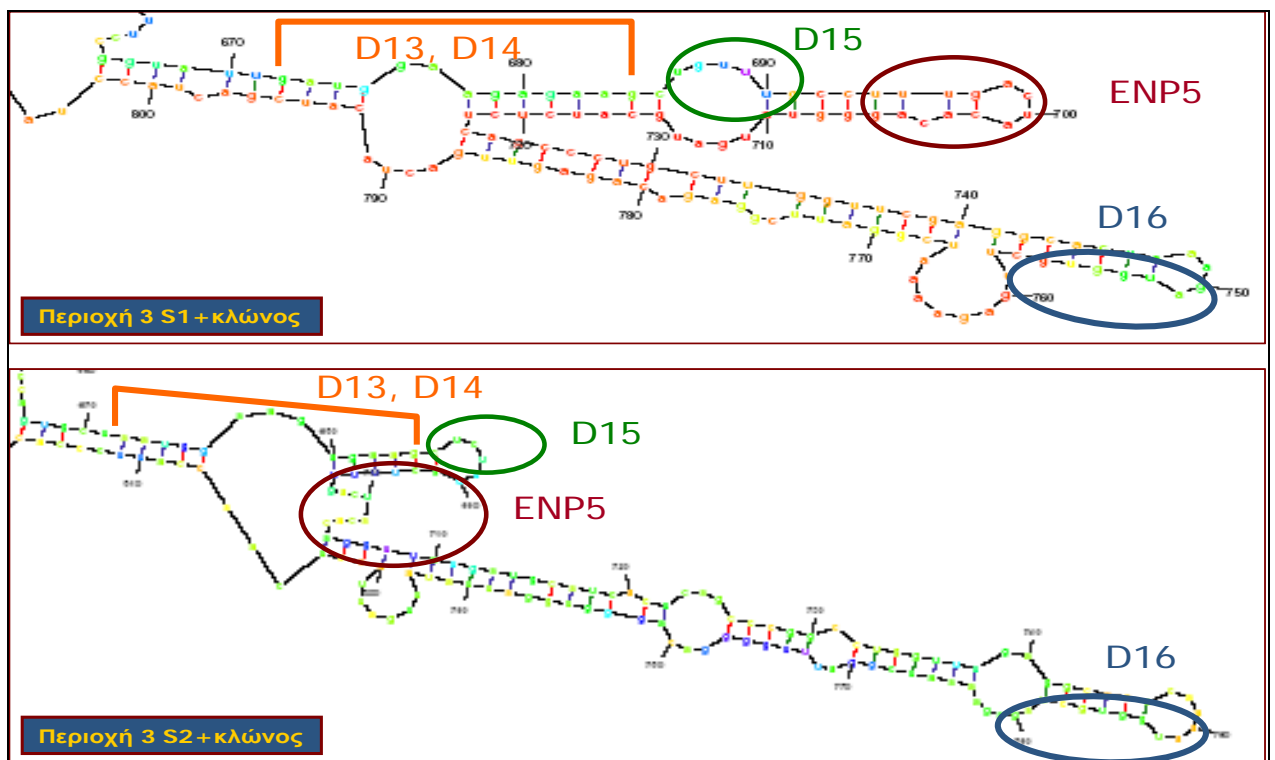
Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 των κλινικών στελεχών (πίνακας 2.3), τα οποία εδράζονται στη 3D περιοχή, στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών των πρότυπων στελεχών Sabin 2 και Sabin 1, στην συγκεκριμένη περιοχή.



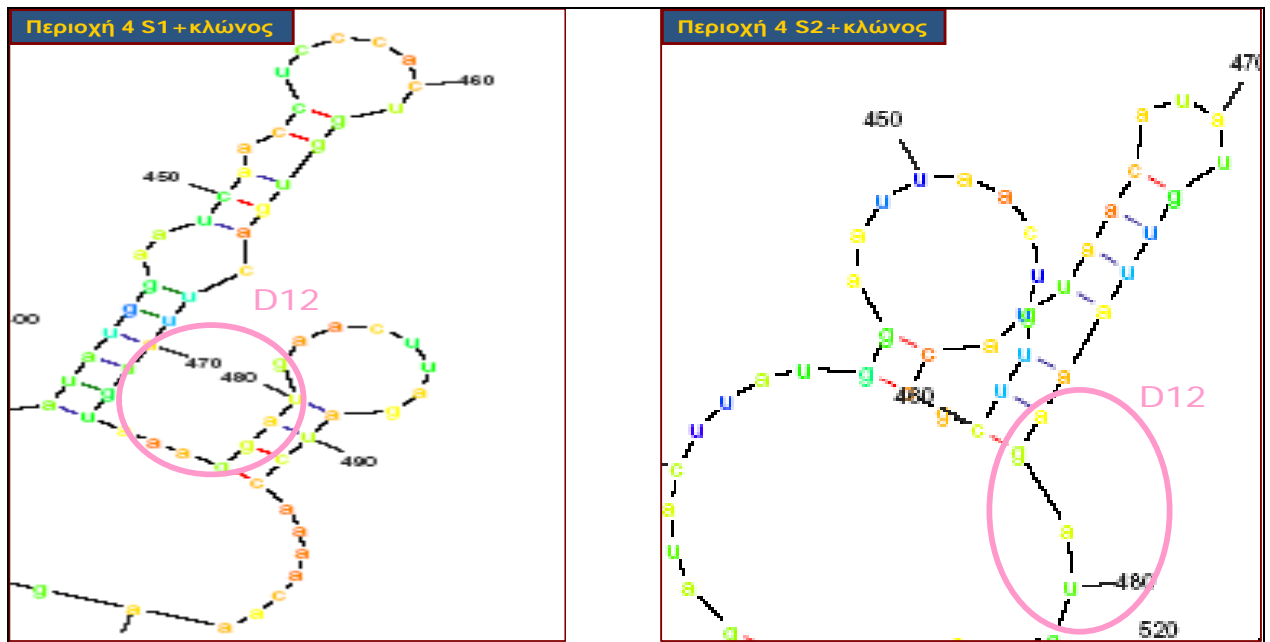
Εικόνα 3.16. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 1) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για τα Sabin 1 και Sabin 2.



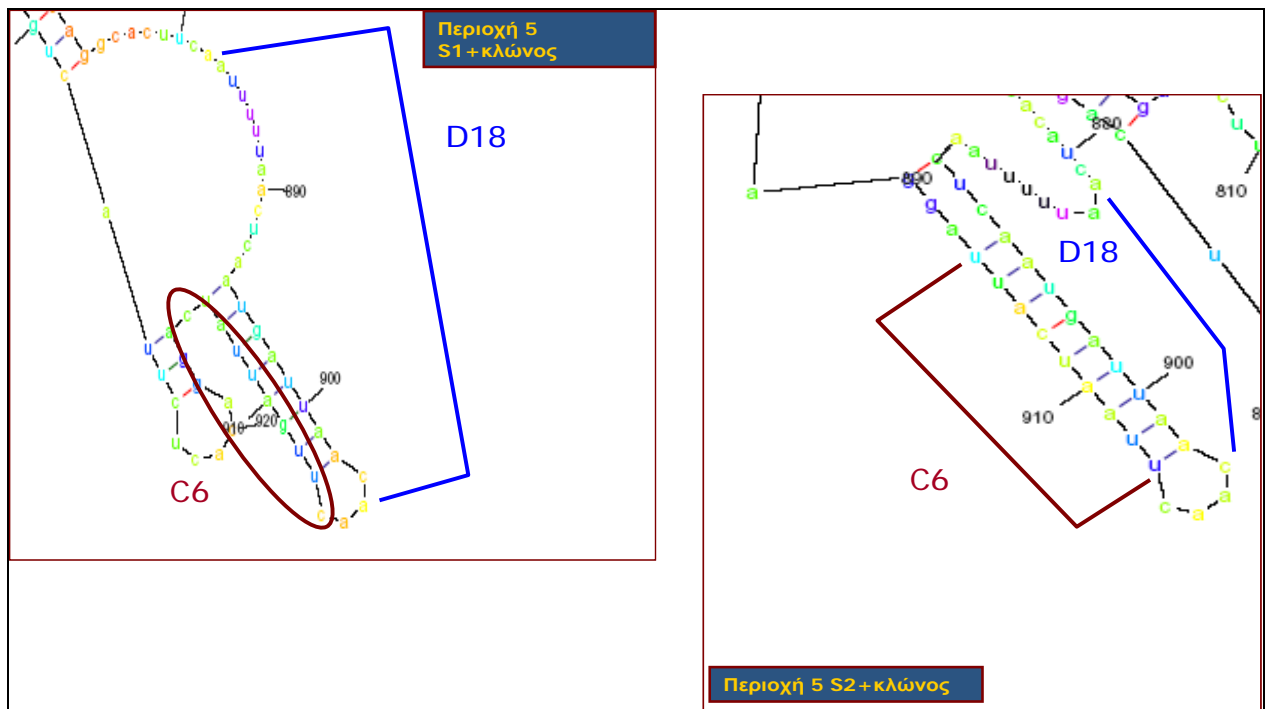
Εικόνα 3.17. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 2) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για τα Sabin 1 και Sabin 2.



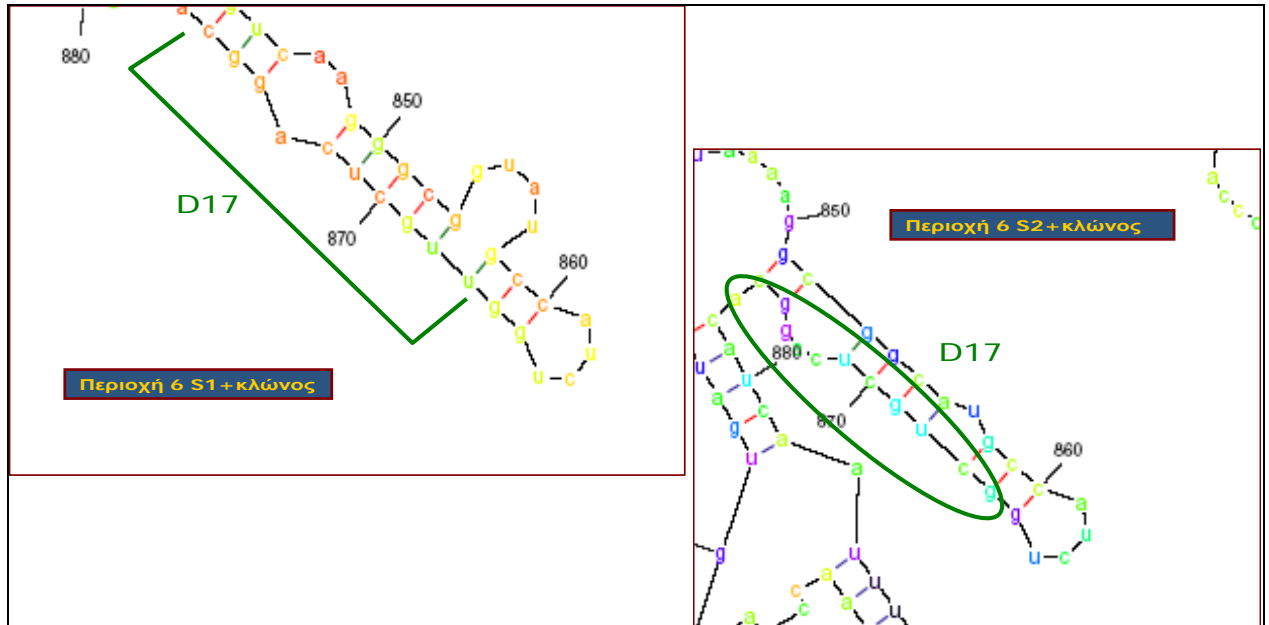
Εικόνα 3.18. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 3) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική Β δομή για το Sabin 1 και η προτεινόμενη δομή για το Sabin 2.



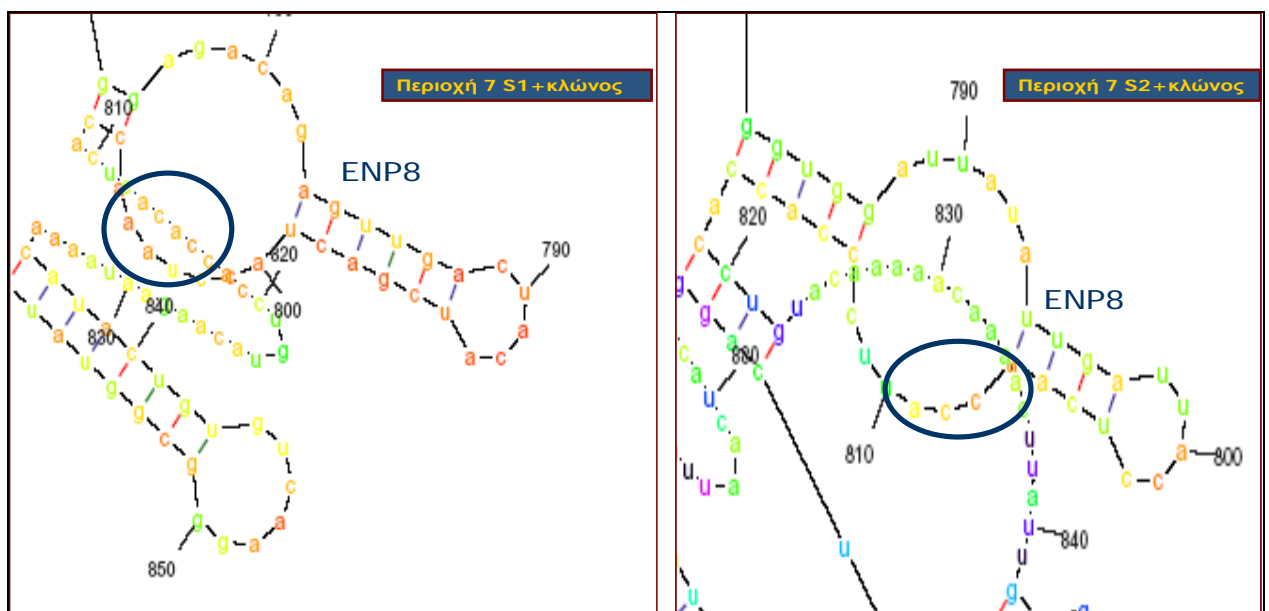
Εικόνα 3.19. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 4) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για τα Sabin 1 και Sabin 2.



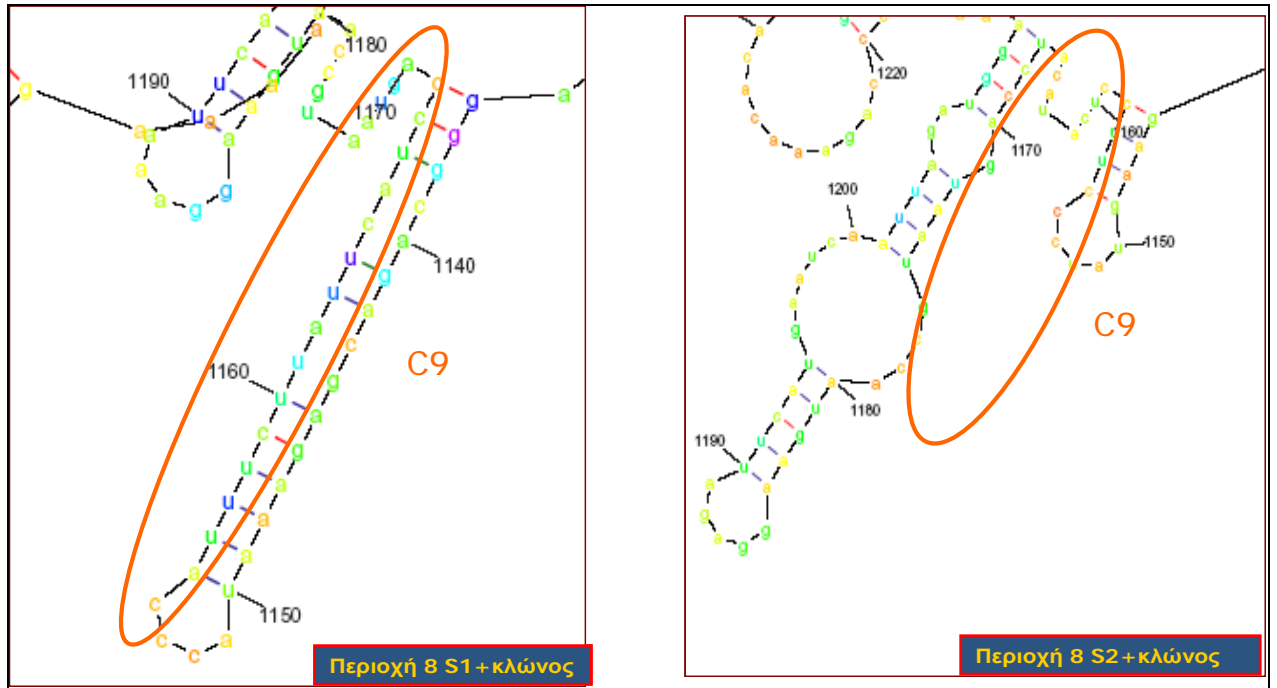
Εικόνα 3.20. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 5) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι εναλλακτικές B δομές για τα Sabin 1 και Sabin 2.



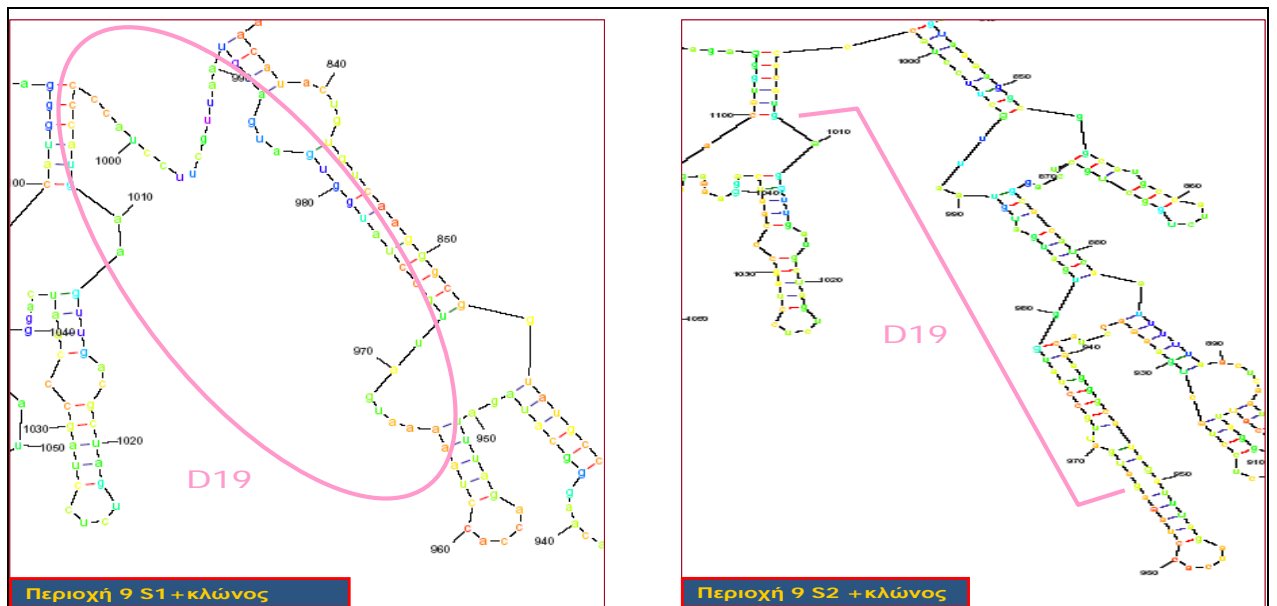
Εικόνα 3.21. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 6) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική B δομή για το Sabin 1 και η προτεινόμενη δομή για το Sabin 2.



Εικόνα 3.22. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 7) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική B δομή για το Sabin 2 και η προτεινόμενη δομή για το Sabin 1.



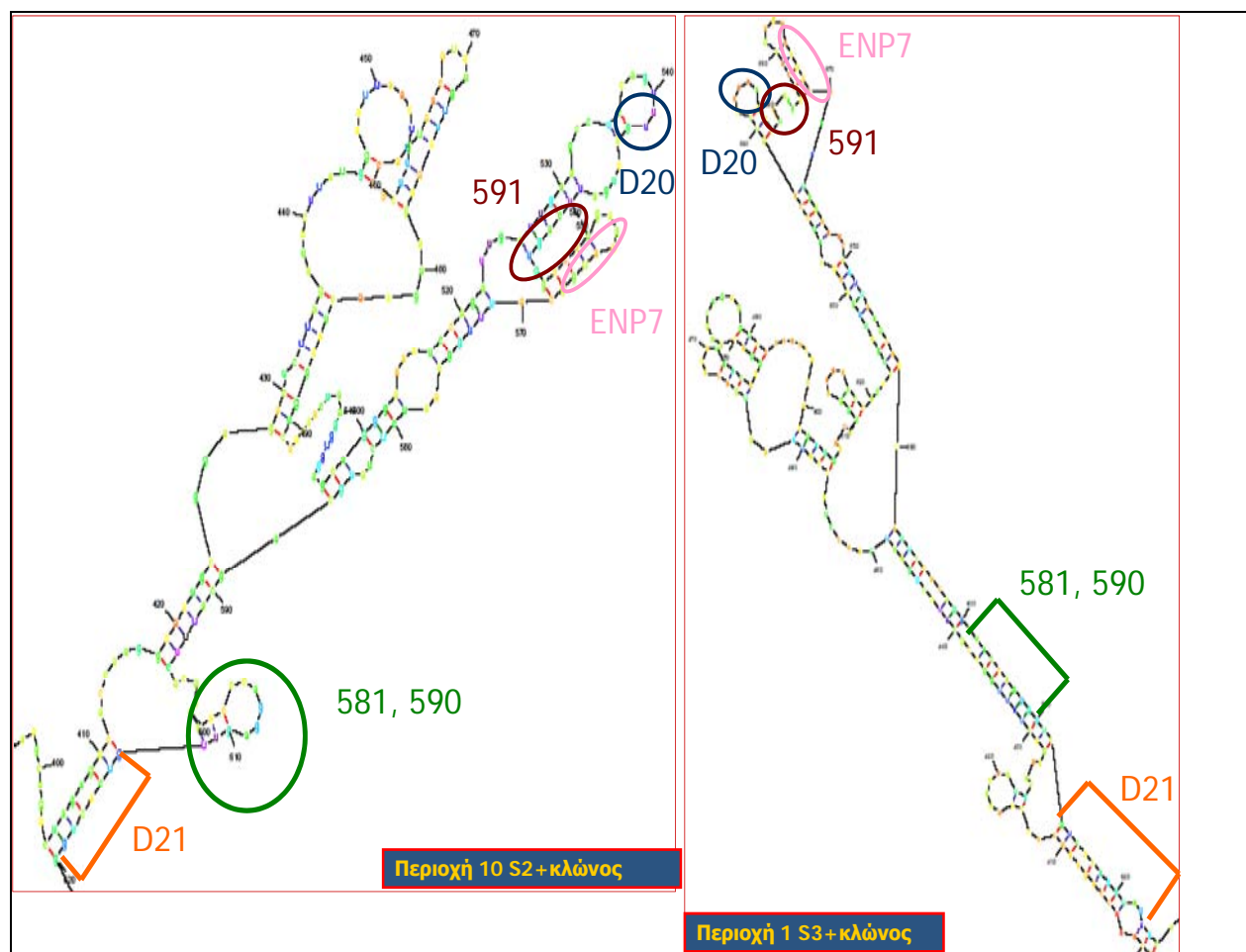
Εικόνα 3.23. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 8) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές για τα Sabin 2 και Sabin 1.



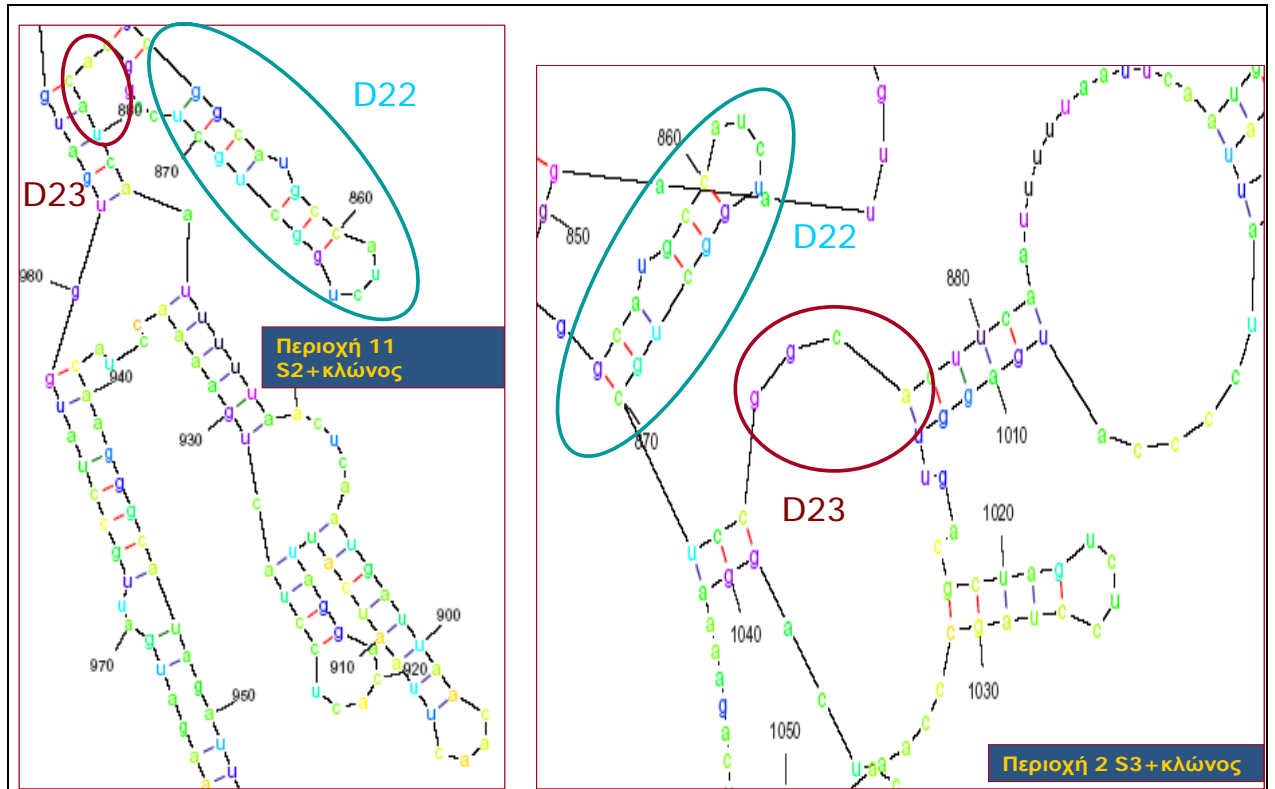
Εικόνα 3.24. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 9) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική δομή Γ για το Sabin 1 και η προτεινόμενη δομή για το Sabin 2.

Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των σημείων ανασυνδιασμού

τύπου Sabin 2/Sabin 3 των κλινικών στελεχών (πίνακας 2.3), τα οποία εδράζονται στη 3D περιοχή, στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών των πρότυπων στελεχών Sabin 2 και Sabin 3, στην συγκεκριμένη περιοχή.



Εικόνα 3.25. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 3 (περιοχές 10 και 1) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 2 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές των Sabin 2 και Sabin 3.



Εικόνα 3.26. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 3 (περιοχές 11 και 2) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 2 και Sabin 3 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές των Sabin 2 και Sabin 3.

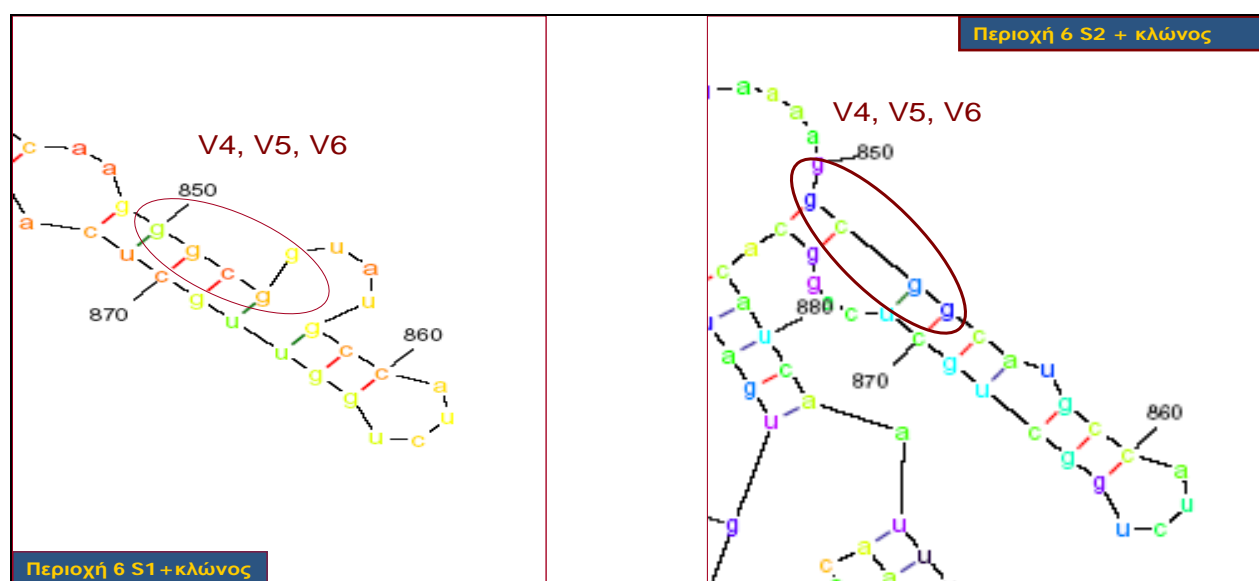
Όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες (3.16-3.26), όπως στην 2C, έτσι και στην 3D γενωμική περιοχή, τα περισσότερα σημεία ανασυνδιασμού εδράζονται σε περιοχές με παρόμοια δευτεροταγή RNA διαμόρφωση μεταξύ των πρότυπων στελεχών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) που συμμετέχουν κάθε φορά στον ανασυνδιασμό.

Στα IM, D16, C6, D17 και ENP7 στελέχη, τα σημεία ανασυνδιασμού βρίσκονται στην δίκλωνη περιοχή (μίσχος), αμέσως πριν τη θηλιά, των εκάστοτε RNA δομικών στοιχείων (δομή θηλιάς-μίσχου), τα οποία είναι κοινά μεταξύ των, κάθε φορά, ανασυνδιαζόμενων στελεχών (Εικόνες 3.16, 3.18, 3.20, 3.21, 3.25 αντίστοιχα) (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3). Στα στελέχη 415 και D18 τα σημεία ανασυνδιασμού εδράζονται στην δίκλωνη περιοχή του μίσχου, αμέσως μετά τη θηλιά των RNA δομικών στοιχείων, τα οποία είναι κοινά μεταξύ των Sabin 1 και Sabin 2 στελεχών (Εικόνες 3.17, 3.20 αντίστοιχα). Ακόμη, στο στέλεχος 6579, (Εικόνα 3.16) το σημείο ανασυνδιασμού εδράζεται σε περιοχή που αποτελείται από μονόκλωνα και δίκλωνα τμήματα RNA, η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε RNA δομικά στοιχεία, παρόμοια μεταξύ των προτύπων στελεχών Sabin 1 και Sabin 2 που συμμετάσχουν στον ανασυνδιασμό. Το σημείο ανασυνδιασμού του στελέχους D20

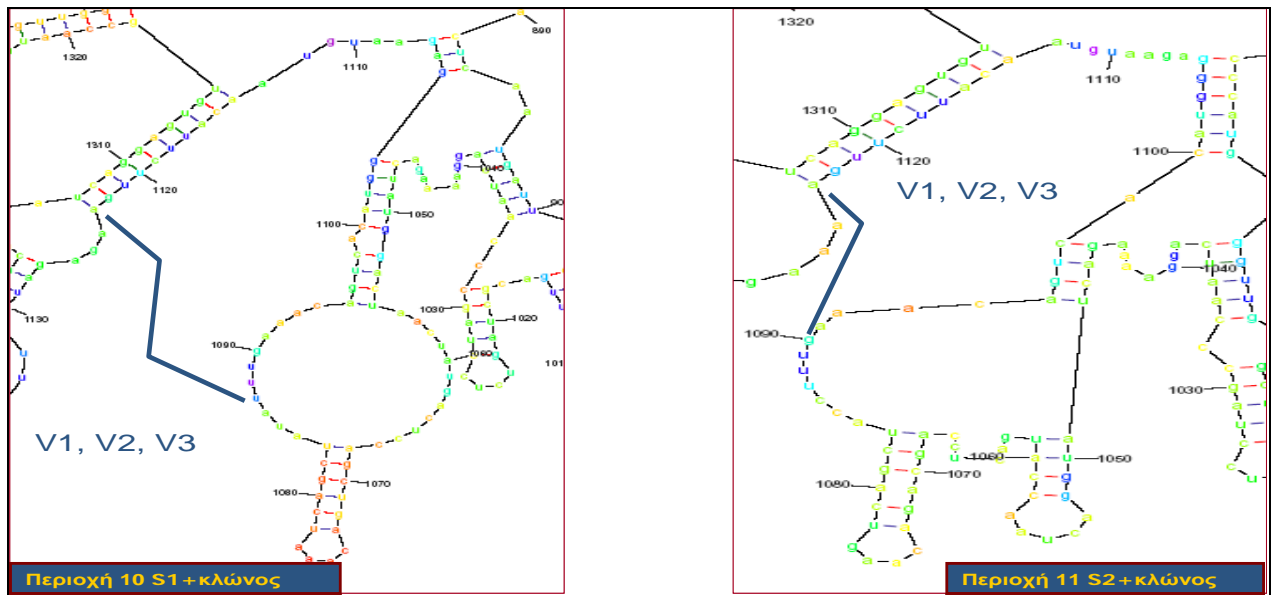
(Εικόνα 3.25) εντοπίζεται στη θηλιά RNA δομικού στοιχείου, τα σημεία ανασυνδιασμού των στελεχών D22, 730, ENP6 και D10, (Εικόνες 3.26, 3.17 αντίστοιχα) εδράζονται σε ολόκληρο το εκάστοτε RNA δομικό στοιχείο, ενώ τα σημεία ανασυνδιασμού των D23, 5749, D11 και ENP8 (Εικόνες 3.26, 3.17, 3.22 αντίστοιχα) εδράζονται σε μονόκλωνες περιοχές, πριν από δομικά RNA στοιχεία. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις τα RNA δομικά στοιχεία είναι κοινά μεταξύ των, κάθε φορά, ανασυνδιαζόμενων μορίων (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3).

3.7.3 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ IN VITRO ΜΟΝΤΕΛΟΥ, ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ RNA ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ 3D ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

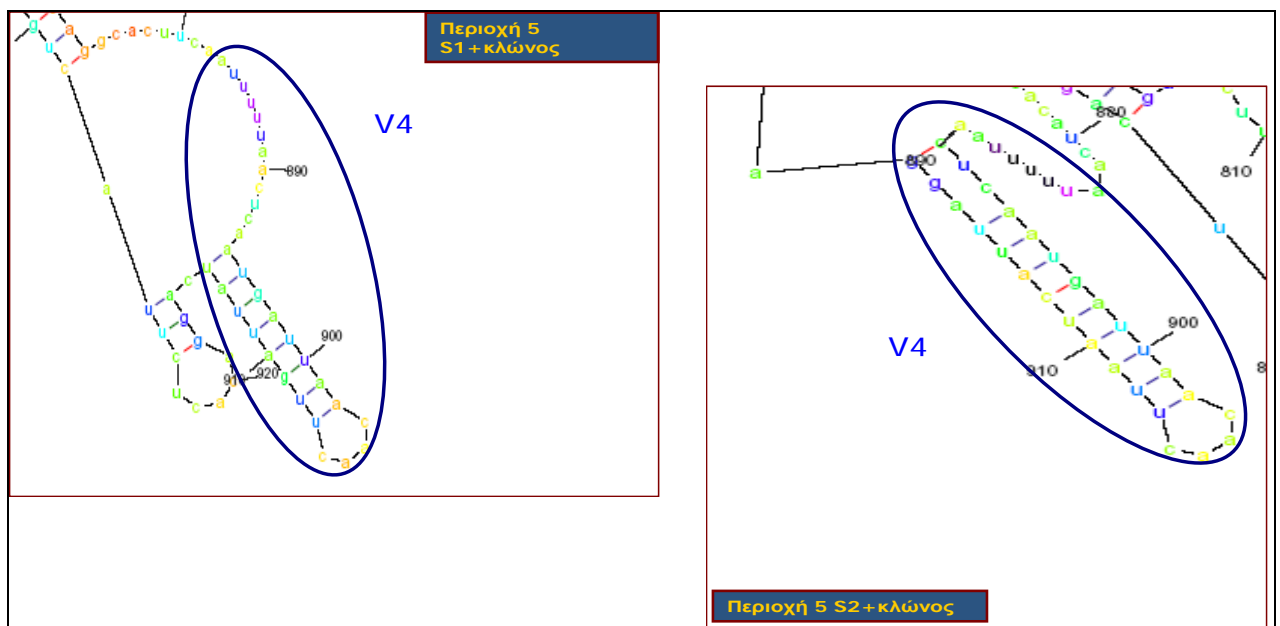
Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 1/Sabin 2 και Sabin 2/Sabin 1 των στελεχών του in vitro μοντέλου (πίνακας 3.7), τα οποία εδράζονται στη 3D περιοχή, στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών των πρότυπων στελεχών Sabin 2 και Sabin 1, στην συγκεκριμένη περιοχή.



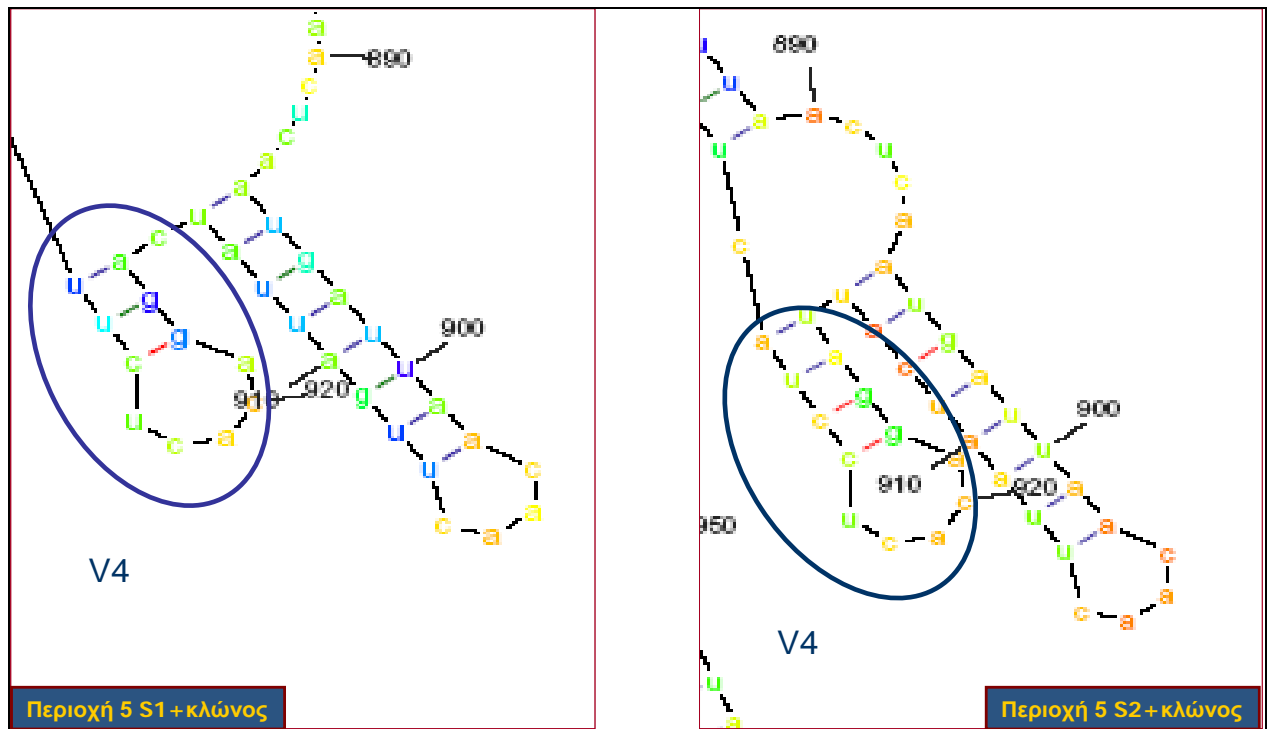
Εικόνα 3.27. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 1/Sabin 2 (περιοχή 6) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική δομή B του Sabin 1 και η προτεινόμενη δομή του Sabin 2.



Εικόνα 3.28. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 1/Sabin 2 (περιοχές 10 και 11) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες δομές των Sabin 1 και Sabin 2.



Εικόνα 3.29. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 2/Sabin 1 (περιοχή 5) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική δομή Γ του Sabin 1 και η προτεινόμενη δομή του Sabin 2.



Εικόνα 3.30. Απεικόνιση των σημείων ανασυνδιασμού τύπου Sabin 1/Sabin 2 (περιοχή 5) στα μοντέλα δευτεροταγών RNA δομών της 3D περιοχής, των Sabin 1 και Sabin 2 πρότυπων στελεχών. Χρησιμοποιήθηκαν η εναλλακτική δομή Γ του Sabin 1 και η προτεινόμενη δομή του Sabin 2.

Τα σημεία ανασυνδιασμού των στελεχών V4, V5 και V6 του *in vitro* μοντέλου εδράζονται στην δίκλωνη περιοχή του μίσχου, αμέσως μετά τη θηλιά των εκάστοτε RNA δομικών στοιχείων (Εικόνα 3.27), ενώ το δεύτερο και τρίτο σημείο ανασυνδιασμού του στελέχους V4 εδράζονται σε ολόκληρο το RNA δομικό στοιχείο (Εικόνες 3.29, 3.30). Σε όλες τις περιπτώσεις τα RNA δομικά στοιχεία παρουσιάζουν ίδια διαμόρφωση μεταξύ των πρότυπων στελεχών Sabin 1 και Sabin 2 που συμμετέχουν στον ανασυνδιασμό.

3.8 ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΣΗΜΕΙΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΥ

Ίσως το πιο σημαντικό στοιχείο που αφορά την τοπολογία των σημείων ανασυνδιασμού, είναι το ότι σχετίζονται, στη μεγάλη πλειοψηφία τους, με RNA δομικά στοιχεία τα οποία είναι όμοια μεταξύ των εκάστοτε προτύπων, ανασυνδιαζόμενων στελεχών και εκτός αυτού, τα ζευγαρώματα βάσεων τα οποία οδηγούν στη δημιουργία των δομικών αυτών στοιχείων, παρουσιάζουν από υψηλές μέχρι πολύ υψηλές πιθανότητες σύμφωνα με το πρόγραμμα RNAfold. Επίσης, αρκετά από αυτά τα δομικά στοιχεία, εκτός από την υψηλή πιθανότητα που παρουσιάζουν, συμπεριλαμβάνονται και στη δομή με τη χαμηλότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας.

Συγκεκριμένα, στη 2C περιοχή τα σημεία ανασυνδιασμού των στελεχών D1, C9, D5, D6, 581, 590, 591 και D8 σχετίζονται άμεσα, καθώς εδράζονται ακριβώς σε τέτοια δομικά στοιχεία, ενώ τα σημεία ανασυνδιασμού των στελεχών D2, D3, C7, D4 σχετίζονται έμμεσα, καθώς βρίσκονται μεταξύ δύο RNA δομικών στοιχείων υψηλής πιθανότητας.

Στη 3D περιοχή, τα σημεία ανασυνδιασμού στην πλειοψηφία τους σχετίζονται άμεσα με δομικά στοιχεία RNA, τα οποία παρουσιάζουν αρκετά υψηλές πιθανότητες, ενώ επίσης αρκετά από αυτά ανήκουν και στη δομή με τη χαμηλότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας. Συγκεκριμένα, στα στελέχη 6579, IM, 415, 730, ENP6, D10, D16, D13, D14, C6, D18, V4 (3 φορές), D17, C9, D19, V5, V6, V1, V2, V3, ENP7, D20 και D22 τα σημεία ανασυνδιασμού εδράζονται στα υψηλής πιθανότητας στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών. Τέλος, στα στελέχη 5749, D11, ENP8, 591 και D23 τα σημεία ανασυνδιασμού βρίσκονται ακριβώς δίπλα στα υψηλής πιθανότητας στοιχεία δευτεροταγών δομών που αναφέρθηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο της διατριβής, 15 ιικά στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν από 14 υγιείς εμβολιασμένους και έναν ασθενή με λευχαιμία, μελετήθηκαν στη VP1 γενωμική περιοχή. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών, καθώς και ο καθορισμός της επίδρασής τους στην αρμοστικότητα των ιικών στελεχών, προβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο μια «εικόνα» της πορείας εξέλιξης των πολιοϊών.

Στη μεγάλη πλειοψηφία τους, οι αμινοξικές αλλαγές που ανιχνεύθηκαν στα στελέχη B1-B15, εδράζονται στο εξωτερικό του καψιδίου και συγκεκριμένα στις αντιγονικές θέσεις του ιού (Ile 90 Met, Ala 96 Thr, Lys 99 Asn, Gln 220 Arg στα Sabin 1 στελέχη, Ala 221 Thr στα Sabin 2 στελέχη) ή πολύ κοντά σε αυτές (Ile 257 Val). Επίσης, αρκετές από τις αμινοξικές αλλαγές εδράζονται στο βόρειο τμήμα της αύλακας (Ala 96 Thr, Lys 99 Asn, Thr 106 Ala, Glu 168 Gly στα Sabin 1 στελέχη, Arg 103 Gly στα Sabin 2 στελέχη), στο οποίο προσδέεται ο υποδοχέας CD155, κατά τη είσοδο του ιού στο κύτταρο (Harber et al., 1995; He et al., 2000).

Ο εντοπισμός των αμινοξικών αλλαγών στις συγκεκριμένες θέσεις (αντιγονικές θέσεις, αύλακα) ίσως να αποτελεί μέρος της στρατηγικής του ιού, η οποία επικεντρώνεται στην αποφυγή της άνοσης απόκρισης του ξενιστή. Οι μεταλλάξεις οι οποίες οδήγησαν σε αμινοξικές αλλαγές στις αντιγονικές θέσεις του ιού, διαφοροποιούν το πρότυπο αναγνώρισης των αντιγονικών θέσεων από τα αντισώματα του ξενιστή. Ως αποτέλεσμα, τα ιικά στελέχη τα οποία παρουσιάζουν τις συγκεκριμένες αντιγονικές ιδιότητες, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε υψηλότερους ρυθμούς στο εντερικό επιθήλιο του ξενιστή.

Ειδικότερα, η πρόσδεση των αντισωμάτων του ξενιστή στις αντιγονικές θέσεις του ιού, οι οποίες εδράζονται κοντά στην αύλακα, οδηγεί σε στερεοχημική παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποδοχέα CD155 στην αύλακα (He et al., 2000), με αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας του στελέχους, καθώς δεν μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο ώστε να πολλαπλασιαστεί.

Αρκετό ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρότυπο μεταλλάξεων που παρατηρείται σε ορισμένα στελέχη. Συγκεκριμένα, τα Sabin 1 προέλευσης στελέχη B3 και B4, καθώς και τα Sabin 2 προέλευσης στελέχη B9, B10 και B11, χαρακτηρίζονται από ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό μη συνώνυμων μεταλλάξεων. Το πρότυπο μεταλλάξεων στη VP1 περιοχή των συγκεκριμένων στελεχών, έρχεται σε αντίθεση με τα πρότυπα μεταλλάξεων που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες εργασίες, όπου οι συνώνυμες μεταλλάξεις ήταν πολύ περισσότερες από τις μη συνώνυμες στη VP1 γενωμική περιοχή (Georgescu et al., 1997; Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; Cherkasova et al., 2002).

Στα ιικά στελέχη B3, B4, B9, B10 και B11 φαίνεται να προτιμούνται οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις, οι οποίες επηρεάζουν άμεσα την αρμοστικότητα τους και όχι οι συνώνυμες μεταλλάξεις, οι οποίες αλλάζουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία, χωρίς όμως να αλλάζουν την αρμοστικότητα των στελεχών. Μια υπόθεση, η οποία θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει το συγκεκριμένο πρότυπο μεταλλάξεων, είναι η διατήρηση δευτεροταγών RNA δομών, σημαντικών για τη βιωσιμότητα του ιού, οι οποίες εδράζονται στη VP1 περιοχή.

Παρά το γεγονός ότι οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη αρμοστικότητα, καθώς ιδιαίτερα στην περιοχή του καψιδίου κυριαρχούν περιορισμοί που αφορούν τις αμινοξικές αλλαγές σε ορισμένα σημεία (Cherkasova et al., 2002) (περιοχές αλληλεπίδρασης ιού-υποδοχέα, περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτομερών κ.α), στα συγκεκριμένα στελέχη οι αμινοξικές αλλαγές οδήγησαν σε αντικατάσταση των αρχικών αμινοξέων από κατάλοιπα με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες (Ile 257 Val, Lys 99 Asn, Gln 220 Arg, Val 56 Ala). Πιθανόν, για αυτό το λόγο τα στελέχη με το υψηλό ποσοστό μη συνώνυμων μεταλλάξεων δεν παρουσίασαν μειωμένη αρμοστικότητα.

Επιπροσθέτως, οι αμινοξικές αλλαγές Ile 90 Met (στέλεχος B3), Thr 106 Ala και Lys 99 Asn (στέλεχος B4) πιθανόν να προσδίδουν επιλεκτικό πλεονέκτημα στα στελέχη B3 και B4, καθώς έχουν βρεθεί με μεγάλη συχνότητα και σε προηγούμενες εργασίες (Georgescu et al., 1997; Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; Mulders et al., 1999; Cherkasova et al., 2002). Επίσης, σύμφωνα με τους Bouchard et al. (1995), το αμινοξικό κατάλοιπο 106 της VP1 αποτελεί σημαντικό καθοριστή εξασθένησης για τα στελέχη Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης. Στα Sabin 2 στελέχη B9 και B11 η μετάλλαξη T 2909 C κατέληξε στην αμινοξική αλλαγή Ile 143 Thr. Η συγκεκριμένη αμινοξική αλλαγή, από το αμινοξύ τύπου Sabin στο αμινοξύ άγριου τύπου, θεωρείται ο

σημαντικότερος καθοριστής νερομολυσματικότητας των Sabin 2 στελεχών (Macadam et al., 1993).

Σε όλα τα Sabin 3 εμβολιακής προέλευσης δείγματα, ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη C 2493 T, η οποία οδήγησε στην αμινοξική αλλαγή Thr 6 Ile. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη συνδέεται με αύξηση της νερομολυσματικότητας των εμβολιακών στελεχών. Συγκεκριμένα, η αμινοξική αλλαγή Thr 6 Ile ενδυναμώνει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της VP1 και των κυτταρικών μεμβρανών, κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Fricks & Hogle, 1990; Tatem et al., 1992).

Από ότι είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, οι αμινοξικές αλλαγές Gln 220 Arg (στέλεχος B4), Ala 221 Thr (στέλεχος B10) και Ile 257 Val (στέλεχος B11), δεν έχουν αναφερθεί ποτέ ξανά σε προηγούμενες εργασίες. Η αμινοξική αλλαγή Gln 220 Arg εντοπίζεται στην αντιγονική θέση 2a, την κύρια θέση αντιγονικής απόκρισης ενάντια στα στελέχη Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης (Minor et al., 1986). Επίσης, η αμινοξική αλλαγή Ala 221 Thr εντοπίζεται στην αντιγονική θέση 2a των Sabin 2 στελεχών. Πιθανώς οι αλλαγές Gln 220 Arg και Ala 221 Thr προσφέρουν επιλεκτικό πλεονέκτημα στα στελέχη που τις φέρουν ως προς την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.

Στα στελέχη εκείνα (Sabin 1: B3, B4, Sabin 2: B9, B10, B11) στα οποία παρατηρήθηκε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό μη συνώνυμων μεταλλάξεων σε σχέση με τις συνώνυμες, παρατηρήθηκε επίσης και η μεγαλύτερη απόκλιση από την VP1 περιοχή των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin 1 και Sabin 2. Το γεγονός αυτό πιθανόν να καταδεικνύει την ικανότητα των συγκεκριμένων στελεχών, εξαιτίας των θέσεων των μη συνώνυμων μεταλλάξεων, να πολλαπλασιάζονται για περισσότερο χρόνο στο έντερο των εμβολιασμένων. Οι αμινοξικές αλλαγές στη μεγάλη πλειονότητά τους, εδράζονται στο εξωτερικό του καψιδίου και δη στις αντιγονικές θέσεις του ιού, γεγονός το οποίο καταδεικνύει, τουλάχιστον εν μέρει, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των αμινοξικών αλλαγών στο καψίδιο οφείλεται στην ανοσολογική πίεση του ξενιστή.

Προτείνουμε ότι η δημιουργία εμβολιακών στελεχών με αυξημένη ικανότητα μετάδοσης και υψηλή μολυσματικότητα, ξεκινάει από χαμηλή νουκλεοτιδική απόκλιση (μικρότερη του 1%) και οφείλεται στην ανοσολογική πίεση του ξενιστή. Κενά στην ανοσολογική κάλυψη ενός πληθυσμού δίνουν καλύτερη ευκαιρία στα ικά στελέχη να προκαλέσουν επιδημίες, ενώ σε επαρκώς ανοσοποιημένους πληθυσμούς

τα μολυσματικά στελέχη δεν προκαλούν επιδημίες, παρά μόνο ασθένεια σε μεμονωμένα μη εμβολιασμένα άτομα.

Συμπερασματικά, τα στοιχεία που παρουσιάζονται στο συγκεκριμένο κεφάλαιο καταδεικνύουν μερικώς τα πρότυπα εξέλιξης των πολιοϊών. Κάποια στελέχη από αυτά που μελετήθηκαν, παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο εξέλιξης στην VP1 περιοχή τους από το αναμενόμενο. Στα συγκεκριμένα στελέχη φαίνεται να προτιμούνται οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις με άμεσο αποτέλεσμα στην αρμοστικότητα του ιού, οι οποίες θα οδηγήσουν σε αμινοξικές αλλαγές στα δομικά στοιχεία της VP1 (αντιγονικές θέσεις, αύλακα), καθώς και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αύξηση της νευρομολυσματικότητας τους, σε σχέση με τις συνώνυμες οι οποίες δεν οδηγούν σε αύξηση της αρμοστικότητας. Το συγκεκριμένο πρότυπο μεταλλάξεων επιτρέπει στον ιό να πολλαπλασιάζεται και κατά συνέπεια να εξελίσσεται, για περισσότερο χρόνο, αποφεύγοντας την άνοση απόκριση του ξενιστή.

4.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ 7/b/97

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο της διατριβής, παρατίθεται ο ολοκληρωμένος γενετικός χαρακτηρισμός του στελέχους 7b/97, ενός εμβολιοσυνδεόμενου στελέχους πολιοϊού (VDPV), το οποίο απομονώθηκε από αστικά λύματα στην περιοχή της Αττικής το έτος 1997.

Η αλληλούχιση σχεδόν ολόκληρου του γενώματος του στελέχους 7/b/97, αποκάλυψε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος έχει προκύψει από ανασυνδυασμό μεταξύ ενός στελέχους εμβολιακής προέλευσης Sabin 1 και ενός στελέχους, το οποίο πιθανότατα ανήκει στο είδος C των εντεροϊών. Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις οι οποίες έχουν αναφερθεί κατά κόρον σε προηγούμενες μελέτες, ανιχνεύθηκαν στην καψιδιακή περιοχή του στελέχους 7/b/97. Ωστόσο, το σημαντικότερο συμπέρασμα του κεφαλαίου είναι ότι εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών, τα οποία παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό απόκλισης, μπορούν να απομονωθούν ακόμα και σε περιοχές με υψηλά επίπεδα ανοσολογικής κάλυψης. Επίσης, τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου καταδεικνύουν την ανάγκη συνέχισης του περιβαλλοντικού ελέγχου για ανίχνευση πολιοϊών, ακόμα και σε περιοχές οι οποίες θεωρούνται ελεύθερες πολιοϊών.

Στην 5' UTR ανιχνεύθηκαν δύο μεταλλάξεις, οι οποίες εδράζονται στις θέσεις 471 (C 471 T) και 583 (C 583 G). Το νουκλεοτίδιο 471 (C 471 T), βρίσκεται σε μονόκλωνη

περιοχή του δομικού RNA στοιχείου V, ενώ το νουκλεοτίδιο 583 (C 583 G) εδράζεται σε δίκλωνη περιοχή του δομικού RNA στοιχείου VI (Piliipenko et al., 1989). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι το νουκλεοτίδιο 583 στο οποίο ανιχνεύτηκε η μεταστροφή C→G, εντοπίζεται σε δίκλωνη περιοχή του δομικού στοιχείου VI, το νουκλεοτίδιο 616 (G) με το οποίο ζευγαρώνει σε φυσιολογικές συνθήκες, δεν άλλαξε μέσα στα πλαίσια της συμμεταβλητότητας που χαρακτηρίζει την περιοχή 5' UTR.

Η αλληλούχηση της καψιδιακής περιοχής του στελέχους 7/b/97, αποκάλυψε αμινοξικές αλλαγές σε σημαντικά σημεία για την λειτουργικότητα του καψιδίου. Αναλυτικότερα, αμινοξικές αλλαγές παρατηρήθηκαν σε σημεία τα οποία σχετίζονται με την σταθερότητα του καψιδίου (Val 56 Ile στην VP1, Met 225 Leu στην VP3), σε αντιγονικές θέσεις του ιού (Lys 60 Thr στην VP3, N-AgIII και Ile 90 Met, Lys 99 Asn στην VP1, N-AgI) και σε κατάλοιπα τα οποία σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιού-υποδοχέα (Thr 106 Ala στην BC θηλιά της VP1 και Phe 237 Ile στην VP1, στο πάτωμα της αύλακας) (Minor, 1990; Macadam et al., 1991; Colston & Racaniello, 1994; Liao & Racaniello, 1997; Belnap et al., 2000).

Έχει προταθεί ότι συγκεκριμένα αμινοξεία, τα οποία εδράζονται σε αντιγονικές θέσεις των Sabin 1 στελεχών (κατάλοιπα: 60 της VP3, 90, 99, 106 της VP1) αλλάζουν με πολύ γρήγορους ρυθμούς κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού στο εντερικό επιθήλιο του ξενιστή, στα αντίστοιχα κατάλοιπα του άγριου τύπου, ή σε κατάλοιπα με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα αντίστοιχα του άγριου τύπου.

Οι πολύ γρήγοροι ρυθμοί αλλαγής των συγκεκριμένων καταλοίπων, πιθανότατα καταδεικνύουν ότι οι αλλαγές στα συγκεκριμένα κατάλοιπα δεν οφείλονται στην προσπάθεια του ιού να αποφύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, αλλά περισσότερο στην προσπάθεια του ιού να προσαρμοστεί στο περιβάλλον του (εντερικό επιθήλιο), ώστε να πολλαπλασιαστεί με υψηλότερους ρυθμούς (Yanovenko et al., 2006). Επιπλέον, το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες αλλαγές εκτός από την καψιδιακή περιοχή του 7/b/97 ανιχνεύθηκαν και σε αρκετές προηγούμενες εργασίες, σε ιικά στελέχη με ανεξάρτητα εξελικτικά μονοπάτια, καταδεικνύει ότι κατά πάσα πιθανότητα συνεισφέρουν ένα εξελικτικό πλεονέκτημα στο στέλεχος 7/b/97 (Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; Gavrilin et al., 2000; Cherkasova et al., 2002; Martin et al., 2004; Dedepsidis et al; 2006).

Επίσης, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι συγκεκριμένες αμινοξικές αλλαγές, οι οποίες εδράζονται στις αντιγονικές θέσεις του ιού, διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις ιού-υποδοχέα. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενδυναμώνεται από το γεγονός της

αλληλοεπικάλυψης των περιοχών πρόσδεσης του υποδοχέα CD155 (αύλακα) και των αντιγονικών περιοχών του ιού. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα κατάλοιπα 60 της VP3, καθώς και για τα κατάλοιπα 90 και 99 της VP1. Συγκεκριμένα, το αμινοξύ 60 (Lys 60 Thr) της VP3, εκτός του ότι συμμετέχει στο σχηματισμό της αντιγονικής θέσης III, εδράζεται και στην περιοχή της αύλακας η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την D1 περιοχή του CD155, κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Επίσης, τα αμινοξέα 99 και 106 της VP1, εκτός του ότι αποτελούν μέρος της αντιγονικής θέσης I, εδράζονται και στη BC θηλιά της VP1 η οποία εμπλέκεται στο σχηματισμό του βόρειου τμήματος της αύλακας πρόσδεσης του υποδοχέα (Harber et al., 1995; Belnap et al., 2000; He et al., 2000; He et al., 2003). Επιπλέον, ο περιορισμός των λειτουργικών διαμορφώσεων των πρωτεϊνικών μορίων σε περιοχές κρίσιμες για τη σταθερότητα του καψιδίου, αντανακλάται σε συντηρητικής φύσεως (παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες) αμινοξικές αλλαγές στις αντίστοιχες περιοχές του 7/b/97 και ειδικότερα στα κατάλοιπα 56 (Val 56 Ile) της VP1 και 225 (Met 225 Leu) της VP3. Τα συγκεκριμένα κατάλοιπα συμμετέχουν σε υδροφοβικής φύσεως αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες VP3 και VP1, οι οποίες συνεισφέρουν στη σταθερότητα του καψιδίου (Cherkasova et al., 2002).

Ανιχνεύθηκαν επίσης μεταλλάξεις οι οποίες οδήγησαν σε απώλεια του εξασθενημένου, καθώς και του θερμοευαίσθητου φαινοτύπου του στελέχους 7/b/97. Οι μεταλλάξεις στα νουκλεοτίδια 2438 (A 2438 T, Met 225 Leu) και 2795 (A 2795 G, Thr 106 Ala), οι οποίες οδηγούν σε απώλεια του εξασθενημένου φαινοτύπου των εμβολιακής προέλευσης Sabin 1 στελεχών, ανιχνεύθηκαν στην καψιδιακή περιοχή του 7/b/97. Επίσης οι μεταλλάξεις, οι οποίες ανιχνεύθηκαν στα νουκλεοτίδια 1944 (A 1944 C, Lys 60 Thr) και 2438 (A 2438 T, Met 225 Leu), καθώς και η αμινοξική αλλαγή στο κατάλοιπο 73 της 3D περιοχής (His 73 Tyr) είχαν ως αποτέλεσμα την απώλεια του θερμοευαίσθητου φαινοτύπου του στελέχους 7/b/97 (Bouchard et al., 1995).

Η αλληλούχιση των λειτουργικών περιοχών του γενώματος του 7/b/97, αποκάλυψε σημείο ανασυνδυασμού στην 2A γενωμική περιοχή του στελέχους 7/b/97, μεταξύ ενός στελέχους Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης και ενός εντεροϊού, οποίος κατά πάσα πιθανότητα ανήκει στο είδος C των εντεροϊών. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί ένδειξη κυκλοφορίας του στελέχους 7/b/97 στην περιοχή από την οποία απομονώθηκε. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι όλα τα εμβολιοσυνδεόμενα κυκλοφορούντα στελέχη πολιοϊών (cVDPVs), τα οποία έχουν απομονωθεί μέχρι

στιγμής, έχουν βρεθεί ανασυνδυασμένα στη μη δομική περιοχή του γενώματός τους με εντεροϊούς του είδους C, καθώς επίσης και από το γεγονός ότι κυκλοφορούντα άγρια στελέχη πολιοϊών έχουν βρεθεί ανασυνδυασμένα με στελέχη Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης (Kew et al., 2002; Rousset et al., 2003; Liu et al., 2003; Shimizu et al., 2004; Liang et al., 2006). Επίσης, ο ανασυνδυασμός μπορεί να συνετέλεσε στην αύξηση της αρμοστικότητας του στελέχους 7/b/97, μέσω αντικατάστασης των καθοριστών θερμοευαισθησίας, οι οποίοι εδράζονται στις 3D και 3UTR περιοχές. Αυτό είναι γεγονός για την 3D περιοχή (His 73 Tyr), αλλά για την 3' UTR δεν μπορούμε να γνωρίζουμε καθώς αλληλουχήθηκε η περιοχή από το νουκλεοτίδιο 48 μέχρι το νουκλεοτίδιο 7406. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύεται από πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν ότι οι πολιοϊοί, όπως και οι εντεροϊοί του είδους C, είναι διακριτές καψιδιακές αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται σε αναζήτηση εκείνων των λειτουργικών περιοχών που θα τους προσδώσουν την μεγαλύτερη δυνατή αρμοστικότητα (Brown et al., 2003).

Το στέλεχος 7/b/97, σύμφωνα με τα κριτήρια της Π.Ο.Υ, χαρακτηρίζεται ως αμφιλεγόμενο εμβολιοσυνδεόμενο στέλεχος πολιοϊού (aVDPV), αν και τα γενωμικά χαρακτηριστικά του στελέχους 7/b/97 μπορούν να το κατατάξουν στην κατηγορία των κυκλοφορούντων εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών (cVDPV). Πρώτον, οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις αντιγονικές θέσεις του 7/b/97, είναι λίγες σε σχέση με το υψηλό ποσοστό συνολικής νουκλεοτιδικής απόκλισης του στελέχους και κατά δεύτερον και ίσως πιο σημαντικό, ο ανασυνδυασμός στη μη δομική περιοχή του στελέχους, αποτελεί ατράνταχτη ένδειξη κυκλοφορίας του στελέχους στον πληθυσμό (Yang et al., 2003; Shimizu et al., 2004; Kew et al., 2005). Ωστόσο, το περίεργο με την συγκεκριμένη υπόθεση είναι ότι κατά την περίοδο την οποία απομονώθηκε το στέλεχος, δεν υπήρχαν κενά στην ανοσολογική κάλυψη του πληθυσμού, ούτε κρούσματα πολιομυελίτιδας, καθώς επίσης δεν συνέτρεχαν και οι κατάλληλες συνθήκες (υγιεινής κυρίως), οι οποίες θα μπορούσαν να προάγουν την κυκλοφορία τέτοιων στελεχών στην Ελλάδα. Συμπερασματικά, το ποσοστό απόκλισης 1,87% της VP1 περιοχής του 7/b/97, από την VP1 περιοχή του πρότυπου στελέχους Sabin 1, όπως και ο ανασυνδυασμός μεταξύ Sabin 1/εντεροϊού είδους C στην 2A περιοχή, μπορούν να κατατάξουν το στέλεχος 7/b/97 στην cVDPV κατηγορία, παρά το γεγονός ότι δεν συνδέεται με κανένα κρούσμα πολιομυελίτιδας.

Στις μέρες μας, η πλειοψηφία των χωρών έχουν σταματήσει τη χορήγηση του OPV και έχουν ξεκινήσει την χορήγηση του IPV εμβολίου. Ωστόσο, το θέμα το οποίο

τίθεται είναι τι θα συμβεί στην περίπτωση εισαγωγής ενός παρόμοιου με το 7/b/97 στελέχους σε περιοχές όπου χρησιμοποιείται το IPV, δεδομένης της ασθενέστερης ανοσοποίησης που επάγει σε σχέση με το OPV. Για αυτό το λόγο, τόσο ο εργαστηριακός έλεγχος, όσο και ο περιβαλλοντικός έλεγχος κρίνονται απαραίτητοι ακόμα και σε χώρες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ελεύθερες πολιτιών.

4.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ K/2002

Σε αυτό το κεφάλαιο της διατριβής περιγράφεται ο ολοκληρωμένος γενετικός χαρακτηρισμός του στελέχους K/2002, το οποίο απομονώθηκε από έναν ασθενή με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP), ηλικίας 7 μηνών, 16 εβδομάδες μετά από την χορήγηση της πρώτης δόσης του εμβολίου OPV. Ο γενετικός χαρακτηρισμός του K/2002 αποκάλυψε ένα σημείο ανασυνδυασμού στο 3' άκρο της VP1 περιοχής, τύπου Sabin 3/Sabin 2, που οδήγησε στην εισαγωγή 6 αμινοξέων τύπου Sabin 2, σε γενωμικό υπόβαθρο τύπου Sabin 3.

Οι *in vivo* διατυπικοί ανασυνδυασμοί στην καψιδιακή περιοχή των εμβολιακών στελεχών Sabin είναι ένα πολύ σπάνιο φαινόμενο. Μέχρι στιγμής μόνο δυο τέτοια στελέχη έχουν απομονωθεί (Martin et al., 2002; Blomqvist et al., 2003). Λαμβάνοντας υπόψιν την σπανιότητα εντόπισης διατυπικών ανασυνδυασμών στην καψιδιακή περιοχή των εμβολιακών στελεχών Sabin, καθώς και το γεγονός ότι σε όλα τα ανασυνδυασμένα στο καψίδιο στελέχη, τα οποία έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής, τα σημεία ανασυνδυασμού εντοπίζονται στην ίδια περιοχή και είναι του ίδιου τύπου, μπορεί να υποτεθεί ότι το 3' άκρο της VP1 περιοχής αποτελεί σημείο «συχνής» εμφάνισης ανασυνδυασμών τύπου Sabin 3/Sabin 2. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύεται από την εμφάνιση συγκεκριμένων τύπων ανασυνδυασμού σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος των εμβολιακών στελεχών πολιτιών. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η 2C περιοχή αποτελεί «πόλο έλξης» των ανασυνδυασμών τύπου Sabin 3/Sabin x (x: Sabin 2 ή Sabin 1), ενώ η 3D περιοχή «πόλο έλξης» των ανασυνδυασμών τύπου Sabin 2/Sabin x (x: Sabin 1 ή Sabin 3) (Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006).

Στην καψιδιακή περιοχή κυριαρχούν περιορισμοί, οι οποίοι αφορούν τις λειτουργικές διαμορφώσεις των πρωτεϊνικών μορίων και πιθανότατα αποτρέπουν τον εμπλουτισμό των διατυπικά ανασυνδυασμένων στελεχών με χιμαιρικά πρωτεϊνικά μόρια (Blomqvist et al., 2003). Στο στέλεχος K/2002, τα εισαγόμενα

αμινοξέα εδράζονται στην b θηλιά της VP1 πρωτεΐνης, μιας περιοχής που βρίσκεται εξ' ολοκλήρου στο εξωτερικό του καψιδίου και για την οποία οι περιορισμοί που ισχύουν για τις λειτουργικές διαμορφώσεις των καψιδιακών πρωτεϊνών δεν είναι τόσο αυστηροί. Επιπροσθέτως, η πλειονότητα των αμινοξικών αλλαγών, οι οποίες οφείλονταν στον ανασυνδυασμό, ήταν συντηρητικής φύσεως (κατάλοιπα με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες). Η συντηρητική φύση των αμινοξικών αλλαγών μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των περιοχών που προσδέεται ο υποδοχέας και των περιοχών όπου εδράζονται οι αντιγονικές θέσεις (Colston & Racaniello, 1995; Harber et al., 1995; Belnap et al., 2000; He et al., 2000). Επιπλέον, οι αμινοξικές αλλαγές οι οποίες έλαβαν χώρα λόγω του ανασυνδυασμού στο στέλεχος K/2002, σε στελέχη προηγούμενων μελετών έχουν συμβεί μέσω μη συνώνυμων μεταλλάξεων (Blomqvist et al., 2004; Yanovenko et al., 2006). Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα κατάλοιπα 286 (Arg 286 Lys), 287 (Asn 287 Asp), 288 (Asn 288 Gly), 290 (Asp 290 Thr) και 293 (Ser 293 Pro). Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι συγκεκριμένες αλλαγές είναι πολύ συχνό φαινόμενο στα Sabin 3 στελέχη, όπως έχουν δείξει και προηγούμενες μελέτες, καθώς και ότι στην περίπτωση του K/2002 οι συγκεκριμένες αλλαγές έλαβαν χώρα μέσω ανασυνδυασμού, μπορεί να υποτεθεί ότι ο ανασυνδυασμός προσδίδει επιλεκτικό πλεονέκτημα που αφορά τους ρυθμούς αντιγραφής του συγκεκριμένου στελέχους.

Επίσης, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε δύο νουκλεοτίδια, οι οποίες σχετίζονται με μεταστροφή του εξασθενημένου εμβολιακού φαινοτύπου Sabin 3 σε νευρομολυσματικό. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη T 472 C, αποτελεί μεταστροφή προς τον άγριο τύπου γεννήτορα, P3/Leon/USA/37, του εμβολιακού στελέχους Sabin 3. Η μετάλλαξη T 472 C αποκαθιστά τη δευτεροταγή διαμόρφωση άγριου τύπου του δομικού στοιχείου V του IRES, με αποτέλεσμα την ισχυρότερη πρόσδεση της πρωτεΐνης PTB, η οποία οδηγεί σε υψηλότερους ρυθμούς ιικής μεταγραφής (Guest et al., 2004). Η μετάλλαξη C 2493 T, η οποία οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή Thr 6 Ile, της VP1, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται στενά με αύξηση της νευρομολυσματικότητας των Sabin 3 στελεχών (Fricks & Hogle, 1990; Tatem et al., 1992).

Ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία του συγκεκριμένου κεφαλαίου είναι η ασυμφωνία η οποία υπάρχει για την ηλικία του K/2002, αν οι υπολογισμοί βασιστούν στην VP1 και αν βασιστούν σε ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή. Συγκεκριμένα, η ηλικία του K/2002 η οποία προκύπτει από την VP1 περιοχή είναι περίπου 11 μήνες, ενώ η ηλικία του K/2002, η οποία προκύπτει από ολόκληρη την

καψιδιακή περιοχή είναι περίπου 12 εβδομάδες. Το στέλεχος K/2002 απομονώθηκε 16 εβδομάδες αφότου ο ασθενής έλαβε την πρώτη δόση του εμβολίου OPV, με συνέπεια η ηλικία που προκύπτει από το καψίδιο να είναι πιο κοντά στην πραγματική ηλικία του στελέχους. Επιπροσθέτως πρέπει να ληφθεί υπόψιν η ανομοιομορφία κατανομής μεταλλάξεων στην καψιδιακή περιοχή του K/2002. Συγκεκριμένα, οι 8 από τις συνολικά 12 μεταλλάξεις, οι οποίες ανιχνεύθηκαν στην καψιδιακή περιοχή του K/2002, εδράζονται στην VP1 περιοχή, ενώ μόνο 4 εδράζονται στις υπόλοιπες καψιδιακές περιοχές. Αυτή η ανομοιομορφία κατανομής μεταλλάξεων μπορεί να οφείλεται σε έναν ενδοτυπικό ανασυνδυασμό στη VP1 περιοχή, ανάμεσα σε δύο Sabin 3 στελέχη με διαφορετικά ποσοστά απόκλισης από το πρότυπο στέλεχος Sabin 3. Άλλη μία εξήγηση της ανομοιομορφίας κατανομής μεταλλάξεων στη VP1, μπορεί να είναι ότι ο ανασυνδυασμός στην VP1 περιοχή «πυροδότησε» έναν υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων στη συγκεκριμένη περιοχή, προκειμένου να αντισταθμιστεί οποιαδήποτε απώλεια αρμοστικότητας του K/2002. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου όπως και τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Cherkasova et al., 2002; Karakasiliotis et al., 2005), υπογραμμίζουν το ότι θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η παρουσία των εμβολιοσυνδεδεμένων στελεχών, τα οποία έχουν δημιουργηθεί εξαιτίας της χορήγησης του OPV, πριν σχεδιαστούν στρατηγικές οι οποίες περιλαμβάνουν το σταμάτημα χορήγησης του OPV. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο, ο εργαστηριακός έλεγχος πρέπει να παραμείνει σε υψηλά επίπεδα, ακόμα και σε χώρες ελεύθερες πολιοϊών.

4.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ RNA ΔΟΜΕΣ ΣΤΑ ΕΜΒΟΛΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Στη συγκεκριμένη ενότητα αναλύεται ο τρόπος συσχέτισης των RNA ανασυνδυασμών με τα στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών, στα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα δομικά RNA στοιχεία και στα σημεία ανασυνδυασμού, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο την μη τυχαία κατανομή των σημείων ανασυνδυασμού, στο γένωμα των εμβολιακών στελεχών πολιοϊών.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των στοιχείων δευτεροταγών RNA δομών, στα οποία εδράζονται τα σημεία ανασυνδυασμού, είναι ότι εμφανίζονται από υψηλή μέχρι

πολύ υψηλή πιθανότητα. Αναλυτικότερα, τα ζευγάρια βάσεων, τα οποία είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό αυτών των δομικών στοιχείων, παρουσιάζουν πολύ υψηλές πιθανότητες ζευγαρώματος, όπως φάνηκε από το RNAfold. Η υψηλή πιθανότητα των ζευγαρωμάτων των συγκεκριμένων βάσεων αναφέρεται στο σύνολο των πιθανών ζευγαρωμάτων που μπορούν να συμβούν σε όλο το μόριο και όχι μόνο τοπικά (McCaskill, 1990). Επιπλέον, η μεγάλη πλειοψηφία των δομικών στοιχείων, εκτός του ότι χαρακτηρίζονται από υψηλή πιθανότητα, συμπεριλαμβάνονται και στη δομή με τη χαμηλότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας. Σύμφωνα με τον Mathews (2004), τα υψηλής πιθανότητας ζευγαρώματα, τα οποία βρίσκονται και στη δομή χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας έχουν πιθανότητα από 83,2% ($\pm 8,3\%$) μέχρι και 91% ($\pm 5,9\%$), να βρίσκονται και στην πραγματική δομή του μορίου. Επομένως, η θετική προγνωστική αξία των στοιχείων δευτεροταγών δομών, στα οποία εδράζονται οι ανασυνδυασμοί, είναι αρκετά υψηλή.

Στη 2C περιοχή το 75% των σημείων ανασυνδυασμού τύπου Sabin3/Sabin2 των κλινικών στελεχών, εδράζεται σε δομικά στοιχεία RNA, υψηλής θετικής προγνωστικής αξίας, καθώς και παρόμοιας δευτεροταγούς διαμόρφωσης μεταξύ των εκάστοτε ανασυνδυαζόμενων προτύπων μορίων, ενώ στην 3D περιοχή το 80% των σημείων ανασυνδυασμού τύπου Sabin2/Sabinx (x: Sabin1, Sabin3) των κλινικών στελεχών, εδράζονται σε υψηλής θετικής προγνωστικής αξίας και παρόμοιας διαμορφώσεως, μεταξύ των προτύπων μορίων που συμμετέχουν κάθε φορά στον ανασυνδυασμό, στοιχεία δευτεροταγών δομών. Το ίδιο ισχύει και για τα σημεία ανασυνδυασμού των στελεχών του *in vitro* μοντέλου. Συγκεκριμένα, όλα τα σημεία ανασυνδυασμού των *in vitro* στελεχών εδράζονται επίσης, σε RNA στοιχεία υψηλής θετικής προγνωστικής αξίας και παρόμοιας δευτεροταγούς διαμόρφωσης, μεταξύ των 2 ανασυνδυαζόμενων προτύπων μορίων. Επομένως, η κατανομή των ανασυνδυασμών στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές των εμβολιακών στελεχών πολιοϊών δεν είναι τυχαία και συνάδει με στοιχεία παρόμοιας δευτεροταγούς διαμόρφωσης μεταξύ των δύο συμβαλλόμενων μορίων.

Το ισχύον μοντέλο ανασυνδυασμού των πολιοϊών έχει προταθεί από τους Romanova et al. (1986) και αποτελείται από τα εξής 4 βήματα:

- Κατά την αντιγραφή, δύο γενώματα στελεχών διαφορετικών οροτύπων πολιοϊών μπορούν να ζευγαρώνουν, δημιουργώντας ετεροδιμερές, σε περιοχές, οι οποίες έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν δευτεροταγείς RNA δομές και είναι ομόλογες μεταξύ των δύο στελεχών.

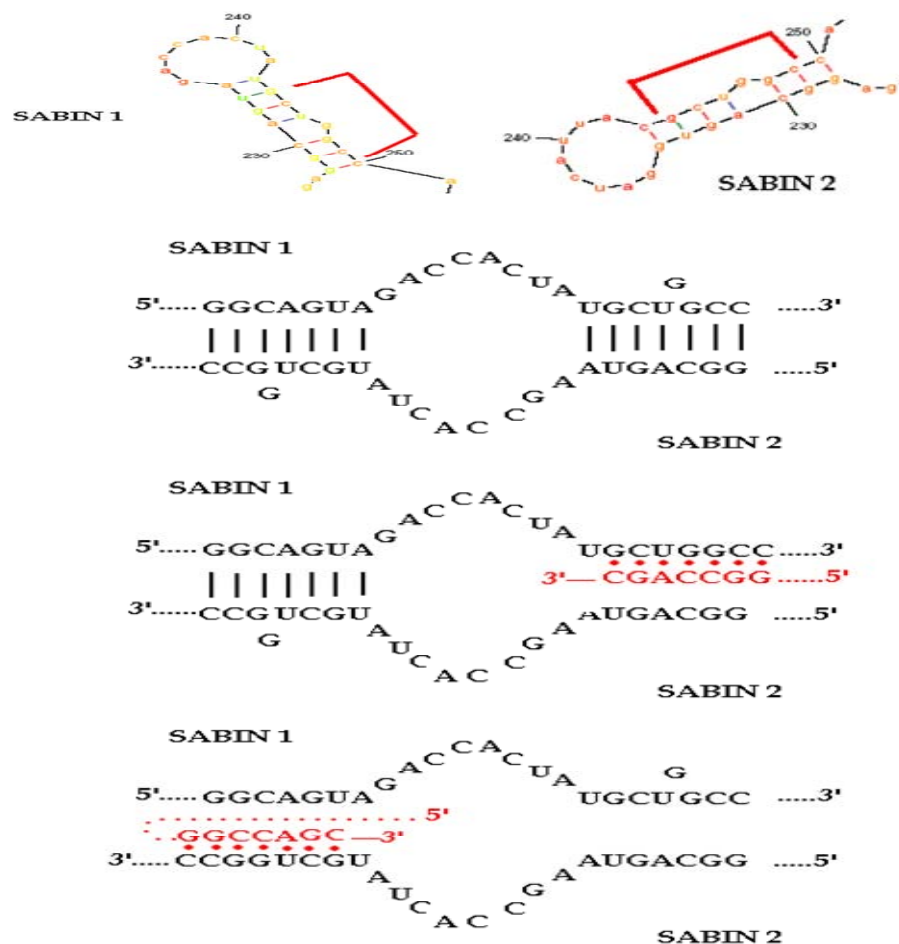
- Η 3D πολυμεράση ξεκινάει την αντιγραφή του γενώματος του πρώτου στελέχους από το 3' άκρο και διαπερνάει, σχετικά εύκολα, την περιοχή του ετεροδιμερούς, αντιγράφοντας τον ένα από τους δύο κλώνους. Ωστόσο, σε κάποια σημεία του ετεροδιμερούς, κυρίως μονόκλωνα, η 3D πολυμεράση με τον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο αρνητικής πολικότητας, αποκολλάται από το πρώτο κλώνο θετικής πολικότητας που χρησιμοποιείται ως καλούπι.
- Ο νεοσυντιθέμενος αρνητικής πολικότητας RNA κλώνος σε σύμπλοκο με τη 3D πολυμεράση προσκολλάται σε ομόλογο σημείο του θετικού κλώνου του δεύτερου RNA μορίου.
- Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου συνεχίζεται με τη χρήση του κλώνου θετικής πολικότητας του δεύτερου μορίου ως καλούπι.

Τα μονόκλωνα σημεία στα οποία η 3D πολυμεράση αποκολλάται σύμφωνα με τους συγγραφείς είναι οι θηλιές των RNA δομικών στοιχείων, καθώς στην εργασία τους όλα τα σημεία ανασυνδυασμού εντοπίστηκαν σε θηλιές δομικών στοιχείων.

Εν αντιθέσει με τους Romanova et al. (1986) στη συγκεκριμένη εργασία, τα σημεία ανασυνδυασμού εντοπίστηκαν, στην πλειοψηφία τους, στην δίκλωνη περιοχή του μίσχου των RNA δομικών στοιχείων. Επίσης τα μοντέλα δευτεροταγών δομών της εργασίας των Romanova et al. (1986) είναι λιγότερο αξιόπιστα σε σχέση με τα μοντέλα που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 3.6 των αποτελεσμάτων, καθώς βασίζονται σε εμπειρική προσέγγιση λόγω του ότι τότε δεν υπήρχαν αξιόπιστα προγράμματα δημιουργίας δευτεροταγών RNA δομών.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, το μοντέλο των Romanova et al. (1986) θα μπορούσε να τροποποιηθεί (Εικόνα 4.1). Αναλυτικότερα: αρχικά σχηματίζεται το ετεροδιμερές μεταξύ των δύο ανασυνδυαζόμενων μορίων, υπόθεση η οποία ενισχύεται και από τους Egger & Bienz (2002) οι οποίοι απέδειξαν ότι η αντιγραφή των πολιοϊών λαμβάνει χώρα σε μικτά σύμπλοκα, στα οποία μπορούν να αντιγράφονται γενώματα διαφορετικών οροτύπων πολιοϊών. Κατά τη δημιουργία του ετεροδιμερούς μεταξύ των ανασυνδυαζόμενων μορίων, οι περιοχές των δευτεροταγών δομών, που αποτελούνται από υψηλής πιθανότητας ζεύγη βάσεων και είναι όμοιες μεταξύ των συμβαλλόμενων μορίων, ζευγαρώνουν μεταξύ τους σταθερά και με υψηλή πιθανότητα ζευγαρώματος. Η 3D πολυμεράση ξεκινάει από το 3' άκρο τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου και είναι πιθανόν όταν φτάνει σε περιοχή του ετεροδιμερούς, η οποία έχει σχηματιστεί από το ζευγάρι των υψηλής πιθανότητας και παρόμοιας δευτεροταγούς διαμόρφωσης περιοχών των

ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων, το 3' άκρο του νεοσυντιθέμενου αρνητικής πολικότητας κλώνου να αποκολλάται σε κάποιο σημείο αυτών των περιοχών και στη συνέχεια να προσκολλάται στην αντίστοιχη περιοχή του δεύτερου RNA μορίου, που συμμετέχει στην δημιουργία του ετεροδιμερούς. Πιθανόν, σε αυτήν την πρόσδεση του 3' άκρου του νεοσυντιθέμενου αρνητικού κλώνου να βοηθάει και η δραστικότητα τσαπερόνης της 3AB (DeStefano & Titilope, 2006). Στη συνέχεια, η σύνθεση του αρνητικού κλώνου συνεχίζεται με καλούπι το δεύτερο, θετικής πολικότητας, μόριο RNA. Ένας πιθανός λόγος αποκόλλησης του 3' άκρου του νεοσυντιθέμενου αρνητικού κλώνου, ίσως να είναι η χαμηλή δραστικότητα της 3AB στο ξετόλιγμα ενεργειακά ευνοούμενων περιοχών του RNA ετεροδιμερούς (DeStefano & Titilope, 2006).



Εικόνα 4.1. Αρχικά σχηματίζεται το ετεροδιμερές μεταξύ των ανασυνδυαζόμενων μορίων. Στη συνέχεια η σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου διακόπτεται σε κάποιο σημείο του ενεργειακά ευνοούμενου ετεροδιμερούς. Ο νεοσυντιθέμενος αρνητικής πολικότητας κλώνος προσδένεται σε περιοχή υψηλής ομολογίας του δεύτερου μορίου που συμμετέχει στον ανασυνδυασμό.

Είναι άξιο προσοχής το γεγονός ότι στο *in vitro* μοντέλο τα μόνα στελέχη που προέκυψαν ήταν ανασυνδυασμένα στην 3D περιοχή του γενώματός τους και σε όλα ο ανασυνδυασμός που ανιχνεύθηκε ήταν τύπου Sabin 1/Sabin 2. Ο τύπος ανασυνδυασμού Sabin 1/Sabin 2 στη 3D περιοχή, είναι εξαιρετικά σπάνιος και υπάρχει μόνο μία αναφορά του συγκεκριμένου τύπου σε κλινικά στελέχη (Karakasiliotis et al., 2005). Είναι επίσης άξιο προσοχής το γεγονός ότι το στέλεχος V4 του *in vitro* μοντέλου παρουσιάζει τριπλό ανασυνδυασμό στην 3D περιοχή (Πίνακας 3.7), καθώς δεν έχει αναφερθεί ποτέ στο παρελθόν τριπλός ανασυνδυασμός στην 3D περιοχή κλινικών στελεχών. Πιθανόν τα αποτελέσματα του *in vitro* μοντέλου να οφείλονται στο γεγονός ότι στις κυτταροκαλλιέργειες είναι ευκολότερο να «επιβιώσουν» στελέχη, τα οποία αν βρίσκονταν στον οργανισμό του εμβολιασμένου δεν θα παρουσίαζαν υψηλή αρμοστικότητα και επομένως δεν θα ανιχνευόντουσαν. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από την εργασία των Egger & Bienz., 2002, στην οποία αναφέρεται η ανίχνευση στελέχους, το οποίο δημιουργήθηκε σε κυτταροκαλλιέργεια και έφερε ανασυνδυασμό Polio 1/Polio 2 στην καψιδιακή περιοχή. Παρόμοιος τύπου ανασυνδυασμού δεν έχει αναφερθεί σε κλινικά στελέχη.

ABSTRACT

POLIOVIRUS O.P.V STRAINS - CORRELATION BETWEEN RECOMBINATION AND RNA SECONDARY STRUCTURES

Evangelos V. Dedepsidis

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

In the first chapter, a study was conducted in order to identify recombination junctions and mutations in VP1 region of 15 poliovirus clinical isolates and assess their effects in virus fitness providing some insights into the patterns of natural evolution of polioviruses. In conclusion, some of the Sabin strains investigated in the present study displayed a different pattern of evolution in VP1 region. Non-synonymous mutations with a direct phenotypic impact to the virus fitness that will result in amino acid substitutions in structural elements of VP1 (N-Ags, canyon), and mutations associated with reversion to neurovirulence are selected, in spite of synonymous mutations with no phenotypic impact to the virus fitness. Thus, virus can replicate and evolve for a longer period of time in the host, escaping the host's immune response.

Full genomic sequencing of two isolates which present extraordinary interest, was conducted. Extensive genomic sequencing of the first strain, isolate 7/b/97, revealed 1.87% VP1 sequence divergence and a recombination event between a Sabin 1 strain and a strain belonging to the group HEV-C, in the 2A genomic region. The genomic features of isolate 7/b/97 may place this strain in the cVDPV category. The 1,87% divergence in VP1 revealed that isolate 7/b/97, was circulated in a region free from poliovirus for approximately 2 years. In the past, cVDPV strains were responsible for polio epidemics, due to their increased neurovirulence and their increased ability for transmission.

Full genomic sequencing of the second strain (K/2002) revealed a Sabin 3/Sabin 2 recombination junction in VP1 genomic region. Intertypic capsid recombination is a very rare event. In our study the age of isolate K/2002, was approximately 11 months, while the age of the patient was 4 months. This means that isolate K/2002 has been circulated in the community, posing questions about the safety of OPV live vaccine.

In order to determine the correlation between the increased frequency of appearance of recombination junction of types Sabin 3/Sabin x (x: Sabin 2 or Sabin 1) and Sabin 2/Sabin x (x: Sabin 1 or Sabin 3) in 2C and 3D regions respectively, we constructed the secondary structure models of positive and negative strand of Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3 strains. Recombination junctions which identified in clinical strains of this study, as well as in clinical strains of previous studies, were superimposed on RNA secondary structure models of 2C and 3D regions. Furthermore an in vitro model for the production of recombinant Sabin strains was created. We aimed to the comparison between the results which refer to the correlation of recombination junctions and RNA secondary structures in clinical strains, with the respective results of the in vitro model.

In conclusion, in vitro model results are in consensus with the results which ensued from the superimposition of recombination junctions of clinical strains on RNA secondary structures. The majority of recombination junctions are correlated with RNA secondary structure elements, which are identical between Sabin strains that participate in the recombination, and also are consisted of base pairs with high probabilities. Furthermore, many of these elements are also included in the minimum free energy structure. As a result, the positive prognostic value of the RNA secondary structure elements where recombination junctions are located, is very high. Finally, we can deduce that the distribution of recombination junctions in Sabin strains is not accidental, and is correlated with RNA secondary structure elements identical to both recombination partners.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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
- Arnold, J. J., D. W. Gohara, and C. E. Cameron.** 2004. Poliovirus RNA-Dependent RNA polymerase (3Dpol): Pre-Steady-State Kinetic Analysis of Ribonucleotide Incorporation in the Presence of Mn²⁺. *Biochemistry* **43**: 5138-5148
- 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., S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 1991. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* **184**: 645-54
- 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
- Bellmunt, A., G. May, R. Zell, P. Pring-Akerblom, W. Verhagen, and A. Heim.** 1999. Evolution of poliovirus type 1 during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *Virology* **265**:178-184.
- Belnap, D. M., B. M. McDermott, D. J. Filman, N. Cheng, B. L. Trus, H. J. Zuccola, V. R. Racaniello, J. M. Hogle, and A. C. Steven.** 2000. Three dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:73-78.
- 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
- Blomqvist, S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi.** 2003. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccine and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* **84**: 573-580.
- Blomqvist, S., A. Skytta, M. Roivainen, and T. Hovi.** 1999. Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2813-2816.
- 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. Racianello.** 1995. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J. Virol.* **69**:4972-4978.
- Brown, B., M. S. Oberste, K. Maher, and M. 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.
- 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., S. Guillot, A. Candrea, F. Delpyroux, and R. Crainic.** 2001. Molecular strategy of 'serotyping' of human enterovirus. *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. Methods* **53**:25-36.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2006. Update on vaccine derived polioviruses. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **55**:1093-1097.
- Cherkasova, E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol.** 2002. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* **76**:6791-6799.
- Chow, M., J.F. Newman, and D. Filman.** 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* **327**:482-486.
- Colston, E. M., and V. R. Racianello.** 1994. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* **13**:5855-5862.
- 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, N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, and R. Crainic.** 2001. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines. *J Virol* **75**: 5740-5751.
- Dedepsidis, E., I. Karakasiliotis, E. Paximadi, Z. Kyriakopoulou, D. Komiotis, and P. Markoulatos.** 2006. Detection of unusual mutation within the VP1 region of different reisolates of poliovirus Sabin vaccine. *Virus Genes* **33**:183-191.
- Dedepsidis, E., I. Karakasiliotis, E. Paximadi, Z. Kyriakopoulou, D. Komiotis, and P. Markoulatos.** 2006. Detection of unusual mutation within the VP1 region of different reisolates of poliovirus Sabin vaccine. *Virus Genes* **33**:183-191.
- Dedepsidis, E., V. Pliaka, Z. Kyriakopoulou, C. Brakoulis, S. Levidiotou-Stefanou, A. Pratti, Z. Mamuris, and P. Markoulatos.** 2008. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin3/Sabin2 capsid recombinant. *FEMS* **52**:342-351
- Dedepsidis, E., Z. Kyriakopoulou, V. Pliaka, C. Kottaridi, E. Bolanaki, S. Levidiotou-Stefanou, D. Komiotis, and P. Markoulatos.** 2007. Retrospective Characterization of a Vaccine-Derived Poliovirus Type 1 Isolate from Sewage in Greece. *Appl. Envir. Microbiol.* **73**: 6697-6704
- DeStefano, J. J., and O. Titilope.** 2006. Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities. *J. Virol.* **80**: 1662-1671
- 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.
- Egger, D., and K. Bienz.** 2002. Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J. Virol.* **76**: 10960-10971.
- Egger, D., R. Gosert, and K. Bienz.** 2002. Role of cellular structures in viral RNA replication, in *Molecular Biology of PicornaViruses* (Semler, B. L., and Wimmer, E., Eds.) pp 20036-22904, ASM Press, Washington, DC.
- Enders, J. F., T. H. Weller, and F. C. Robbins.** 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis in cultures of various human embryonic tissues. *Science* **109**: 85-87.

- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, and J. Maniloff.** 2005. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- 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., R. Syed, M. Chow, A. J. Macadam, and J. M. Hogle.** 1989. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* **8**: 1567-1579
- Fricks, C. E., and J. M. Hogle.** 1990. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino-terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* **64**:1934-1945
- Gamarnik, A. V, and R. Andino.** 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **12**:2293-2304.
- Gavrilin, G. V., E. A. Cherkasova, G. Y. Lipskaya, O. M. Kew, and V. I. Agol.** 2000. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.* **74**:7381-7390.
- Georgescu, M. M., J. Balanant, A. Macadam, D. Otelea, M. Combiescu, A. A. Combiescu, R. Crainic, and F. Delpeyroux.** 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 of vaccine and wild type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J Clin Microbiol* **141**:1047-54.
- Gmyl, A.P., E.V. Belousov, S.V. Maslova, E.V. Khitrina, A.B. Chetverin, and V.I. Agol.** 1999. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* **73**: 8958-8965.
- Grant, R. A., C. N. Hiremath, D. J. Filman, R. Syed, K. Andries, and J. M. Hogle.** 1994. Structures of poliovirus complexes with anti-viral drugs: implications for viral stability and drug design. *Curr.Biol.***4**:784-97
- 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**:8434-8443.
- 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., G. Bernhardt, H. H. Lu, J. Y. Sgro, and E. Wimmer.** 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.
- 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.
- Hofacker, I. L.** 2003. Vienna RNA secondary structure server. *Nucl. Acids Res.* **31**: 3429-3431.

- 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.
- Jacjson, R. J., and A. Kaminski.** 1995. Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 1:985-1000
- 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
- Jurgens, C. K., D. J. Barton, N. Sharma, B. J. Morasco, S. A. Ogram, J. B. Flanagan.** 2006. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA *Virology* 345:346 – 357
- Karakasiliotis, I., E. Paximadi, and P. Markoulatos.** 2005. Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol* 86: 3137–3142.
- Karakasiliotis, I., P. Markoulatos, and T. Katsorchis.** 2004. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes* 18: 103–109.
- Kentaro, F., S. S. Krishnakumar, D. Franco, A. V. Paul, E. London, and E. Wimmer.** 2007. Membrane Topography of the Hydrophobic Anchor Sequence of Poliovirus 3A and 3AB Proteins and the Functional Effect of 3A/3AB Membrane Association upon RNA Replication. *Biochemistry.* 46:5185-5199
- Kew, O. M., R. W. Sutter, B. K. Nottay, M. J. McDonough, D. R. Prevots, L. Quick, and M. A. Pallansch.** 1998. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2893–2899.
- 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.
- 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.
- Kew, O. M., V. M. Glasgow, M. Landaverde, C. Burns, J. Shaw, Z. Garib, J. Andre, E. Blackman, C. J. Freeman, J. Jorba, R. Sutter, G. Tambini, L. Venczel, C. Pedreira, F. Laender, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Mijamura, H. van der Avoort, M. S. Oberste, D. Kilpatrick, S. Cochi, M. Pallansch, and C. de Quadros.** 2002. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 296:356–359.
- King A.M.Q.** 1988. Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: an analysis of 40 intertypic cross-over sequences. *Nucleic Acids Research* 16:11705-11723
- 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.** 2000. Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, New York.
- Kirkegaard, K. & Baltimore, D.** 1986. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47: 433-443.
- Kirkegaard, K.** 1990. Mutations in VP1 of poliovirus specifically affect both encapsidation and release of viral RNA. *J Virol* 64: 195-206.
- Knipe, D. M., and P. M. Howley.** 2007 *Fields Virology*, 5th Edition, Vol:1, Copyright: Lippincott Williams & Wilkins.

- 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
- 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. *J. Virol.* **24**:1779-1790
- Li, W. H., C. I. Wu, and C. C. Luo.** 1985. A new method of estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* **2**: 150-174.
- Liang, X., Y. Zhang, W. Xu, N. Wen, S. Zuo, L. A. Lee, and J. Yu.** 2006. An outbreak of poliomyelitis caused by type-1 vaccine-derived poliovirus in China. *J. Infect. Dis.* **194**:545-551.
- Liao, S., and V. Racianello.** 1997. Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants target mutant cell receptors. *J. Virol.* **71**:9770-9777.
- Liu, H. M., D. P. Zheng, L. B. Zhang, M. S. Oberste, O. M. Kew, and M. A. Palansch.** 2003. Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant poliovirus in China. *J. Virol.* **77**:10994-11005.
- Lyle, J. M., E. Bullitt, K. Bienz, and K. Kirkegaard.** 2002. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**:2218-2222.
- Lyle, J., A. Clewell, K. Richmond, O. Richards, D. Hope, and S. Schultz.** 2002. Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* **277**:16324-31.
- 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**:10696-10708
- Macadam, A. J., G. Ferguson, C. Arnold, and P. D. Minor.** 1991. An assembly defect as a result of an attenuating mutation in the capsid proteins of poliovirus type 3 vaccine strain. *J. Virol.* **65**:5225-5231.
- Macadam, A. J., S. R. Pollard, G. Ferguson, R. Skuce, D. Wood, J. W. Almond, and P. D. Minor.** 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
- 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, 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**: 10921-10928.
- Martin, J., G. Dunn, R. Hull, V. Patel, and P. D. Minor.** 2000. Evolution of the sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. *J Virol* **74**: 3001-3010.
- Martin, J., K. Odoom, G. Tuite, G. Dunn, N. Hopewell, G. Cooper, C. Fitzharris, K. Butler, W. W. Hall, and P. D. Minor.** 2004. Long-term excretion of vaccine-derived poliovirus by a healthy child. *J. Virol.* **78**:13839-13847.
- Mathews, D. H.** 2004. Using an RNA secondary structure partition function to determine confidence in base pairs predicted by free energy minimization. *RNA* **10**: 1178-1190

- McCaskill, J. S.** 1990. The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers* **29**: 1105-1119
- Minor, P. D.** 1990. Antigenic structure of picornavirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **161**:124-154.
- 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
- Mulders, M. N., G. Y. Lipskaya, H. G. van der Avoort, M. P. Koopmans, O. M. Kew, and A. M. van Loom.** 1995. Molecular epidemiology of wild poliovirus 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J. Infect. Dis.* **171**:1399-1405.
- Mulders, M. N., J. H. J. Reimerink, M. Stevnik, I. Alaeddinoglou, H. G. A. M. van der Avoort, T. Hovi, and M. P. G. Koopmans.** 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.
- Murray K.E., and D.J. Barton.** 2003. Poliovirus CRE- Dependent VPg Uridylylation Is Required for Positive-Strand RNA Syntesis but Not for Negative -Strand RNA Synthesis. *J.Virol.***77**:4739-4750.
- Oberste, M. S., K. Maher, M. R. Flemister, G. Marchetti, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch.** 2000. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* **38**:1170-4
- Paul, A. V., E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom, and E. Wimmer.** 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.
- Paximadi, E., I. Karakasiliotis, D. Papaventsis, G. Papageorgiou, and P. Markoulatos.** 2007a. Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and Cyprus. *J. Appl. Microb.* **104**:1153-1162
- Paximadi, E., I. Karakasiliotis, E. Bolanaki, A. Krikelis, and P. Markoulatos.** 2007b. Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* **35**:541-548
- Paximadi, E., I. Karakasiliotis, Z. Mamuris, C. Stathopoulos, V. Krikelis, and P. Markoulatos.** 2006. Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* **32**: 203-210.
- 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
- Pfister T., E. Wimmer, and C. Mirzayan.** 1999. *Molecular Biology of poliovirus.* Academic Press Encyclopedia of Virology **2e**.
- Pilipenco, E.V., A.P. Gmyl, and V.I. Agol.** 1995. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* **23**: 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.
- Pilipenko, E. V., V. M. Blinov, L. I. Romanova, A. N. Sinyakov, S. V. Maslova, and V. I. Agol.** 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
- Prevot D., D. Decimo, C.H. Herbreteau, F. Roux, J. Garin, J. Luc Darlix, and T. Ohlmann.** 2003. Characterization of a novel RNA - binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Jour.* **22**: 1909-1921

- 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
- Romanova L. I., V. M. ,Blinov, E. A. Tolskaya, E. G. Viktorova, M. S. Kolesnikova, E. A. Guseva, and V. I. Agol.** 1986. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* **155**: 202-213
- Rousset, D., M. R. Andrianarivelo, R. Razafindratsimandresy, B. Randriamanalina, S. Guillot, J. Balanant, P. Maucle`re, and F. Delpeyroux.** 2003. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:885-887.
- Rust, R. C., L. Landmann, R. Gosert, B. L. Tang, W. Hong, H. P. Hauri, D. Eggr, 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.** 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
- 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. *JAMA* **173**:1521-26
- Sabin, A.B.,** 1956. Pathogenesis of poliomyelitis: reappraisal in light of new data. *Science* **123**: 1151-1157.
- 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.
- Sharma, R., S. Raychaudhuri, and A. Dasgupta.** 2004. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **320**:195-205.
- Shimizu, H., B. Thorley, F. J. Paladin, K. A. Brussen, V. Stambos, L. Yuen, A. Utama, Y. Tano, M. Arita, H. Yoshida, T. Yoneyama, A. Benegas, S. Roesel, M. Pallansch, O. Kew, and T. Miyamura.** 2004. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J. Virol.* **78**:13512-13521.
- 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
- 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.
- Strauss, D.M., L.W. Glustrom, 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
- Tatem, L. M., C. Weeks-Levy, A. Georgiou, S. J. Dimichelle, E. J. Gorgacz, V. R. Racaniello, F.R. Cano, and S. J. Mento.** 1992. A mutation present in the amino terminus of sabin 3 poliovirus VP1 protein is attenuating. *J Virol* **66**: 3194-3197.
- Teterina, N. L., A. E. Gorbalenya, D. Egger, K. Bienz, and E. Ehrenfeld.** 1997. Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J. Virol.* **71**:8962-8972.
- Teterina, N. L., E. Levenson, M. S. Rinaudo, D. Egger, K. Bienz, A. E. Gorbalenya, and E. Ehrenfeld.** 2006. Evidence for Functional Protein Interactions Required for Poliovirus RNA Replication. *J. Virol.***80**:5327-5337

- 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
- van Kuppeveld, F.J., J.G. Hoenderop, R.L. Smeets, P.H. Willems, H.B. Dijkman, J.M. Galama, and W.J. Melchers.**1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J* **16**: 3519-3532.
- 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
- 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 Res*. **95**:75-85.
- Wien, M. W., S. Curry, D. J. Filman, and J. M. Hogle.** 1997. Structural studies of poliovirus mutants that overcome receptor defects. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 666-674.
- Yakovenko, M. L., E. A. Cherkasova, G. V. Rezapkin, O. E. Ivanova, A. P. Ivanov, T. P. Eremeeva, O. Y. Baykova, K. M. Chumakov, and V. I. Agol.** 2006. Antigenic evolution of vaccine-derived polioviruses: changes in individual epitopes and relative stability of the overall immunological properties. *J. Virol.* **80**:2641-2653.
- Yang, C. F., T. Naguib, S. J. Yang, E. Nasr, J. Jorba, N. Ahmed, R. Campagoli, H. van der Avoort, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Mijamura, M. Pallansch, and O. M. Kew.** 2003. Circulation of endemic type 2 vaccinederived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J. Virol.* **77**:8366-8377.
- Zuker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* **31**: 3406-3415

