

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ-  
ΘΕΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ**

Ελένη Δ. Παξιμάδη

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ  
2009

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ-  
ΘΕΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ

Ελένη Δ. Παξιμάδη

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΛΑΡΙΣΑ  
2009

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 9  
Συνολικός αριθμός σελίδων: 156  
Αριθμός πινάκων: 11  
Αριθμός σχημάτων: 35  
Αριθμός εικόνων: 8  
Αριθμός διαγραμμάτων : 1  
Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 249

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

### **Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ( ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ )**

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

### **Ν. ΚΑΤΗΣ**

Καθηγητής Ιολογίας Φυτών  
Γεωπονική Σχολή , Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

### **Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ**

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ**

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Α. ΖΙΦΑ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας)  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ζήση Μαμούρη και τον επίκουρο καθηγητή Κωνσταντίνο Σταθόπουλο οι οποίοι με τίμησαν συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αυτής της διατριβής. Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Νικόλαο Κατή και Δημήτριο Κουρέτα καθώς και τους επίκουρους καθηγητές Δημήτριο Κομιώτη και Α. Ζίφα για τη συμμετοχή τους στην επεμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Ελίνα Χορευτή που χάριν της βρέθηκα στο εργαστήριο Ιολογίας του Ινστιτούτου Pasteur και έτσι γνώρισα τον καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο ο οποίος με εμπιστεύτηκε για την διεκπεραίωση αυτής της διατριβής.

Ένα θερμό ευχαριστώ στην Ευγενία Μπολανάκι και τον Γιάννη Καρακασιώτη για την πολύτιμη βοήθειά και συνεργασία τους όλα τα χρόνια της διδακτορικής διατριβής καθώς και των Λένα Αφεντάκη και Χριστίνα Κοτταρίδη.

Ένα ειδικό ευχαριστώ στους άλλοτε προπτυχιακούς φοιτητές και νυν Διδάκτορες και υποψήφιους Διδάκτορες Βαγγέλη Δεδεψίδη και Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου αντίστοιχα, για την εμπειρία της διδασκαλίας και την ικανοποίηση της συνέχισης της ανάλυσης της παρούσας δουλειάς.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την καθοδήγηση και την επιστημονική επίβλεψη της παρούσας διατριβής, αλλά περισσότερο για το ενδιαφέρον του τη συμπαράσταση και την κατανόηση σε δύσκολες στιγμές.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη όλα αυτά τα χρόνια, μα περισσότερο τον άντρα μου για την εμπύχωση και το κουράγιο.

*Στον άντρα μου  
για το κουράγιο και την υπομονή του  
και στο μικρό μου Ελενάκι για το  
“νόημα”*

## Περίληψη

Στη παρούσα διατριβή αναλύονται ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊών τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα.

Αρχικά αναζητήθηκαν οι πιθανές θέσεις ανασυνδυασμών στο γένωμα των πολιοϊών καλύπτοντας την γενωμική περιοχή από τη 2C έως τη 3D με σκοπό τον εντοπισμό όλων των πιθανών σημείων ανασυνδυασμού.

Πέντε κλινικά στελέχη προερχόμενα από υγιείς εμβολιασμένους και ασθενείς με VAPP εξετάστηκαν για τον εντοπισμό θέσεων ανασυνδυασμού. Κατόπιν ανάλυσης RT-PCR, RFLP και αλληλούχισης, σε τρεις γενωμικές περιοχές (5'UTR, 2C και 3C-D) τα πέντε δείγματα εμφάνισαν θέσεις ανασυνδυασμού. Τα ανασυνδυασμένα δείγματα στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν από τη 2C έως τη 3'UTR. Τα στελέχη EP6 και EP12 παρουσίασαν τον τύπο ανασυνδυασμού S2/S1 στη 3D γενωμική περιοχή, ενώ τα στελέχη EP16 και EP23 τους τύπους S3/S2 και S3/S1 αντίστοιχα στη 2C περιοχή. Το στέλεχος EP9 βρέθηκε ανασυνδυασμένο στη 3A περιοχή ως S2/S1, γενωμική περιοχή όπου οι ανασυνδυασμοί σπανίζουν. Άξιο λόγου είναι το γεγονός πως οι θέσεις των ανασυνδυασμών στα στελέχη EP12 και EP16 είναι όμοιες με αυτές που βρέθηκαν σε προηγούμενη μελέτη. Επίσης παρατηρήθηκαν σημειακές μεταλλαγές στα ανασυνδυασμένα δείγματα EP6, EP9 και EP12.

Πέντε στελέχη Sabin εμφάνισαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ευρέθηκαν διπλά ανασυνδυασμένα. Ανάλυθηκαν και πάλι με RT-PCR, RFLP και αλληλούχιση. Τα πέντε δείγματα εμφάνισαν δύο θέσεις ανασυνδυασμού: η πρώτη στη 2C περιοχή και η δεύτερη στη 3D. Στα δείγματα EPA, EPB και EPC το 5' τμήμα του γονιδιώματος ήταν Sabin τύπου 3, το ενδιάμεσο Sabin τύπου 2 και το τμήμα 3' Sabin τύπου 3 (S3/S2/S3). Ο πρώτος ανασυνδυασμός και για τα τρία στελέχη βρισκόταν στη 2C περιοχή και ο δεύτερος ήταν επίσης και για τα τρία στελέχη στη 3C-D περιοχή.

Για τα στελέχη EDP11 και EDP12 το 5' τμήμα του γονιδιώματος ήταν Sabin τύπου 3, το ενδιάμεσο τμήμα τύπου 2 και το 3' τμήμα τύπου 1

(S3/S2/S1), τα μοτίβα και οι θέσεις των ανασυνδυασμών ήταν κοινά. Όσον αφορά το στέλεχος EDP11 αυτό παρουσίασε ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό, μία αλληλουχία 120 περίπου νουκλεοτιδίων η οποία φαίνεται να προκύπτει από μέλος της ομάδας των εντεροϊών C (CAV18 ή CAV21). Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό, καθώς το στέλεχος EDP11 απομονώθηκε από περιοχή που τη δεδομένη χρονική περίοδο, καμία επιδημία από ιούς Coxsackie A ή πολιοϊούς δε συνέβαινε.

Στελέχη πολιοϊών απομονώθηκαν επίσης από λύματα στη Μεταμόρφωση Αττικής, Μάιος- Οκτώβριος 1996 και στη Λεμεσό και Λευκωσία Μάιος -Δεκέμβριος 2003 για τον εντοπισμό ανασυνδυασμών. Τρία στελέχη πολιοϊών βρέθηκαν διπλά ανασυνδυασμένα (LK3, LK 6, LK 10) ως S3/S2/S1 στη 2C γενωμική περιοχή του ιού, με τη πρώτη θέση ανασυνδυασμού S3/S2 προς το 5' άκρο της 2C και τη δεύτερη θέση ανασυνδυασμού προς το 3' άκρο της 2C. Ο εντοπισμός τέτοιου τριμερούς ανασυνδυασμένου στελέχους εντός της 2C είναι σπάνιο γεγονός. Τα δείγματα ENP 5, ENP 6 και ENP8 βρέθηκαν με μονό ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 όπως και το στέλεχος ENP 7 με ανασυνδυασμό τύπου S2/S3. Οι θέσεις ανασυνδυασμού για τα στελέχη αυτά εντοπίστηκαν σε διαφορετικά σημεία της 3D γενωμικής περιοχής.

Το πολυανασυνδυασμένο στέλεχος I<sub>34</sub> (S2/S1/S2S1) απομονώθηκε από τα κόπρανα νεογέννητου πέντε μηνών, 20 περίπου ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το OPV με κλινική εικόνα χαλαρής παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Στο στέλεχος πολιοϊού που απομονώθηκε μετά από αλληλούχιση εντοπίστηκαν δυο θέσεις ανασυνδυασμού στη 3D γενωμική περιοχή. Η πρώτη θέση ανασυνδυασμού ως S1/S2 και η δεύτερη ως S2/S1. Ο τρίτος ανασυνδυασμός εντοπίστηκε μέσω αλληλούχισης ολόκληρου του 3' τμήματος του γενώματος και ήταν ως αναμενόταν, τύπου S2/S1. Επίσης μελετήθηκαν οι μεταλλαγές που ευρέθησαν και υπολογίστηκαν οι παράμετροι Ks, Ka και Kt για όλη την αλληλουχιμένη γενωμική περιοχή

Συμπερασματικά , σε αυτή τη διατριβή συγκεκριμένοι τύποι και θέσεις ανασυνδυασμών και σημειακών μεταλλαγών αναλύθηκαν όσον αφορά την εξέλιξη των πολιοϊών. Μελετήθηκαν επίσης οι συγκεκριμένες θέσεις και τα μοτίβα αλληλουχιών πολιοϊών τα οποία εμπλέκονται σε γεγονότα ανασυνδυασμού με άλλους εντεροϊούς μη-πολιοϊούς όπως ο ιός Coxsackie A και οι οποίοι μπορεί να συμμετέχουν σε ανασυνδυασμούς. Ο εντοπισμός εξελιγμένων κυκλοφορούντων εμβολιακών στελεχών (c VDPVs) είναι σημαντικός καθώς εμπλέκονται σε γεγονότα ανασυνδυασμού. Εισαγωγή τέτοιων στελεχών (c VDPVs) σε ένα πληθυσμό θέτει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία για αυτό επιβάλλεται η περιβαλλοντική παρακολούθηση της κυκλοφορίας των πολιοϊών.



**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ****ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	1
1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ PICORNA ΙΩΝ .....	4
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ 17 .....	
1.4 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	22
1.5 ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ -ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ .....	40
1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	45
1.7 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	48
1.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ .....	49
1.9 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ .....	57
1.10. ΝΕΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	66
1.11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	67

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ .....	68
2.2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	68
2.3. ΑΠΟΨΥΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	71
2.4. ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	71
2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD .....	72
2.6. ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ .....	73
2.7 . ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ 76 .....	
2.8 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	80
2.9 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης) .....	85

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

3.1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SABIN .....	94
3.2 ΔΙΠΛΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ SABIN ΕΜΒΟΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ .....	101
3.3 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ SABIN ΣΕ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΚΥΠΡΟ .....	108
3.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΝΟΣ ΠΟΛΥΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥ .....	114

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

4.1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SABIN .....	117
4.2 ΔΙΠΛΑ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ SABIN ΕΜΒΟΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ .....	120
4.3 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ SABIN ΣΕ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΚΥΠΡΟ .....	124
4.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΝΟΣ ΠΟΛΥΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥ .....	127
ABSTRACT.....	130
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	133

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών και κατατάσσονται στην οικογένεια *Picornaviridae*. Η οικογένεια *Picornaviridae* περιλαμβάνει μια ομάδα πολύ μικρών RNA ιών ( Pico στα Λατινικά , μικρός ) (Buxton and Fraser,1977). Οι Picorna ιοί είναι μεταξύ των πιο ποικιλόμορφων μικρών ιών (περισσότεροι από 230 ορότυποι) , οι οποίοι ευθύνονται για πολλές ανθρώπινες και ζωικές ασθένειες. Η πολυομυελίτιδα αναγνωρίστηκε ως ύκνη νόσος το 1909 από τους Landsteiner και Popper, παρότι ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1930.

#### 1.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι Picorna ιοί συχνά προκαλούν ρινοφαρυγγικές και γαστρεντερικές μολύνσεις. Οι ασθένειες χαρακτηρίζονται από τη μόλυνση συγκεκριμένων ιστών (τροπισμός) με καθορισμένα συμπτώματα . Οι περισσότεροι Picorna ιοί συνήθως δεν προκαλούν κλινικά συμπτώματα, αλλά ορισμένοι εξ αυτών μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), όπως παράλυση ή εγκεφαλίτιδα, βλάβες οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν ακόμη και τον θάνατο του ξενιστή (Rotbart and Kirkegaard,1992).

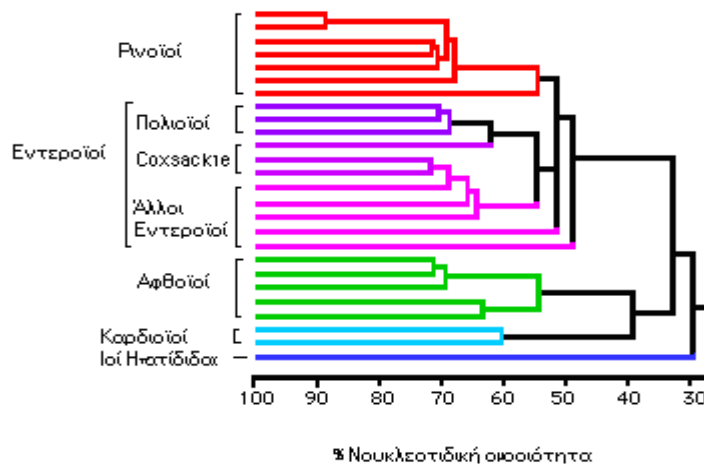
Με βάση τη διαφοροποίηση την οποία παρουσιάζουν, σχετικά με τα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά, τους ξενιστές και τα όργανα τα οποία προσβάλλουν , τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες ( ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός - pH) καθώς και την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, οι Picorna ιοί χωρίζονται σε εννέα γένη. Στους Αφθοϊούς ( *Apthoviruses* ) , που επονομάστηκαν έτσι από τις φλύκταινες που προκαλούν στα πόδια των ζώων, στους Καρδιοϊούς ( *Cardioviruses* ), οι οποίοι προκαλούν εγκεφαλομυοκαρδίτιδα κυρίως στα τρωκτικά, στους Εντεροϊούς ( *Enteroviruses* ), το πιο παθογόνο γένος για τον άνθρωπο με σημαντικότερους μεταξύ αυτών τους Πολιοϊούς, στους ιούς της Ηπατίτιδας Α ( *Hepatoviruses* ), στους (Ρινοϊούς) *Rhinoviruses*, οι οποίοι

ευθύνονται για το απλό κρυολόγημα , στους ιούς *Parechoviruses*, και *Kobuvirus*, οι οποίοι παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια καθώς και στους ιούς *Teschovirus* και *Erbovirus* οι οποίοι δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια παθογένεια σε ζωικούς οργανισμούς (King et al., 2000).

Οι εντεροϊοί που προσβάλουν τον άνθρωπο αρχικά χωρίστηκαν σε υποομάδες. Στους Πολιοϊούς , τους Coxsackie A και B ιούς τους Echo ιούς και κάποιους αταυτοποιητούς εντεροϊούς , τους εντεροϊούς 67-71 (Stanway,1990, Σχήμα 1.1 ).

Στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικών αντιορών, αυτά τα είδη χωρίστηκαν επιπρόσθετα σε 64 αντιγονικά διακριτούς οροτύπους (Πολιοϊοί 1-3, Coxsackie A ιοί 1-24, Coxsackie B ιοί 1-6 και Echo ιοί 1-33) (Melnick J.L., 1996).

Ωστόσο η ανωτέρω ταξινόμηση δεν ήταν ιδανική αφού για παράδειγμα με βάση τη παθολογία τους έχουν εντοπιστεί 23 coxsackie A ορότυποι (CAV) και 6 coxsackie B (CBV) ορότυποι , εκ των οποίων οι CAV-9 είναι γενετικά περισσότερο όμοιοι στους CBVs και echo ιούς παρά σε άλλους CAVs (Chang et al,1989; Royry et al, 1996). Επίσης οι Echo ιοί 22 και 23 κατόπιν ανάλυσης της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας διαχωρίστηκαν από το γένος των εντεροϊών και ταξινομήθηκαν εκ νέου ως νέο γένος, αυτό των parechovirus 1 και 2 αντίστοιχα (Joki-Korpela and Hyypria,2001).



**Σχήμα 1.1** Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των Picornaviridae βασισμένο στη νουκλεοτιδική ομοιότητα των μελών των διαφορετικών γενών. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα [www.vadscorner.com/outbreak.html](http://www.vadscorner.com/outbreak.html)

Με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών, η οροταυτοποίηση αντικαταστάθηκε από τη γενωμική ανάλυση ως μέσω ανίχνευσης και ταυτοποίησης-ταξινόμησης των εντεροϊών. Το 1999, η αναταξινόμηση των εντεροϊών με βάση την πρωτοταγή τους δομή (νουκλεοτιδική και αμινοξική) έγινε αποδεκτή από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses - ICTV).

Σύμφωνα με αυτή, το γένος των εντεροϊών χωρίστηκε σε 8 είδη (King et al., 2000). Από αυτά, τα πέντε (Poliovirus, και Human Enterovirus A - D) παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 γενωμικής περιοχής τους οι 65 ορότυποι, που αποτελούν το σύνολο των ανθρώπινων εντεροϊών, κατανέμονται στα είδη που προαναφέρθηκαν ως εξής. Το είδος A (HEVA) αποτελείται από τους Coxsackie ιούς A2-A8, A10, A12, A14, A16 και από τον εντεροϊό 71. Το είδος B (HEVB) περιλαμβάνει όλους τους Coxsackie B ιούς (CBV1-6), όλους τους Echo ιούς (E1-E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33), τον Coxsackie A9 και τους Εντεροϊούς 69 και 73 (EV69, EV73) (Oberste et al., 2001). Το είδος C (HEVC) αποτελείται αποκλειστικά από Coxsackie A ιούς και συγκεκριμένα από τους A1, A11, A13, A15, A17-22 και A24. Τέλος, το είδος D περιλαμβάνει τους πρόσφατα ταυτοποιημένους ιούς EV68 και EV70, ενώ το είδος των πολιοϊών περιλαμβάνει τους πολιοϊούς Polio 1,2,3.

Ο διαχωρισμός των πολιοϊών από τους εντεροϊούς του είδους C βασίζεται στην ικανότητά τους να προκαλούν πολιομυελίτιδα, αν και οι πολιοϊοί παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τους ιούς αυτού του είδους. Μάλιστα, μελέτες (Brown et al., 2003) προτείνουν να αναταξινομηθούν οι πολιοϊοί και να συμπεριληφθούν στο είδος C των εντεροϊών. Γενικότερα η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς αναβαθμίζεται εξαιτίας της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων (Enterovirus 74-75 - Oberste et al., 2004a και Enterovirus 77-78 - Norder et al., 2003), ενώ, ακόμη και σήμερα, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός στελεχών, τα οποία φέρουν τον τίτλο «αταυτοποίητα».

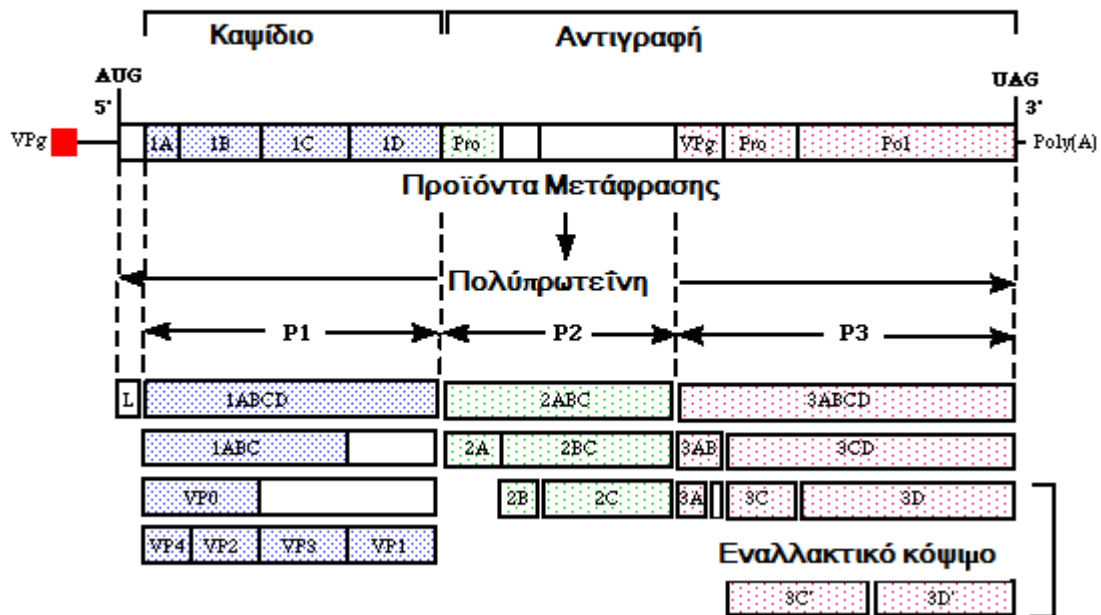
## 1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ PICORNA ΙΩΝ

Το γεγονός ότι οι ιοί picorna αποτελούνται από σχετικά μικρό γένωμα καθώς και το ότι είναι παθογόνοι για τους ανθρώπους και τα ζώα, αποτελούν κατάλληλο στόχο για την διερεύνηση τους ιδίως σε μοριακό επίπεδο (Rueckert,1996, Stanway,1990).

### 1.2.1 Δομή Γονιδιώματος

Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι Picorna ιοί είναι μικροί RNA ιοί θετικής πολικότητας ( 7,2kb), οι οποίοι περιβάλλονται από μη ελυτροφόρο καψίδιο (25 -35nm) εικοσαεδρικής συμμετρίας (Rueckert R.R., 1985). Μέχρι σήμερα έχει αναλυθεί κρυσταλλογραφικά η τρισδιάστατη οργάνωση 10 οροτύπων Picorna ιών, των PV1, PV3 (Hogle et al., 1985, Hogle et al., 1987), CBV3 (Muckelbauer et al., 1995), CAV9 (Hendry et al., 1999), BEV (bovine enterovirus - εντεροϊός των βοοειδών), Swine Vesicular Disease Virus (SVDV)-(Jimenez-Clavero et al, 2003; Lin et al., 2002), CAV21 (Xiao et al., 2005), FMDV (Foot-and-mouth disease virus) (Acharya et al., 1989) και Mengovirus παρέχοντας αντιπροσωπευτική εικόνα, όχι μόνο για τη δομή αλλά και τη βιολογία των εντεροϊών.

Το RNA των picorna ιών χωρίζεται σε τρία λειτουργικά τμήματα. Στο 5' άκρο τοποθετείται το πρώτο τμήμα της μη μεταφραζόμενης περιοχής (untranslated region , UTR) , το οποίο ποικίλλει από 600nt στους ρινοϊούς έως 1250nt στους αφθοϊούς .Ακολουθεί το δεύτερο τμήμα , η κωδική περιοχή ( ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης -open reading frame, ORF) η οποία κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη , και είναι μήκους έως 6000 νουκλεοτιδίων και τέλος η τρίτη περιοχή μήκους 50-100 νουκλεοτιδίων, η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (untranslated region , UTR). Οι άκρες του γενώματος είναι συνδεδεμένες η μεν 5' ομοιοπολικά με τη βασική πρωτεΐνη VPg (περίπου 23 αμινοξέων) ενώ η 3' με την ούρα πολυαδενοσίνης (poly A tail).



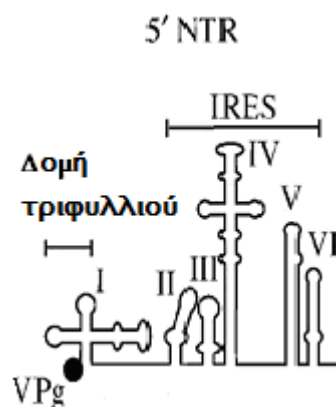
Σχήμα 1.2 Η δομή του γονιδιώματος των Picorna-ίων κατά τα στάδια της μετάφρασης.

### 1.2.2 Η 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR)

Η 5' αμετάφραστη περιοχή των Picorna-ίων είναι ασυνήθιστα μεγάλη σε σχέση με αντίστοιχες περιοχές πολλών κυτταρικών ή άλλων ιικών RNA γονιδιωμάτων, συνιστώντας το 8% - 12% του γενώματος. Μεταξύ στενά συγγενικών ιών, η 5' UTR αποτελεί, γενικά, το πιο ομόλογο τμήμα του γονιδιώματός τους και περιέχει ορισμένες ομάδες νουκλεοτιδίων, οι οποίες είναι μερικώς ή ακόμη και πλήρως συντηρημένες από είδος σε είδος. Οι συγκεκριμένες ομάδες νουκλεοτιδίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή των ιών. Μάλιστα συντηρημένες αλληλουχίες αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται σήμερα ως θέσεις υβριδοποίησης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την επίτευξη στόχων ανίχνευσης μεγάλου εύρους ιών της οικογένειας των Picorna-ίων (Gama et al., 1988, Hyypria et al., 1989, Siafakas et al., 2000, Torgersen et al., 1989).

Αποτελείται από δύο λειτουργικές περιοχές. Η μία είναι η δομή τριφυλλιού στο 5' άκρο της 5'UTR (Σχήμα 1.3 κατωτέρω) με εντυπωσιακά σταθερή την δομή στελέχους-θηλιάς I. (Andino R. et al., 1990).

Έτσι φάνηκε για πρώτη φορά η άμεση σχέση της δομής τριφυλλιού με την έναρξη της αντιγραφής του ιικού RNA. Η δομή αυτή ακολουθείται πάντα από μια poly(C) περιοχή η οποία αποτελεί θέση δέσμησης της πρωτεΐνης PCBP (Poly C Binding Protein) του ξενιστή και η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή (Gamarnik A., 2000). Η άλλη σημαντική περιοχή της 5'UTR, η οποία και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της, είναι η περιοχή του Internal Ribosome Entry Site (IRES) και είναι απαραίτητη για την έναρξη της μετάφρασης του RNA. Η παρουσία της είναι κοινή σε όλους τους εντεροϊούς και αποτελεί τρόπο cap-ανεξάρτητης δέσμησης του RNA στα ριβοσώματα και έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Pelletier, 1988). Για τη διαμόρφωση της λειτουργικής δομής του IRES απαραίτητες είναι οι περιοχές II, IV, V και ένα μέρος της VI (Σχήμα 1.3). Η λειτουργία και οι σχέσεις του IRES με τους κυτταρικούς παράγοντες έναρξης της μεταγραφής θα αναλυθούν στον κύκλο ζωής του ιού. Ένα σημαντικό στοιχείο που σχετίζεται με την 5'UTR είναι η σύνδεση του 5' ελεύθερου άκρου της με μια μικρή ιϊκής προέλευσης πρωτεΐνη (23a.a.), της VPg, η οποία και συνδέεται ομοιοπολικά μέσω ενός καταλοίπου τυροσίνης με το 5' P του RNA.



Σχήμα 1.3 Η δευτεροταγής δομή της 5'UTR στην οποία φαίνονται όλες οι λειτουργικές cis-acting περιοχές της και η σύνδεση του 5' άκρου της με τη VPg, (Σχήμα από De Jesus, *Virology Journal*, 2007 4:70).

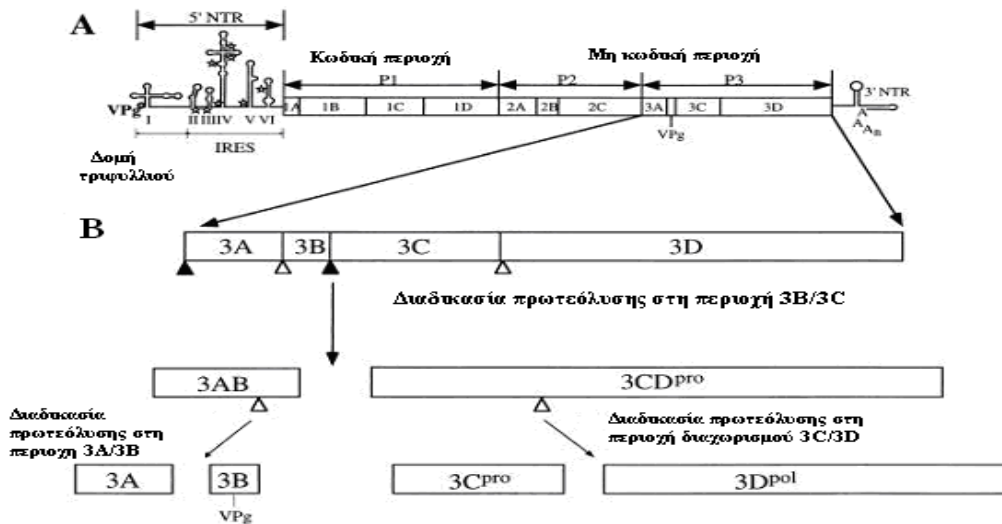
### 1.2.3 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η κωδική περιοχή αποτελεί ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη η οποία χωρίζεται σε 3 περιοχές . Την P1 η οποία περιέχει τα καψιδικά πολυπεπίδια VP 4,2,3 και 1 και τα πρόδρομα μόρια τους , την P2 η οποία αποτελεί τις μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C και τέλος την P3 η οποία κωδικοποιεί για τα μη δομικά πολυπεπίδια 3A, 3B, 3C και 3D (Σχήμα 1.4 A).

#### *Η Πολυπρωτεΐνη*

Η πολυπρωτεΐνη τέμνεται αυτοκαταλυτικά στα επιμέρους τμήματα P1, P2 και P3. Η τομή γίνεται με τη βοήθεια των ικών πρωτεασών (2A και 3C) το ενεργό κέντρο των οποίων είναι λειτουργικό στην πολυπρωτεΐνη αλλά και σε όλα τα παραγόμενα πολυπεπίδια. Το ενεργό κέντρο της 2A καταλύει την τομή στο N-άκρο της χωρίζοντας την P1 από την P2 περιοχή. Η 3C τέμνει και αυτή στο N-άκρο της την πολυπρωτεΐνη, χωρίζοντας την P2 από την P3. Στη συνέχεια των αυτοκαταλυτικών τομών η P1 διασπάται σε VP0,VP3 και VP1 από την 3C, η P2 σε 2A και 2BC από την 3C και η P3 σε 3AB και 3C πάλι από την 3C. Σε επόμενο στάδιο χωρίζονται με τη βοήθεια της 3C, η 2B από την 2C και η 3C από την 3D. Άλλη μια τομή της 3C οδηγεί στη δημιουργία της VPg (ή 3B) από την 3AB. Μια εναλλακτική θέση κοπής βρίσκεται στην 3CD η οποία μπορεί να κοπεί και από την 2A δίνοντας δύο εναλλακτικά μόρια, τα 3C' και 3D'. (Σχήμα 1.4B)

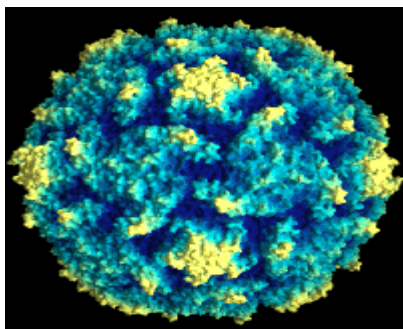




Σχήμα 1.4 Α. Δομή του γενώματος των Picorna-ίων . Β. Πρωτεόλυση της P3 γενωμικής περιοχής.

### P1 -Η δομή του καψιδίου

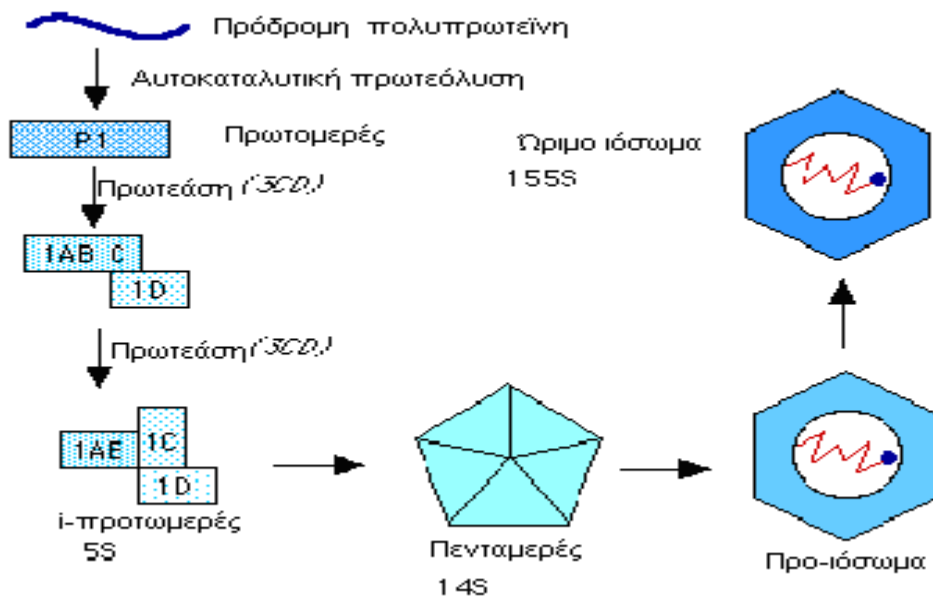
Οι πρωτεΐνες της P1 περιοχής αποτελούν τις πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού. Η δομή των πολιοϊών έχει μελετηθεί με τη βοήθεια κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Έτσι έχουν δημιουργηθεί τρισδιάστατες απεικονήσεις (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Κρυσταλλογραφική δομή πολιοϊού τύπου 1 Mahoney.

Η δομή του καψιδίου είναι η ίδια για όλα τα μέλη της οικογένειας των Picornaviridae. Το καψίδιο τους συνίσταται από 60 αντίγραφα των 4 πρωτεϊνών (VP1-VP4) (Rueckert R.R., 1985).

Η βασική δομική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι τα πρωτομερή τα οποία αποτελούνται από αντίγραφα των δομικών πρωτεϊνών και οργανώνονται σε πενταμερή, Σχήμα 1.5.



Σχήμα 1.5 Σχηματισμός πενταμερούς.

Κατά τον σχηματισμό του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται για να σχηματίσουν το εικοσαεδρικό καψίδιο πενταμερούς συμμετρίας, το οποίο σταθεροποιείται, καθώς ταυτόχρονα πραγματοποιείται η πρωτεόλυση της VP0 (στις VP2 και VP4) και ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού στο νεοσχηματιζόμενο ιϊκό σωματίο. Η διάσπαση της VP0 δεν παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις, μιας και στο ώριμο καψίδιο παραμένουν αδιάσπαστα ένα με δύο αντίγραφα αυτής, με την λειτουργική σημασία αυτού του φαινομένου να μην είναι ακόμη γνωστή. Οι VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η VP4 στο εσωτερικό. Το κάθε πενταμερές φαίνεται να σταθεροποιείται από ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρβοξυτελικού και αμινοτελικού άκρου των VP1, VP2 και VP3 με την VP4 (Stanway G., 1990). Γειτονικά πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των τμημάτων των VP2 και VP3, κάτι που είναι ίσως σημαντικό για την αποδιάταξη του καψιδίου κατά την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα. Αλλαγή ενός αμινοξέος στη σύνδεση αυτή οδηγεί στο θερμοευαίσθητο φαινότυπο που παρουσιάζει ο εμβολιακός τύπος του πολιοϊού τύπου 3 (Westrop G. D., 1989). Οι καψιδιακές πρωτεΐνες δεν είναι γλυκοσυλιωμένες αλλά η VP4 είναι μυριστυλιωμένη στην N-τελική

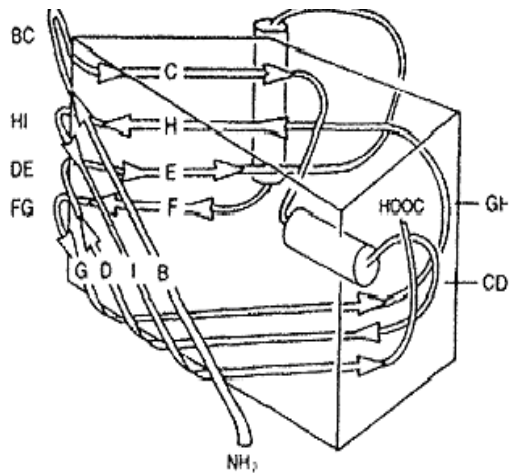
γλυκίνη . Το μυριστικό οξύ πιστεύεται ότι σταθεροποιεί τη σύνδεση μεταξύ VP4 και VP3.

Στην τρισδιάστατη δομή των *ricorna* ιών παρουσιάζεται μια μεγάλη αυλάκωση (canyon) με βάθος 1,2nm και πλάτος 1,5nm η οποία αποτελεί την θέση δέσμευσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα. Στο βάθος αυτής της αυλάκωσης στη VP1 υπάρχει μια υδρόφοβη θήκη (cavity or pocket), η οποία σχετίζεται επίσης με την προσκόλληση στον υποδοχέα (Smith et al., 1986), ενώ ταυτόχρονα άλλες μελέτες (Filman et al., 1989) προτείνουν την συμμετοχή της ανωτέρω θήκης στη ρύθμιση των δομικών αλλαγών του καψιδίου κατά την απελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Επίσης οι θέσεις αυτές αποτελούν στόχο φαρμάκων που εμποδίζουν την πρόσδεση του υποδοχέα . Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της δομής είναι η αδυναμία των αντισωμάτων να φτάσουν σε αυτή την τόσο λειτουργική περιοχή του καψιδίου. Η φύση και η χωροδιάταξη των αμινοξέων που βρίσκονται μέσα στην αυλάκωση είναι αρκετά συντηρημένη τόσο ανάμεσα στους πολιοιούς όσο και μεταξύ των άλλων *ricorna* ιών, κυρίως λόγω της έλλειψης ανοσολογικής πίεσης στις περιοχές αυτές (Stanway G., 1990).

Γύρω από την αυλάκωση, τα τμήματα της επιφάνειας του καψιδίου, τα οποία προεξέχουν και δεν έχουν κάποια προφανή λειτουργική σημασία, εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβλητότητα, ως προς την πρωτοταγή και συνεπώς ως προς την τριτοταγή τους οργάνωση (Stanway G., 1990).

Οι ορότυποι των πολιοιών είναι μόνο τρεις. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί δομικά. Οι δομές των VP1, VP2 και VP3, που είναι οι εκτεθειμένες ανοσολογικά πρωτεΐνες, έχουν αναλυθεί. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από οκτώ κλώνους αντιπαράλληλων β-

πτυχωτών επιφανειών, μια χαρακτηριστική δομή στους εικοσαεδρικής δομής RNA ιούς (Σχήμα 1.6)



Σχήμα 1.6 Η τριτογενής δομή των καψιδιακών πρωτεϊνών των πολιοϊών (VP1, VP2, VP3) (Encyclopedia of Virology, 1999)

Οι πιο φωτεινές επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους με αλληλουχίες  $\alpha$ -έλικας οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για καθεμιά από τις καψιδιακές πρωτεΐνες και συμμετέχουν στην δημιουργία των επιτόπων. Αυτοί οι επιτόποι είναι τα βασικά στοιχεία των «αντιγονικών θέσεων» (N-Ags) εξουδετέρωσης των πολιοϊών. Οι κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) είναι τέσσερις (N-Ag I, II, IIIA, IIIB) και οι συνδυασμοί με τους οποίους απαντώνται στους ορότυπους είναι τρεις. Κατά συνέπεια ορολογικά οι πολιοϊοί χωρίζονται σε τρεις ομάδες.

## P2- Οι Πρωτεΐνες

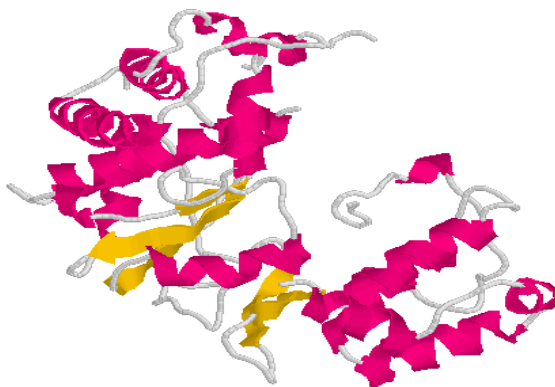
Οι πρωτεΐνες της P2 περιοχής συμμετέχουν κυρίως στην αντιγραφή του ιικού RNA, ως τμήματα του συμπλόκου αντιγραφής. Εξαίρεση αποτελεί η 2A πρωτεΐνη η οποία είναι μια από τις δύο πρωτεάσες του ιού όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Ωστόσο εκτός από τις τομές που προκαλεί στην πολυπρωτεΐνη, έχει σαν υπόστρωμα και πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή και μεταξύ αυτών προκαλεί την διάσπαση του eIF-4G, ο οποίος εμπλέκεται στην «cap-εξαρτώμενη» μετάφραση του κυττάρου ξενιστή. Έτσι η 2A οδηγεί στο λεγόμενο “shutoff” (διακοπή) της κυτταρικής μετάφρασης ενώ η μετάφραση της ιικής πολυπρωτεΐνης δεν επηρεάζεται αφού χρησιμοποιεί το IRES της 5’UTR για να δεσμευτεί στα ριβοσώματα.

**Η πρωτεΐνη 2B** είναι μια πρωτεΐνη ενσωμάτωσης στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Είναι κατά βάση υδρόφοβη, με την ιδιότητα αυτή να εντοπίζεται κυρίως σε δύο περιοχές. Η πρώτη περιοχή έχει μήκος μεταξύ 32-55aa και είναι μερικώς αμφιπαθική ως μια κατιονική α-έλικα. Η δεύτερη έχει μήκος μεταξύ 61-81aa και μπορεί να είναι και διαμεμβρανική. Η 2B σχηματίζει ομο-τετραμερή φτιάχνοντας υδατικούς πόρους διαμέτρου 5- 10 Å *in vitro* σε ανιονικές διπλοστιβάδες (Agirre A., 2002). Αυτή είναι ίσως ο παράγοντας που τροποποιεί την διαπερατότητα των μεμβρανών του κυττάρου και οδηγεί σε αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης των ιόντων Ca<sup>2+</sup> με τη μεταφορά τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

**Η πρωτεΐνη 2C** μήκους 329 αμινοξέων είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στους *picorna* ιούς. Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης από τον ιό η πρωτεΐνη 2C και η πρόδρομή της 2B βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο στη συνέχεια μεταναστεύουν στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου όπου και προωθούν την ανάπτυξη κυστιδίων μέσα στα οποία θα δημιουργηθεί το σύμπλοκο αντιγραφής του ιικού RNA (Bienz K. et al., 1994). Πολλές μεταλλαγές στην 2C περιοχή αποβαίνουν θανάσιμες για τον ιό (Wimmer E. et al., 1993). Μη θανάσιμες μεταλλαγές οι οποίες οδηγούν σε προβληματική αντιγραφή του ιού έχουν παρατηρηθεί, όπως μεταλλαγές που προκαλούν θερμοευαίσθητη αντιγραφή και φαινότυπο “μικρής πλάκας” όταν ο ιός

μολώνει “in vitro” μία ευαίσθητη κυτταρική σειρά (Li J. P. and Baltimore D.,1988). Η 2C πρωτεΐνη φαίνεται να χρειάζεται μόνο για την έναρξη της αντιγραφής του RNA αλλά όχι για την επιμήκυνση του (Barton and Flanagan, 1997).

Μελέτες προτείνουν, ότι η 2C, διαθέτει μερικά από τα μοτίβα, που εντοπίζονται στην υπεροικογένεια των ελικασών (Gorbalenya et al., 1989a, Gorbalenya et al., 1989b). Οι ελικάσεις, είναι πρωτεΐνες που προωθούν το ξεδίπλωμα δίκλωνων DNA, δίκλωνων RNA και RNA-DNA δομών, διευκολύνοντας την αντιγραφή τους. Είναι πιθανό, ότι η δραστικότητα ελικάσης της 2C είναι σημαντική κατά τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών. Μια περιοχή πολύ συντηρημένη στο καρβοξυτελικό άκρο της 2C έχει ένα μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνη σημαντικό για την αντιγραφή του ιού (Pfister et al.,2000). Για το ρόλο της 2C έχει επίσης περιγραφεί η δέσμευσή της (ακόμα και ως 2BC) στην 3’ τρίφυλλη δομή του αρνητικής πολικότητας RNA αλλά και η παρουσία μιας μεμβρανοσυνδεδεμένης περιοχής στο μόριο που ίσως βοηθά την προσαρμογή αυτού στα κυστίδια αντιγραφής. Έτσι μπορεί με τη δέσμευση του (-)RNA στα κυστίδια να ακινητοποιεί την 3’ τρίφυλλη δομή του επιτρέποντας την μεταφορά της πολυμεράσης του ιού από την 5’ τρίφυλλη δομή με την οποία είναι συνδεδεμένη κατά την σύνθεση του (-)RNA (Banerjee R. et al.,2001)



Σχήμα 1.7 Δευτεροταγής δομή της RNA πολυμεράσης των πολιοϊών.

### Οι Πρωτεΐνες P3

Βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν εντοπίσει αρκετές λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών και των προδρόμων τους, οι οποίες παρατίθενται στον Πίνακα 1.1.

3A	Πρόσδεση σε μεμβράνη Υπόστρωμα γλυκοζυλίωσης Μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης Αναστολή εκκριτικής οδού ξενιστή	3C	Πρωτεολυτικές τομές ικόν πρωτεϊνών Πρωτεολυτικές τομές πρωτεϊνών ξενιστή Ασθενές RNP σύμπλοκο με τη 5' δομή τριφυλλιού του RNA και την 3AB
3B/Vpg	Ασθενής διέγερση της 3D Ασθενής διέγερση της αυτοτομής της 3CD Έναρξη της αντιγραφής του RNA	3D	Ουριδύλιωση της VPg RNA πολυμεράση Τελική αδενυλοτρανσφεράση Ως πολυμερές ζετυλίγει το δίκλωνο RNA Πρόσδεση στο RNA Σύμπλοκο RNP με 3'UTR και με την 3AB Σύνδεση στην 3AB Αλληλεπίδραση με την ξενιστική Sam68
3AB	Πρόσδεση σε μεμβράνη Υπόστρωμα γλυκοζυλίωσης Ισχυρή διέγερση της 3D Ισχυρή διέγερση αυτοτομής της 3CD Μη ειδική πρόσδεση στο RNA Απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA	3CD	Πρωτεολυτικές τομές ικόν πρωτεϊνών Σύνδεση στην 3AB Ισχυρό σύμπλοκο RNP με τη 5' δομή τριφυλλιού και την 3AB

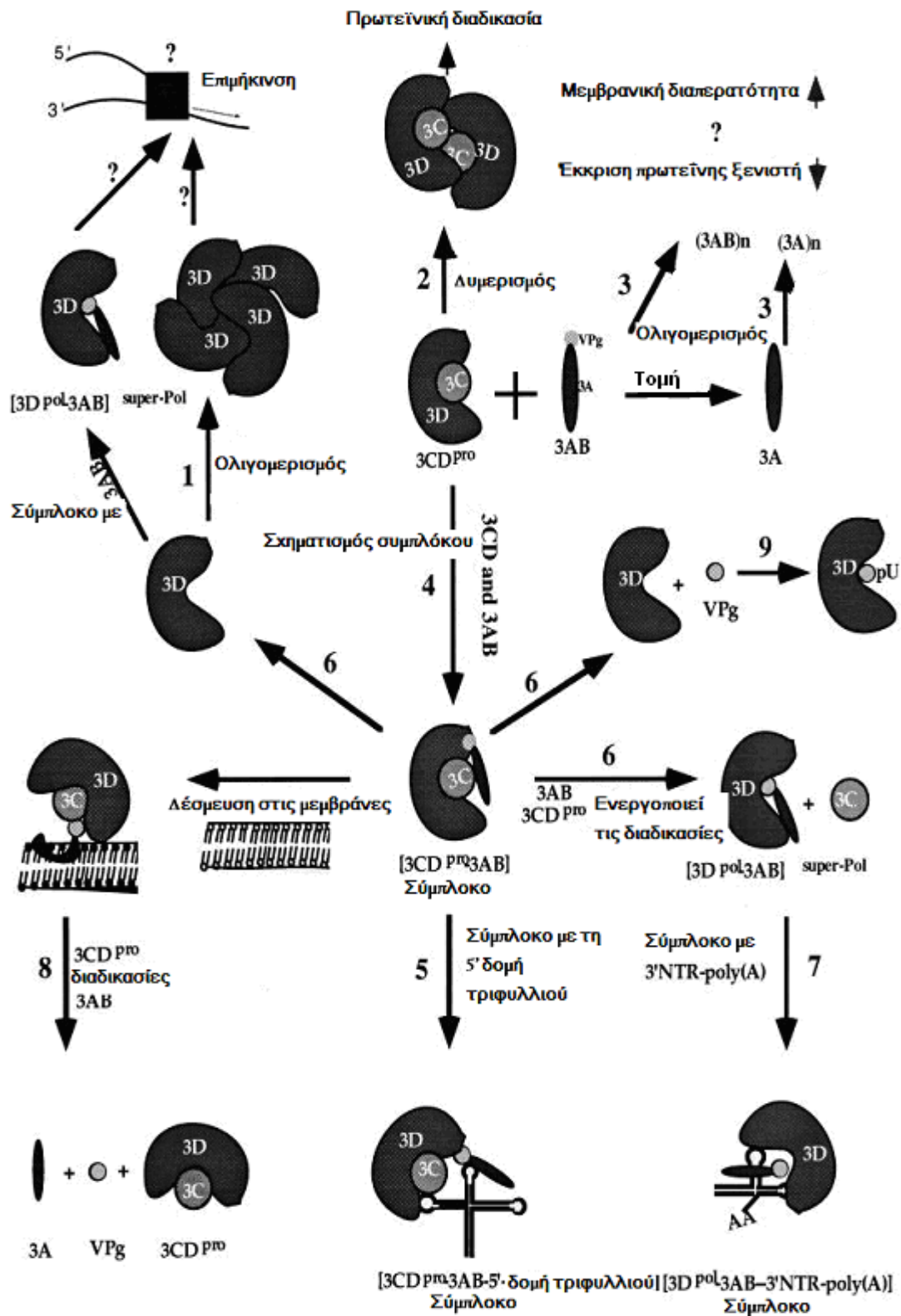
Πίνακας 1.1 Οι λειτουργίες των P3 πρωτεϊνών (Xiang W. et al., 1998).

Ο Xiang W. και οι συνεργάτες του (Xiang W. et al., 1998), απέδειξαν την άμεση σύνδεση της 3D με την VPg. Επίσης επιβεβαιώθηκε η τάση της 3AB να ολιγομερίζεται και αναγνωρίστηκαν οι περιοχές αλληλεπίδρασης. Ο ολιγομερισμός της 3AB σε συνδυασμό με την δεδομένη σύνδεσή της με τη μεμβράνη οδηγεί ίσως στην υπόθεση του σχηματισμού ενός πόρου ο οποίος θα ήταν υπεύθυνος για την αλλαγή της διαπερατότητας των μεμβρανών με τα στοιχεία αυτά. Ο Xiang W. και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα μοντέλο το οποίο παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.8.

Σε αυτό φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις ως εξής: (1) Η 3D πολυμεράση παρουσιάζεται σαν ένα τετραμερές. Τα ολιγομερή της 3D είναι πιο ενεργά από τα μονομερή στην επιμήκυνση του RNA. Το ίδιο ίσως να ισχύει και για το σύμπλοκο 3AB/3D. (2) Η λειτουργία των διμερών της 3CD δεν είναι

γνωστή, ωστόσο μάλλον εξυπηρετούν στην αυτοκατάλυση και/ή στην τροποποίηση ιικών πρωτεϊνών. (3) Η 3AB και το προϊόν της 3A μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης και αναστέλλουν την έκκριση. Το αν αυτές οι πρωτεΐνες πρέπει να οργανωθούν σε διμερή ή σε ολιγομερή μέσω της υδρόφοβης περιοχής τους δεν είναι γνωστό. (4) Η 3AB και η 3CD μπορούν να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο σε διάλυμα το οποίο (5) προσδέεται με μεγάλη ειδικότητα στην 5' δομή τριφυλλιού, μια διαδικασία απαραίτητη για την έναρξη της παραγωγής της αρνητικής πολικότητας RNA αλυσίδας. (6) Όταν η 3AB και η 3CD συνδέονται μεταξύ τους η 3AB διεγείρει την αυτοκαταλυτική πρωτεολυτική τομή της 3CD σε 3C και 3D. Η 3D και η 3AB μπορούν να παραμείνουν συνδεδεμένες σε σταθερό σύμπλοκο, κάτι που αυξάνει την ικανότητα πολυμερισμού της 3D. (7) Το σύμπλοκο 3AB/3D φαίνεται να αναγνωρίζει την 3' UTR και να συμμετέχει στην έναρξη της σύνθεσης του RNA αρνητικής πολικότητας (8) ο χρόνος ημιζωής της 3AB εξαρτάται από την 3CD καθώς η συνδεδεμένη με την μεμβράνη 3AB μπορεί να τμηθεί από την 3CD σε 3A και 3B (VPg), ο ρόλος των οποίων είναι εντελώς διαφορετικός από την πρόδρομό τους 3AB. (9). Η VPg από την άλλη ουριδυλιώνεται από την 3D πολυμεράση σε VprgpU το οποίο και αποτελεί το εναρκτήριο μόριο για την επιμήκυνση από την 3D.





Σχήμα 1.8 Μοντέλο λειτουργιών των P3 πρωτεϊνών (Xiang et al., 1998).

**Η 3' αμετάφραστη περιοχή** είναι μεταβλητή μεταξύ των Picorna ιών. Με βάση την οργάνωση της 3' UTR οι εντεροϊοί μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, εκείνη των πολιοϊών (η οποία περιλαμβάνει επιπρόσθετα τον εντεροϊό Coxsackie A21 και τους εντεροϊούς των βοοειδών) και εκείνη των Coxsackie B ιών (η οποία περιλαμβάνει επίσης τους εντεροϊούς των χοιροειδών, τον Coxsackie A9 και τους Echo ιούς 6 και 11). Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων έγκειται στο γεγονός, ότι η ομάδα των Coxsackie B ιών παρουσιάζει, στην 3' UTR, μια πλήρη διάταξη θηλειάς (Stem Loop), η οποία απουσιάζει από την ομάδα των πολιοϊών (Auvinen et al., 1989). Αντίθετα, στους πολιοϊούς, παρουσιάζονται, στην περιοχή αυτή του γονιδιώματος, δύο θηλιές (Χ και Ψ), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής «δομή ψευδοκόμπου». Η δομή αυτή αποτελείται από επιμέρους δομές φουρκέτας. Η 3' UTR περιέχει μια αλληλουχία η οποία δημιουργεί μια δομή τριφυλλίου που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας (-) RNA. Στο τέλος της 3' UTR ξεκινά η πολυαδενυλιωμένη επέκτασή της (ή ουρά πολυαδενοσίνης) η οποία φαίνεται να κωδικοποιείται γενετικά από τους ίδιους τους ιούς (Rueckert R.R., 1985). Μπορεί, ωστόσο, να υφίσταται κάποιας μορφής μετά - μεταφραστική προσθήκη. Οι πολυ - A «ουρές» των μελών της οικογένεια Picornaviridae ποικίλλουν σε μήκος μεταξύ 35 (στους καρδιοϊούς) και 100 καταλοίπων (στους αφθοϊούς). Γενώματα τα οποία είχαν λιγότερα από 20 κατάλοιπα αδενοσίνης στην poly(A) ουρά ήταν λειτουργικά μόνο κατά 5% σε σχέση με τα φυσιολογικά. (Wimmer et al., 1993).

Σχετικά με την λειτουργικότητα της 3' UTR πιστεύεται ότι το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδιώματος των εντεροϊών περιέχει δομικά «σήματα», που σχετίζονται με την σύνδεση της πολυμεράσης. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε μελέτες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στους πολιοϊούς και οι οποίες προτείνουν, ότι η 3' UTR παίζει κάποιο ρόλο στην αντιγραφή τους (Rohll et al., 1995). Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις, ότι οι ιικές πρωτεΐνες 3AB και 3CD καθώς και μια πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή μεγέθους 34-36 Kd ριβονουκλεοπρωτεΐνη (ribonucleoprotein-RNP) δεσμεύονται στην 3'

UTR. Πειράματα μεταλλαξογένεσης, που αναστέλλουν την πρόσδεση της 3' UTR με τον προαναφερόμενο κυτταρικό παράγοντα φαίνεται, ότι παρεμβαίνουν στον πολλαπλασιασμό των ιών, πιθανότατα στο επίπεδο της σύνθεσης της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας RNA (Herold and Andino, 2001).

### 1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

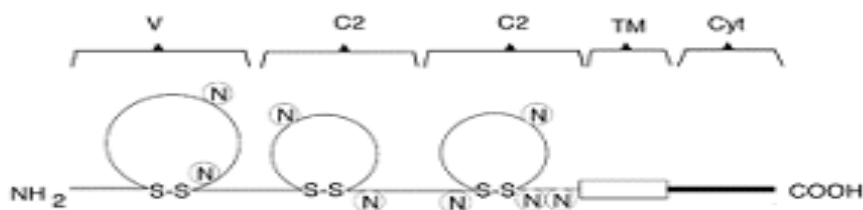
Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μολυσματική δράση ενός ιού είναι η πρόσδεσή του σε κάποιο συστατικό της κυτοπλασματικής μεμβράνης. Στη διαδικασία πρόσδεσης, η οποία είναι συνήθως πολύ ειδική, συμμετέχουν πρωτεΐνες της επιφάνειας του ιού καθώς και του κυτάρου-ξενιστή.

Ιός	Υποδοχέας	Τύπος υποδοχέα	Συνυποδοχέας
Foot-and-mouth disease virus (cell culture adapted)	Heparan sulfate	Glycosaminoglycan	
Foot-and-mouth disease virus	$\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Encephalomyocarditis virus	Vcam-1	Ig-like	
	Sialylated glycoprotein A (for hemagglutination only)	Carbohydrate	
Polioviruses 1–3	Pvr	Ig-like	
Coxsackieviruses A13, A18, A21	Icam-1	Ig-like	
Coxsackievirus A21	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	Icam=1
Coxsackievirus A9	$\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Coxsackieviruses B1–B6	Car (coxsackievirus-adenovirus receptor)	Ig-like	
Coxsackieviruses B1, B3, B5	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	$\alpha_v\beta_5$ -Integrin
Echoviruses 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Integrin (Vla-2)	Integrin	$\beta_2$ -Microglobulin
Parechovirus 1	$\alpha_v\beta_1$ , $\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Echoviruses 3, 6, 7, 11–13, 20, 21, 24, 29, 33	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	$\beta_2$ -Microglobulin
Enterovirus, 70	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	
Bovine enterovirus	Sialic acid	Carbohydrate	
Hepatitis A virus	HAVcr-1	Ig-like, mucin-like	
Major group rhinoviruses (91 serotypes)	Icam-1	Ig-like	
Minor group rhinoviruses (10 serotypes)	Low-density lipoprotein receptor protein family	Signaling receptor	
Rhinovirus 87	Sialic acid	Carbohydrate	

Ig, immunoglobulin; SCR, short consensus repeat.

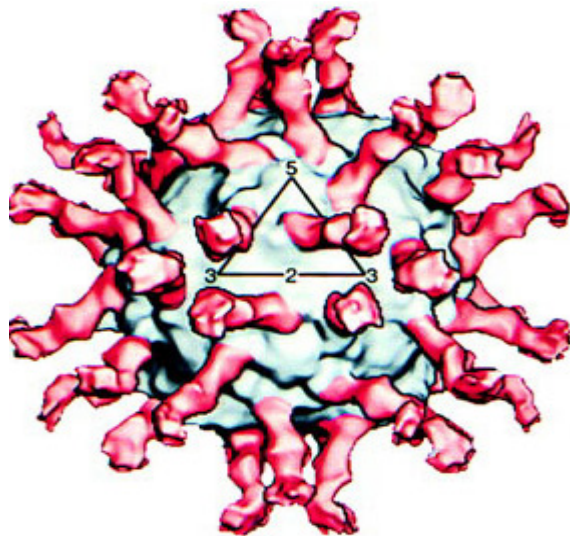
Πίνακας 1.2. Υποδοχείς των Picorna ιών.

Ο υποδοχέας των πολιοϊών, χρησιμοποιείται και από τους τρεις τύπους, έχει κλωνοποιηθεί και αναγνωρίστηκε ως ένα μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig) και ονομάζεται CD155 ή πιο συχνά PVR (Polio Virus Receptor) (Mendelsohn et al., 1989), και η γενετική ανάλυση προσδιόρισε τη θέση του υποδοχέα των πολιοϊών στο χρωμόσωμα 19. Σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους του ίδιου χρωμοσώματος εντοπίστηκε η πληροφορία για τον υποδοχέα του ιού Coxsackie B3 και του ιού echovirus 11 (Rotbart and Kirkegaard 1992). Η δομή του αποτελείται από τρεις εξωκυτταρικές Ig-like δομές που σχηματίζονται από δισουλφιδικούς δεσμούς (V-C2-C2) μια διαμεμβρανική TM και μια τελική κυτοπλασματική περιοχή Cyt (Σχήμα 1.9) Το γονίδιο του CD155 είναι καλά χαρακτηρισμένο και εκφράζεται στους ανθρώπινους ιστούς σε τέσσερις ισομορφές, δύο από τις οποίες είναι μεμβρανοσυνδεδεμένες και αποτελούν τον PVR, ενώ οι άλλες δύο εκκρίνονται από τα κύτταρα. Οι πύθκοι εκφράζουν ένα ομόλογο του CD 155 το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως PVR. Εξαιτίας της ύπαρξης αυτού του ομόλογου οι πύθκοι χρησιμοποιήθηκαν για την πρώτη προσπάθεια καλλιέργειας του ιού, και αργότερα για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας εμβολιακών στελεχών.



Σχήμα 1.9 Η δομή του CD155 με τις 5 διακριτές περιοχές (V-C2-C2-TM-Cyt). Τα N συμβολίζουν πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης (Σχήμα από Mueller et al, 2002)

Η βασική λειτουργική περιοχή του PVR είναι η περιοχή V, η οποία είναι απαραίτητη για να προωθήσει την ιϊκή μόλυνση. Άμεση απόδειξη του ρόλου της περιοχής V και της καιψιδιακής αυλάκωσης αποτελεί η



Σχήμα 1.10 PV1-PVR/CD155 πρόσδεση.  
Ανάλυση cryo-EM 22 Å (He Y. et al, 1998)

ανάλυση με κρυσηλεκτρονική μικροσκοπία του ιού PV1 (RIPO) ενός πολύ εξασθενημένου παραγωγού στελέχους του Mahoney (PV1) περιβεβλημένου από τον PVR Σχήμα 1.10 (He Y. et al, 1998). Οι άλλες δύο περιοχές C2 είναι δευτερεύουσας σημασίας και βοηθούν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της σύνδεσης ιού – V περιοχής. Και οι τρεις ορότυποι ανταγωνίζονται για τον ίδιο υποδοχέα.

Ο τροπισμός του ιού, δηλαδή η ειδική προσβολή ορισμένων ιστών του οργανισμού καθορίζεται από την έκφραση του PVR. Ο τροπισμός του ιού περιορίζεται στις αμυγδαλές του ρινοφάρυγγα, στις πλάκες Peyer του λεπτού εντέρου και στους κινητικούς νευρώνες του ΚΝΣ. Τα ποντίκια παρόλο που έχουν ένα ομόλογο του PVR είναι ανθεκτικά στη μόλυνση από πολιοϊούς. Ωστόσο για τον ποιοτικό έλεγχο των εμβολίων (OPV) έχουν αναπτυχθεί εργαστηριακά ειδικά διαγονιδιακά ποντίκια ως προς τον CD155 τα οποία είναι ευπαθή και στους τρεις οροτύπους. Αυτά τα ποντίκια εμφανίζουν ένα σύνδρομο που δεν ξεχωρίζει από την ανθρώπινη πολιομυελίτιδα. Εντύπωση προκαλεί στα διαγονιδιακά ποντίκια η αδυναμία μόλυνσης μέσω της κλασσικής στοματικής οδού ενώ είναι απαραίτητη η ενδοφλέβια, ενδομυϊκή ή ενδοσπονδυλική ένεση του ιού.

Ο κύριος υποδοχέας των ανθρώπινων ρινοϊών (περίπου 91 ορότυποι), ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα. Είναι μια δομική πρωτεΐνη 95kDa, μέλος επίσης της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών που ονομάζεται ICAM-1. Η γενετική ανάλυση προσδιόρισε τη θέση του υποδοχέα επίσης στο χρωμόσωμα 19 (Greve et al., 1989). Το μόριο ICAM-1 συμμετέχει σε κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων τύπων ιστών καθώς και σε ανοσολογικές λειτουργίες (Springer T.A., 1990, White and Littman 1989). Μελέτες έδειξαν ότι ο ICAM-1 έχει μήκος περίπου 19 nm (Staunton et al., 1990) και αποτελείται από πέντε εξωκυττάρια τμήματα τύπου ανοσοσφαιρίνης. (Greve et al., 1989, Staunton et al., 1990, Tomassini et al., 1989). Εκτός από τους ρινοϊούς αποτελεί υποδοχέα και για τους ιούς Cocksackie A13, A18 και A21 (Colonno et al., 1989). Σε ένα μικρό ποσοστό (περίπου 10%), οι ρινοϊοί χρησιμοποιούν ως υποδοχέα και μέλη της οικογένειας των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low Density Lipoprotein, LDL) (Staunton et al, 1989; Greve et al, 1989).

Μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του υποδοχέα των echo ιών. Οι δύο υπομονάδες της ιντεγκρίνης VLA-2 (Very Late Antigen-2),  $\beta 1$  (130kDa) και  $\alpha 2$  (125kDa), είναι τα μόρια που συνδέονται με τα μονοκλωνικά αντισώματα και εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο για τους echo ιούς 1 και 8 (Bergelson et al., 1992). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο echo ιός τύπου 1 προσκολλάται στο τμήμα I (Inserted) εντός της υπομονάδας  $\alpha 2$  ενώ ο μηχανισμός πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα είναι διαφορετικός από αυτόν που χρησιμοποιεί ο υποδοχέας για την αλληλεπίδρασή του με μόρια της εξωκυτταρικής ουσίας. Αντί-VLA-2 αντισώματα προστατεύουν τα HeLa κύτταρα από τη μόλυνση με τους ιούς echo 1 και 8, αλλά όχι από άλλους ορότυπους αποδεικνύοντας την ύπαρξη και άλλου υποδοχέα (Bergelson et al., 1993). Τα ανωτέρω επιβεβαιώθηκαν χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα αντι-υποδοχέα τα οποία παρεμπόδισαν τη σύνδεση των echo ιών 7,13,21,29 και 33. Η κυτταρική λειτουργία αυτής της ιντεγκρίνης είναι η προσκόλληση των κυττάρων στην

εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην ενδοκυτταρική επικοινωνία με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Hynes R.O., 1987).

Ο παράγοντας επιτάχυνσης της αλλοίωσης- decay- accelerating factor (DAF επίσης γνωστός και ως CD 55) είναι ένας υποδοχέας ο οποίος εμπλέκεται στη σύνδεση και άλλων εικοτών (Bergelson et al., 1994). Ο DAF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφοϊνοσιτόλης, που απαντά στη επιφάνεια της πλειοψηφίας των ορο-εκτιθέμενων κυττάρων και τα προστατεύει από τη λύση που προκαλεί το συμπλήρωμα, καθώς επιταχύνει την αποικοδόμηση των μετατροπασών του κλασσικού C3 και C5 μονοπατιού (Lublin and Atkinson 1989). Ο DAF έχει επίσης αναγνωριστεί ως μείζον υποδοχέας κυτταρικής σύνδεσης για τους CBV1,3 και 5 (Shafren et al,1995; Bergelson et al,1995).

Η ταυτοποίηση του κυτταρικού υποδοχέα της ομάδας των ιών Coxsackie B καθώς και των αδενοϊών είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση από κύτταρα HeLa μιας πρωτεΐνης της CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) η οποία αποτελείται από 365 αμινοξέα (Bergelson et al., 1997, Carson et al., 1997, Tomko et al., 1997). Πρόκειται για ακόμα ένα μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών και έχει στο εξωκυττάριο τμήμα της μια αμινο-τελική V-like και μια C2-like υπομονάδα. Κατόπιν γενετικής ανάλυσης προσδιόριστηκε η θέση του υποδοχέα CAR επίσης στο χρωμόσωμα 19. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης διαχωρίζεται από τη C2-like υπομονάδα με μια απλή διαμεμβρανική αλληλουχία. Ωστόσο είναι ακόμα άγνωστο το τμήμα της πρωτεΐνης CAR που είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του ιού.

Επιπλέον οι ιοί Coxsackie B αλληλεπιδρούν με τον DAF/CD55 (Shafren et al., 1995). Οι αλληλεπιδράσεις των ιών Coxsackie B με τους υποδοχείς CAR και DAF είναι αρκετά ετερογενείς ακόμα και μεταξύ στελεχών του ίδιου οροτύπου. (Selinka et al., 2004).

Οι υποδοχείς CAR και DAF εκφράζονται αμφότεροι στην ανθρώπινη καρδιά. Υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης CAR απαντούν στους παρεμβαλλόμενους δίσκους (intercalated discs), περιοχές μέγιστης σημασίας

για τη λειτουργική ακεραιότητα της καρδιάς. Ο υποδοχέας DAF επιδρά στη σύνδεση του ιού με ορισμένους ορότυπους, ενώ ο υποδοχέας CAR σχετίζεται με την 'εσωτερίκευση' του ιικού σωματιδίου (Bergelson et, 1997). Έτσι ο ρόλος του DAF φαίνεται να περιορίζεται σε αυτόν του συν-υποδοχέα, καθώς διευκολύνει την παρουσίαση των ιικών σωματιδίων στους υποδοχείς CAR.

Πρόσφατη ανάλυση με κρυομικροσκοπία της αλληλεπίδρασης του ιού Echo 7 με τον DAF, έδειξε ότι ο DAF δεν προσδένεται στην αύλακα, αλλά στην υπερμεταβλητή περιοχή της VP2 ακριβώς έξω από τη «νότια» άκρη της αύλακας καθώς επίσης και σε υπερμεταβλητή περιοχή της VP3. Επίσης πειράματα κρυομικροσκοπίας έδειξαν ότι ο DAF προσδένεται στον Echovirus 12 κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων της αλληλουχίας SCR3 με τη VP2 (Bhella et al., 2006).

Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με έναν υποδοχέα μπορεί να μην είναι επαρκής για την είσοδό του στο κύτταρο. Έτσι για τον Coxsackie A21 απαραίτητη είναι η παρουσία τόσο του DAF όσο και του ICAM-1 ως συνυποδοχέων προκειμένου να αρχίσει ένας παραγωγικός για τον ιό μολυσματικός κύκλος (Shafren et al., 1997). Επίσης κάποιοι Coxsackie B ιοί που προσδένονται στον DAF απαιτούν ως συνυποδοχείς  $\alpha_5\beta_6$ -ιντεγκρίνες (Agrez et al., 1997), ενώ κάποιοι echo-ιοί που χρησιμοποιούν τις  $\alpha_2\beta_1$ -ιντεγκρίνες ή τον DAF ως υποδοχέα, πιστεύεται ότι απαιτούν ως συνυποδοχέα τη  $\beta_2$ -μικροσφαιρίνη (Ward et al., 1998).

#### 1.4 Ο Κύκλος Ζωής των Εντεροϊών

##### **Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, είσοδος στα κύτταρα και απένδυση των ιών**

Μπορεί όπως έχει ήδη αναφερθεί 1.2.3(P1), το καψίδιο των picorna-ιών να είναι συγκροτημένο από αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών σχηματίζοντας εικοσαεδρική συμμετρία όμως μεταξύ των μελών της οικογένειας, οι καψιδικές πρωτεΐνες είναι τοποθετημένες με παρόμοιο τρόπο, έτσι ώστε η



αρχιτεκτονική τους επιφάνεια να διαφέρει. Αυτή η διαφορά δεν σχετίζεται μόνο με τον ορότυπο, αλλά συνεπώς και με τον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς. Οι αύλακες είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης του ιού με τους κυτταρικούς υποδοχείς (Belnap et al., 2000, He et al., 2001, He et al., 2003, Kolatkar et al., 1999, Xiao et al., 2001). Μεταλλαγές σε αμινοξέα της αύλακας των πολιοϊών και των ρινοϊών μπορεί να επηρεάσουν τη συγγένεια πρόσδεσης με τους υποδοχείς. (Colston et al., 1994, Colston et al., 1995, Harber et al., 1995, Liao et al., 1997). Αρχικά υπήρχε η θεώρηση ότι οι αύλακες είναι στενές και βαθιές προκειμένου να αποφεύγεται η προσκόλληση στο εσωτερικό της των ογκωδών αντισωμάτων (Rossmann et al., 1989). Με αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστευόταν ότι αμινοξέα βασικά για την πρόσδεση με τον υποδοχέα προφυλάσσονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Δομικές μελέτες ενός συμπλέγματος ρινοϊού-αντισώματος, έδειξαν ότι το αντίσωμα μπορεί να διεισδύσει στην αύλακα όπως ακριβώς και ο υποδοχέας ICAM-1 (Smith et al., 1996) προτείνοντας έτσι ότι οι αύλακες δεν παίζουν ρόλο στην αποφυγή της ανοσολογικής αντίδρασης εναντίον του ιού.

Η πρόσδεση των ιών σε διαλυτό μονομερή πρωτεϊνικό υποδοχέα *in vitro* προκαλεί μια αμετάκλητη δομική αλλαγή στο ιϊκό σωματίο η οποία εκδηλώνεται ως αλλαγή στα χαρακτηριστικά καθίζησης του ιού (από 160 S στο ώριμο ιόσωμα σε 135 S στο Α-σωμάτιο) (Hoover-Litty and Greve, 1993). Παρόμοιες αλλαγές στο συντελεστή καθίζησης, έχουν παρατηρηθεί όταν ο ιός αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια και τέτοιες αλλαγές θεωρείται ότι είναι βασικές για την επιτυχή είσοδο του ιού και τη μόλυνση (Fenwick and Cooper, 1962, Guttman and Baltimore, 1977). Οι δομικές ανακατατάξεις που οδηγούν σε αλλαγές στην καθίζηση περιλαμβάνουν απώλεια της VP4 και “εξωτερικευση” του N-τελικού άκρου της VP1, που υπό κανονικές συνθήκες εδράζει εσωτερικά στο καψίδιο περιβάλλοντας τις πενταμερείς κορυφές του ώριμου ιόσωματος. Το προεξέχον άκρο της VP1, το οποίο είναι υδρόφοβο, ενώνεται με τη μεμβράνη και σχηματίζει μια διόδο

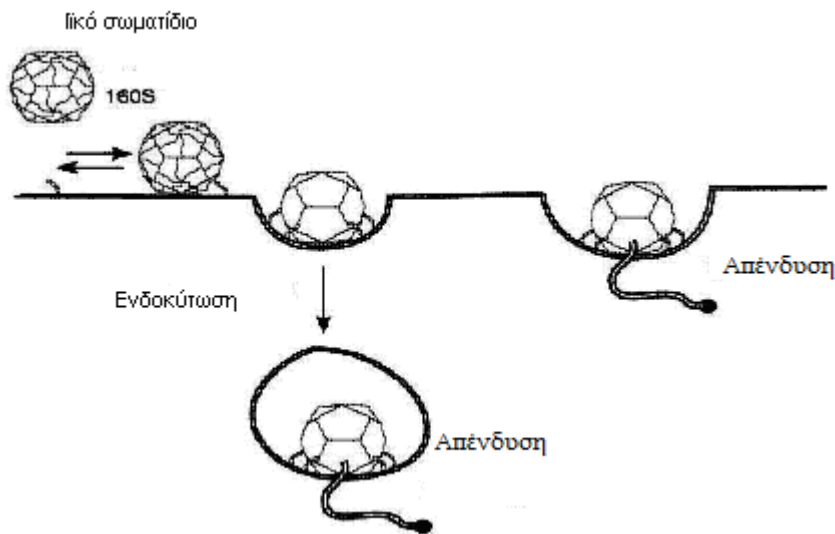
μέσω της οποίας το γένωμα του ιού εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Guttman and Baltimore, 1990).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το καψίδιο των Coxsackie A9 και των αφθοϊκών καθώς πιστεύεται ότι προσδένονται στους κυτταρικούς υποδοχείς μέσω ενός τριπεπτιδίου Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού οξέος (RGD motif) το οποίο αναγνωρίζεται από τις ιντεγκρίνες των κυττάρων και εμφανίζεται σαν μια επιπρόσθετη, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς, αλληλουχία 17 αμινοξέων στο υδρόφιλο και προς την επιφάνεια του καψιδίου καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης VP1 (Roivainen et al., 1991). Ωστόσο, απάλειψη του τριπεπτιδίου ή μεταλλαγές στην αντίστοιχη περιοχή δεν εμποδίζουν τον ιό να εισέλθει στο κύτταρο προτείνοντας έτσι ότι ο ιός μπορεί να προσδεθεί και σε άλλο υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας (Hughes et al., 1995).

Μετά την πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, το ιικό καψίδιο πρέπει να απελευθερώσει το RNA το οποίο στη συνέχεια θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα ακολουθήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού. Για κάποιους *picorna*-ιούς, η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Για άλλους *picorna*-ιούς, ο κυτταρικός υποδοχέας επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών προκειμένου να απελευθερωθεί το γένωμα του ιού.

Η αλληλεπίδραση των πολιοϊών με τον υποδοχέα τους, PVR, οδηγεί το καψίδιο σε δομικές αλλαγές, όπως αναφέραμε. Σχηματίζονται τα *A σωμάτια* τα οποία περιέχουν το ιικό RNA, έχουν όμως χάσει την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, το N-τελικό άκρο της VP1 που κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, έρχεται στην επιφάνεια του *A σωματίου* (Fricks et al., 1990). Αυτή η αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και έτσι τα *A σωμάτια* έχουν αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες σε σύγκριση με το φυσικό ιικό σωματίο. Έτσι σύμφωνα με μια υπόθεση εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο, η πρόσδεση στον υποδοχέα οδηγεί στις παραπάνω δομικές

αλλαγές: το εκτεθειμένο λιπόφιλο N-τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο διαμέσου του οποίου το RNA ταξιδεύει προς το κυτταρόπλασμα (Σχήμα 1.11). Τα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία *A* σωματίδια όταν προστεθούν σε λιπιδική διλοστιβάδα, επάγουν τη δημιουργία ιοντικών καναλιών, ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση (Tosteson et al., 1997). Αν και πιστεύεται ότι το RNA των πολιοϊών διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, δεν είναι γνωστό αν αυτό συμβαίνει μέσω της πλασματικής ή της ενδοσωμικής μεμβράνης. (Perez et al., 1993).

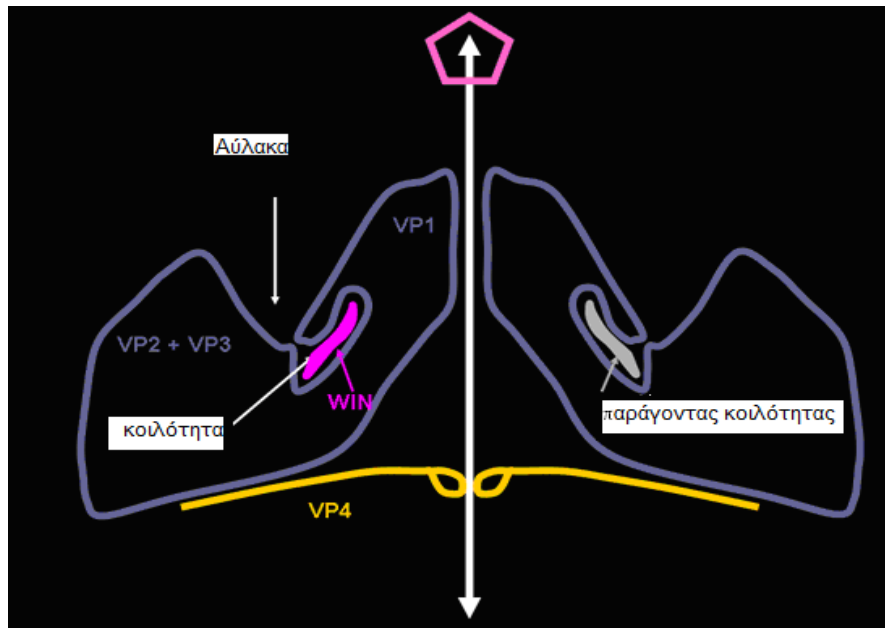


Σχήμα 1.11: Το ιόσωμα προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα και υφίσταται τις αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλούν την παραγωγή των *A* σωματίων τα οποία είναι υδρόφοβα και έχουν χάσει τη VP4 καψιδική πρωτεΐνη. Το N-τελικό άκρο της VP1 έχει μεταφερθεί στην επιφάνεια και το ιικό RNA (καμπυλοειδής γραμμή), εξέρχεται από το σωματίο είτε από την πλασματική μεμβράνη, είτε διαμέσου των ενδοσωμάτων

Το ερέθισμα για την απένδυση του ιού δίνεται από την πτώση του pH στο ενδόσωμα. Όταν το pH είναι περίπου 6.5, το ιικό καψίδιο διαχωρίζεται στα πενταμερή, απελευθερώνοντας το ιικό RNA (van Vlijmen et al., 1998). Η διερεύνηση της ατομικής δομής του ιού αποκάλυψε ότι υψηλή πυκνότητα

καταλοίπων ιστιδίνης επενδύουν εσωτερικά την κοινή επιφάνεια του πενταμερούς (Acharya et al., 1989). Τα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα προσφέρουν σταθερότητα στο καψίδιο. Καθώς το pKa της ιστιδίνης είναι 6.8, κοντά στο pH όπου το καψίδιο διαχωρίζεται, η προσθήκη πρωτονίων στις πλευρικές αλυσίδες της ιστιδίνης πιθανόν να προκαλεί ηλεκτροστατική απώθηση που οδηγεί σε αποδιοργάνωση του ιοσώματος (Curry et al., 1995). Πειράματα μεταλλαξιγένεσης κατά τα οποία ένα κατάλοιπο ιστιδίνης στη θέση 142 της πρωτεΐνης VP3 αντικαταστάθηκε σε αργινίνη οδήγησαν σε καψίδια περισσότερο σταθερά σε χαμηλά pH ενισχύοντας τον πιθανό ρόλο της ιστιδίνης στην αποδιοργάνωση του ιϊκού καψιδίου (Ellard et al., 1999).

Η υδρόφοβη κοιλότητα (hydrophobic pocket) που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια κάθε πρωτομερούς, φαίνεται πως είναι βασικός ρυθμιστής των δομικών μεταβολών που επάγονται από τον υποδοχέα του ιού. Η εικοσαεδρική συμμετρία του καψιδίου επιτρέπει στην κοιλότητα αυτή να περιέχει έως 60 λιπιδικά μόρια. Για τους πολιοϊούς τύπου 1 έχει καταγραφεί η ύπαρξη σφιγγοσίνης (Filman et al., 1989), ενώ για τους Coxsackie B3 έχει αναφερθεί ένας παράγοντας που προσομοιάζει με C16 λιπαρό οξύ (Muckelbauer et al., 1995). Τα λιπίδια πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη σταθερότητα του ιού, και ελέγχουν την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές αλλαγές κατά την προσκόλληση του σε κυτταρικούς υποδοχείς για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρικό περιβάλλον. Την παραπάνω υπόθεση ενισχύουν μελέτες κατά τις οποίες αντιϊκά φάρμακα όπως το παρασκεύασμα WIN, (εκτοπίζει λιπίδια), προσδένονται σταθερά στην υδρόφοβη κοιλότητα, και έτσι εμποδίζουν τη μολυσματικότητα του ιού, καθώς η αλλοίωση της χωροδιάταξης του κατώτερου τμήματος της αύλακας, δεν επιτρέπει την προσκόλληση του ιού στους κυτταρικούς υποδοχείς (Lewis et al., 1998). Σχήμα 1.12



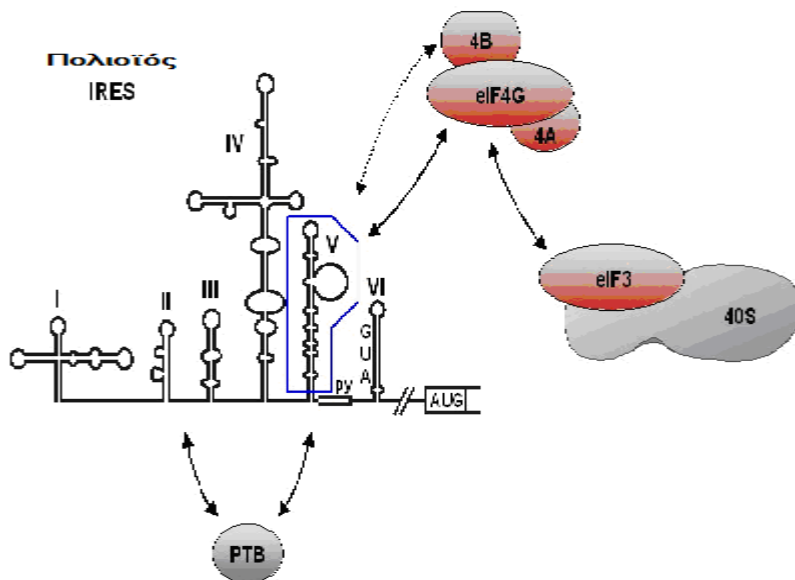
Σχήμα 1.12 Το παρασκεύασμα WIN τροποποιεί το κατώτερο τμήμα της αύλακας (Kolakat et al. EMBO J., 1999, 6249).

#### 1.4.1 Η είσοδος του ιϊκού RNA στο κύτταρο

Η πρόσδεση του πολιοϊού γίνεται μέσω του CD155 υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Ο υποδοχέας ως καταλύτης απομακρύνει από το καψίδιο τις VP4 υπομονάδες μετατρέποντας το 160S καψίδιο σε 135S (σωμάτια-A). Τα περισσότερα προσδεδεμένα καψίδια όταν φτάσουν στο στάδιο του *σωμάτιου-A* αποκολλούνται από τη μεμβράνη. Παράλληλα με την απομάκρυνση των VP4 σε όσα καψίδια καταφέρουν να σταθεροποιήσουν τη δέσμευσή τους στη μεμβράνη, πολλαπλές N-τελικές περιοχές με δομή αμφιπαθικής α-έλικας εκτείνονται από το καψίδιο και εισέρχονται στην λιπιδική διπλοστιβάδα. Μια από τις πιο σημαντικές είναι η VP1 N-τελική περιοχή. Επακόλουθο της προσβολής της μεμβράνης είναι η δημιουργία ενός πόρου μέσω του οποίου περνά το ιϊκό RNA από το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα. (Tsang S.K. et al., 2001)

### 1.4.2 Η Μετάφραση

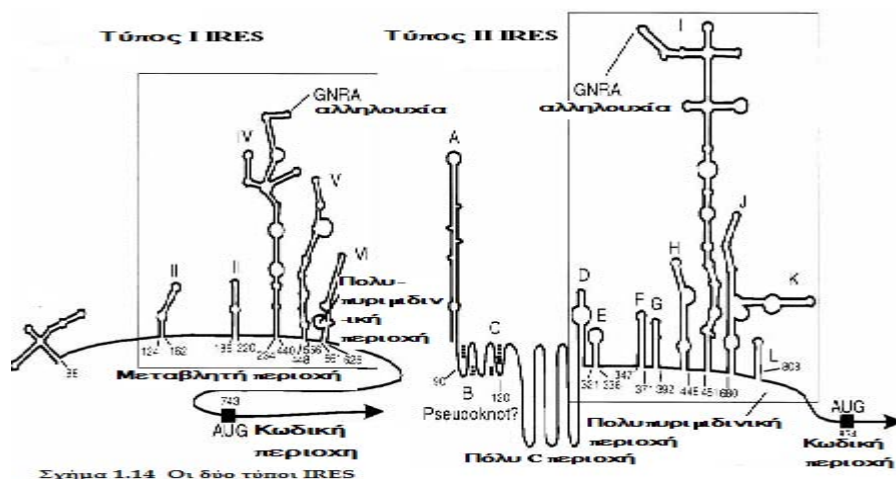
Οι μονόκλωνοι RNA ιοί θετικής πολικότητας χρησιμοποιούν το RNA τους άμεσα για τη μετάφραση με την είσοδό τους στο κύτταρο. Η μετάφραση ξεκινά με την πρόσδεση του IRES του ιϊκού RNA στην ριβοσωμική υπομονάδα 40S με τη βοήθεια σχεδόν όλων των παραγόντων εκκίνησης της μετάφρασης (translation initiation factors) eIF4 υπομονάδων (eIF4G, eIF4B, eIF4A, eIF3 και eIF2), (Ochs K. et al., 2002). Το RNA δεσμεύεται άμεσα στις eIF4G, eIF4A, eIF4B και eIF3. Εκτός των πρωτεϊνών αυτών και άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου φαίνεται να εμπλέκονται στη ικανότητα πρόσδεσης του IRES στο ριβόσωμα, όπως η PTB (polyuridylic track binding protein), οι PCBP1,2 (polycytidine binding protein 1 και 2), η Unr (upstream of N-Ras) συνδεδεμένη με την Unrip (unr-interacting protein), και η La (La auto antigen). Εκτός από την Unr η οποία είναι απαραίτητη φαίνεται ότι αυτές οι πρωτεΐνες δεν είναι απαραίτητες για τη μετάφραση αλλά ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της, (Boussadia O. et al., 2003). Στο Σχήμα 1.13 φαίνεται η διάταξη των eIF4-G, eIF4B, eIF4A του eIF3, της 40S υπομονάδας και της PTB (polyuridylic tract-binding protein, PTB) στο IRES.



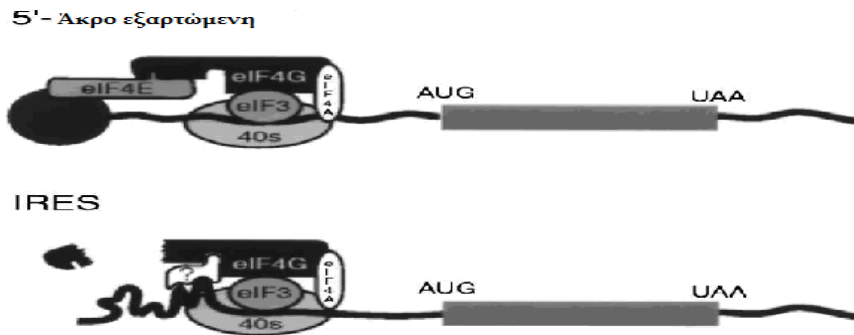
Σχήμα 1.13 Αλληλεπίδραση IRES και των παραγόντων eIF στους πολιοϊούς. [http://www.uniklinikum-giessen.de/bio/ag\\_niepmann/research.htm](http://www.uniklinikum-giessen.de/bio/ag_niepmann/research.htm)

Μετά την πρόσδεση στο 40S ακολουθεί η πρόσδεση και της 80S ριβοσωμικής υπομονάδας και έναρξη της μεταγραφής. Το αποτέλεσμα της μετάφρασης είναι η παραγωγή της ιϊκής πολυπρωτεΐνης, η οποία ακολουθείται από την αυτοκαταλυτική τομή της όπως έχει ήδη περιγραφεί.

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενώματος των πολιοϊών, αποκάλυψε μια μη-μεταφραζόμενη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων που περιέχει επτά AUG κωδικόνια (Kitamura et al., 1981, Racaniello et al., 1981) και συγκεκριμένες αλληλουχίες στο εσωτερικό της που υποβοηθούν την έναρξη της μετάφρασης του ιϊκού γενώματος με την προσκόλληση των ριβοσωμάτων σε αυτές. Οι εν λόγω αλληλουχίες ονομάζονται IRES/Internal Ribosome Entry Site (Pelletier et al., 1988). Το IRES των ricorna-ιών περιέχει συντηρημένες δευτεροταγείς δομές RNA και απαντά ως τύπος I (εντεροϊοί και ρινοϊοί) και τύπος II (καρδιοϊοί και αφθοϊοί). Συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας και στους δύο τύπους IRES είναι το GNRA (N: οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, R: πουρίνη) στο stem-loop IV του IRES τύπου I και στο stem-loop I του IRES τύπου II και το Υn-Χm-AUG μοτίβο όπου το Υn αντιστοιχεί σε περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες (n=6-8) και το Χm είναι ένα τμήμα 15-25 νουκλεοτιδίων που ακολουθείται από το κωδικόνιο AUG (Ehrenfeld and Semler, 1995). Αυτό το κωδικόνιο AUG είναι πολύ σημαντικό αλλά σιωπηλό για την μετάφραση, μέχρι το πραγματικό κωδικόνιο έναρξης (το οποίο βρίσκεται δεξιάτερα), να αναγνωριστεί από το ριβόσωμα κατά την διαδικασία της σάρωσης του RNA (Pestova et al., 1994).



Η έναρξη της μετάφρασης απαιτεί μια ομάδα εναρκτήριων κυτταρικών πρωτεϊνών που θα την ενεργοποιήσουν. Σύμφωνα με ένα μοντέλο για το μηχανισμό πρόσδεσης στο ριβόσωμα, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα προσδένεται στο IRES μέσω της αλληλεπίδρασης αυτής με τον eIF3 ο οποίος έχει σχηματίσει σύμπλοκο με το C-τελικό τμήμα του eIF4G (Σχήμα 1.15).



Σχήμα 1.15 Στην 5' καλύπτρα εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα αλληλεπιδρά με το mRNA μέσω του eIF3, ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με τους eIF4G, eIF4A (ελικάση απαραίτητη για το ξεδίπλωμα δευτεροταγών δομών του RNA) και eIF4E (πρόσδεση στη δομή cap). Στην IRES εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, το σύμπλοκο eIF3-40S προσδένεται στο RNA μέσω της αλληλεπίδρασης του eIF4G με κυτταρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το IRES.

Μια άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στην έναρξη της μετάφρασης και δημιουργεί σύμπλοκο με το IRES είναι αυτή που προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein) και ρυθμίζει το μάτισμα (splicing) του πρόδρομου m-RNA (Hellen et al., 1993). Άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή απαραίτητες για την έναρξη της μετάφρασης είναι η Unr (Upstream of N-Ras) (Boussadia et al., 2003, Costa-Mattioli et al., 2004) και η poly r (C) πρωτεΐνη PCBP (Poly r (C) Binding Protein). Η τελευταία έχει βρεθεί ότι προσδένεται στο stem-loop IV του IRES τύπου I καθώς και στη δομή τριφυλλιού (Blyn et al., 1996, Parsley et al., 1997). Η αλληλεπίδραση της poly r (C)BP με τη δομή τριφυλλιού έχει προταθεί ότι ρυθμίζει αν ένα θετικής πολικότητας RNA θα μεταφραστεί ή θα αντιγραφεί.



### 1.4.2 Μετάφραση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

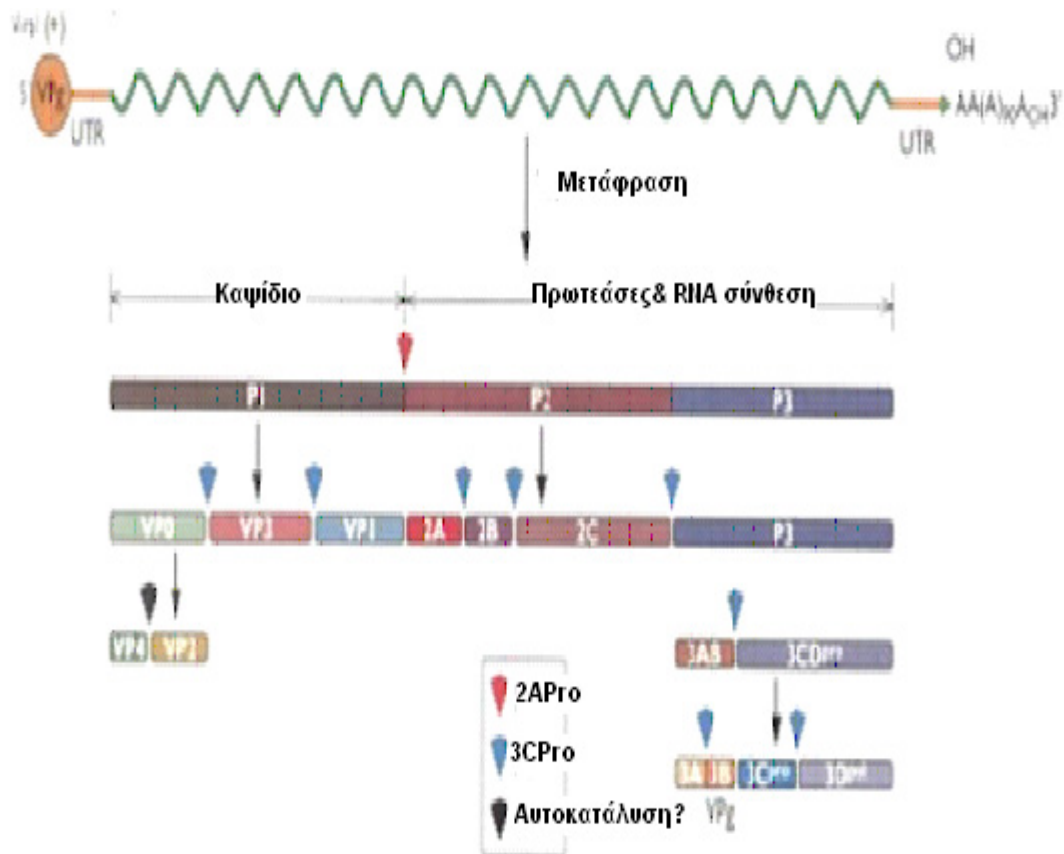
Μία πολύπλοκη διαδικασία ξεκινά από τη μετάφραση μίας και μόνο πολυπρωτεΐνης των πικορναϊών, η οποία ακολουθείται από τη δημιουργία πρόδρομων μορίων μέχρι τη σύνθεση των τελικών ιϊκών πρωτεϊνών των πικορναϊών που κωδικοποιούν τις τρεις πρωτεάσες οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης, αυτές είναι οι 3C<sup>pro</sup> και 2A<sup>pro</sup> (Σχήμα 1.16).

Η 3C<sup>pro</sup> είναι η κύρια πρωτεάση για όλους τους πικορναϊούς η οποία εκτελεί τις περισσότερες διασπάσεις, κάποιες ενώ ακόμα βρίσκεται με τη 3D στο πρόδρομο μόριο 3CD<sup>pro</sup>. Η 3CD<sup>pro</sup> αυτο-αποκόπτεται από την πολυπρωτεΐνη και αρχίζει τη διάσπασή της. Στη συνέχεια το πρόδρομο μόριο 3CD<sup>pro</sup> και η ώριμη πρωτεΐνη 3C<sup>pro</sup> απελευθερώνονται από την P3 με αυτοκαταλυτική διάσπαση και καταλύουν τη δημιουργία των μη-δομικών πρωτεϊνών από τις P2 και P3.

Όλοι οι πικορναϊοί κωδικοποιούν την 3C<sup>pro</sup> η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της 2C από την 3A πρωτεΐνη. Η 3C<sup>pro</sup> των πολιοϊών αναγνωρίζει μόνο θέσεις όπου απαντά το διπεπτιδίο Gln-Gly ενώ η 3C<sup>pro</sup> των υπόλοιπων πικορναϊών είναι δραστική και σε άλλες θέσεις που περιλαμβάνουν Gln-Ser, Gln-Ile, Gln-Asn, Gln-Ala, Gln-Thr, και Gln-Val. (Melnick J.L., 1996).

Η 2A<sup>pro</sup> συμμετέχει στην αρχική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης στο πρόδρομο μόριο P1 και στην P2-P3 χωρίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις πρόδρομες πρωτεΐνες των καψομερών από αυτές των μη δομικών πρωτεϊνών. Οι θέσεις διάσπασης στην πρόδρομη πρωτεΐνη βρίσκονται μεταξύ θρεονίνης-γλυκίνης και φαινυλαλανίνης-γλυκίνης σε κάποιους coxsackie και echo ιούς και μεταξύ τυροσίνης-γλυκίνης σε άλλους εντεροϊούς. Έχει προταθεί ότι η δομή της 2A<sup>pro</sup> είναι παρόμοια με εκείνη των πρωτεασών που μοιάζουν με χυμοθρυψίνη, με τη διαφορά ότι το N-τελικό τμήμα δεν έχει τη δομή β-βαρελιού, αλλά β-ελάσματος. Ένα άλλο ασυνήθιστο χαρακτηριστικό της 2A<sup>pro</sup> είναι τα στενά προσδεδεμένα ιόντα ψευδαργύρου στην αρχή του C-τελικού άκρου τα οποία είναι ουσιώδη για τη δομή του ενζύμου (Petersen et al., 1999, Sommergruber et al., 1994, Voss et al., 1995).

Το τελευταίο πρωτεολυτικό ρήγμα είναι η δημιουργία των πρωτεϊνών VP2 και VP4 από την VP0, το οποίο είναι και το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του καψιδίου. Πιθανότατα το στάδιο αυτό να γίνεται εντός του καψιδίου και έχει προταθεί ότι πρόκειται για αυτοκατάλυση. (Agol et al., 1999)



Σχήμα 1.16 Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης

### 1.4.3. Αντιγραφή του γενώματος και σύνθεση του νέου ιϊκού RNA θετικής πολικότητας

Η αντιγραφή των θετικής πολικότητας RNA εντεροϊών γίνεται σε δύο φάσεις. Αρχικά παράγονται αρνητικής πολικότητας αντίγραφα από το θετικής πολικότητας RNA τα οποία κατόπιν χρησιμοποιούνται ως μήτρες για τη παραγωγή θετικής πολικότητας μορίων (Porter, 1993).

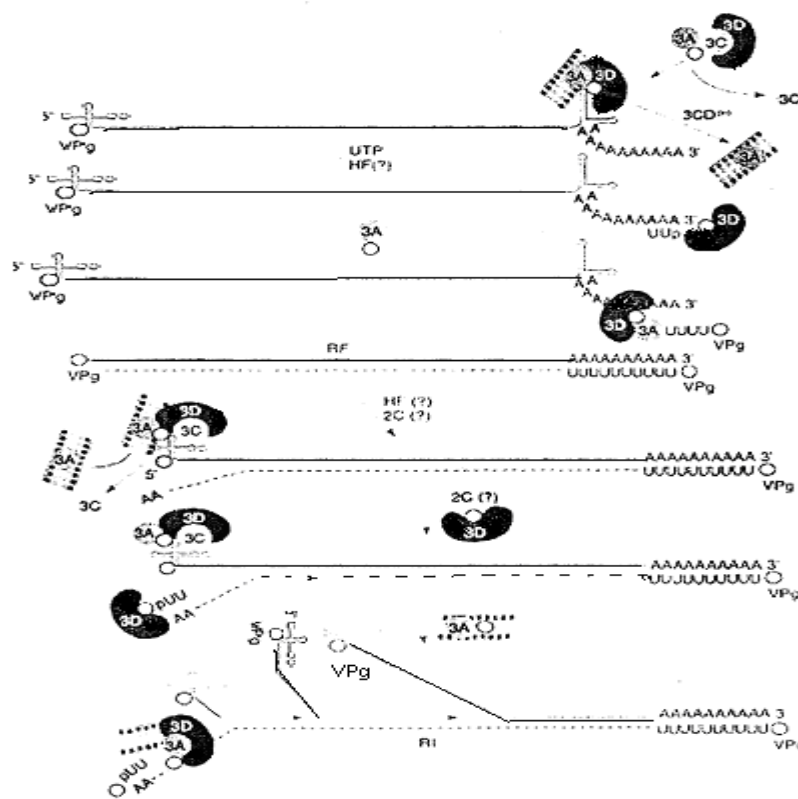
Σαν πρώτο στάδιο της αντιγραφής απαιτείται ο σχηματισμός κυστιδίων που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια των 2BC, 2C και 3A πρωτεϊνών του ιού, οι οποίες μπορούν να προσδεθούν στις μεμβράνες και να προωθήσουν την αναδιάταξη των μεμβρανικών δομών σε κυστιδία, με περιπυρηνική διάταξη. Τα κυστιδία αυτά είναι οι θέσεις στις οποίες γίνεται η αντιγραφή του ιού. Οι πρωτεΐνες 3CD και 3AB σχηματίζουν με τη βοήθεια και κάποιων πρωτεϊνών του κυττάρου, όπως η PCBP (poly C binding protein) και η PABP (poly A binding protein), ένα RNP σύμπλοκο στο 5' άκρο του +RNA, γύρω από την 5' δομή τριφυλλίου στη D θηλιά αυτής (Gamarnick A. et al., 2000). Το σύμπλοκο παράλληλα αλληλεπιδρά με την 3' poly-A ουρά συνδέοντας τα άκρα του ιϊκού RNA. Ο σχηματισμός αυτής της κυκλικής δομής είναι απαραίτητος για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας RNA (Herold J., Andino R., 2001). Η κυκλοποίηση του ιϊκού RNA φαίνεται να είναι μια γενική τακτική που ακολουθείται από τους θετικής πολικότητας RNA ιούς. Η πρόσδεση του συμπλόκου στα κυστιδία προωθείται από την 3AB πρωτεΐνη. Εκεί συσσωρεύονται πολλά σύμπλοκα αντιγραφής πολύ κοντά μεταξύ τους (Egger D. and Bienz K., 2002).

Η παραγωγή του αρνητικής πολικότητας (-)RNA αρχίζει με την ουριδυλίωση της πρωτεΐνης VPg (νεοσυνθετικής) από την 3D πολυμεράση. Η προσθήκη των δύο καταλοίπων ουριδίνης στην VPg γίνεται με τη χρήση ως μήτρας μιας περιοχής που βρίσκεται στην 2C περιοχή του γονιδιώματος και *cre* (cis -acting replication element). Τα απαραίτητα στοιχεία για τη ουριδυλίωση της VPg, *in vitro* είναι η 3D, η 3CD, UTP και μια Poly(A) μήτρα (Goodfellow I.A., 2003). Απαραίτητη είναι όμως και η μεσολάβηση του 5' άκρου (Lyons T., 2001). Χρησιμοποιώντας την VrgpUpU<sub>OH</sub> σαν εναρκτήριο

μόριο (primer) η 3D πολυμεράση ξεκινά την παραγωγή του αρνητικής πολικότητας RNA. Η αρχή γίνεται με την υβριδοποίηση των δύο ουριδινών με κατάλοιπα αδενοσίνης της poly(A) ουράς κοντά στο 3' άκρο της 3' 'UTR. Η επιμήκυνση του 3' γίνεται από την 3D χωρίς τη μεσολάβηση άλλης πρωτεΐνης, αφού διαθέτει και ενεργότητα ελικάσης για το ξεδιπλωμα των δίκλωνων περιοχών.

Το νεοσχηματιζόμενο δίκλωνο RNA μάλλον δεν ξεδιπλώνεται κατά τη διάρκεια της παραγωγής της επιμήκυνσης. Αυτό υποστηρίζεται από την εύρεση τέτοιων δίκλωνων μορίων σε μολυσμένα κύτταρα αλλά και από την έως τώρα αδυναμία εύρεσης ελεύθερου μονόκλωνου RNA. Μετά την παραγωγή του δίκλωνου RNA ακολουθεί με τη χρησιμοποίηση της (-) RNA αλυσίδας η παραγωγή των (+) RNA. Για την έναρξη του πολυμερισμού είναι απαραίτητη η παρουσία  $V_{pgp}U_pU_{OH}$  ως εναρκτήριο μορίου. Υπάρχουν δύο υποθέσεις για το πως επιτυγχάνεται αυτό. Η πρώτη αναφέρει πως γίνεται με τη μετατόπιση του AA άκρου του +RNA στο 3' άκρο του -RNA και χρησιμεύει για την έναρξη, ενώ η δεύτερη αφορά την ουριδυλίωση της με μήτρα το 3' άκρο του αρνητικής πολικότητας RNA. Ωστόσο η περισσότερο υποστηριζόμενη άποψη είναι η πρώτη κατά την οποία το δεξι άκρο του δίκλωνου RNA αναγνωρίζεται από ικές ή κυτταρικές πρωτεΐνες και αποσταθεροποιείται η δομή (όπως γίνεται σε ορισμένους DNA ιούς όπως τους αδενοϊούς, που το γενετικό τους υλικό είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνη). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι μάλλον οι πρωτεΐνες του RNP συμπλόκου που συνδέουν μεταξύ τους τα 3' και 5' άκρα. Γι' αυτό και για την έναρξη της σύνθεσης του (+) RNA είναι απαραίτητη η παρουσία των 3AB, 3CD και της δομής τριφυλλιού του 5' άκρου του μητρικού (+) RNA. Η παραγωγή του (+) RNA έχει μελετηθεί λιγότερο και ο ρόλος των διαφόρων πρωτεϊνών στα περισσότερα σημεία της είναι αμφιλεγόμενος, όπως αυτός της 2C η οποία μπορεί να δρα ως ελικάση αποδιάταξης του δεύτερου δίκλωνου RNA (-RNA και +RNA). Η παραγωγή των (+) RNA είναι συνεχής με αποτέλεσμα να παράγονται αρκετές χιλιάδες νέα μόρια. Στο Σχήμα 1.17 φαίνεται το μοντέλο όλης της πορείας της αντιγραφής όπως πιστεύεται ότι ισχύει σήμερα. Εκτός

από την δομή τριφυλλιού και την poly(A) ουρά, μια άλλη δομή του RNA του ιού συμβάλλει στην έναρξη της αντιγραφής και την δημιουργία του εκκινητικού μορίου. Η δομή αυτή βρίσκεται στην περιοχή της 2C του γενώματος, έχει μορφή θηλιάς και είναι γνωστή ως στοιχείο CRE (Goodfellow et al., 2000). Προτείνεται όμως, ότι τα μόρια της VPgpUpU προερχόμενα από το στοιχείο CRE χρησιμοποιούνται ως εκκινητικά μόρια μόνο για την σύνθεση του +RNA, χρησιμοποιώντας την AA αλληλουχία στο 3' άκρο του -RNA. Εξασφαλίζεται έτσι ένας ικανός μηχανισμός για την έναρξη της σύνθεσης πολλών +RNA μορίων (Morasco et al., 2003).



Σχήμα 1.17 Το μοντέλο της παραγωγής του αρνητικής και θετικής πολικότητας RNA. Το (+)RNA παρουσιάζεται ως συνεχής γραμμή και το (-) RNA ως διακεκομμένη. Οι λεπτομέρειες παρουσιάζονται αναλυτικά στο κείμενο. RF και RI είναι το σύμπλοκο (+/-) που παράγονται στα δύο στάδια της αντιγραφής, ενώ HF είναι οι πιθανοί κυτταρικοί παράγοντες που απαιτούνται (Encyclopedia of Virology, 1999).

#### 1.4.4 Απελευθέρωση των νεοσυντεθειμένων ιϊκών σωματιδίων

Τα νέα θετικής πολικότητας RNA προστίθενται στις καψιδιακές πρωτεΐνες VP0, VP3 και VP1 οι οποίες μετά την παραγωγή τους από την πολυπρωτεΐνη διατηρούν τις μεταξύ τους μη ομοιοπολικές συνδέσεις οι οποίες ενισχύονται από νέες κατά την αλλαγή της στερεοδιάταξης από την πρωτεολυτική τομή. Οι πρωτεΐνες - μονομερή προστιθέμενες στο RNA δημιουργούν πενταμερή και το συμπυκνώνουν σχηματίζοντας ένα πρώιμο καψίδιο. Στο καψίδιο στη συνέχεια αυτοκαταλυτικά διασπάται η VP0 σε VP2 και VP4 μια διαδικασία που ο μηχανισμός της είναι ακόμα άγνωστος.

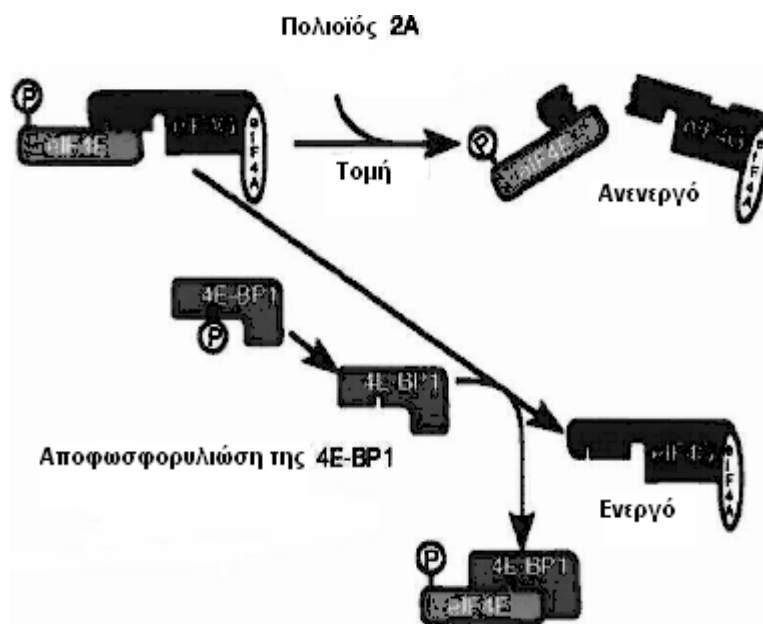
Η δημιουργία πολλαπλών κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση της μεταγραφής και της πρωτεϊνσύνθεσης του κυττάρου από τις 2A και 3C πρωτεάσες αλλά και την αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης από τη δημιουργία πόρων από την 2B πρωτεΐνη του ιού οδηγεί στη “στρογγυλοποίηση” του κυττάρου. Η “στρογγυλοποίηση” και η επακόλουθη καταστροφή του κυττάρου αποτελεί το παρατηρούμενο χαρακτηριστικό κυτοπαθολογικό φαινόμενο (CPE – CytoPathic Effect) όλων των Εντεροϊών, όπως αυτό παρατηρείται “*in vitro*” σε κυτταροκαλλιέργειες οι οποίες έχουν ενοφθαλμισθεί με κάποιο εντεροϊό. Αποτέλεσμα της κυτταρικής λύσης είναι η απελευθέρωση των νέων ιών, οι οποίοι μπορούν να φτάσουν μέχρι και τις 100.000 ιϊκά σωματίδια.

#### 1.4.5. Συνέπειες του ιϊκού πολλαπλασιασμού στο κύτταρο ξενιστή

Σε καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών η μόλυνση με εντεροϊό οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μετά από περίπου 2 ώρες, η μετάφραση όλων σχεδόν των κυτταρικών mRNA σταματά και αντικαθίσταται από τη μετάφραση του ιϊκού mRNA. Ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF4G απενεργοποιείται με τη διάσπασή του από την ιϊκή πρωτεάση 2A<sup>pro</sup> στα σημεία που αυτός προσδένεται στη δομή cap του mRNA

και στο ριβόσωμα (Lamphear et al., 1995) και δίνει το ερέθισμα για την IRES εξαρτώμενη μετάφραση (Σχήμα 1.18).

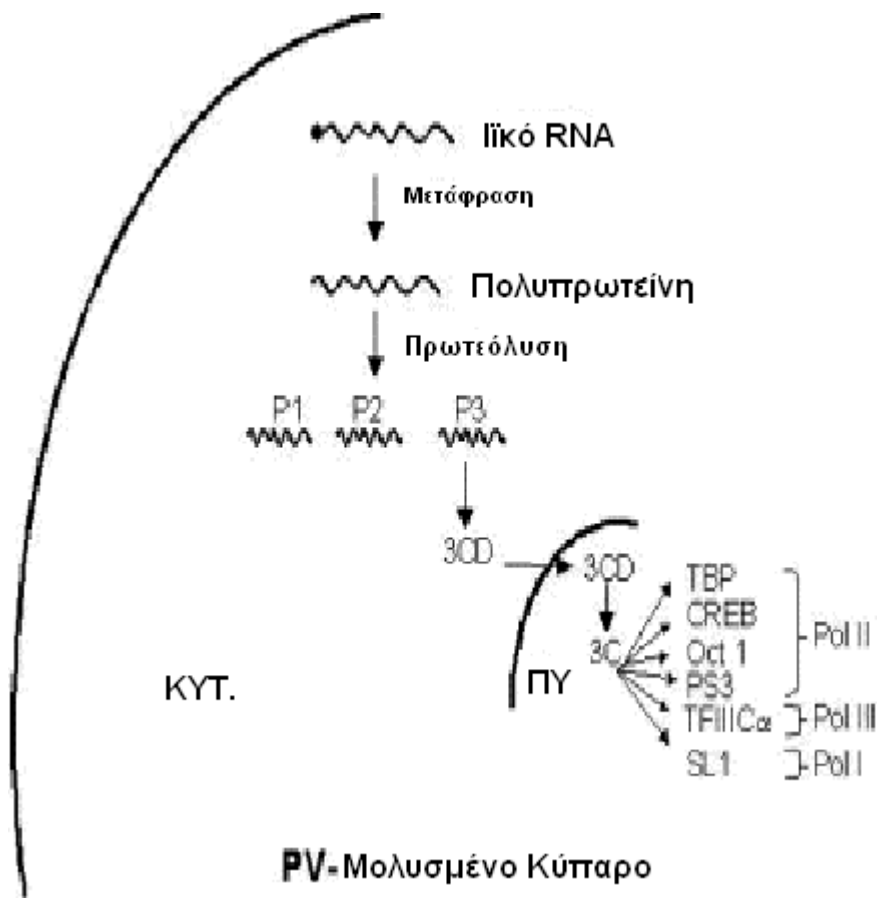
Δύο κυτταρικές πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, οι 4E-BP1 και 4E-BP2, προσδένονται στον κυτταρικό παράγοντα eIF4E και αναστέλλουν την εξαρτώμενη από το 5' άκρο μετάφραση (Pause et al., 1994). Σε κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με εντεροϊό η 4E-BP1 ή η 4E-BP2 αποφωσφορυλιώνονται και προσδένονται στον eIF4E με τρόπο που δεν εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τις 5' cap δομές, αναστέλλει όμως την πρόσδεση στον eIF4G και έτσι δεν σχηματίζεται ο ενεργός παράγοντας eIF4F (Σχήμα 1.18).



Σχήμα 1.18 Οι δύο μηχανισμοί για τη ρύθμιση της ενεργότητας του eIF4F σε κύτταρα μολυσμένα με picorna-ϊούς.

Εκτός από την μετάφραση, οι ιϊκές πρωτεάσες 2A<sup>pro</sup> και 3C<sup>pro</sup> απενεργοποιούν και τα τρία συστήματα μεταγραφής του κυττάρου (Dasgupta et al., 2002). (Σχήμα 1.18). Το σύστημα μεταγραφής της RNA Polymerase I είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του ριβοσωμικού RNA (rRNA) και η απενεργοποίησή του, η οποία γίνεται πολύ νωρίς (1,5-2h μετά την μόλυνση) συνοδεύεται από πολλαπλά κοψίματα του παράγοντα TAF<sub>110</sub> (TBP-Associated Factor), από την 3C<sup>pro</sup> στις θέσεις gln-gly (Dasgupta et al., 2002). Το σύστημα μεταγραφής της RNA polIII είναι υπεύθυνο για την παραγωγή όλων των tRNA και των 5S rRNA. Η απενεργοποίηση του συστήματος γίνεται με την απενεργοποίηση της α-υπομονάδας του παράγοντα μεταγραφής TFIIIC από την 3C<sup>pro</sup> (Shen et al., 1996). Το σύστημα μεταγραφής της RNA polIII είναι υπεύθυνο για τη παραγωγή των mRNA και αναστέλλεται από δύο ιϊκές πρωτεάσες, οι οποίες απενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής όπως ο TBP (TATA-binding protein), ο CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein), ο Oct-1 (Octamer-binding factor) και την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Das and Dasgupta, 1993, Weidman et al., 2001, Yalamanchili et al., 1996, Yalamanchili et al., 1997a, Yalamanchili et al., 1997b). Ενδεχομένως, η 3C<sup>pro</sup> να ενεργοποιεί έναν κυτταρικό παράγοντα ο οποίος με την σειρά του να αλλοιώνει την p53. Η καταστροφή της πρωτεΐνης αυτής φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιεί ο ιός για να καθυστερήσει ο κυτταρικός θάνατος, έτσι ώστε να μπορέσει να ολοκληρώσει την αναπαραγωγή του.





Σχήμα 1.19 Προτεινόμενο μοντέλο για την αναστολή της μεταγραφής του κυττάρου-ξενιστή. Η πρόδρομος πρωτεΐνη 3CD εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και με αυτοπρωτεόλυση δημιουργεί την 3C<sup>pro</sup>. Η ιϊκή πρωτεάση επιδρά σε διάφορους παράγοντες μεταγραφής και των τριών συστημάτων του ξενιστή.

### 1.5 Πολιομυελίτιδα -Παθογένεια

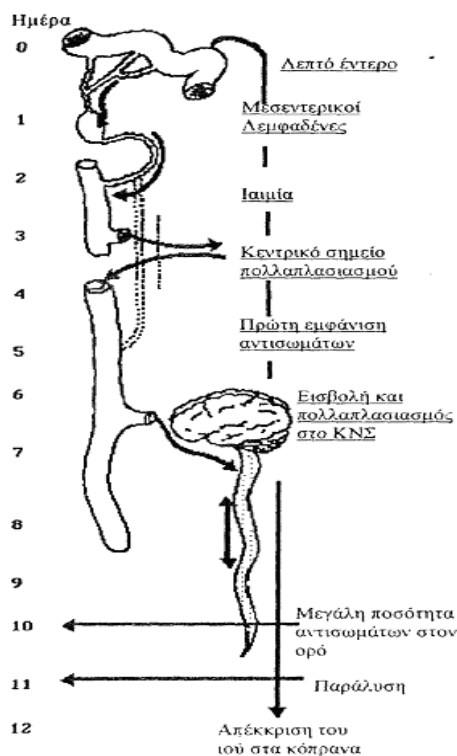
Η είσοδος των εντεροϊών στον οργανισμό γίνεται από το στόμα. Εξαιρέση αποτελούν οι CAV21 που κυρίως ευθύνονται για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και προσβάλλουν τον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού, καθώς επίσης και ο EV70, που χρησιμοποιεί τις οφθαλμικές και αναπνευστικές εκκρίσεις ως μέσο μετάδοσής του. Ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών γίνεται στο φάρυγγα και στο λεπτό έντερο. Η περίοδος επώασης είναι συνήθως 7-14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2-35 ημέρες (Melnick J.L., 1996). Δύο ή και περισσότεροι εντεροϊοί μπορεί να πολλαπλασιασθούν ταυτόχρονα στο πεπτικό σύστημα, αλλά ο πολλαπλασιασμός του ενός μπορεί να είναι ανταγωνιστικός των άλλων.

Οι πολιοϊοί είναι βασικά εντερικοί ιοί (εντεροϊοί), προκαλώντας τις περισσότερες φορές ασυμπτωματική μόλυνση και σπάνια (1% των περιπτώσεων) προσβάλλουν το ΚΝΣ προκαλώντας βλάβες στα εγκεφαλικά κύτταρα και πολιομυελίτιδα.

Η βασική αλληλουχία γεγονότων που ακολουθείται από τον ιό κατά τον κύκλο του μέσα στον οργανισμό έχει μελετηθεί σε ανθρώπους και χιμπατζήδες. Η περίοδος επώασης του ιού είναι περίπου 7 -14 μέρες. Η μετάδοση του ιού γίνεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Η αρχική μόλυνση αφορά την προσβολή του στόματος-φάρυγγα και του λεπτού εντέρου. Συνήθως ο ιός εμφανίζεται στο φαρυγγικό υγρό 1-2 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση και απεκκρίνεται από τα κόπρανα για 4 - 8 εβδομάδες. Οι θέσεις αυτής της αρχικής μόλυνσης έχουν προσδιοριστεί και είναι οι αμυγδαλές στο στόμα -φάρυγγα και οι πλάκες Peyer στο λεπτό έντερο. Ωστόσο οι πλάκες Peyer δεν είναι άμεσα προσεγγίσιμες από τον ιό ο οποίος βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα. Μια υπόθεση θέλει την μόλυνση των Μ κυττάρων (Microfold cells) του εντερικού επιθηλίου από τον ιό και μεταφορά μέσω αυτών στις πλάκες Peyer, όπου και γίνεται ο βασικός πολλαπλασιασμός του. Είναι εμφανές ότι ο ιός “προτιμά” λεμφικής προελεύσεως κύτταρα. Μεγάλη σημασία έχει δοθεί στην μόλυνση των μονοκυττάρων, τα οποία είναι

ίσως το όχημα μεταφοράς μεταξύ των διαφόρων ιστών. Ίσως τα μονοκύτταρα αποτελούν και την πρωταρχική θέση μόλυνσης στις πλάκες. Ο πολλαπλασιασμός του ιού ακολουθείται από την εμφάνιση ενός υψηλού ιϊκού τίτλου στον εντερικό σωλήνα.

Από τους λεμφικούς ιστούς του στόματος-φάρυγγα και του λεπτού εντέρου η μόλυνση περνά και σε άλλους λεμφικούς ιστούς όπως οι μεσεντερικοί λεμφαδένες. Επακόλουθο του εκτεταμένου πολλαπλασιασμού του ιού είναι η παρουσία του στο αίμα προκαλώντας μια παροδική ιαιμία. Και οι τρεις ορότυποι έχουν αυτή τη δυνατότητα. Κατά την ιαιμία ο ιός μεταφέρεται σε όλα τα όργανα του σώματος προσβάλλοντας και άλλους εναισθητούς ιστούς όπως τους περιφερειακούς λεμφαδένες. Αυτοί συντηρούν την ιαιμία σε συνδυασμό με την παραγωγή νέων ιών από τα μονοκύτταρα του αίματος.



Σχήμα 1.20 Η πορεία του ιού από το λεπτό έντερο μέχρι την αρχή της χαλαρής παράλυσης σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την πρώτη μόλυνση και η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η εμμένουσα ιαιμία είναι ο απαραίτητος παράγοντας για το πέρασμα του ιού στο ΚΝΣ (Σχήμα 1.20). Η μετάβαση αυτή είναι πολύ δύσκολη αφού ο ιός πρέπει να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η μεταφορά γίνεται ίσως με τη χρήση των μακροφάγων ως φορέων και ίσως μέσω των περιφερειακών νευριτών των κινητικών νευρώνων, για τους οποίους ο ιός εμφανίζει τροπισμό. Η μεταφορά των πολιοϊών μέσω των νευρικών ινών έχει παρατηρηθεί μετά από πειράματα με ενδομυϊκή χορήγηση του ιού. Πιθανολογείται πως χρησιμοποιώντας τους νευρίτες ως

σωλήνες μεταφοράς, ο ιός περνά από τα τριχοειδή αγγεία στο ΚΝΣ. Αυτή την οδό έχει διαπιστωθεί πως χρησιμοποιούν και άλλοι ιοί για να περάσουν στο ΚΝΣ.

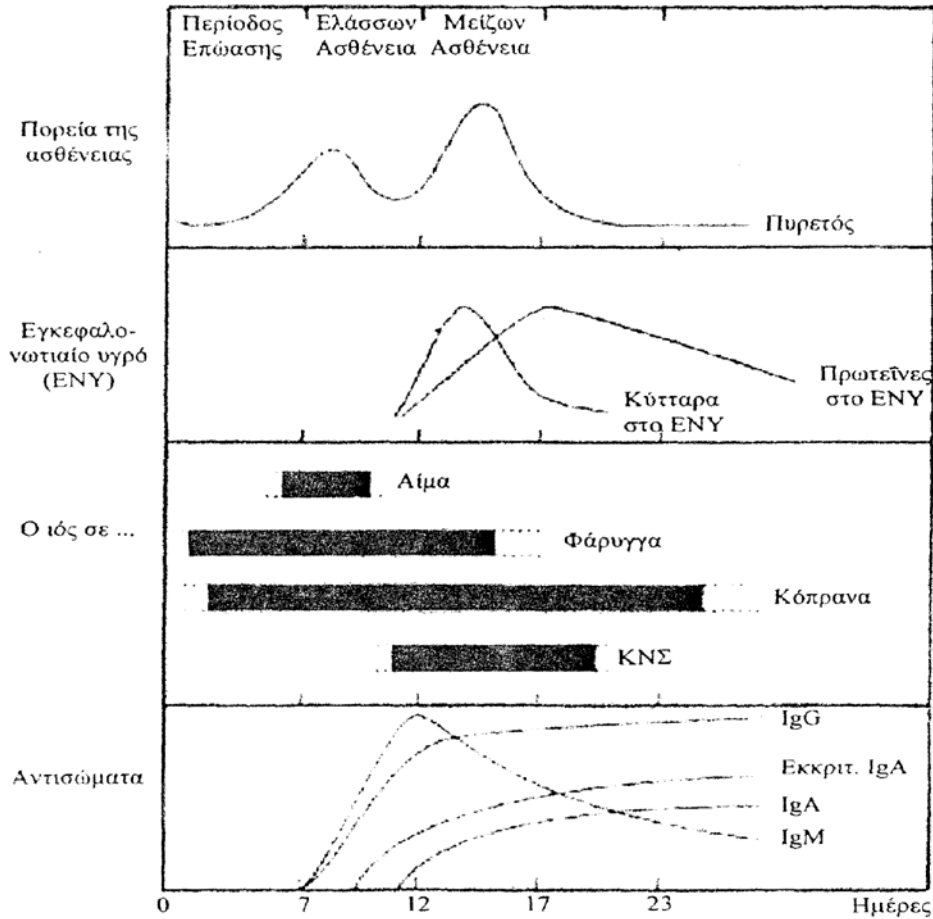
Αντίθετα με τη προσβολή του λεπτού εντέρου η προσβολή του ΚΝΣ προκαλεί βλάβες χαρακτηριστικές της πολιομυελίτιδας. Βασική είναι η προτίμηση στους κινητικούς νευρώνες των πρόσθιων κεράτων της φαιάς ουσίας της αυχενικής και οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού. Σε σπάνιες περιπτώσεις προσβάλλονται δευτερογενώς τα οπίσθια κέρατα της φαιάς ουσίας και αισθητικά γάγγλια.

Στον εγκέφαλο πολλά από τα κέντρα του φλοιού έχουν εμπλακεί στην εγκεφαλική μόλυνση όπως και διάφοροι κινητικοί και αισθητικοί πυρήνες. Οι θέσεις προσβολής μέσα στον εγκέφαλο έχουν αρκετά επιλεκτική φύση ίσως λόγω της κίνησης του ιού μέσω ορισμένων νευρικών ινών. Επακόλουθο του λυτικού τρόπου αντιγραφής του ιού είναι η νέκρωση των κυττάρων τα οποία προσελκύουν μακροφάγα κύτταρα και τα οποία τελικά δημιουργούν τη φλεγμονή.

Οι κλινικές εκδηλώσεις που παρουσιάζονται σε μια μόλυνση από τους πολιοϊούς διαφέρουν ανάλογα με τη θέση της προσβολής και την σοβαρότητα των βλαβών. Η πιο συχνή επίδραση του ιού στον οργανισμό είναι ασυμπτωματική ή υποκλινική συμβαίνει στο 90 - 95 % των μολύνσεων. Ωστόσο και σ' αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει παρουσία του ιού στα κόπρανα και το άτομο μπορεί να τον μεταδώσει. Το 5% των προσβεβλημένων ατόμων εμφανίζουν ελάσσονα συμπτώματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει μόλυνση του ΚΝΣ και τα άτομα αναρρώνουν σε λιγότερο από μία εβδομάδα. Έχουν παρατηρηθεί τρία σύνδρομα που αφορούν ελάσσονα συμπτώματα μόλυνσης του ανώτερου αναπνευστικού (πονόλαιμος και πυρετός), γαστρεντερικές διαταραχές (ναυτία, κοιλιακό άλγος, δυσκοιλιότητα, ή διάρροια) και συμπτώματα ίδια με της γρίπης (influenza-like illness). Σε περίπου 1 – 2% των περιπτώσεων τα παραπάνω συμπτώματα ακολουθούνται από άσηπτη μηνιγγίτιδα (μη παραλυτική πολιομυελίτιδα) με συμπτώματα ακαμψίας του αυχένα και / ή των ποδιών. Η κατάσταση αυτή κρατά από 2 μέχρι 10 ημέρες και ακολουθείται από πλήρη ανάρρωση.

Λιγότερο από 2% των μολύνσεων από πολιοϊούς έχουν σαν αποτέλεσμα χαλαρή παράλυση (παραλυτική πολιομυελίτιδα). Τα συμπτώματα ξεκινούν από 1 με 10 μέρες μετά τις αρχικές εκδηλώσεις και εξελίσσονται μέσα σε τρεις μέρες. Γενικά καμία περαιτέρω παράλυση δεν ακολουθεί μετά την επαναφορά

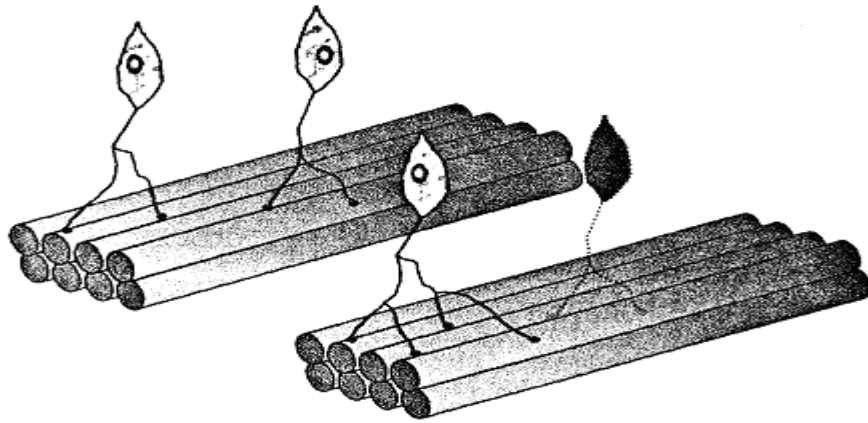
της θερμοκρασίας στα φυσιολογικά επίπεδα. Οι πρόδρομες εκδηλώσεις μπορεί να είναι ειδικά στα παιδιά διφασικές και τα κύρια συμπτώματα να χωρίζονται από τα ελάσσονα από μια περίοδο 17 ημερών. Στο Διάγραμμα 1.1 φαίνεται η συνολική πορεία της ασθένειας.



Διάγραμμα 1.1 Η πορεία της ασθένειας, τα χαρακτηριστικά του ENY, η παρουσία του ιού στις διάφορες θέσεις εντοπισμού του και τα αντισώματα που παράγονται συναρτήσει του χρόνου σε μία τυπική περίπτωση παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Επιπλέον πρόδρομα συμπτώματα μπορεί να είναι η απώλεια επιφανειακών αντανακλαστικών, αρχικά αυξημένα τενοντικά αντανακλαστικά, έντονοι μυϊκοί πόνοι και σπασμοί στα άκρα. Οι ασθενείς δεν έχουν απώλεια αισθητικών λειτουργιών ή ανώτερων πνευματικών λειτουργιών. Μετά από μερικές εβδομάδες η δύναμη στους μύες αρχίζει να επανέρχεται με νεύρωση των μυών από παράπλευρους νευρώνες (Σχήμα 1.21). Πολλοί ασθενείς με παραλυτική πολιομυελίτιδα ανένησαν πλήρως με τις μυϊκές λειτουργίες να

έχουν επανέλθει σε κάποιο βαθμό. Ωστόσο σε περιπτώσεις που η παράλυση εμμένει παραπάνω από 12 μήνες αφήνει μόνιμες αναπηρίες.



Σχήμα 1.21 Η καταστροφή ενός νευρώνα (μαύρο) και η νεύρωση του μυός από παράπλευρο νευρώνα (λευκό). Καταστροφή αυτών των κλάδων αργότερα οδηγεί στο σύνδρομο post polio.

Η παραλυτική πολιομυελίτιδα χωρίζεται σε τρεις τύπους ανάλογα με την προέλευση της παράλυσης. Η νωτιαία παράλυση (spinal polio) είναι η πιο συχνή και αποτελούσε το 79% των παραλυτικών περιπτώσεων από το 1969 μέχρι το 1979. Χαρακτηρίζεται κυρίως από ασύμμετρη παράλυση και στις περισσότερες περιπτώσεις εμπλέκει τα κάτω άκρα. Η βολβοειδής πολιομυελίτιδα (bulbar polio) εμφανίζεται στο 2% των περιπτώσεων και οδηγεί σε αδυναμία των μυών που νευρώνονται από εγκεφαλικά νεύρα. Η τρίτη περίπτωση συνδυάζει τις δύο παραπάνω και ονομάζεται βολβονωτιαία πολιομυελίτιδα (bulbospinal polio) και εμφανίζεται στο 19% των περιπτώσεων. Η θνησιμότητα από την παραλυτική πολιομυελίτιδα είναι 2 – 5% στα παιδιά και 15 – 30% στους ενήλικες (αυξάνεται με την ηλικία). Παρόμοια συμπτώματα με την παραλυτική πολιομυελίτιδα (ψευδοπολιομυελίτιδα) από πολιοϊούς έχουν παρατηρηθεί και από άλλους ιούς όπως ο εντεροϊός 71 (da Silva E.E. et al., 1996) και ο Echo ιός 7 (Rakoto Andrianarivelo M. Et al., 2000).

## 1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Δεν υπάρχει επί του παρόντος διαθέσιμη θεραπεία για τις λοιμώξεις από εντεροϊούς. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα μιας ποικιλίας φαρμάκων *in vitro* καθώς και *in vivo* ενώ είναι σε εξέλιξη διάφορες κλινικές δοκιμές. Η ιντερφερόνη, ως αντικό φάρμακο, δρα στα πρώιμα στάδια του κύκλου ζωής του ιού και έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα της α- και β-ιντερφερόνης σε *in vitro* λοιμώξεις από τον ιό Coxsackie A24 (Langford et al., 1988). Ανοσοσφαιρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος από εντεροϊούς σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Άλλα αντικά φάρμακα έχουν συντεθεί για να στοχεύουν τις πρωτεΐνες των εντεροϊών. Τα σκευάσματα WIN, που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην αντιμετώπιση των ρινοϊών, συγκεντρώνουν τη μεγαλύτερη προσοχή. Τα σκευάσματα αυτά προσδένονται στην υδρόφοβη αύλακα του ιού, παρεμβαίνοντας στο ξεδίπλωμα του και/ή την προσρόφηση, όπως ήδη αναφέρθηκε. Η λήψη του WIN 54954 από το στόμα μείωσε σημαντικά τον ιικό τίτλο και τα επακόλουθα συμπτώματα μετά από λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, από τον ιό Coxsackie A21 (Schiff et al., 1992). Το Pleconaril ή VP 63843 είναι ένα πιο πρόσφατο τύπου WIN σκεύασμα, το οποίο συσσωματώνεται στην υδρόφοβη αύλακα του ιικού καψιδίου και επηρεάζει την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα, αναστέλλοντας την ιική αντιγραφή. Σημαντική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί κατά τη χρήση του σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα (Rotbart et al., 1998) και σε γαστρεντερική λοίμωξη βρεφών με οξεία υποκλινική ανοσοανεπάρκεια (Nowak-Wegrzyn et al., 2001) έναντι των ιών Echo 11 και Coxsackie A21 (Schiff and Sherwood, 2000). Το Enviroxime είναι ένα άλλο αντικό φάρμακο που στοχεύει στη μη δομική πρωτεΐνη 3A και εμποδίζει τη σύνθεση της θετικής πολικότητας αλυσίδας του ιικού RNA. Το φάρμακο αυτό είναι τοξικό για τον άνθρωπο (Diana and Pevear, 1997).

### 1.6.1. Εμβόλια έναντι των πολιοϊών

Οι μολύνσεις από πολιοϊούς συμβαίνουν συνήθως το καλοκαίρι και το φθινόπωρο σε εύκρατες περιοχές και όλο το χρόνο στις τροπικές. Πέραν του



κλίματος οι άσχημες συνθήκες υγιεινής και η πληθυσμιακή πυκνότητα συμβάλουν στην μετάδοση των πολιοϊών.

Οι πρώτες προσπάθειες αντιμετώπισης της ασθένειας ήταν το 1955 με την ανακάλυψη του “νεκρού” εμβολίου (Inactivated Poliovirus Vaccine -IPV) το οποίο περιείχε αδρανοποιημένα ιϊκά σωματίδια άγριου τύπου και των τριών τύπων των πολιοϊών. Η αδρανοποίηση γίνεται με τη χρήση φορμαλδεΐδης. Τα άγρια στελέχη Mahoney-τύπος 1,MEF-1- τύπος 2 και Sauckett -τύπος 3 αναπτύσσονται σε κυτταρικές σειρές νεφρών πράσινου πιθήκου (green monkey kidney cells GMK,T-Vero cells) και εν συνεχεία οι αντιγονικές τους θέσεις τροποποιούνται με φορμαλδεΐδη. Παρά την τροποποίηση αυτές παραμένουν λειτουργικές με αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσίας στον εμβολιασμένο αποτρέποντας την προσβολή του ΚΝΣ από τον ιό. Το IPV είναι επιπλέον ασφαλές και κατάλληλο ακόμα και για ανοσοκατεσταλμένους. Μειονεκτήματα του είναι η ακριβή τιμή και η ανικανότητα πρόκλησης ανοσίας στην περιοχή του εντέρου όπου και πολλαπλασιάζεται ο ιός. Έτσι ο εμβολιασμένος δεν διατρέχει κίνδυνο ασθένειας από πολιοϊό, αλλά είναι φορέας αυτού στην περιοχή του εντέρου για μεγάλο χρονικό διάστημα με αύξηση έτσι της πιθανότητας μετάδοσης του ιού σε μη εμβολιασμένα άτομα.

Εν συνεχεία παρασκευάστηκε το ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο (Oral Poliovirus Vaccine- OPV) το οποίο αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών και των τριών οροτύπων τα στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 και βρίσκονται στο εμβόλιο σε αναλογία 10:1:3 αντίστοιχα. Τα στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 προέρχονται από τα αντίστοιχα νευρομολυσματικά LS-c, P712 και Leon 12 τα οποία απώλεσαν τη νευρομολυσματικότητα τους ύστερα από πολλαπλά περάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες, έχοντας με αυτό τον τρόπο συσσωρευθεί μεταλλαγές που σχετίζονται με τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (Kew et al.,2005). Το εμβόλιο χορηγείται από το στόμα και πολλαπλασιάζεται στο φάρυγγα και στο γαστρεντερικό σωλήνα χωρίς να προσβάλλουν το ΚΝΣ. Τα στελέχη τύπου Sabin δημιουργούν χυμική ανοσία με τη παραγωγή αντισωμάτων έναντι και των τριών οροτύπων του ιού καθώς επίσης και την επιθηλιακή άνοση απόκριση που περιλαμβάνει

παραγωγή ιντερφερόνης και IgA αντισωμάτων ειδικών για τον ιό κατά μήκος του επιθηλίου του φάρυγγα και του γαστρεντερικού σωλήνα.

Αντίθετα με το IPV το OPV είναι φθηνό, και προκαλεί ισχυρότερη ανοσοποίηση όχι μόνο στον εμβολιασμένο αλλά και σε μη εμβολιασμένα άτομα λόγω της έκκρισής του στο περιβάλλον. Είναι επίσης αρκετά ασφαλές. Αν και η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.) το 1988 ενεργοποίησε το πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας επιλέγοντας το OPV για την εξάλειψη των αγρίων στελεχών πολιοϊών παγκοσμίως, λόγω της ισχυρής άνοσης απόκρισης και του χαμηλού κόστους, με θεαματικά αποτελέσματα. Από τα 350.000 περιστατικά το 1988 τα περιστατικά μειώθηκαν σε 1874 το 2006. Όμως η γενετική αστάθειά του εμβολίου μπορεί να οδηγήσει στη πρόκληση επιδημιών από κυκλοφορούντα στελέχη πολιοϊών (Circulating Vaccine Derived Poliovirus), εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική παράλυση (Vaccine associated Paralytic Poliomyelitis) και χρόνιες μολύνσεις ατόμων με σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας (Kew et al.,2005).

Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να σημειωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα στελέχη Sabin του OPV οι οποίες σχετίζονται με αναστροφή του εξασθενημένου φαινοτύπου τους και οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της νευρομολυσματικότητάς τους με πιθανότητα πρόκλησης εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (vaccine associated paralytic poliomyelitis -VAPP). Ένα στέλεχος πολιοϊού θεωρείται ως εμβολιακό OPV (Vaccine Derived Polio Virus-VDPV) όταν φέρει απόκλιση  $\geq 1\%$  στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής του αντίστοιχου προτύπου OPV στελέχους. Τα VDPVs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: στα iVDPV που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια, τα κυκλοφορούντα cVDPV τα οποία έχουν αυξημένη δυνατότητα μετάδοσης και πρόκλησης πολιομυελίτιδας και τα aVDPV τα οποία απομονώνονται είτε από το περιβάλλον είτε από μη ανοσοανεπαρκείς ασθενείς χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η προέλευση τους.

## 1.7 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η εξέλιξη των πολιοϊών και γενικότερα των εντεροϊών, ως πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της εμφάνισης νέων μεταδοτικών ασθενειών (Lukashev et al., 2003b, Lukashev et al., 2004) αλλά και της επανεμφάνισης παλαιότερων (Palacios et al., 2002, Thoelen et al., 2003) από τα σύγχρονα κυκλοφορούντα στελέχη, βρίσκονται στο επίκεντρο των σύγχρονων μελετών. Κατά συνέπεια ο μηχανισμός, η έκταση και οι συνέπειες του γρήγορου ρυθμού μεταλλαξογένεσης και ανασυνδυασμού των ιών αυτών αναλύονται συνεχώς.

### 1.7.1. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥΣ

#### 1.7.1.1. Οι μεταλλάξεις στους πολιοϊούς

Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των πολιοϊών οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λαθών της ιϊκής RNA πολυμεράσης (3D<sup>pol</sup>) και στην απουσία μηχανισμού ελέγχου πιστότητας της αντιγραφής. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι εκείνες, που κωδικοποιούν για τις καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3, και κυρίως τα τμήματα αυτών που εκτίθενται στην ιική επιφάνεια. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1, περιέχει, όπως προαναφέρθηκε, τις κυριότερες αντιγονικές θέσεις και κατά συνέπεια δέχεται την μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή.

Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των λεγόμενων «quasi-species» (σχεδόν είδος) δηλαδή μεγάλων πληθυσμών ιών που περιλαμβάνουν διαφορετικούς γονοτύπους. Κύριο χαρακτηριστικό ενός «quasi-species» αποτελεί το γεγονός, ότι τα μέλη, που το αποτελούν, δεν διαθέτουν μία μοναδική αλλά μία κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων

(Domingo et al., 1985). Υπάρχουν κυρίως δύο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων και επομένως των quasi-species, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Gavrillin et al., 2000).

### 1.7.1.2. Ο ανασυνδυασμός στους πολιοϊούς

Οι πολιοϊοί ήταν οι πρώτοι RNA ιοί στους οποίους παρατηρήθηκε ανταλλαγή γενετικού υλικού. Η πρώτη αναφορά ανασυνδυασμένων πολιοϊών έγινε το 1962 από τον Hirst, με τη βοήθεια δύο στελεχών πολιοϊού τύπου 1 με δύο ξεχωριστούς γενετικούς δείκτες. Τα ανασυνδυασμένα στελέχη είχαν και τους δύο γενετικούς δείκτες μαζί (Hirst G., 1962). Η επόμενη αναφορά ανασυνδυασμού σε μη Picorna RNA ιούς ήταν πολλά χρόνια αργότερα το 1985 για τον Murine hepatitis virus 8 (Coronavirus) (Aaziz R. and Terper M., 1999). Ο καλύτερος τρόπος αναζήτησης ανασυνδυασμένων πολιοϊών είναι η μελέτη των περιπτώσεων VAPP και ο χαρακτηρισμός των υπεύθυνων στελεχών αφού όπως αναφέρθηκε προηγούμενα ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων VAPP (>50%) σχετίζεται με ανασυνδυασμένους πολιοϊούς.

## 1.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ

### 1.8.1 Ανασυνδυασμοί πολιοϊών *in vivo*

Οι ανασυνδυασμοί φαίνεται να είναι ένα συχνό φαινόμενο στο έντερο των δεκτών του OPV. Το OPV περιέχει και τους τρεις ορότυπους (Sabin 1, 2 και 3) με αποτέλεσμα να ευνοεί την ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου από διάφορους συνδυασμούς των τριών οροτύπων. Από την Cuervo N. S. et al προσδιορίστηκε η συχνότητα εμφάνισης ανασυνδυασμένων στελεχών στα κόπρανα υγιών εμβολιασμένων ατόμων μέσα σε 60 ημέρες μετά τη χορήγηση του OPV. Τα ποσοστά φαίνεται να εξαρτώνται από τον ορότυπο. Υπολογίστηκε πως το 79% των στελεχών τύπου 3 Sabin ήταν ανασυνδυασμένα. Τα αντίστοιχα τύπου 2 ήταν 53% και τα τύπου 1 μόλις 2%. Αυτό βέβαια δε σημαίνει πως ο τύπος 1 δεν συμμετέχει στους ανασυνδυασμούς αφού τμήματά του εμφανίζονται πολύ συχνά σε άλλους οροτύπους κυρίως Sabin 2. Σημαίνει όμως πως το 5' τμήμα του γονιδιώματος του Sabin 1 "συνεργάζεται" πολύ δύσκολα με τα 3' τμήματα των Sabin 2 και 3 στελεχών ή πως ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται ο ανασυνδυασμός δεν

ευνοεί την παραγωγή ενός τέτοιου ανασυνδυασμένου στελέχους (Cuervo N.S., 2001).

Ένα θέμα που έχει συζητηθεί όσον αφορά την παραγωγή των ανασυνδυασμένων ιών είναι το αν αυτά παράγονται στο εντερικό επιθήλιο των εμβολιασμένων. Η πιθανότητα να υπήρχαν μέσα στο εμβόλιο τα ανασυνδυασμένα στελέχη είναι σχεδόν απίθανο αφού τα στελέχη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του OPV παράγονται από καθαρούς κλώνους στελεχών. Η παραγωγή τους γίνεται ξεχωριστά και ελέγχονται για την ποιότητά τους (Sabin A. B., 1973).

Έχουν παρατηρηθεί όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των οροτύπων Sabin σε ανασυνδυασμένα στελέχη. Ωστόσο υπάρχει σημαντική διαφορά στα ποσοστά εμφάνισης του κάθε τύπου ανασυνδυασμού. Πολύ σπάνιοι, όπως είπαμε, είναι οι ανασυνδυασμοί S1/S2 και S1/S3. Οι πιο συχνοί ανασυνδυασμοί είναι οι S2/S1 και S3/S2, Αυτοί οι ανασυνδυασμοί είναι συχνοί σε υγιείς εμβολιασμένους (Cuervo N. S. et al., 2001) αλλά και σε περιπτώσεις VAPP (Guillot S et al., 2000). Αυτό ίσως εξηγείται μερικώς με τη χρονική σειρά με την οποία εκκρίνονται οι τρεις ορότυποι. Αρχικά εκκρίνεται ο ορότυπος 1, μετά ο ορότυπος 2 και τελικά ο ορότυπος 3 (Cuervo N.S. et al .,2001). Εκτός από τους απλούς ανασυνδυασμούς έχουν παρατηρηθεί και πολλαπλοί ανασυνδυασμοί κυρίως με την συμμετοχή του ορότυπου 3. Και σε αυτούς εκδηλώνεται μια προτίμηση στη σειρά με την οποία ανασυνδυάζονται. Πιο συχνοί είναι οι τριπλοί ανασυνδυασμοί S3/S2/S3 (Cuervo N.S. et al .,2001,Blomqvist et al, 2003) και S3/S2/S1 (Martin J. et al., 2002, Cuervo N.S. et al .,2001).

Όσον αφορά τις θέσεις των ανασυνδυασμών φαίνεται να είναι διάσπαρτες κυρίως στην γενωμική περιοχή των λειτουργικών πρωτεϊνών του ιού και σπάνια συναντώνται στην γενωμική περιοχή των καψιδιακών πρωτεϊνών. Στελέχη με ανασυνδυασμούς στην 5'UTR και στην 3'UTR δεν έχουν μέχρι τώρα απομονωθεί από υγιείς εμβολιασμένους ή περιπτώσεις VAPP.

Οι περισσότεροι ανασυνδυασμοί του Sabin τύπου 2 εντοπίζονται στην P3 περιοχή και ιδιαίτερα στην περιοχή της 3D πολυμεράσης (Cuervo N.S. et al .,2001,Georgopoulou A and Markoulatos ., 2001).

Οι περισσότεροι ανασυνδυασμοί του Sabin τύπου 3 εντοπίζονται στην P2 περιοχή και κυρίως στην 2C. Φαίνεται λοιπόν πως εκδηλώνεται μια προτίμηση σε κάποιες συγκεκριμένες θέσεις ανάλογα με την προέλευση του 5' και του 3' τμήματος της θέσης ανασυνδυασμού. Τέτοια προτίμηση εκδηλώνεται και σε πιο σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμών όπως είναι ο ανασυνδυασμός S1/S3 ο οποίος εντοπίζεται στην περιοχή 5672 –6169 (Driesel G et al., 1995, Georgescu et al., 1997, Cuervo N.S. et al., 2001).

Η εμφάνιση ανασυνδυασμού στην καψιδική περιοχή του γονιδιώματος (VP4-VP2-VP3-VP1) είναι πολύ σπάνια και υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για τέτοια φυσικά ανασυνδυασμένα στελέχη. Ένας προφανής λόγος είναι η μικρότερη, σε σχέση με το τμήμα των λειτουργικών πρωτεϊνών, ομολογία μεταξύ των καψιδικών περιοχών των τριών οροτύπων, η οποία και εξελίσσεται κάτω από την ανοσοολογική πίεση, πάντα όμως μέσα στα πλαίσια της διατήρησης ενός βιώσιμου στελέχους (Muir P. et al., 1998). Οι μόνες θέσεις ανασυνδυασμού που έχουν παρατηρηθεί σε φυσικά ανασυνδυασμένα στελέχη είναι στα άκρα της καψιδικής περιοχής. Μια τέτοια θέση εντοπίζεται στο 3' άκρο της VP1 περιοχής (Martin J. et al., 2002, Blomqvist et al., 2003). Σημαντικό είναι πως και στις δύο ανωτέρω αναφορές ο ανασυνδυασμός ήταν τύπου S3/S2. Στο ανασυνδυασμένο στέλεχος των Blomqvist et al. στην VP1 του Sabin 3 υπήρχαν 6 αμινοξέα από το Sabin 2. Η δεύτερη περιοχή στην οποία έχει παρατηρηθεί ανασυνδυασμός στο καψιδικό τμήμα του γονιδιώματος είναι αυτή της VP4. Ωστόσο αυτή έχει παρατηρηθεί σε ανασυνδυασμό μεταξύ άγριου και εμβολιακού στελέχους (Georgescu M. M. et al., 1995). Έχουν γίνει προσπάθειες δημιουργίας *in vitro* ανασυνδυασμένων πολιοϊών στην P1 περιοχή οι οποίες κατέληξαν σε μη βιώσιμα στελέχη ή σε στελέχη με μικρή ικανότητα πολλαπλασιασμού (Stanway G. et al., 1986, Kohara et al., 1985). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως είναι απαραίτητη η ακεραιότητα των καψιδικών πρωτεϊνών του κάθε οροτύπου για τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του ιού. Όλες οι VP πρωτεΐνες συμβάλλουν στην δημιουργία της θέσης δέσμευσης με τον υποδοχέα και έχουν εξελιχθεί παράλληλα σε κάθε ορότυπο, ώστε οι ανασυνδυασμοί να δημιουργούν συνδυασμούς που δεν είναι κατά κανόνα βιώσιμοι. Έτσι είναι σπάνιος ο εντοπισμός φυσικών ανασυνδυασμών σε πιο κεντρικές περιοχές

των καψιδικών πρωτεϊνών. Χιμαιρικά στελέχη με ακέραια την P1 περιοχή και τις άλλες περιοχές προερχόμενες από διαφορετικό ορότυπο, έχουν προταθεί ως υποψήφια στελέχη εμβολίου (Kohara et al., 1988, Nomoto A et al., 1993, Gromeier M., 1996)

Η μελέτη των ανασυνδυασμών των πολιοϊών γίνεται με μεγαλύτερη ευκολία σε στελέχη Sabin αφού η δημιουργία τους ευνοείται μετά τη χορήγηση του OPV. Ωστόσο ανασυνδυασμοί έχουν παρατηρηθεί και μεταξύ στελεχών εμβολίου με άγρια στελέχη πολιοϊών και πιθανώς με στελέχη άλλων εντεροϊών (Rico-Herse R. Et al., 1987, Georgescu et al., 1995, Guillot S. Et al., 2000, Dahourou G et al., 2002, Kew O., et al., 2002). Τέτοια στελέχη έχουν απομονωθεί σε περιπτώσεις VAPP και σύμφωνα με τη Furione et al περίπου το 6% των στελεχών από VAPP έχουν κάποιο μη εμβολιακό τμήμα στο γονιδίωμά τους (Furione et al., 1993). Η εμφάνιση ενός ανασυνδυασμένου στελέχους με γενωμικά τμήματα από εμβολιακό στέλεχος και στέλεχος άγριου πολιοϊού πιστεύεται πως προκύπτει κατά την ταυτόχρονη αντιγραφή μέσα στο έντερο ενός εμβολιασμένου, ή ενός ατόμου που ήρθε σε επαφή με μολυσμένα εκκρίματα ενός εμβολιασμένου και ενός άγριου στελέχους πολιοϊού που κυκλοφορεί στην περιοχή. Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις ανασυνδυασμού ο δότης—άγριο στέλεχος δεν μπόρεσε να εντοπιστεί. Σε ένα κρούσμα VAPP που παρουσιάστηκε στην Ρουμανία ο δότης εντοπίστηκε και ήταν ένα άγριο στέλεχος πολιοϊού τύπου 1 που κυκλοφορούσε σε μια πολύ περιορισμένη περιοχή (Guillot et al., 2000). Άλλη μια παρόμοια περίπτωση με αναγνωρισμένο το δότη εμφανίστηκε στην Κίνα (Li J et al. 1996). Μια ενδιαφέρουσα περίπτωση ανασυνδυασμού εμβολιακού με άγριο στέλεχος παρουσιάστηκε από την Georgescu et al . το 1995, το οποίο είχε μια ακέραιη καψιδική περιοχή Sabin 2 ανάμεσα σε δύο περιοχές μη εμβολιακού στελέχους και απομονώθηκε από ένα θανατηφόρο περιστατικό VAPP. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την αναγκαιότητα της ακέραιης καψιδικής περιοχής για έναν αποδοτικό πολλαπλασιασμό του ιού (Georgescu et al., 1995).

Μια σημαντική παράμετρος των ανασυνδυασμένων στελεχών που τέθηκε από την Guillot et al., το 2000 είναι ο προσδιορισμός της νευρομολυσματικότητας

τους σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Τα ανασυνδυασμένα στελέχη προκαλούσαν παράλυση στο 50 – 67% των εμβολιασθέντων διαγονιδιακών ποντικών σε αντιδιαστολή με τα άγρια στελέχη που η νευρομολυσματικότητα τους προσδιορίστηκε στο 80 – 100%. Αυτό σημαίνει πως οι ανασυνδυασμοί και οι μεταλλαγές τις οποίες έφεραν δεν ήταν ικανές να προσδώσουν τον φαινότυπο που έχει ένα άγριο στέλεχος πολιοϊού. Ωστόσο η ασθένεια την οποία προκαλούν τα ανασυνδυασμένα Sabin/άγρια στελέχη δεν μπορεί να ξεχωρίσει από αυτή που προκαλούν τα αμιγώς άγρια στελέχη.

Η παραγωγή Sabin/αγρίων στελεχών είναι αρκετά εύκολη δεδομένης της υψηλής συγγένειας που έχουν τα εμβολιακά με τα άγρια στελέχη πολιοϊών. Ανασυνδυασμοί μεταξύ πολιοϊών και στελεχών άλλων εντεροϊών πρέπει να είναι μάλλον σπάνιοι. Ωστόσο υπάρχουν αναφορές σε ανασυνδυασμένα στελέχη στα οποία ο μη εμβολιακός δότης δεν έχει εντοπισθεί μεταξύ των αγρίων πολιοϊών (Dahourou G., 2002). Η κυκλοφορία ανασυνδυασμένων στελεχών εμβολίου με άγρια στελέχη μπορεί, στη συνέχεια, να ακολουθείται από επιπρόσθετα γεγονότα ανασυνδυασμού (Liu et al., 2003). Μια σημαντική περίπτωση τέτοιου τύπου ήταν η έξαρση πολιομυελίτιδας στην Αϊτή και τη Δομινικανή Δημοκρατία την περίοδο 2000-2001. Ένα στέλεχος Sabin τύπου 1 ανασυνδυάστηκε με τουλάχιστο τέσσερις εντεροϊούς στην μη δομική περιοχή του γενώματός τους. Τα τέσσερα ανασυνδυασμένα στελέχη που κυκλοφόρησαν και προκάλεσαν την έξαρση ήταν S1/C1 S1/C1/ C2/? S1/C1/C3 S1/C1/C4 όπου C1,C2,C3 και C4 τα τέσσερα στελέχη μη πόλιο εντεροϊών. Τα στελέχη αυτά εντοπίστηκαν στην ομάδα C των εντεροϊών στην οποία εντάσσονται 11 ορότυποι Cocksackie A (Kew O. et al., 2002). Σε πολλές από τις περιπτώσεις, όπου ο δότης γενετικού υλικού δεν έχει εντοπιστεί, έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι μπορεί, αυτός, να αποτελεί μέλος της ομάδας C των εντεροϊών (HEV-C) (Guillot et al., 2000, Liu et al., 2003). Μία τέτοια υπόθεση δεν έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί, αφού οι αλληλουχίες μεγάλου αριθμού αγρίων στελεχών εντεροϊών δεν έχουν ακόμη καθοριστεί και κατατεθεί σε κάποια γονιδιακή τράπεζα ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση μαζί τους. Ωστόσο, πρόσφατες φυλογενετικές έρευνες υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση (Liu et al., 2003). Έχει,



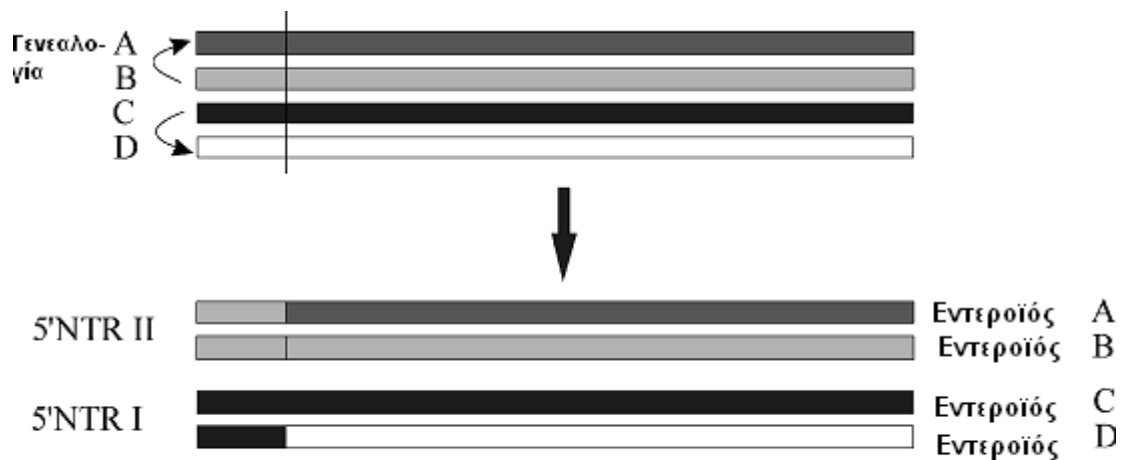
μάλιστα, εντοπισθεί ένα στέλεχος Sabin 1, το οποίο παρουσίασε στη μη δομική περιοχή του γονιδιώματός του, ανασυνδυασμό με κάποιους μη-πόλιο εντεροϊούς της ομάδας C, με πιο πιθανά, τα στελέχη Coxsackie A21 και A24 (Kew et al., 2002).

Η ανίχνευση ανασυνδυασμένων στελεχών πολιοϊών είναι σχετικά απλή, λόγω της ύπαρξης μόνο τριών διαφορετικών οροτύπων, γεγονός, το οποίο καθιστά δυνατή τη χρήση των τεχνικών της PCR και της RFLP για τη σάρωση του γονιδιώματος ενός μεγάλου αριθμού κλινικών δειγμάτων, με σχετικά χαμηλό κόστος. Αυτή η προσέγγιση, ωστόσο, περιορίζεται από την αδυναμία ανίχνευσης ανασυνδυασμών σε θέσεις, οι οποίες δεν περιλαμβάνονται σε καθορισμένες θέσεις (Cherkasova et al., 2003).

### 1.8.2. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΗ - ΠΟΛΙΟ - ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ

Μέχρι πρόσφατα, ο ανασυνδυασμός στους εντεροϊούς παρουσίαζε μικρό ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα να έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες μελέτες γύρω από το αντικείμενο της επιδημιολογίας και της πλήρους ανάλυσης της πρωτοταγούς τους διάταξης. Σήμερα, ωστόσο, εξαιτίας του γεγονότος, ότι η εξάλειψη των αγρίων στελεχών πολιοϊών φαίνεται εφικτή, ένα μεγάλο μέρος των επιστημονικών ερευνών έχει στραφεί προς τους εντεροϊούς. Οι πρώτες ενδείξεις ανασυνδυασμού στους ιούς αυτούς προέρχονται από μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν γύρω από την πλήρη αλληλουχία ενός μέλους του είδους HEV-C των εντεροϊών, του στελέχους Coxsackie A21, το οποίο παρουσίαζε, στο μη δομικό γονιδίωμα, μεγάλη ομολογία με τους πολιοϊούς (Hughes et al., 1989). Στη συγκεκριμένη μελέτη η πρωταρχική θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε μεταξύ των 2C και 3C γενετικών περιοχών, χωρίς, ωστόσο, να ακολουθήσει κάποια φυλογενετική ανάλυση του στελέχους, η οποία θα ήταν ικανή να αποδείξει την υπόθεση αυτή. Κατά ανάλογο τρόπο, υποστηρίχθηκε, ότι το πρότυπο στέλεχος Hill (Echo 9) είναι ανασυνδυασμένο στέλεχος των προτύπων στελεχών Metcalf (Echo 18) και Barty (Echo 9) (Andersson et al., 2002).

Μία πρώτη προσπάθεια εκτίμησης του ανασυνδυασμού σε ολόκληρο το γονιδίωμα των εντεροϊών πραγματοποιήθηκε το 1999 (Santti et al., 1999). Η ανάλυση όλων των διαθέσιμων, μέχρι τότε, αλληλουχιών (34 αλληλουχίες, οι οποίες αντιπροσώπευαν 24 οροτύπους εντεροϊών) απέδειξε, ότι έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός κατά την μακροεξελικτική ιστορία του γένους των εντεροϊών. Ως αποτέλεσμα αυτού του ανασυνδυασμού, τα μέλη των ειδών HEV-A και HEV-B των εντεροϊών διαθέτουν 5' μη κωδική περιοχή τύπου II (IRES), ενώ τα μέλη των ειδών HEV-C και HEV-D μοιράζονται παρόμοια 5' μη κωδική περιοχή, τύπου I (IRES), η οποία είναι διαφορετική από την προαναφερόμενη βλέπε Σχήμα 1.13. Στο Σχήμα 1.22 παρουσιάζονται τα προτεινόμενα γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' μη κωδικής περιοχής και του υπόλοιπου γονιδιώματος.



Σχήμα 1.22 Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων γεγονότων ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' μη κωδικής περιοχής και του υπόλοιπου γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των εντεροϊών. Η αναπαράσταση αυτή μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη των γνωστών μέχρι σήμερα υποομάδων εντεροϊών. Ανατύπωση από Santti et al., 1999.

Αργότερα, πραγματοποιήθηκαν συστηματικές αναλύσεις των γενετικών αλληλουχιών όλων των προτύπων στελεχών των ειδών HEV-B και HEV-C των εντεροϊών. Η σύγκριση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών του είδους HEV-C απέδειξε, ότι έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός εντός καθώς και μεταξύ των μελών του είδους HEV-C και του είδους των πολιοϊών (Brown et al., 2003). Αυτά τα αποτελέσματα συνιστούν πιθανή απόδειξη της θεωρίας, που υποστηρίζει, ότι ο διαχωρισμός των πολιοϊών σε ένα διαφορετικό είδος από εκείνο των εντεροϊών είναι μάλλον βεβιασμένος. Επιπρόσθετα, στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε μία προφανής απουσία ανασυνδυασμού μεταξύ των στελεχών CAV1, CAV19, CAV22 και άλλων μελών του είδους HEV-C. Οι ιοί αυτοί διαφέρουν από τους υπόλοιπους εντεροϊούς, εξαιτίας της αδυναμίας, που παρουσιάζουν, να αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες, πιθανώς λόγω του ότι χρησιμοποιούν κάποιο διαφορετικό κυτταρικό υποδοχέα. Επομένως, αυτή η παρατήρηση παρέχει ένα παράδειγμα της επίδρασης, που μπορεί να έχουν τα βιολογικά όρια στην πιθανότητα πραγματοποίησης αλλά και επικράτησης ενός γεγονότος ανασυνδυασμού.

### 1.9 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ

Η πρώτη γενετική απόδειξη των ανασυνδυασμών έγινε από τον Hirst το 1962. Από τότε έχουν μελετηθεί γενετικά με τη χρήση διαφόρων δεικτών, όπως η ευαισθησία ή η ανθεκτικότητα σε HCl- γουανιδίνη, που εντοπίζεται στην περιοχή της 2C και σε διάφορες θέσεις θερμοευαισθησίας σε όλο το γονιδίωμα (Hirst G., 1962, Cooper P., 1968). Ωστόσο η βιοχημική απόδειξη των ανασυνδυασμών ήρθε αργότερα από τους Romanova και Tolskaya με μερική πρωτεόλυση και ισοηλεκτρική εστίαση δείχνοντας πως τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που κωδικοποιούσαν οι προγονικοί ιοί διασταυρώνονταν στα ανασυνδυασμένα απογονικά στελέχη (Romanova, 1980, Tolskaya, 1983). Ακόμα πιο άμεση απόδειξη του ανασυνδυασμού έδωσαν πειράματα αποτόπωσης δύο διαστάσεων ολιγονουκλεοτιδίων μετά από δράση TI

RNάσης και μερικής αλληλούχισης. (Agol V. I., 1984, 1985). Η τελική απόδειξη των ανασυνδυασμών αλλά και η έναρξη της μελέτης του μηχανισμού τους έγινε με τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς αλληλουχίας των θέσεων ανασυνδυασμού (Kirkegaard K. and Baltimore D., 1986).

### 1.9. 1 Μηχανισμός αλλαγής μήτρας

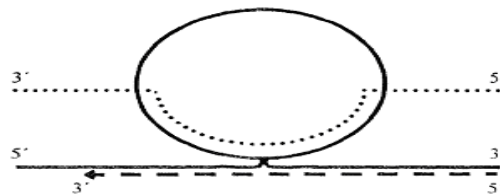
Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς που έχουν προταθεί για τον ανασυνδυασμό είναι ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switching). Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στην ιδέα πως ένα συντιθέμενο RNA πάνω σε μία μήτρα συνεχίζει τη σύνθεσή του χρησιμοποιώντας μία άλλη. Αυτός ο μηχανισμός ανασυνδυασμού ονομάζεται και αντιγραφικός αφού εξαρτάται από τον πολυμερισμό και τη δράση της 3D πολυμεράσης. Μια από τις πιο σημαντικές παρατηρήσεις και ίσως η σημαντικότερη που υποστηρίζει αυτό το μηχανισμό είναι αυτή των Arnold και Cameron οι οποίοι απέδειξαν *in vitro* πως η 3D πολυμεράση είναι ικανή από μόνη της να προάγει την αλλαγή μήτρας και τον ανασυνδυασμό (Arnold J.J. and Cameron C. E., 1999).

Ο ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου γίνεται κατά την σύνθεση του αρνητικής πολικότητας (-) RNA. Αυτό φαίνεται από μια σειρά παρατηρήσεις, η πιο σημαντική από τις οποίες προέκυψε από τη μελέτη των Kirkegaard και Baltimore (Cell, 1986). Χρησιμοποίησαν δύο στελέχη με αδυναμία να πολλαπλασιαστούν το ένα στους 39°C και το άλλο παρουσία γουανιδίνης - HCl, ψάχνοντας δηλαδή για στελέχη που έχουν ανθεκτικότητα και στις δύο περιοριστικές αυτές συνθήκες. Μετά από ταυτόχρονη μόλυνση παρουσία HCL- γουανιδίνης δεν εμφανίστηκαν ανασυνδυασμοί, ενώ στους 39 °C οι συχνότητες ανασυνδυασμών ήταν οι φυσιολογικές. Γνωρίζοντας τον εντοπισμό πάνω στο γονιδίωμα των δύο δεικτών φαίνεται πως ο ανασυνδυασμός γίνεται κατά τη σύνθεση του (-) RNA. Η παραπάνω μελέτη αποτελεί και μια πρώτη γενετική απόδειξη της ύπαρξης του αντιγραφικού ανασυνδυασμού (Kirkegaard and Baltimore, 1986). Μια άλλη παρατήρηση που ευνοεί την υπόθεση του ανασυνδυασμού κατά τη σύνθεση του (-) RNA είναι αυτή των Charini et al. οι οποίοι ανέφεραν την παρεμβολή 15 νουκλεοτιδίων

ριβοσωμικής προέλευσης στο γονιδίωμα ενός πολιοιού. Τα 15 νουκλεοτίδια είχαν την αλληλουχία του 28S rRNA και όχι τη συμπληρωματική της, που σημαίνει ότι η αλλαγή μήτρας έγινε κατά την (-)RNA σύνθεση (Charini et al. 1994).

Μια από τις πρώτες θεωρίες ήταν αυτή των Kuge et al. ο οποίος πρότεινε πως οι δύο αλληλουχίες δότες (5' δότης και 3' δότης) έρχονται σε επαφή και συνδέονται με ένα τρίτο μόριο το οποίο έχει μία θέση με καλή συμπληρωματικότητα για τον 3' δότη που να ακολουθείται από μια αντιστοιχη θέση για τον 5' δότη. Έτσι η 3D πολυμεράση δεν είναι αναγκασμένη να αποκολληθεί αλλά θα συνεχίσει να πολυμερίζει πάνω στο άλλο μόριο στο σημείο ανάμεσα στις δύο θέσεις υβριδισμού με το τρίτο μόριο. Το μοντέλο αρχικά προτάθηκε για την εξήγηση του φαινομένου των ελλείψεων αλλά επεκτάθηκε και στους ανασυνδυασμούς. (Kuge et al., 1986)

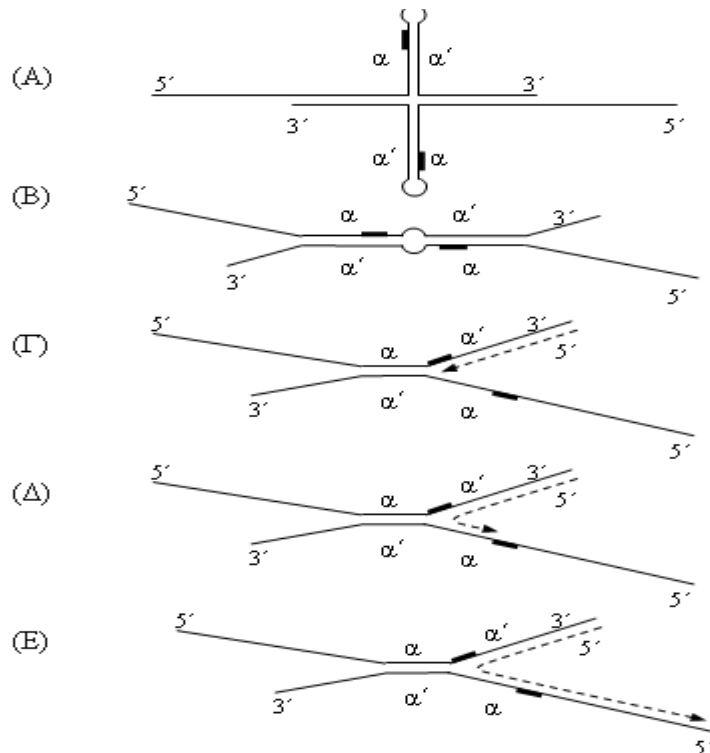
Σχήμα 1.23.



Σχήμα 1.23 Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Kuge. Με τη συνεχή γραμμή αναπαρίσταται το μόριο δότης στην περίπτωση της δημιουργίας έλλειψης. Στον ανασυνδυασμό ο 5' δότης και ο 3' δότης είναι ξεχωριστά μόρια. Με τη σπικτική γραμμή αναπαρίσταται το βοηθητικό μόριο και με τη διακεκομμένη το ανεπτυγμένο ανασυνδυασμένο RNA. Όπως φαίνεται και στο σχήμα δεν χρειάζεται να διαταραχθεί η πορεία της 3D πολυμεράσης (Kuge et al., 1986).

Ένας δεύτερος μηχανισμός ο οποίος προτάθηκε το 1986 από την Romanova et al., λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι οι περισσότεροι ανασυνδυασμοί είναι ομόλογοι. Η Romanova et al., μετά τη μελέτη της πρωτοταγούς δομής των θέσεων ανασυνδυασμού πρότεινε ένα μοντέλο στο οποίο για να γίνει ο ανασυνδυασμός είναι απαραίτητη η παρουσία δύο

αλληλουχιών με αντίστροφη συμπληρωματικότητα οι οποίες ενδέχεται να σχηματίζουν μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας (Σχήμα 1.24 Α). Έτσι δύο όμοια μόρια RNA που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους μπορούν να υβριδοποιηθούν στις θέσεις συμπληρωματικότητας έχοντας αντίστροφο προσανατολισμό (Σχήμα 1.24 Β). Έτσι η πολυμεράση συναντώντας ένα τέτοιο σταθερό σύμπλοκο θα μπορούσε να “εκτροχιαστεί” περνώντας από το ένα μόριο στο άλλο συνεχίζοντας τον πολυμερισμό του άλλου κλώνου RNA, (Σχήμα 1.24 Γ, Δ, Ε), (Romanova et al., 1986).



Σχήμα 1.24 Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romanova et al. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που, χρησιμεύουν ως μήτρες ανασυνδυασμού. Οι δυο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι α και α', ενώ οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις, όπου πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA. Ανατύπωση από Romanova et al., 1986.

Ένα μοντέλο σαν αυτό απαιτεί την παρουσία δύο μορίων RNA σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους κατά την αντιγραφή. Κάτι τέτοιο βέβαια έγινε γνωστό αρκετά αργότερα όταν διαπιστώθηκε πως μερικά σύμπλοκα αντιγραφής μπορούσαν να συγχωνευθούν φτιάχνοντας πιο πολύπλοκα συστήματα με περισσότερα από ένα μόρια RNA (Bolten R. Et al., 1998) και επιπλέον πως σε αυτά προάγεται ο ανασυνδυασμός (Egger D. et al., 2002). Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν το μοντέλο, δεν του προσφέρουν όμως

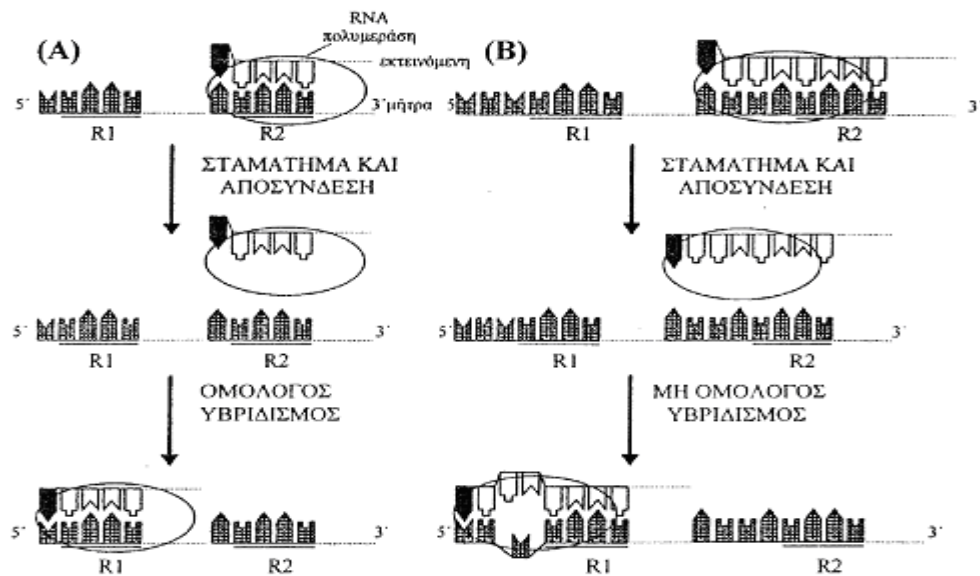
πλεονέκτημα έναντι των άλλων αφού σε όλα τα μοντέλα είναι απαραίτητη η προσέγγιση των μορίων RNA. Ωστόσο εδώ φαίνεται πως τα μεικτά σύμπλοκα αντιγραφής χρειάζονται για τον αντιγραφικό ανασυνδυασμό.

Οι παραπάνω μηχανισμοί παρόλο που έχουν μια συγκροτημένη λογική στερούνται μέχρι σήμερα μια ικανοποιητική πειραματική υποστήριξη. Ο πιο σημαντικός από τους μηχανισμούς αντιγραφικού τύπου που έχουν προταθεί είναι αυτός των Jarvis και Kirkegaard και ο οποίος φαίνεται να επικρατεί από τα πειραματικά δεδομένα. Σύμφωνα με το γενικό κανόνα που διέπει κάθε πρόταση για έναν τέτοιο μηχανισμό η πολυμεράση κατά την σύνθεση του RNA πάνω σε ένα υπόστρωμα σταματά από κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα να αποκολλάται ολόκληρο το συντιθέμενο RNA ή μόνο το 3' άκρο του (γιατί ο πολυμερισμός έχει 5' → 3' κατεύθυνση) με ή χωρίς την 3D πολυμεράση προσδεσμένη και να χρησιμεύει ως εναρκτήριο μόριο για τη συνέχιση του πολυμερισμού του σε μία άλλη μήτρα, ή σε ένα άλλο σημείο της ίδιας μήτρας. Το κεντρικό ερώτημα σε αυτό το γενικό κανόνα είναι το αίτιο που προκαλεί τον “εκτροχιασμό” της 3D πολυμεράσης. Σε αυτό το ερώτημα έχουν επιχειρηθεί να δοθούν πολλές απαντήσεις.

Από τον Philipenko et al. προτάθηκε ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η πρόσδεση της 3D πολυμεράσης διαταράσσεται μετά την προσθήκη, κατά τον πολυμερισμό, ενός λανθασμένου νουκλεοτιδίου (nucleotide misincorporation). Το λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο μπορεί μαζί με μερικά προηγούμενα να υβριδοποιηθούν σε ένα άλλο μόριο RNA και να συνεχίσουν τον πολυμερισμό. Η υβριδοποίηση στο αρχικό μόριο είναι δύσκολη αφού το μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο δεν μπορεί να φτιάξει ζεύγος. Έτσι ευνοείται η πρόσδεση σε ένα άλλο μόριο στο οποίο θα μπορεί να υβριδοποιηθεί το συντιθέμενο RNA πιο αποτελεσματικά, δηλαδή στη θέση της μεταλλαγής θα υπάρχει στη νέα μήτρα το συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο. Ένα τέτοιο σημείο όπως είναι εμφανές δεν μπορεί παρά να είναι σε μια αντίστοιχη θέση στο άλλο γονιδίωμα (Σχήμα 1.25). Δηλαδή το μοντέλο επιβεβαιώνεται από την παρατήρηση πως σε μεγάλο ποσοστό οι ανασυνδυασμοί είναι ομόλογοι. (Pilipenko et al., 1995). Βέβαια αυτό το μοντέλο δεν μπορεί να ερμηνεύσει τη συγκέντρωση των θέσεων ανασυνδυασμού σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, αν και σ' αυτή

τη παρατήρηση δεν είναι βέβαιο ακόμα ότι δεν εμπλέκεται η φυσική επιλογή, ωστόσο θα μπορούσε να ερμηνεύσει μερικές θέσεις ανασυνδυασμού που βρίσκονται διάσπαρτες σε όλο το γονιδίωμα.

Μια άλλη υπόθεση, αλλά λιγότερο διερευνημένη, για το πώς μπορεί να αποσταθεροποιηθεί το σύμπλοκο 3D - μήτρας κατά τη σύνθεση του συμπληρωματικού RNA είναι αυτή που εμπλέκει σταθερές δευτεροταγείς δομές οι οποίες προβάλλουν εμπόδιο στην δραστικότητα ελικάσης της 3D πολυμεράσης με αποτέλεσμα να προκαλούν μια πρόωμη λήξη της επιμήκυνσης. Το μοντέλο αυτό διαφέρει από το μοντέλο της Romanova et al., στο οποίο είναι απαραίτητη η εμπλοκή των περιοχών αντιστροφής συμπληρωματικότητας (Romanova et al., 1986).



Σχήμα 1.25 Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Philipenko et al. Ανασυνδυασμός με τη βοήθεια ενός λάθος τοποθετημένου νουκλεοτιδίου κατά τη σύνθεση του θυγατρικού RNA κλώνου (A) ομόλογος (B) μη ομόλογος (Philipenko et al., 1995).

Αυτό το μοντέλο άρχισε να στηρίζεται πειραματικά από τον Wilson et al ο οποίος παρατήρησε πως τα σημεία στα οποία γίνεται ο ανασυνδυασμός στον FMDV αντιστοιχούν σε περιοχές με υψηλό βαθμό τοπικής δευτεροταγούς δομής (Wilson et al., 1988). Η εμπλοκή δευτεροταγών δομών

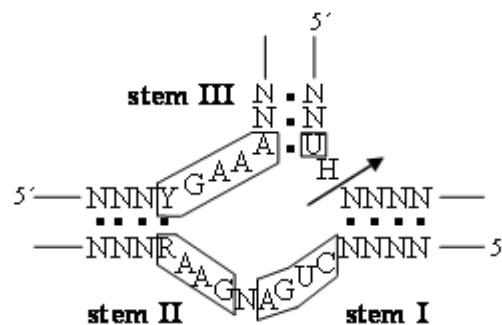


κατά τον ανασυνδυασμό επιβεβαιώθηκε και από μια μελέτη της κατανομής πάνω στο γονιδίωμα των θέσεων ανασυνδυασμού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Παρατηρήθηκε πως οι θέσεις άλλαζαν κατανομή ανάλογα με τη θερμοκρασία. Η πιο άμεση επίδραση της θερμοκρασίας σε ένα μόριο RNA είναι η μεταβολή της δευτεροταγούς δομής του (Duggal et al., 1999). Ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί το είδος της δευτεροταγούς δομής το οποίο μπορεί να αποτελέσει σήμα για την αλλαγή μήτρας από την 3D πολυμεράση.

### 1.9.2 Μηχανισμός τομής - σύνδεσης

Όπως αναφέρθηκε ο μόνος μηχανισμός που μπορούσε να υποστηριχθεί μέχρι το 1999 ήταν αυτός του αντιγραφικού ανασυνδυασμού. Το 1999 παρουσιάστηκε από τον Gmyl και τους συνεργάτες του μια μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δύο γενωμικά RNA, το ένα με ακέραιη την 5' UTR, χωρίς όμως κωδική περιοχή, την 3' UTR και poly(A) ουρά και το άλλο με κωδική περιοχή, την 3' UTR και poly (A) αλλά με αδυναμία μεταγραφής δηλαδή μη ικανό IRES. Μετά από ταυτόχρονη διαμόλυνση κυττάρων με τους δύο τύπους RNA παρήχθησαν ζωντανοί ιοί. Αυτοί δεν μπορούν παρά να έχουν προέλθει από ένα μηχανισμό ανεξάρτητο της αντιγραφής και γενικότερα της 3D πολυμεράσης (Gmyl et al., 1999). Παρόμοια πειράματα, αλλά *in vitro*, έγιναν και με γενωμικά RNA του βακτηριοφάγου Qβ. Τα RNA μπορούσαν να ανασυνδυαστούν από μόνα τους με μόνη απαίτηση την παρουσία ιόντων (ανασκόπηση: Chetverin A. B., 1999). Στα πειράματα αυτά φάνηκε πως ο ανασυνδυασμός γίνεται με μια αντίδραση trans-εστεροποίησης. Ωστόσο προτάθηκαν δύο μοντέλα. Στο μοντέλο κατά Gmyl et al. ένα 2'-υδροξύλιο προσβάλλει ως νουκλεόφιλο ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό. Έτσι παράγονται ένα 2',3'-κυκλικό φωσφορικό και ένα 5'- υδροξυλικό άκρο, τα οποία με αντίδραση trans-εστεροποίησης μπορούν να ενωθούν. Η όλη διαδικασία, αλλά και η ανάγκη το 2',3'-κυκλικό φωσφορικό και το 5'-υδροξυλικό άκρο να βρεθούν κοντά οδήγησε στην υπόθεση της ύπαρξης δομών με ριβοενζυμική δράση. Αυτή η υποθετική δομή φαίνεται στο Σχήμα 1.26. Σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα του Chetverin ο ανασυνδυασμός γίνεται

μετά από νουκλεόφιλη προσβολή του 5'- φωσφορικού από ένα 2'-υδροξύλιο. Αν η προσβολή γίνει ενδομοριακά τότε ακολουθείται το μοντέλο του Gmyl et al., ενώ αν γίνει διαμοριακά το 5'- φωσφορικό και το 5'- υδροξύλιο δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης την οποία η Qβ πολυμεράση μπορεί, χρησιμοποιώντας την ως μήτρα να δώσει το τελικό ανασυνδυασμένο μόριο. Επίσης από τη διασπορά των θέσεων ανασυνδυασμού, αλλά και από την παρατήρηση πως ο ρυθμός των ανασυνδυασμών δεν αλλάζει με τροποποίηση των αντιδρώντων άκρων οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως δεν εμπλέκεται δράση ριβοενζύμων στο δεύτερο τύπο ανασυνδυασμού που πρότειναν.



Σχήμα 1.26 Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Gmyl et al. Η θέση τομής παρουσιάζεται με ένα βέλος. Ανατύπωση από Gmyl et al., 1999

Έχει υποστηριχθεί, ότι στην πλειοψηφία των μελετημένων περιπτώσεων πολιοϊών, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα στο μη - δομικό γονιδίωμα και συνήθως στο τμήμα 2A - 2C (εικόνα 1). Σε κάποιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' NTR και της P1 κωδικής περιοχής του καψιδίου (Georgescu et al., 1995), ενώ ο ανασυνδυασμός εντός του γενωμικού τμήματος, που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του καψιδίου, φαίνεται να αποτελεί περισσότερο εξαίρεση παρά κανόνα των περιπτώσεων ανασυνδυασμού (Blomqvist et al., 2003, Martin et al., 2002). Έχει δειχθεί, ωστόσο, ότι ο *in vitro* ανασυνδυασμός εντός της P1 κωδικής περιοχής εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Σε αντίστοιχα πειράματα αποδείχθηκε, ότι ενώ τους 37<sup>0</sup> C ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται, επιλεκτικά, στο μη - δομικό γονιδίωμα, στους 34<sup>0</sup> C μπορεί να συμβεί στο δομικό τμήμα του γονιδιώματος (Duggal and Wimmer, 1999). Η πιο σημαντική παρατήρηση αυτής της τελευταίας μελέτης ήταν, ότι τα στελέχη, που παρουσιάζουν ανασυνδυασμό στο δομικό γονιδίωμα, δεν είναι λιγότερο

μολυσματικά από τα στελέχη, που είναι ανασυνδυασμένα σε άλλα γενωμικά τμήματα, γεγονός, που υποδεικνύει, ότι πιθανότατα ο ανασυνδυασμός στο γενετικό τμήμα P1 περιορίζεται από κάποιον ενδογενή ιικό μηχανισμό και όχι από ασυμβατότητα πρωτεϊνών.

### 1.10. ΝΕΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η παρούσα και άλλες μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα, προτείνουν ένα νέο μοντέλο σχετικά με την γενετική των εντεροϊών. Μέχρι σήμερα θεωρείτο, ότι τα είδη των εντεροϊών (A, B, C, D και rolío) αποτελούνται από οροτύπους - υποείδη, κάθε ένα από τα οποία παρουσιάζει δικό του πρότυπο εξέλιξης. Δεδομένων των πρόσφατων αποδείξεων ανασυνδυασμών, τόσο εντός, όσο και μεταξύ των οροτύπων αυτών, η άποψη αυτή οφείλει να τεθεί υπό αμφισβήτηση.

Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες, οι οποίες προτείνουν, ότι τα είδη των εντεροϊών υφίστανται ως ένα πεδίο από καψιδικά γονίδια και μία δεξαμενή από λειτουργικά γονίδια και 5' μη κωδικές περιοχές (Lukashev et al., 2003a, Oberste et al., 2004c, Santti et al., 1999). Αυτά τα τμήματα γενετικής πληροφορίας εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, ακόμη και σε μικροεξελικτικό επίπεδο, και ανασυνδυάζονται ελεύθερα, παρέχοντας, έτσι, τη δυνατότητα παραγωγής ποικιλιών μιας αρχικής δομής, με μη προβλέψιμες ιδιότητες. Αυτό το πρότυπο μπορεί να θεωρηθεί ως μία εξελικτική απόκριση αυτών των ιών ως προς το πολύπλοκο και υψηλά προσαρμόσιμο εξελικτικό σύστημα των ξενιστών τους. Μάλιστα, συστήνεται, ότι η μηχανή αντιγραφής των ιών δεν είναι απλώς «μη ακριβής», λόγω μιας πρωτόγονης πολυμεράσης αλλά, ότι έχει εξελιχθεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να ισορροπεί μεταξύ ενός στενού ορίου μέγιστης ποικιλομορφίας (μέσω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών) και καταστροφής λόγω αντιγραφικών λαθών. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο μοριακής επιδημιολογίας των εντεροϊών, το οποίο παρουσιάζει μία προσαρμοστικότητα, μιας και έχει πολλές φορές παρατηρηθεί, ότι υπότυποι ή γενότυποι εντεροϊών προκαλούν επιδημίες, εξαπλώνονται διεθνώς εντός μερικών χρόνων, κυκλοφορούν για κάποια επιπρόσθετα χρόνια και στη συνέχεια εξαφανίζονται, δίνοντας τη θέση τους σε νέες ποικιλίες. Κατά συνέπεια, μπορεί να υποστηριχθεί, ότι το γένος των

εντεροϊών υφίσταται ως μία παγκόσμια δεξαμενή γενετικού υλικού, η οποία εξελίσσεται χρησιμοποιώντας ως μέσα τις μεταλλάξεις και τους ανασυνδυασμούς (Lukashev et al., 2005a).

### 1.11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν, η ανάλυση των περιοχών του γονιδιώματος των πολιοϊών από τη 2C έως τη 3'UTR γενωμική περιοχή (κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών) και τον εντοπισμό των θέσεων ανασυνδυασμών. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μία αρχική RFLP ανάλυση χρησιμοποιώντας τέσσερα ζεύγη εκκινητών πάνω σε προεπιλεγμένα διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος των ιών, στην 5'UTR, στη 2C και στην 3D.

Στη συνέχεια της μελέτης, τα στελέχη τα οποία εμφάνισαν πιθανό ανασυνδυασμό μετά τον έλεγχο με RFLP, πολλαπλασιάστηκαν μέσω PCR με αλληλοεπικαλυπτόμενους εκκινητές ώστε να αλληλουχηθούν από τη 2C μέχρι την 3D γενωμική περιοχή και να εντοπισθεί ο ακριβής τύπος και η θέση του ανασυνδυασμού. Εν συνεχεία οι τύποι και οι θέσεις ανασυνδυασμών συγκρίθηκαν μεταξύ τους (κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη) καθώς και μεταξύ των ήδη δημοσιευμένων ανασυνδυασμών στην διεθνή βιβλιογραφία.

Βρέθηκαν πέντε απλά ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊού κλινικής προέλευσης (EP6:S2/S1, EP9:S2/S1, EP12:S2S1, EP16:S3/S2, EP23:S3/S1) και τέσσερα διπλά ανασυνδυασμένα (EPA: S3/S2/S3, EPB: S3/S2/S3, EPC: S3/S2/S3, EDP12: S3/S2/S1). Τα κλινικά στελέχη EDP11( S3/S2-CAV 18 or 21-S2/S1) και I34 (S2/S1/S2/S1) χαρακτηρίζονται ως πολυανασυνδυασμένα. Βρέθηκαν ακόμα και τέσσερα περιβαλλοντικά απλά ανασυνδυασμένα στελέχη (ENP5: S2/S1, ENP6: S2/S1, ENP7: S2/S3, ENP8: S2/S1), καθώς και τρία διπλά (LK3: S3/S2/S1, LK6: S3/S2/S1, LK10: S3/S2/S1). Πολλές ήταν επίσης και οι σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες εμφανίζονται σε συγκεκριμένα γενωμικά σημεία στα στελέχη εμβολίων τύπου Sabīn των πολιοϊών, οι οποίες είναι γνωστές ως καθοριστικός παράγων εξασθένησης της μολυσματικότητας ή επιστροφής της νευρομολυσματικότητας των στελεχών. Τέλος προτείνεται ότι οι πολιοϊοί υφίστανται ως μία δεξαμενή γενετικού υλικού, η οποία εξελίσσεται μέσω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

##### 2.1.1 ΠΡΟΤΥΠΙΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα πρότυπα στελέχη Sabin 1,2 και 3 που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των διαφορετικών πρωτοκόλλων PCR της εργασίας ,προήρχοντο από το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας -ΠΟΥ (World Health Organization-WHO).

##### 2.1.2. ΚΛΙΝΙΚΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν προήρχοντο από τη συλλογή δειγμάτων του εργαστηρίου Εντεροϊών του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur.

Εξ αυτών τα 29 δείγματα πολιοϊών, από την χρονική περίοδο 1978-1985, προήρχοντο από κόπρανα υγιών εμβολιασμένων ή VAPP ασθενών. Τα δείγματα είχαν ειδη τυποποιηθεί με οροεξουδετέρωση με πολυκλωνικά αντισώματα (National Institute for Public Health and Environment -RIVM-The Netherlands). Στα κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν, προστέθηκαν στη συνέχεια 21 περιβαλλοντικά δείγματα από την Ελλάδα (Μεταμόρφωση, Αττικής, Μάιος - Οκτώβριος, 1996) και από την Κύπρο (Απρίλιος Δεκέμβριος 2003, Εργαστήριο Μικροβιολογίας Υδάτων και Περιβαλλοντικής Ιολογίας, Γενικό Κρατικό Εργαστήριο Κύπρου). Τελικά, από το σύνολο των 50 στελεχών που εξετάστηκαν τα 18 αναλύθηκαν, περαιτέρω, ως προς την πρωτοταγή τους διάταξη, προκειμένου να γίνει ανάλυση των ανασυνδυασμών τους.

#### 2.2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ.- World Health Organization, 1996), για την απομόνωση και την καλλιέργεια των ιών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος (Rhabdomyosarcoma ,Rd). Τα Rd είναι ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από ραβδομυοσάρκωμα, έχουν ατρακτοειδή δομή και αναπτύσσονται προσκολλούμενα σε πλαστικές κωνικές φιάλες. Όλες οι εργασίες πραγματοποιούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε ειδικούς

θαλάμους βιολογικής ασφαλείας (P2) με κάθετη νηματική ροή αέρα και με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών. Τα κύτταρα παραλαμβάνονται σε ειδικές αμπούλες, φέροντας ετικέτες που προσδιορίζουν τα χαρακτηριστικά της ποιότητάς τους και φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (-196°C). Χρησιμοποιούνται δύο τύποι μέσων καλλιέργειας: το μέσο καλλιέργειας ανάπτυξης (Growth Medium-GM) και το μέσο καλλιέργειας διατήρησης (Maintenance Medium-MM). Το πρώτο διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε ορό (συνήθως 10%) και επάγει τη γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ το δεύτερο έχει περιεκτικότητα σε ορό περίπου 2% και χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών σε στάσιμη κατάσταση αργής κυτταρικής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ιών.

### 2.2.1 Διαλύματα:

**Διάλυμα ερυθρού της φαινόλης 0,4%:** Το ερυθρό της φαινόλης είναι δείκτης του pH. Για την παρασκευή του ετοιμάζεται απόθεμα διαλύματος 0,4 w/v σε απεσταγμένο νερό, το οποίο μοιράζεται σε σφραγισμένα γυάλινα δοχεία, θερμαίνεται σε κλίβανο στους 10 psi (70 kPa) για 15 λεπτά όπου και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 7,5%:** 7,5 γρ. NaHCO<sub>3</sub> διαλύονται σε 50 ml απεσταγμένου νερού. Προστίθενται 0,2 ml διαλύματος ερυθρού της φαινόλης 0,4% και συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα εμποτίζεται με CO<sub>2</sub> μέχρι την αποκτήση πορτοκαλί χρώματος και μοιράζεται σε μικρούς σωλήνες των 5ml. Ακολουθεί θέρμανση σε κλίβανο στους 10psi (70kPa) για 15 λεπτά.

**GM (Hank's Growth Medium):** 85,3 ml Minimum essential medium (Hank's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-γλουταμίνη (L-glutamine) 200 mM, 10 ml Fetal Calf Serum, 1,5 ml διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διάλυματος στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

**MM (Hank's Maintenance medium):** 92,3 ml Minimum essential medium (Hank's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 2 ml Fetal Calf Serum, 2,5 ml διαλύματος NaHCO<sub>3</sub> 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διάλυματος στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

Τα προαναφερθέντα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων σε κλειστά συστήματα (σωλήνες και πλαστικές

φιάλες με πώματα που κλείνουν σταθερά) χωρίς την παρουσία CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, μπορεί εναλλακτικά η ανάπτυξη των κυττάρων να πραγματοποιηθεί και σε ατμόσφαιρα με 95% υγρασία και 5-7% CO<sub>2</sub>, με σκοπό τη διατήρηση του pH του θρεπτικού μέσου σε σταθερά επίπεδα. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται τα παρακάτω καλλιεργητικά μέσα ανάπτυξης και διατήρησης κυττάρων:

**Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης:** 1x10<sup>6</sup> units πενικιλίνης και 1 gr στρεπτομυκίνης διαλύονται σε 100 ml PBS, αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος.

**GM (Eagle's growth medium):** 83,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earle's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 10 ml Fetal Calf Serum, 3,5 ml διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

**MM (Eagle's maintenance medium):** 90,3 ml Eagle's minimum essential medium (Eagle's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 2 ml Fetal Calf Serum, 4,5 ml διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.  
PBS ελεύθερο ασβεστίου/ μαγνησίου

**Διάλυμα Trypsine/EDTA.** Το διάλυμα τρυψίνης ή/και Versene παρασκευάζεται μέσα σε διάλυμα PBS ελευθέρου ιόντων Mg<sup>++</sup> και Ca<sup>++</sup>, γιατί αυτά αυξάνουν την σταθερότητα των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων, κάνοντας δύσκολη την αποκόλληση των κυττάρων από το πλαστικό υπόβαθρο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί.

**Διάλυμα Τρυψίνης.** Αραιώνεται 1gr. Difco 1:250 trypsin σε 400 ml ατελούς διαλύματος PBS και ακολουθεί ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά στους 36°C. Το διάλυμα φιλτράρεται (φίλτρο 0,22 μm) και μοιράζεται σε γυάλινα δοχεία των 5 ml. Φυλάσσεται στους -20° C.

**Διάλυμα EDTA:** (EDTA= Disodium Salt of Ethylenediaminetetra-acetic acid). Αραιώνεται 0,1 gr EDTA σε 10 ml απεσταγμένου νερού και μοιράζεται σε ποσότητες των 0,5 ml, σε γυάλινα δοχεία. Ακολουθεί τοποθέτηση σε κλίβανο στους 10 psi (70 kPa) για 15 λεπτά και τελική φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη χρήση, προστίθενται 0,4 ml του διαλύματος αυτού 1% σε 20 ml PBS ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 0,02 %.

### 2.3. ΑΠΟΨΥΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μία αμπούλα κυττάρων μεταφέρεται από το υγρό άζωτο (-196°C) σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό στους 36°C, έως ότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν. Ακολουθεί προσεκτικό άνοιγμα κάθε αμπούλας όπου το περιεχόμενο (κύτταρα και θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) μεταφέρεται σε πλαστική φιάλη καλλιέργειας. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα GM (10 ml) για την παραγωγή κυτταρικής μονοστιβάδας (αν η αμπούλα περιέχει  $4 \times 10^6$  κύτταρα/ml, τότε 1ml αραιωμένων κυττάρων επαρκεί για την παραγωγή 1-2 δοχείων καλλιέργειας των 75 cm<sup>2</sup>). Στη συνέχεια, η πλαστική φιάλη επωάζεται (overnight) σε κλίβανο θερμοκρασίας 36°C. Την επομένη γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού της φιάλης των κυττάρων με 20 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού GM και η φιάλη επανατοποθετείται στους 36°C ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

### 2.4. ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι φιάλες των κυττάρων μεταφέρονται από τον κλίβανο και εξετάζονται ως προς την ποιότητά τους σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Αν η μονοστιβάδα αποτελείται από υγιή κύτταρα, τότε το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται και τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS ελεύθερου Mg<sup>++</sup> και Ca<sup>++</sup>. Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και ειδικά των αναστολέων τρυψίνης όπως του ορού εμβρύου μόσχου, που περιέχονται σε αυτό. Προστίθεται διάλυμα τρυψίνης-EDTA και με κυκλικές κινήσεις τα κύτταρα αποκολλώνται από την βάση της φιάλης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο και χρησιμοποιείται για την αποκόλληση κυττάρων από γυάλινα ή πλαστικά υποστρώματα. Επίσης για την αποκόλληση κυττάρων χρησιμοποιείται το EDTA, το οποίο αποτελεί παράγοντα δέσμευσης ιόντων (chelating agent).

Μετά από τρία πλυσίματα, η φιάλη τοποθετείται στους 36°C έως την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων, η οποία πιστοποιείται με παρατήρηση στο



ανάστροφο μικροσκόπιο. Ακολούθως, τα κύτταρα αναμειγνύονται σε καλλιεργητικό μέσο GM (4,5 ml σε φιάλη 25 cm<sup>2</sup>) με ταυτόχρονη ανάδευση με πλαστική πιπέτα 10ml, ώστε να διασπαστούν πιθανά συσσωματώματα κυττάρων. Ορισμένη ποσότητα των αραιωμένων, σε θεραπευτικό υλικό κυττάρων [ανάλογα με την καταμέτρηση των κυττάρων ή την προκαθορισμένη αναλογία διαχωρισμού (συνήθως 1:3)] αποβάλλεται και προστίθεται επιπλέον μέσο καλλιέργειας (20ml), το οποίο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, περιέχει 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FCS), αντιβιοτικά πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και L-γλουταμίνη (200 mM). Η γλουταμίνη είναι απαραίτητη για τη γρήγορη ανάκαμψη των κυττάρων, ενώ τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη προστίθενται για την καταπολέμηση πιθανής βακτηριακής μόλυνσης.

Η φιάλη με τα κύτταρα μεταφέρεται στον επωαστήρα και η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται στους 36°C. Η ανακαλλιέργεια επαναλαμβάνεται κάθε 2-3 ημέρες, ανάλογα με την κατάσταση των κυττάρων.

## 2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων (RD) από τη φιάλη και την εναιώρησή τους σε κατάλληλη ποσότητα θεραπευτικού μέσου, το οποίο περιέχει 10% ορό, 2ml κυττάρων μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες καλλιέργειας (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Οι σωλήνες επωάζονται σε κλίβανο θερμοκρασίας 36°C για 24-48 ώρες.

Μετά την ανάπτυξη μονοστιβάδας κυττάρων στους σωλήνες, το μέσον ανάπτυξης αποβάλλεται και αντικαθίσταται με 2ml μέσου καλλιέργειας συντήρησης (MM-με 2% ορό). Οι σωλήνες μεταφέρονται σε διαφορετικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (BSL-2) για τον ενοφθαλμισμό των ιών.

Από το υπερκείμενο επεξεργασμένων κοπράνων, το οποίο έχει ξεπαγώσει στους +4°C, λαμβάνονται 200ml και ενοφθαλμίζονται κάτω από στείρες συνθήκες στους σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας. Από κάθε υπερκείμενο, η προαναφερθείσα ποσότητα μεταφέρεται σε ένα σωλήνα κυτταρικής σειράς Rd, ενώ διατηρείται, ως αρνητικός μάρτυρας ένας σωλήνας στον οποίο δεν ενοφθαλμίζεται το προς εξέταση δείγμα.

Οι σωλήνες μεταφέρονται σε κλίβανο επώασης στους 36°C, όπου τοποθετούνται υπό κλίση (5°) σε περιστρεφόμενο ρότορα. Οι σωλήνες

παρατηρούνται καθημερινά για πιθανή εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης και τα αποτελέσματα της παρατήρησης καταγράφονται. Επίσης, καταγράφονται πιθανές ενδείξεις τοξικότητας, εκφυλισμού των κυττάρων ή επιμόλυνσης. Μετά από την παρατήρηση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης, οι σωλήνες ψύχονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Για ενίσχυση του ιϊκού τίτλου, η ανωτέρω διαδικασία επαναλήφθηκε, τρεις φορές και από τους σωλήνες της τρίτης ανακαλλιέργειας, λήφθηκε το υλικό για περαιτέρω επεξεργασία.

## 2.6. ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Ενδεχομένως στα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα να υπάρχουν περισσότερα από ένα στελέχη. Για να αποφευχθεί η ύπαρξη μίγματος στελεχών που θα περιέπλεκε τη μοριακή ανάλυση σε κάθε θετικό δείγμα έγιναν σειριακές αραιώσεις της αρχικής καλλιέργειας σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, μέχρι  $1 \times 10^{-19}$  της αρχικής συγκέντρωσης. Μία τέτοια πλάκα φαίνεται στο Σχήμα 2.1. Σε κάθε θέση εκτός της πρώτης προστέθηκαν 90  $\mu\text{l}$  υλικού MEM-D. Εκατό  $\mu\text{l}$  της αρχικής καλλιέργειας προστέθηκαν στην πρώτη θέση. Από αυτά τα 10  $\mu\text{l}$  μεταφέρθηκαν στη δεύτερη θέση ( $10^{-1}$ ) και μετά από καλή ανάμειξη μεταφέρθηκαν διαδοχικά 10  $\mu\text{l}$  μέχρι την τελική αραιώση  $10^{-19}$ . Τελικά σε κάθε θέση προστέθηκαν 100  $\mu\text{l}$  κυττάρων και οι πλάκες επώστηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE. Από την τελευταία αραιώση κάθε δείγματος στην οποία παρατηρήθηκε πλήρες CPE μεταφέρθηκε το περιεχόμενο σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας με επιστρωμένα κύτταρα όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$		M
B	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$		M
C	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	$10^{-14}$	$10^{-15}$	$10^{-16}$	$10^{-17}$	$10^{-18}$	$10^{-19}$		M
D	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	$10^{-14}$	$10^{-15}$	$10^{-16}$	$10^{-17}$	$10^{-18}$	$10^{-19}$		M
E	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$		M
F	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$		M
G	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	$10^{-14}$	$10^{-15}$	$10^{-16}$	$10^{-17}$	$10^{-18}$	$10^{-19}$		M
H	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	$10^{-14}$	$10^{-15}$	$10^{-16}$	$10^{-17}$	$10^{-18}$	$10^{-19}$		M

Σχήμα 2.1 Πλάκα μικροτιτλοποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τις διαδοχικές αραιώσεις. Η κάθε πλάκα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δύο δείγματα. (ABCD το πρώτο δείγμα και EFGH το δεύτερο). Οι αριθμοί μέσα στις θέσεις είναι οι αραιώσεις και Μ ο μάρτυρας μη μολυσμένων κυττάρων.

### 2.6.1 Ταυτοποίηση των στελεχών με οροεξουδετέρωση

Για την ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν μετά τις διαδοχικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού, έναντι των τριών οροτύπων των πολιοϊών 1, 2 και 3 (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, The Netherlands). Κατά την οροεξουδετέρωση τα αντισώματα δεσμεύονται πάνω στο ιικό καψίδιο εμποδίζοντας το να προσεγγίσει τον υποδοχέα του και συνεπώς εμποδίζοντας τον ιό να προσβάλλει το κύτταρο. Σε μια πλάκα μικροτιτλοποίησης προστίθενται μίγματα των αντιορών όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2 (50μl / θέση) και υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας ιού (50μl / θέση). Η πλάκα επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C για να προσδεθούν τα αντισώματα στα ιικά σωματίδια. Τέλος προστίθενται 100μl / θέση κυττάρων και οι μικροπλάκες επωάζονται στους 37°C μέχρι και 24 ώρες μετά την εμφάνιση πλήρους CPE στο μάρτυρα ιού (δηλαδή στη θέση που περιέχει μόνο

ιό αλλά όχι αντιορό). Σε μια επιτυχή δοκιμασία οροεξουδετέρωσης το Polio-pool δεν θα πρέπει να εμφανίζει καταστροφή των κυττάρων όπως και ο μάρτυρας των κυττάρων. Αντίθετα θα πρέπει πάντα να εμφανίζει CPE ο μάρτυρας του ιού. Στις τρεις εναπομείνουσες στήλες (P1+P2, P1+P3, P2+P3) θα πρέπει να εμφανίζεται CPE μόνο σε μία από τις τρεις. Ο ορότυπος του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία είναι αυτός που αντιστοιχεί στον αντιορό που δεν υπήρχε στην στήλη που εμφάνισε CPE. Δηλαδή για παράδειγμα αν παρατηρήθηκε καταστροφή κυττάρων στη στήλη P I + P2, ο ορότυπος του στελέχους θα ήταν πολιοϊός τύπου 3.

	Polio-pool		P1 + P2		P1 + P3		P2 + P3		V. C.		C. C.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Σχήμα 2.2 Πλάκα μικροτιτλοποίησης, για την ταυτοποίηση πολιοϊών. Κάθε δείγμα εξετάζεται δύο φορές (4 δείγματα / πλάκα). Polio-pool μείγμα και των τριών αντιορών. P1+P2 : μείγμα αντι-polio1 και αντι-polio2. P1+P3 : μείγμα αντι-polio 1 και αντι-polio 3. P2+P3 : μείγμα αντι-polio 2 και αντι-polio 3. V.C.: μάρτυρας του ιού (χωρίς αντιορό). C.C.: μάρτυρας κυττάρων (χωρίς αντιορό και χωρίς ιό).

### 2.6.2 Εκχύλιση του RNA

Η τεχνική η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι μια γενική τεχνική απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων, όπου 250μl καλλιέργειας κυττάρων ενοφθαλμισμένων με τα αντιστοιχα ιϊκά στελέχη τοποθετήθηκαν μέσα σε

σωληνάκι Eppendorf (2ml), προστέθηκαν 750μl διαλύματος λύσης (4M GuSCN, 0,5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate) και 10μl γλυκογόνου (40mg / tube) (Casas et al., 1995). Το μίγμα επώαστηκε σε πάγο για 20 λεπτά. Το διάλυμα λύσης καταστρέφει τις κυτταρικές δομές ενώ το γλυκογόνο δεσμεύει τα νουκλεϊκά οξέα βοηθώντας την κατακρήμνισή τους. Στη συνέχεια στο μίγμα προστέθηκαν 1000μl ισοπροπανόλης και το μίγμα επώαστηκε για 20 λεπτά σε πάγο. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14000xg για 10 λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστέθηκαν 1000μl αιθανόλης 70% και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στα 14000xg. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε εκ νέου και το ίζημα διαλύθηκε σε 50μl ddH<sub>2</sub>O και τα σωληνάκια τελικά μεταφέρθηκαν στους -20°C.

## 2.7 . ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Τα εκκινητικά μόρια, που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό στάδιο της εργασίας, επιλέχθηκαν με βάση την περιοχή - γενωμικό στόχο η οποία ήταν επιθυμητό να ελεγχθεί ως προς την ανίχνευση ανασυνδυασμών και η οποία θα αναλύόταν ως προς την εξελικτική συσχέτιση μεταξύ των κλινικών στελεχών αλλά και των περιβαλλοντικών στελεχών.

Αρχικά ανιχνεύθηκαν τέσσερις βασικές περιοχές του ιϊκού γονιδιώματος με τα εναρκτήρια μόρια που αναφέρονται στη δημοσίευση των Guillot et al., 2000 και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 μαζί με τις αλληλουχίες τους, την περιοχή την οποία ενισχύουν και το μήκος του προϊόντος της PCR. Τα εναρκτήρια μόρια με κωδικό UG είναι τα αριστερά ή γενωμικά ενώ με κωδικό UC τα δεξιά ή συμπληρωματικά.

Κωδικός	Αλληλουχία	Περιοχή	Μήκος προϊόντος
---------	------------	---------	-----------------

UG52	(162)CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG(182)	5'UTR	434
UC53	(595)TTGTCACCATAAGCAGCCA(577)		
UG23	(4169)AAGGGATTGGAGTGGGTGTC(4188)	2C	797
UC15	(4965)CATCTCTTGAAGTTTGCTGG(4946)		
UG16	(5921)GTTGGTGGGAACGGTTCACA(5940)	3C-D	596
UC12	(6516)TCAATTAGTCTGGATTTTCCCTG(6494)		

Πίνακας 2.1 Στον πίνακα παρουσιάζονται τα εναρκτήρια μόρια ανα ζεύγη (UG-UC), η αλληλουχία τους, η περιοχή στην οποία εντοπίζεται το ενισχυόμενο τμήμα του γονιδιώματος και το μήκος αυτού. Οι αριθμοί στη στήλη των αλληλουχιών είναι οι θέσεις νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα στις οποίες αντιστοιχεί κάθε εναρκτήριο μόριο (η αρίθμηση αντιστοιχεί στο στέλεχος Sabin 1).

Για να μελετηθεί ολόκληρη η γνωμική περιοχή από τη 2C έως τη 3'UTR σχεδιάστηκαν επιπλέον εκκινητικά μόρια μέσω του προγράμματος Primer 3 (Σχήμα 2.3), τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2 μαζί με τις αλληλουχίες τους, την περιοχή την οποία ενισχύουν και το μήκος του προϊόντος της PCR.

Primer3  
pick primers from a DNA sequence (older interface). [NEW](#) [New interface allows check for mispriming in template.](#) [NEW](#) [disclaimer](#) [code](#)  
[cautions](#) [FAQ](#)

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINES, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

NONE

Pick left primer or use left primer below.  Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below.  Pick right primer or use right primer below (5'->3' on opposite strand).

Pick Primers

[Sequence Id:](#)  A string to identify your output.

[Targets:](#)  E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [ and ]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

[Excluded Regions:](#)  E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges:](#)

[Click here to specify the min, opt, and max product sizes only if you absolutely must. Using them is too slow \(and too computationally intensive for our server\).](#)

[Number To Return:](#)  [Max 3' Stability:](#)

[Max Mispriming:](#)  [Pair Max Mispriming:](#)

**General Primer Picking Conditions**

[Primer Size](#) Min:  Opt:  Max:

[Primer Tm](#) Min:  Opt:  Max:  [Max Tm Difference:](#)

[Product Tm](#) Min:  Opt:  Max:

[Primer GC%](#) Min:  Opt:  Max:

[Max Self Complementarity:](#)  [Max 3' Self Complementarity:](#)

[Max #N's:](#)  [Max Poly-X:](#)

[Inside Target Penalty:](#)  [Outside Target Penalty:](#)  [Set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.](#)

[First Base Index:](#)  [CG Clamp:](#)

[Salt Concentration:](#)  [Annealing Concentration:](#)  [Oligo Concentration:](#)  [\(Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.\)](#)

[Liberal Base](#)  [Show Debuging Info](#)  Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus

Το πρόγραμμα Primer 3 επιλέγει εκκινητικά μόρια από συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες. Η αλληλουχία για την οποία θέλουμε να σχεδιάσουμε εκκινητές εισάγεται σε μορφή fasta ACGT.... από 5'-3'. Το γράμμα N καθώς και οι αριθμοί αγνοούνται. Κατόπιν συμπληρώνουμε την άνωθεν φόρμα. Τα σημεία που πρέπει να συμπληρωθούν προσεκτικά είναι τα έξης :

- **Product Size Range** Μεγέθη, 150-250 100-300 301-400 κ.λ.π. το πρόγραμμα δίνει την δυνατότητα προεπιλογής του προϊόντος της PCR.
- **Primer Size** Το μέγεθος των εκκινητών καλό είναι να βρίσκεται κοντά στο βέλτιστο μήκος 20 νουκλεοτιδίων με ελάχιστο τα 18 και μέγιστο τα 22νουκλεοτίδια.
- **Primer T<sub>m</sub>** (Celsius) Καλό είναι η θερμοκρασία τήξεως να βρίσκεται κοντά στο προεπιλεγμένο βέλτιστο για τα εκκινητικά μόρια. Το Primer3 δεν θα επιλέξει εκκινητές με θερμοκρασία τήξεως μικρότερη του ελάχιστου ή μεγαλύτερη του μέγιστου.
- **Primer GC%** Προεπιλογή τουελάχιστου, βέλτιστου, και μέγιστου ποσοστού % των Gs και Cs για κάθε εκκινητή.
- **Max Complementarity** Το μέγιστο επιτρεπτό όριο αυτοσυμπληρωματικότητας για κάθε εκκινητή και συμπληρωματικότητας μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών.

[Steve Rozen](#) and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

[Source code available at http://fokker.wi.mit.edu/primer3/.](http://fokker.wi.mit.edu/primer3/)

Τα επιλεγμένα εκκινητικά μόρια ακολούθως μεταφέρονται στο πρόγραμμα Blastn με σκοπό 1<sup>ον</sup> την επιβεβαίωση της σωστής επιλογής του Primer 3 για το πλήρες γένωμα των στελεχών πολιοϊών και 2<sup>ον</sup> τη σειρά επιλογής μεταξύ των τριών στελεχών πόλιο 1,2,3.



Γενωμική περιοχή	Ζεύγη Εκκινητών	Αλληλουχία 5'→3'	Προϊόν PCR σε ζεύγη βάσεων
2C	S <sub>2</sub> 97	4717-TTAGCCTCCACCAACTCCAG-4737	502
	S <sub>2</sub> 598	5218-TGATGTTCCCTCTCTGTTTGAACC-5195	
	S <sub>3</sub> 141	4741-AGGCATTCTGTTTCACATCCAAC-4763	495
2C/3C <sup>pro</sup>	S <sub>3</sub> 368	5239-ATGTTGACGATCCATCCTTTCT-5217	
	S <sub>1</sub> 42	4962-GATGCTGTCCTTTAGTGTGTGG-4984	911
	S <sub>1</sub> 952	5873-TCCTGCTCTGGTTGGAAAGT-5853	
3C <sup>pol</sup> /3D <sup>pro</sup>	S <sub>2</sub> 48	4968-TCCTTTAGTGTGTGGCAAGG-4988	864
	S <sub>2</sub> 911	5832-GTTTGTCTGTCACCGAGATT-5812	
	S <sub>1</sub> 70	5769-TATGTATGTTCCGTGTCGGTGCT-5791	230
3D <sup>pol</sup>	S <sub>1</sub> 299	5999-ACTGGATTTACCTTGACTCTG-5977	
	S <sub>3</sub> 64	5763-GTATGTTCCGTGTCGGTGCTGT-5784	227
	S <sub>3</sub> 290	5990-ACTGGATTTACCTTGCTCT-5969	
3D/3'UTR	S <sub>1</sub> 7	6427-ATATGGAATCAACCTCCCACT-6448	444
	S <sub>1</sub> 450	6871-ATTGAAGTGCCTGAGCAACC-6851	
	S <sub>2</sub> 60	6480-AACTAAGGTGGAGCAGGAAA-6501	321
	S <sub>2</sub> 380	6800-TGGGAATGGTTGAGGTAATC-6780	
	S <sub>3</sub> 25	6445-ATATGTCAAGGACGAGCTGAGG-6468	249
	S <sub>3</sub> 273	6694-GCGTCGTATCCTGTGTAATCAA-6672	
3D/3'UTR	S <sub>1</sub> 198	6728-GCACTAAAGATGGTGTCTTGAGAAA-6752	688
	S <sub>1</sub> 885	7415-CTACAACAGTATGACCCAATCCAA-7391	
	S <sub>2</sub> 107	6647-TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA-6668	766
	S <sub>2</sub> 872	7413-ACAACAGCATGACCCAATCC-7393	

Πίνακας 2.2: Εκκινητές από τη 2C έως τη 3'UTR περιοχή. Οι θέσεις αντιστοιχούν στους τύπους Sabin σύμφωνα με τη σήμανση των εκκινητών (S1: Sabin type 1 strain AY184219, S2: Sabin 2 strain AY184220 and S3: Sabin strain AY184221). Η αρίθμηση πριν και μετά την αλληλουχία των εκκινητών αντιστοιχεί στη γενωμική θέση των στελεχών Sabin 1,2 και 3.

## 2.8 Αντίστροφη Μεταγραφή – Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-PCR)

Την εκχύλιση του RNA ακολούθησε η παραγωγή από αυτό του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Η παραγωγή του cDNA γίνεται για να ακολουθήσει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα DNA. Σε σωληνάκια των 500μl προστέθηκαν 5μl από το εκχυλισμένο RNA μαζί με 2μl εναρκτήριων μορίων 100 pmol. Τα εναρκτήρια μόρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τυχαία εξανουκλεοτιδία d(N)<sub>6</sub> (NEW ENGLAND BioLabs, USA). Το μίγμα επώαστηκε στους 70°C για 5 λεπτά ώστε τα μόρια του RNA να αποδιαταχθούν και τα εναρκτήρια μόρια να μπορέσουν να υβριδοποιηθούν πάνω τους. Κατόπιν γρήγορης μεταφοράς στον πάγο τα εναρκτήρια μόρια εγκλωβίζονται στο RNA.

Στη συνέχεια σε κάθε σωληνάκι προστέθηκε το μίγμα της αντίδρασης της αντιστροφής μεταγραφής (RT). Το μίγμα αποτελείται από 5μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται μαζί με το ένζυμο, 5μl διαλύματος 10mM των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs) (Promega, USA), 0,5 μl αναστολέα των ριβονουκλεασών από ανθρώπινο πλακούντα (40U/μl) (HT Biotechnology,UK), 200U αντιστροφής μεταγραφάσης M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega , USA), και νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 25μl. Το συνολικό μίγμα επωάστηκε για 1 ώρα στους 37°C ,θερμοκρασία δράσης της M-MLV και ακολούθως στους 94°C για 5 λεπτά ώστε να καταστραφεί το ένζυμο M-MLV.

Μετά την παραγωγή του cDNA ακολουθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) που έγινε με τη χρήση Platinum Taq (Invitrogen, USA). Πριν εφαρμοστεί ένα πρωτόκολλο στα κλινικά στελέχη, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης για τα τρία πρότυπα στελέχη Sabin 1, 2 και 3.

Έτσι, ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο. Σε μικρά σωληνάκια (200μl) προστέθηκαν 3μl από το cDNA μαζί με 2μl του ζεύγους εναρκτηρίων μορίων συγκέντρωσης 10pmol για το ζεύγος UG52 / UC53 και 50 pmol για τα τρία υπόλοιπα ζεύγη (Πίνακας 2.1). Στο μίγμα προστέθηκε το μίγμα της αντίδρασης, το οποίο αποτελείτο από 5μl διαλύματος 10mM των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs) (τελική συγκέντρωση 1mM), (Promega, USA), 2μl διαλύματος 50mM MgCl<sub>2</sub> (τελική συγκέντρωση 2mM), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, 1μl ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης (5U/ μl) (Platinum Taq ,Invitrogen, USA) και νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Τα σωληνάκια μπήκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Gene Amp 2700 και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα:

Κ  
Υ  
Κ  
Λ  
Ο  
1

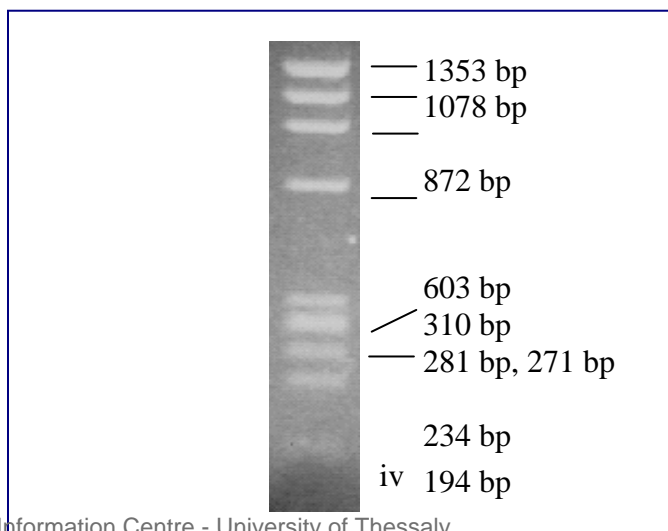
95°C για 20 δευτερόλεπτα για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων  
55°C για 10 δευτερόλεπτα για την υβριδοποίηση των εναρκτηρίων μορίων

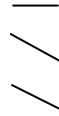
40

πλην των S<sub>3</sub>141- S<sub>3</sub>368, S<sub>3</sub>64- S<sub>3</sub>290 και S<sub>3</sub>25- S<sub>3</sub>273 όπου ήταν 60°C  
 και των S<sub>1</sub>42- S<sub>1</sub>952 και S<sub>1</sub>198- S<sub>1</sub>885 όπου ήταν στους 50°C  
 74 °C για 20 δευτερόλεπτα για την επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων κλώνων  
 78°C για 15 λεπτά για την ολοκλήρωση της επιμήκυνσης όλων των ημιτελών μορίων

### 2.8.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης

Την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 4% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris Boric EDTA) ενώ προστέθηκε και 1μg / ml βρωμιούχο αιθίδιο. Δέκα μl από το προϊόν της PCR αναμιχθήκαν με διάλυμα χρωστικής bromophenol blue (0,25%) σε 50% σακχαρόζης. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε δοχείο ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TBE και εφαρμόστηκε τάση 200V. Τα πηκτώματα φωτογραφήθηκαν σε φωτογραφικό σύστημα υπεριώδων ακτίνων Foto/Phoresis I (Fotodyne,USA). Το ύψος της κάθε ζώνης στο πήκτωμα μετρήθηκε με τη βοήθεια ενός μάρτυρα μοριακού βάρους, του προϊόντος πέψης με το ένζυμο περιορισμού HaeIII του DNA φάγου ΦΧ174 (Gibco BRL), με τη βοήθεια του προγράμματος Gel Pro Analyzer (Media Cybernetics,USA). Στην Εικόνα 2.1 φαίνεται ο μάρτυρας σε πήκτωμα αγαρόζης 4% και το μοριακό βάρος κάθε ζώνης.





**Εικόνα 2.1.** Ο μάρτυρας μοριακού βάρους ΦΧ 174

### 2.8.2 Πολυμορφισμός μήκους ζωνών περιορισμού (RFLP)

Η τεχνική RFLP είναι μια δοκιμασία με την οποία μπορούν να ανιχνευτούν διαφορές στην αλληλουχία δύο μορίων DNA. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται τα περιοριστικά ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες σε δίκλινα μόρια DNA τις οποίες τέμνουν σε συγκεκριμένη για το κάθε ένζυμο περιορισμού πρωτοδιάταξη. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των προϊόντων PCR ανάλογα με την προέλευσή τους, δηλαδή αν ανήκουν σε στελέχη Sabin 1,2 ή 3 ή αν το προϊόν της PCR είναι προϊόν ανασυνδυασμού δύο στελεχών. Για το τμήμα που ενισχύουν τα εναρκτήρια μόρια UG52 / UC53 χρησιμοποιήθηκαν τρία ένζυμα περιορισμού HaeIII, NcoI και DdeI (Promega, USA). Για ένα στέλεχος χρησιμοποιήθηκε και το ένζυμο AluI(Promega, USA). Στη συγκεκριμένη περίπτωση η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η αντιστοιχία οροτύπου και γονοτύπου της 5'UTR γενωμικής περιοχής. (Georgoroulou A., 2000). Το τμήμα για το ζεύγος UG1/UC1 κόπηκε με τα ένζυμα HpaII (NEW ENGLAND Biolabs,USA), HaeIII, και DdeI (Promega, USA). Το τμήμα για το ζεύγος UG23 / UC15 κόπηκε με τα ένζυμα HinfI (NEW ENGLAND Biolabs,USA) και RsaI (Invitrogen,USA). Τέλος το τμήμα για το ζεύγος UG16 / UC12 κόπηκε με τα ένζυμα HinfI (NEW ENGLAND Biolabs,USA), RsaI (Invitrogen,USA) και DdeI (Promega, USA).

RFLP Ανάλυση									
UG52/UC53 HpaII 434bp	S1	161	148	107	18				
	S2	148	121	108	40	18			
	S3	148	148	121	18				
UG52/UC53 HaeIII 434bp	S1	209	90	80	55				
	S2	210	149	80					
	S3	146	130	70	53				
UG52/UC53 NcoI 434bp	S1	227	207						
	S2	No Cut							
	S3	314	120						
UG52/UC53 AluI 434bp	S1	164	149	121					
	S2	267	149	18					
	S3	149	122	107	56				
UG16/UC12 HinfI 596	S1	452	84	60					
	S2	424	102	60					
	S3	300	212	84					
UG16/UC12 RsaI 596bp	S1	346	250						
	S2	283	226	87					
	S3	283	178	92	43				
UG16/UC12 DdeI 596bp	S1	423	71	56	46				
	S2	253	158	57	52	33	31	13	
	S3	281	189	56	46	24			
UG16/UC12 HaeIII 596bp	S1	282	280	34					
	S2	280	213	69	34				
	S3	562	34						
UG23/UC15 HinfI	S1	479	213	95					
	S2	422	245	120					

787bp	S3	576	95	67	49				
UG23/UC15	S1	379	325	83					
RsaI	S2	380	280	82	45				
787bp	S3	364	184	116	82	41			
UG23/UC15	S1	321	278	125	63				
AluI	S2	468	237	65	17				
787bp	S3	310	278	125	74				

Πίνακας 2.3 Ένζυμα περιορισμού τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση RFLP, και οι θέσεις στις οποίες κόβουν τις αλληλουχίες ανάλογα με τα εκάστοτε ζεύγη εκκινητών για το κάθε στέλεχος Sabin.

**Για τα τμήματα που παράγονται από τα ζεύγη εκκινητών που αναφέρονται στο Πίνακα 2.3 τα ένζυμα περιορισμού επιλέχτηκαν μέσω του προγράμματος Gene Runner.**

Το Gene Runner επιτρέπει την :

- Αναζήτηση θέσεων περιορισμού σε βάση δεδομένων περιοριστικών ενζύμων.
- Μετάφραση της αλληλουχίας DNA σε πρωτεϊνική αλληλουχία, και εύρεση ORFs
- Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για PCR ή για αλληλούχιση.

Τα ένζυμα τα οποία επιλέχτηκαν ήταν αυτά που θα οδηγούσαν σε καλύτερα αποτελέσματα:1<sup>ov</sup>) χωρίς επικαλύψεις αλληλουχιών μεταξύ των στελεχών Sabin1,2 και 3, 2<sup>ov</sup>) διακριτά κομμάτια πέψης και 3<sup>ov</sup>) το χαμηλό κόστος των ενζύμων περιορισμού.

Η αντίδραση έγινε για όλα τα ένζυμα περιορισμού στους 37°C για 1 ώρα. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 6 - 14μl προϊόντος PCR, ανάλογα με την ένταση της ζώνης του προϊόντος μετά την ηλεκτροφόρηση, 2μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης 10x που παρέχεται μαζί με το κάθε ένζυμο, 20U ενζύμου και συμπλήρωση με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 20μl. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε στα 150V, σε πυκνό πήκτωμα αγαρόζης 4% ώστε να

γίνει καλύτερος διαχωρισμός των ζωνών. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης είναι ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

### **2.9 Αλληλούχιση (προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης)**

Τα προϊόντα της PCR, τα οποία μετά από πέψη RFLP παρουσίαζαν άλλο ορότυπο από αυτόν που είχε αρχικά προσδιοριστεί ή παρουσίαζαν RFLP με συνδυασμούς ζωνών που αντιστοιχούσαν σε περισσότερα από ένα πρότυπα στελέχη ή παρουσίαζαν RFLP που δεν μπορούσαν να αντιστοιχηθούν με αυτά των προτύπων Sabin στελεχών, υποβλήθηκαν σε αλληλουχία από την εταιρία MacroGen Inc (Seoul, Korea) με τη χρήση των αντίστοιχων εκκινητικών μορίων, έτσι ώστε να εντοπισθεί η ακριβής θέση του ανασυνδυασμού.

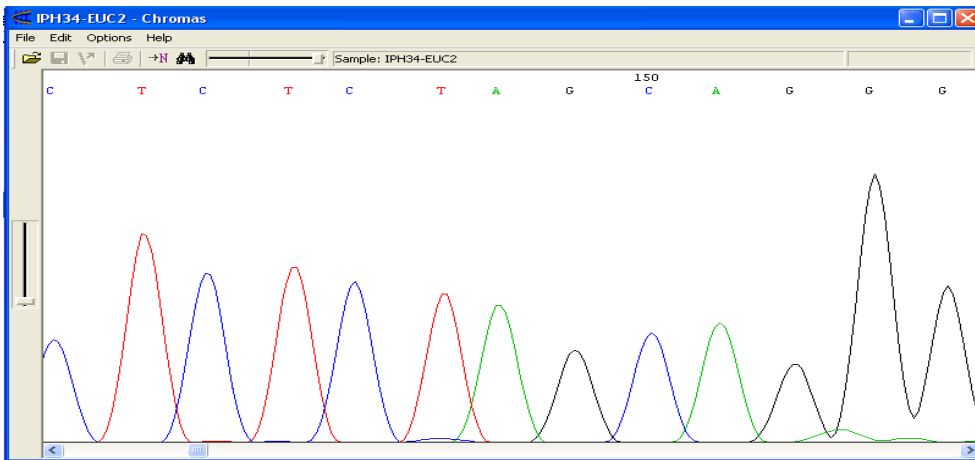
#### **2.9.1 . ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών, μελετήθηκαν ως προς την πιθανή ύπαρξη ανασυνδυασμών σε σχέση με αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες προτύπων στελεχών πολιοϊών. Συνολικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση RFLP της 5'UTR γενωμικής περιοχής και όλου το γενώματος από τη 2C έως τη 3D γενωμική περιοχή (~3500 βάσεις) μέσω αλληλούχισης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο.

#### **2.9.2. ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ**

Τα αποτελέσματα καθορισμού της πρωτοταγούς διάταξης ενός γενετικού τμήματος παρελήφθησαν από τη MacroGen μέσω E-mail υπό μορφή χρωματογραφήματος (Εικόνα 2.2), που μπορεί εύκολα να «διαβαστεί», μετά τον καθαρισμό του πιθανού θορύβου που συνοδεύει την αλληλουχία. Σε πολλές, ωστόσο, περιπτώσεις είναι πιθανό ο θόρυβος να δημιουργεί πρόβλημα στην ανάγνωση, με αποτέλεσμα κάποιες κορυφές να αναγνωρίζονται ως N, δηλαδή ως πιθανή ύπαρξη, στη συγκεκριμένη θέση, οποιασδήποτε από τις βάσεις A, T, G ή

C. Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται εμπειρία για την διάκριση της πραγματικής αλληλουχίας, ενώ σε άλλες, απαιτείται η επανάληψη όλης της διαδικασίας προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης. Επίσης, σε περιπτώσεις όπου μία αλληλουχία είναι φαινομενικά σωστή, είναι απαραίτητη η προσεκτική ανάλυσή της βάση προς βάση και κορυφή προς κορυφή, για την ανίχνευση πιθανών κενών (gaps), δηλαδή κορυφών του χρωματογραφήματος που δεν έχουν διαβαστεί.



Εικόνα 2.2. Τυπική εμφάνιση ενός χρωματογραφήματος: διακρίνονται οι «κορυφές» που αντιστοιχούν στις διαφορετικές βάσεις της αλληλουχίας του DNA

### 2.9.3. ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ

Μετά από την ταυτοποίηση μιας καινούργιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (ή αμινοξέων), απαιτείται συχνά η αναζήτηση της πλησιέστερης της ομόλογης αλληλουχίας. Η σύγκριση πραγματοποιείται μέσα σε ένα σύνολο αλληλουχιών που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (EMBL, GenBank, DDBJ). Η ανεύρεση του πιο κοντινού, από άποψη πρωτοταγούς δομής, γονιδίου πραγματοποιείται μέσω του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο δημιουργήθηκε το 1990 από τους Altschul et al. και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο μέσα από την διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.



Ο αλγόριθμος BLAST λειτουργεί μέσω μιας διαδικασίας διάσπασης της αρχικής αλληλουχίας σε μικρότερα γενωμικά τμήματα ή «λέξεις», ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται αναζήτηση της συσχέτισης μεταξύ αυτών των «λέξεων» και άλλων «λέξεων», οι οποίες προέρχονται από τη διάσπαση των ήδη κατατεθειμένων, στο διαδίκτυο (GenBank), αλληλουχιών. Μόλις εντοπισθεί ένα τέτοιο «ταίριασμα» μεταξύ δύο τμημάτων, τότε η αναζήτηση συσχέτισης επεκτείνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις (upstream και downstream) των ομόλογων τμημάτων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία τοπική στοίχιση. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοίχισεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs - high scoring segment pairs) καταγράφονται σε μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός παρουσιάζει, τελικά, τις πιο «συγγενικές» προς την εξερευνούμενη περιοχή αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης κι επομένως ομολογίας (Εικόνα 2.3).

Accession	Description	Score (Bits)	E Value
gi 151556925 gb AY679733.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	557	7e-156
gi 151291526 gb AY682389.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	327	1e-86
gi 137623057 gb AY342619.1	Human coxsackievirus A9 patient BE...	313	2e-82
gi 142794323 gb AY466029.1	Human enterovirus B strain Cuba267...	303	2e-79
gi 142794313 gb AY466024.1	Human enterovirus B strain Cuba270...	303	2e-79
gi 142794321 gb AY466028.1	Human enterovirus B strain Cuba163...	295	4e-77
gi 142794319 gb AY466027.1	Human enterovirus B strain Cuba135...	295	4e-77
gi 142794317 gb AY466026.1	Human enterovirus B strain Cuba100...	295	4e-77
gi 142794315 gb AY466025.1	Human enterovirus B strain Cuba450...	295	4e-77
gi 142794309 gb AY466022.1	Human enterovirus B strain Cuba960...	295	4e-77
gi 142794311 gb AY466023.1	Human enterovirus B strain Cuba450...	287	9e-75
gi 137623075 gb AY342628.1	Human coxsackievirus A9 patient BE...	281	6e-73
gi 142794329 gb AY466032.1	Human enterovirus B strain Cuba689...	272	6e-70
gi 142794331 gb AY466033.1	Human enterovirus B strain Cuba230...	264	1e-67
gi 142794327 gb AY466031.1	Human enterovirus B strain Cuba470...	264	1e-67
gi 142794325 gb AY466030.1	Human enterovirus B strain Cuba350...	264	1e-67
gi 151556927 gb AY679734.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	256	3e-65
gi 145581610 dbj AB167979.1	Human coxsackievirus A9 VP1 gene ...	250	2e-63
gi 151556929 gb AY679735.1	Human coxsackievirus A9 strain USA...	242	5e-61
gi 150812454 gb AY573577.1	Human coxsackievirus A9 patient FJ...	242	5e-61
gi 137623433 gb AY342807.1	Human coxsackievirus A9 patient BE...	240	2e-60
gi 137623311 gb AY342746.1	Human coxsackievirus A9 patient BE...	240	2e-60
gi 145581608 dbj AB167978.1	Human coxsackievirus A9 VP1 gene ...	238	8e-60
gi 145581612 dbj AB167980.1	Human coxsackievirus A9 VP1 gene ...	234	1e-58
gi 151556929 gb AY679735.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	232	5e-58
gi 151556931 gb AY679753.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	216	3e-53
gi 151556931 gb AY679736.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	216	3e-53
gi 137623309 gb AY342745.1	Human coxsackievirus A9 patient BE...	216	3e-53
gi 145643710 gb AY563359.1	Human coxsackievirus A9 isolate B8...	208	7e-51
gi 145643702 gb AY563354.1	Human coxsackievirus A9 isolate A6...	208	7e-51
gi 151291553 gb AY683391.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	208	7e-51
gi 151291540 gb AY682390.1	Human coxsackievirus A9 isolate A9...	208	7e-51

Εικόνα 2.3. Αποτελέσματα αναζήτησης Blast μετά από την εισαγωγή της γενετικής αλληλουχίας του στελέχους A9\_611/80/1 στο ειδικό παράθυρο δεδομένων.

Τα προγράμματα αναζήτησης BLAST περιλαμβάνουν πολλά εξειδικευμένα προγράμματα, κυριότερα το BLASTN, το οποίο συγκρίνει μία αρχική νουκλεοτιδική αλληλουχία με τη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων και το BLASTP, το οποίο συγκρίνει πρωτεϊνικές αλληλουχίες με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων. Στην παρούσα μελέτη, μετά από τη διόρθωση των αρχικών



με

Εικόνα 2.4. Τοποθέτηση αλληλουχίας σε μορφή fasta στο ειδικό παράθυρο δεδομένων του προγράμματος Blast.

χρωματογραφημάτων, οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τα γενωμικά τμήματα από τη 2C έως τη 3D τοποθετήθηκαν στα προγράμματα BLASTN σε μορφή «fasta», [στη μορφή fasta το όνομα κάθε στελέχους, στο οποίο αντιστοιχεί η αλληλουχία, γράφεται μετά από ένα σύμβολο «>», ενώ ακολουθεί ένα κενό (Enter) πριν τη γραφή της αλληλουχίας με μορφή βάσεων ή αμινοξέων (Εικόνα 2.4). Στις μη δομικές περιοχές, που ερευνήθηκαν 2C και 3D, η χρήση του προγραμμάτων (BLASTN) βοήθησε στην ανεύρεση των πλησιέστερων ετεροτοπικών στελεχών, για τη μελέτη πιθανών ανασυνδυασμών και εξελικτικών σχέσεων.

#### 2.9.4. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (CLUSTALW)

Ένα από τα κοινά σημεία των αναλύσεων αλληλουχιών είναι η στοιχισή των γενωμικών τμημάτων που πρόκειται να μελετηθούν. Η στοιχισή προηγείται οποιασδήποτε περαιτέρω επεξεργασίας, είτε αυτή αφορά στην εύρεση ομοιοτήτων μέσα σε μία οικογένεια αλληλουχιών, είτε στην πρόβλεψη δευτεροταγών δομών των στοιχισμένων τμημάτων.

Το clustalW είναι πρόγραμμα πολλαπλής στοιχίσης αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών. Το πρόγραμμα ClustalW διατίθεται ελεύθερα (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>), ο αλγόριθμος που χρησιμοποιεί έχει τη δυνατότητα λήψης ενός αρχείου αλληλουχιών και αυτόματης στοιχίσης τους. Η βασική πληροφορία που παρέχει είναι ο εντοπισμός συντηρημένων πρωτεϊνικών περιοχών. Το ClustalW προσφέρει ένα σχετικά απλό περιβάλλον εργασίας βασισμένο σε δομή κειμένου (simple text-based interface), το οποίο είναι κατάλληλο για εργασίες υψηλού φόρτου (high throughput tasks).

Το πρόγραμμα διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία συμβάλλουν στην πραγματοποίηση στοιχίσεων με εξαιρετική ακρίβεια και ταχύτητα. Στην περίπτωση στενά συγγενικών αλληλουχιών χρησιμοποιείται λογισμικό που δίνει υψηλή βαθμολογία (high scores), ενώ στην αντίθετη περίπτωση δίνει χαμηλή. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί είναι απαραίτητη η απόδοση υψηλής βαθμολογίας σε ταιριάσματα (matches) συντηρημένων αμινοξικών τμημάτων. Τα σύμβολα ομοφωνίας (consensus symbols) έχουν ως εξής

- \* τα νουκλεοτίδια στη στήλη είναι ίδια σε όλες τις αλληλουχίες
- : παρατηρούνται διατηρημένες αντικαταστάσεις
- . παρατηρούνται ημί-διατηρημένες αντικαταστάσεις

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες κάθε γενωμικής προς σύγκριση περιοχής τοποθετήθηκαν σε μορφή «fasta» η μία εκατέρωθεν της άλλης. Στη πρώτη γραμμή πληκτρολογείται το σύμβολο > ακολουθεί το όνομα της αλληλουχίας και στην επόμενη γραμμή εισάγεται η αλληλουχία. Στη συνέχεια, το σύνολο των αλληλουχιών τοποθετείται μέσω αντιγραφής-επικόλλησης στο ειδικό παράθυρο του προγράμματος, όπου μετά την πληκτρολόγηση της αντίστοιχης εντολής, πραγματοποιήθηκε η στοιχίση τους ανά ζεύγη, προκειμένου να παραχθεί ένα λογισμικό απόστασης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός πρωταρχικού δέντρου εξέλιξης των αλληλουχιών. Το αποτέλεσμα κάθε στοιχίσης διασώθηκε με την μορφή αρχείου

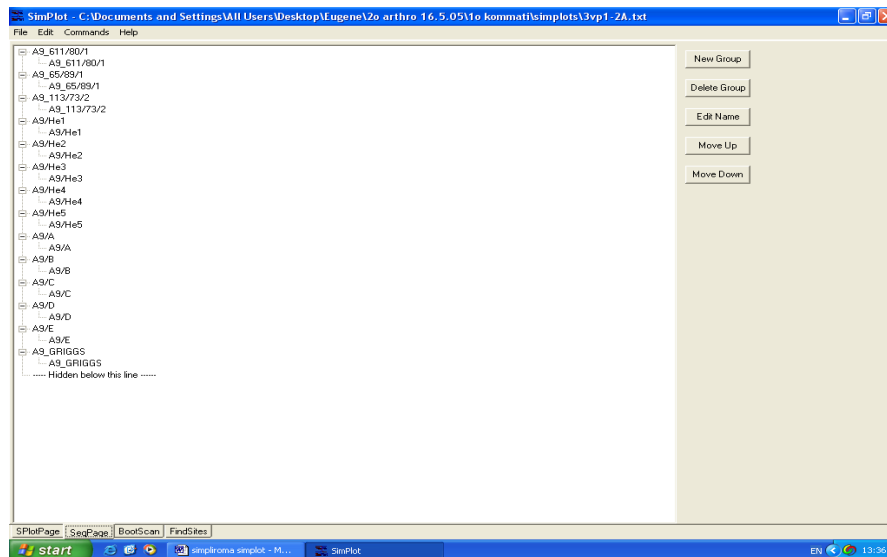
κατάληξης «.aln» για περαιτέρω χρήση στο πρόγραμμα στοίχισης Similarity Plot.

### 2.9.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ

Οι περισσότερες μέθοδοι, που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων στελεχών ή την απεικόνιση των θέσεων ανασυνδυασμού σε γενετικές αλληλουχίες, χρησιμοποιούν αλγορίθμους που βασίζονται στη γενετική απόσταση ή τη φυλογενετική ανάλυση. Η αρχή αυτών των μεθόδων είναι η εξής: ένα σύνολο αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences) και μία πιθανά ανασυνδυασμένη αλληλουχία (query sequence) στοιχίζονται και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε αλληλο-επικαλυπτόμενες υπο-περιοχές, για τις οποίες υπολογίζεται μία παράμετρος (statistic/measure). Αυτή η παράμετρος, αναπαρίσταται, κατόπιν, σε ένα γράφημα  $x/y$  ( $x/y$  scatter plot), τοποθετώντας ως συντεταγμένες στο άξονα  $x$  τις τιμές της στοίχισης (alignment coordinates) και στον άξονα  $y$  τη διακύμανση της παραμέτρου. Όλες οι τιμές (values) καταγράφονται στο μέσο (midpoint) ενός παραθύρου απεικόνισης (window) και συνδέονται γραφικά μέσω οριζόντιων γραμμών. Στην παραπάνω κατηγορία μεθόδων ανήκουν οι μέθοδοι ομοιότητας-ετερογένειας (similarity-dissimilarity methods) και οι μέθοδοι σάρωσης «bootscanning», οι οποίες βασίζονται σε ένα συνδυασμό φυλογενετικής ανάλυσης και ελέγχου αξιοπιστίας (bootstrap value) των υπό μελέτη αλληλουχιών. Στην πρώτη περίπτωση, η ανάλυση των πιθανά ανασυνδυασμένων αλληλουχιών πραγματοποιείται, χρησιμοποιώντας ως παράμετρο (statistic/measure) την τιμή της ομοιότητας (sim-similarity value) ή της ετερογένειας ( $1-sim$ ), που υπολογίζεται μεταξύ της εξεταζόμενης αλληλουχίας (query sequence) και κάθε μίας εκ των αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences). Στη δεύτερη περίπτωση, η φυλογενετική συσχέτιση των αλληλουχιών σε κάθε παράθυρο σάρωσης προκύπτει, χρησιμοποιώντας το προαναφερόμενο «bootstrap resampling» και η παράμετρος, που επιλέγεται για τη σύγκριση, είναι η αξία «bootstrap» των κλάδων που περιέχουν την πιθανά ανασυνδυασμένη

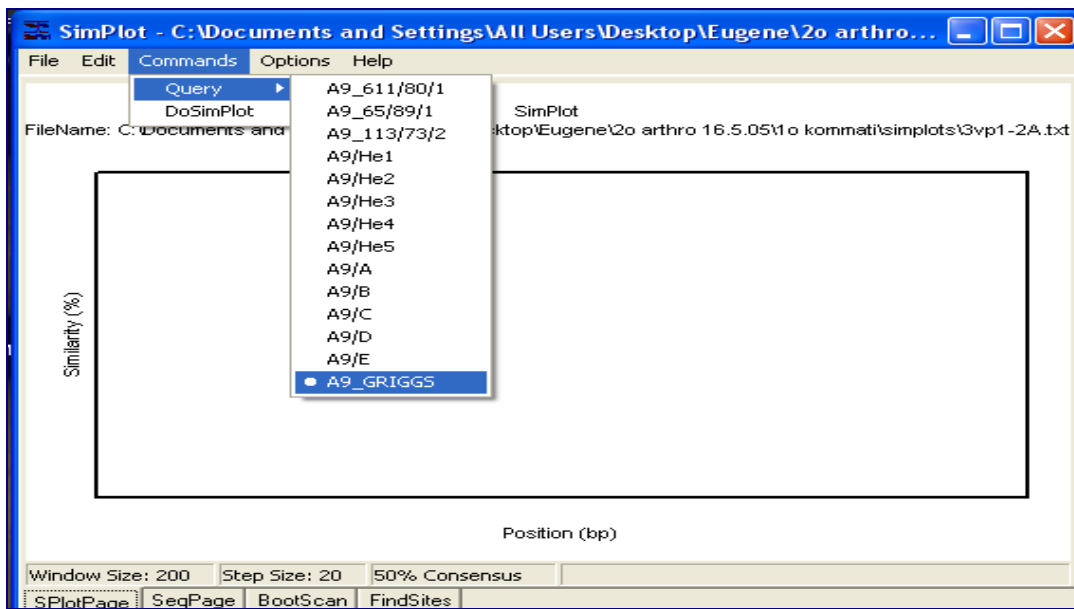
αλληλουχία μαζί με κάποια ή κάποιες από τις αλληλουχίες αναφοράς. Το πλεονέκτημα των μεθόδων σάρωσης «bootscanning» έναντι των μεθόδων ομοιότητας έγκειται στο γεγονός ότι η μετάπτωση από μία υψηλή σε μία χαμηλή αξία, χρησιμοποιώντας ως μέτρο σύγκρισης τις τιμές «bootstrap», είναι πιο προφανής.

Για τα στελέχη τα οποία αναλύθηκαν ως προς τον εντοπισμό πιθανού ανασυνδυασμού επιλέχθηκε, για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, το λογισμικό πακέτο Simplot, το οποίο πραγματοποιεί ανάλυση ομοιότητας-ετερογένειας αλλά και ανάλυση bootscanning. Το Simplot αποτελεί ένα ευπροσάρμοστο λογισμικό ανάλυσης ανασυνδυασμών (Lole et al., 1999) και μπορεί να εγκατασταθεί μέσω της διεύθυνσης <http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/>. Για την πραγματοποίηση μελέτης «bootscanning» είναι απαραίτητη και η ύπαρξη του λογισμικού πακέτου PHYLIP (απαραίτητα αρχεία είναι τα PHYLIP95.exe και PHYLIP96.exe), ενώ για την πραγματοποίηση σάρωσης με παράμετρο σύγκρισης την ομοιότητα ή την ετερογένεια των αλληλουχιών, το πρόγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά τη φόρτωσή του, ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία: μετά το άνοιγμα του προγράμματος, πραγματοποιείται φόρτωση ενός αρχείου στοίχισης (alignment file) των αλληλουχιών που πρόκειται να ερευνηθούν ως προς πιθανό ανασυνδυασμό. Έτσι προκύπτει ένα γράφημα με μορφή δέντρου, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.5.

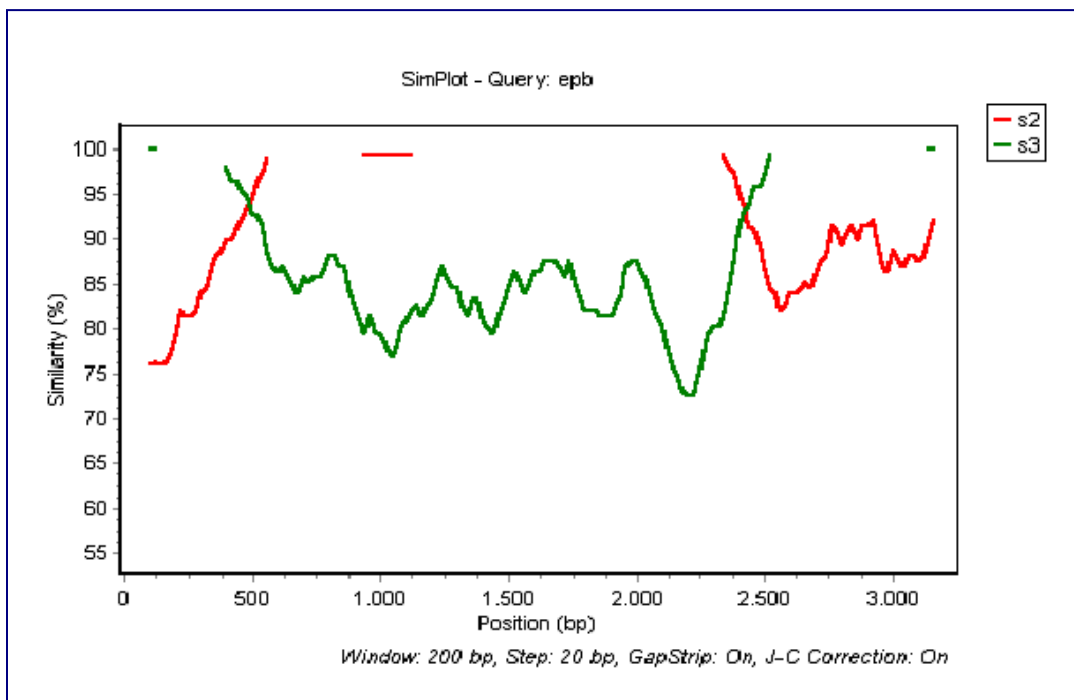


Εικόνα 2.5. Γράφημα μορφής φυλογενετικού δέντρου του προγράμματος Simplot.

Στη βάση του παράθυρου βρίσκεται η εντολή «SplotPage», μέσω της οποίας γίνεται μετάβαση στη σελίδα, όπου σχεδιάζονται τα γραφήματα ομοιότητας (Similarity Plots). Μέσω της εντολής «Commands» στο μενού αυτής της σελίδας, ορίζεται αρχικά η προς μελέτη αλληλουχία «query sequence», η οποία φέρει τον πιθανό ανασυνδυασμό και ως «reference sequence» τα πρότυπα στελέχη Sabin 1,2 ή 3 κατά περίπτωση όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 2.6. Στη συνέχεια, δίνεται η εντολή «Do Simplot» όπου προκύπτει ένα γράφημα όμοιο με αυτό που παρουσιάζεται στην εικόνα 2.7, στο οποίο αναπαρίσταται γραφικά η μεταβολή της ομοιότητας των εξεταζόμενων αλληλουχιών ως προς την αλληλουχία του προτύπου(ων) στελέχους(ων). Μέσω του γραφήματος είναι δυνατός, ο εντοπισμός πιθανής αντιστροφής της ομοιότητας μιας αλληλουχίας, συγκριτικά με μία άλλη, με αποτέλεσμα τον ακριβή καθορισμό θέσης «Position», κατά αλληλουχία «Sequence” και το ποσοστό % ομοιότητας «Similarity» μέσω της γραφικής απεικόνισης πιθανής ή πιθανών θέσεων ανασυνδυασμού.



Εικόνα 2.6. Επιλογή της εξεταζόμενης αλληλουχίας (query sequence) από ένα σύνολο αλληλουχιών που πρόκειται να αναλυθούν ως προς πιθανό ανασυνδυασμό με το πρόγραμμα



Εικόνα 2.7. Γραφική αναπαράσταση της αντιστροφής της ομολογίας δύο κλινικών, ανασυνδυασμένων στελεχών Sabin (S2/ S3/ S2 και S3/ S2/ S3) ως προς το πρότυπο στέλεχος S3, το οποίο έχει τεθεί ως «query sequence».

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Γενωμική ανάλυση ανασυνδυασμένων κλινικών στελεχών Sabin

##### Ανάλυση RFLP

Τα 23 εξετασθέντα κλινικά δείγματα ελέγχθηκαν για την εμβολιακή τους προέλευση και για το γονότυπο του τμήματος της 5'UTR γενωμικής περιοχής με τα εναρκτήρια μόρια UG52/UC53. Ακολούθως τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *HaeIII*, *HpaII*, *NcoI* και *AvaI* (Πίνακας 3.1.1).

Ο γονοτυπικός έλεγχος ανέδειξε μεταξύ των 23 στελεχών, 6 ως Sabin 1, 12 ως Sabin 2 και πέντε ως Sabin 3. Κανένα από τα 23 στελέχη δεν παρουσίασε μία ή περισσότερες τροποποιημένες περιοχές πέψης με οποιοδήποτε από τα ένζυμα περιορισμού ούτε διαφορετικό από το αναμενόμενο σύνολο (433bp) των τμημάτων της πέψης, γεγονός τα οποία θα δήλωναν την ύπαρξη μείγματος πολιοϊών. Τα αποτελέσματα του RFLP συνέπιπταν με τον ορότυπο του κάθε στελέχους όπως προσδιορίστηκε με την οροεξουδετέρωση.

Όσον αφορά τις πέψεις με τα ζεύγη UG1/UC1 και UG23/UC15, τα οποία ενισχύουν μέρος της καψιδιακής περιοχής και της 2C αντίστοιχα, όλα τα δείγματα παρουσίασαν το αναμενόμενο προφίλ σύμφωνα με τον ορότυπό τους και το γονότυπο με βάση τη 5'UTR περιοχή.

Τέλος όσον αφορά το ζεύγος των εναρκτήριων μορίων UG16/UC1, το οποίο ενισχύει μέρος της γενωμικής περιοχής 3C/3D, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ανασυνδυασμών πέραν της 2C περιοχής προς το 3'UTR άκρο του γενώματος, 17 από τα 23 δείγματα παρουσίασαν το αναμενόμενο RFLP προφίλ, ενώ τα υπόλοιπα έξι παρουσίασαν τα ακόλουθα προφίλ. Το δείγμα EP6 (Sabin 2 γονότυπος) παρουσίασε προφίλ S1 για τη πέψη με το *Hinfl* και S2 προφίλ με τα ένζυμα *RsaI* και *DdeI*. Το δείγμα EP12 (Sabin2 γονότυπος) παρουσίασε μίγμα προφίλ (S1/S3) για το ένζυμο *Hinfl* και (S2/?απροσδιόριστο)



για το *DdeI*. Το EP3 (Sabin 1 γονότυπος) παρουσίασε άγνωστο προφίλ με το *RsaI* και τα δείγματα EP9 (Sabin 2 γονότυπος) και EP16 (Sabin 3 γονότυπος) παρουσίασαν τα ίδια προφίλ για τα τρία ένζυμα που χρησιμοποιηθήκαν ως Sabin 1 και Sabin 2 αντίστοιχα. Τέλος το δείγμα EP23 (Sabin 3 γονότυπος) παρουσίασε προφίλ Sabin 1 και για τα τρία ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 3.1.1).

### 3.1.2 Ανάλυση αλληλουχιών

Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά ή απροσδιόριστα RFLP προφίλ από τα αναμενόμενα, αλληλουχήθηκαν τα δείγματα αυτά ήταν τα εξής: EP3,EP6,EP9,EP12,EP16 και EP23.

Οι αλληλουχίες των αναγνωρισμένων ως ανασυνδυσασμένων στελεχών στοιχίστηκαν -ευθυγραμμίστηκαν και με τις δύο εμπλεκόμενες αλληλουχίες των στελεχών Sabin που είναι κατοχηρωμένες στο GenBank. Οι δύο ευθυγραμμίσεις συνδέθηκαν έτσι ώστε να καθορίσουν την ελάχιστη κοινή τους αλληλουχία η οποία συνορεύει με δύο ετεροτυπικά νουκλεοτίδια. Αυτή η περιοχή αποτελεί το σημείο του ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων. Με αυτό τον τρόπο η ελάχιστη κοινή αλληλουχία που συνορεύει μεταξύ των δυο ετεροτυπικών νουκλεοτιδίων αποκαλύπτει το σημείο του ανασυνδυασμού των δύο γενωμάτων. Τέτοιες περιοχές βρέθηκαν για πέντε από τα 23 εξεταζόμενα στελέχη. Τα κλινικά στελέχη EP6,EP9,EP12,EP16 και EP23 βρέθηκαν ανασυνδυσασμένα σε ένα σημείο. Οι θέσεις των ανασυνδυασμών των πέντε στελεχών φαίνονται στο Σχήμα 3.1.1.

Επίσης προκειμένου να απεικονισθεί η ακριβής θέση των ανασυνδυασμών δημιουργήθηκε η ανάλυση Simplot, υπολογίζοντας το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ανασυνδυασμένων στελεχών και των δυο στελεχών αναφοράς τύπου Sabin που εμπλέκονται σε αυτόν (Σχήμα 3.1.2).

Το στέλεχος EP6 βρέθηκε ανασυνδυσασμένο στη 3D περιοχή, όπου το 5' άκρο είναι Sabin 2 ενώ το 3' άκρο είναι Sabin 1. Η κοινή περιοχή βρίσκεται μεταξύ των

νουκλεοτιδίων 6363-6372(αρίθμηση σύμφωνα με την αλληλουχία Sabin 2 - GenBank κωδικός AY184220). Το στέλεχος EP9 βρέθηκε ανασυνδυασμένο στη 3A περιοχή με σημείο ανασυνδυασμού S2/S1 μεταξύ των νουκλεοτιδίων 5313-5319 και το στέλεχος EP12 στη 3D περιοχή βρέθηκε ανασυνδυασμένο (S2/S1) στη θέση μεταξύ 6338-6363. Το στέλεχος EP16 παρουσίασε ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 στη 2C περιοχή, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4892-4914 (αρίθμηση σύμφωνα με την αλληλουχία Sabin 3 - GenBank κωδικός AY184221). Τέλος το EP23 βρέθηκε ανασυνδυασμένο (S3/S1) στη 2C περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4878-4887. Τα ανωτέρω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακας 3.1.2.

Πέραν των παρατηρούμενων ανασυνδυασμών παρατηρήθηκαν επίσης σημειακές μεταλλάξεις από το αρχικό εμβολιακό στέλεχος. Το EP3 παρουσίασε μία μετάλλαξη (συντηρημένη αντικατάσταση) στο νουκλεοτίδιο 6292 (αρίθμηση κατά Sabin 1) από T σε C (TAT, TAC → Tyr, Y) προσθέτοντας νέο σημείο κοπής για το ένζυμο *RsaI*. Συντηρημένες αντικαταστάσεις επίσης παρατηρήθηκαν στο στέλεχος EP9, στη θέση 4473 (αρίθμηση κατά Sabin 2) από G σε A (AAG, AAA → Lys, K) όπως επίσης στη θέση 4842 από G σε A (AGG, AGA → Arg, R) και στη θέση 5130 από T σε C (GAT, GAC Asp,D). Οι ανωτέρω μεταλλαγές δεν εμφάνισαν διαφοροποίηση στην αλληλουχία των αμινοξέων. Αντιθέτως η μεταλλαγή στο δείγμα EP6 άλλαξε την αλληλουχία του αμινοξέος στη θέση 5801 από A σε C (CAG, CCG από Gln, Q σε Pro, P) όπως επίσης η μεταλλαγή στη θέση 4992 του δείγματος EP12 από T σε A (TCA, ACA) άλλαξε τη αλληλουχία των αμινοξέων από Ser, S σε Thr, T. Οι δυο αυτές αμινοξικές αλλαγές δεν επηρέασαν τα αποτελέσματα του RFLP αφού δεν εντοπίζονται στις θέσεις πέψης των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 3.1.1).

Πίνακας 3.1.1. Οροτύπος, γονότυπος 5' UTR και RFLP προφίλ των κλινικών στελεχών.

ΣΤΕΛΕ ΧΟΣ	Ορότυπος	Γονότυπος 5'UTR	Εκκινητές								
			UG <sub>52</sub> /UC <sub>53</sub>		UG <sub>1</sub> /UC <sub>1</sub>		UG <sub>23</sub> /UC <sub>15</sub>			UG <sub>16</sub> /UC <sub>12</sub>	
			HaeII	Dde	HpaII	HinfI	Rsa	Alu	HinfI	Rsa	DdeI
			I	I			I	I		I	
EP1	Polio 1	Sabin 1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1
EP2	Polio 1	Sabin 1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1?	S1	S1?
EP3	Polio 1	Sabin 1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S?	S1
EP4	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP5	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP6	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S1	S2	S2
EP7	Polio 1	Sabin 1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1
EP8	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP9	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S1	S1	S1
EP10	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP11	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP12	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S1/S3	S2	S2/?
EP13	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
EP14	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
EP15	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
EP16	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S2	S2	S2
EP17	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP18	Polio 1	Sabin 1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1

EP19	Polio 1	Sabin 1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1
EP20	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP21	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP22	Polio 2	Sabin 2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
EP23	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S1	S1	S1

S1,S2 και S3 αντιστοιχούν στο RFLP προφίλ των κλινικών στελεχών με αυτά των προτύπων, ?

=απροσδιόριστο προφίλ.

Πίνακας 3.1.2. Μεταλλαγές, θέσεις και τύποι ανασυνδυασμών, αριθμός καταχώρισης στην γονιδιακή τράπεζα GenBank και ιστορικό .

Στελέχη	Μεταλλαγές Νουκλεοτιδική Θέση	Ανασυνδυασμός Νουκλεοτιδική Θέση	Τύπος Ανασυνδυασμού	Αριθμός καταχώρισης GenBank	Ιστορικό
EP3	T6294C/S1			AY741398	Υγιής εμβολιασμένος
EP6	C5801A/S2	6363-6372/S2	S2/S1	AY736177	Υγιής εμβολιασμένος
EP9	A4473G/S2 A4842G/S2 C5130T/S2	5313-5319/S2	S2/S1	AY736178	Υγιής εμβολιασμένος
EP12	A4992T/S2	6338-6363/S2	S2/S1	AY736179	Υγιής εμβολιασμένος
EP16		4892-4914/S3	S3/S2	AY736180	Υγιής

EP23	4878-4887/S3	S3/S1	AY736181	VAPP	–
				Εμβολιο	
				εξαρτώμενη	
				παραλυτική	
				πολιομυελίτιδα	

```

Sabin1      ****  *****  *****  *****  *****  *****  *****
EP 6        CCACCAGTGTGCTTACCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAAAG AAGAGAGA TATCTTGAACAAACA
Sabin2      CCACTAGTGTGCTGATACCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAAA AAGAGAGA TATCTTGAACAAACA
             CCACTAGTGTGCTGGATACCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAAA AAGAGAGA CATCTTGAATTAACA 6386
             *****  *****  *****  *****  *****  *****
    
```

```

Sabin1      ****  *****  *****  *****  *****  *****
EP 9        AGGGCAATGACAATTCTACAAGCGGTACAACCTTCGCGCAGTGGCTGGAGTTGTCTAT
Sabin2      CGGGCGATGACTATCCTACAAGCAGTAACTACTTTCGCGCAGTGGCTGGAGTTGTCTAT
             CGGGCGATGACTATCCTACAAGCAGTAACTACTTTCGCTGCAGTAGCGGGTGTCTGTAC 5340
             *****  *****  *****  *****  *****
    
```

```

Sabin1      ***  ****  *****  *****  *****  *****
EP 12       TTGTCCACCAAGTGTGCTGCTTACCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAAAG AAGAGAGATATCTTGAACA
Sabin2      TTGACCACTAGTGTGCTGATACCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAAAG AAGAGAGATATCTTGAACA
             TTGACCACTAGTGTGCTGGATACCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAAA AAGAGAGACATCTTGAATA 6382
             *****  *****  *****  *****  *****
    
```

```

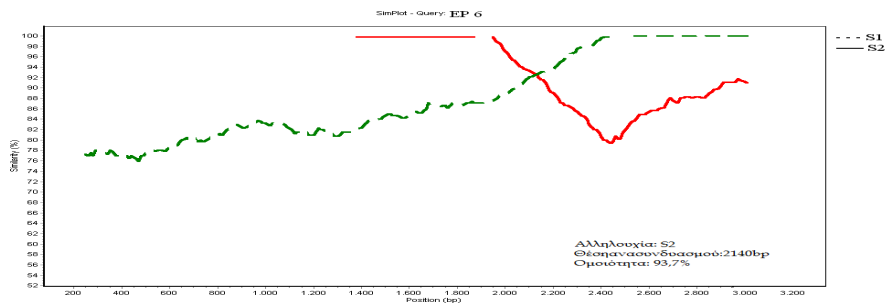
Sabin2      ***  **  *****  *****  *****  *****
EP 16       AGTCATGAGCGAGTACTCCAGAGACGGCAAAG CTCAACATGGCAATGGCTACTGA AATGTG
Sabin3      AGTGATGGGCGAGTACTCCAGAGATGCTAAA CTCAACATGGCAATGGCTACTGA AATGTG
             AGTGATGGGCGAGTACTCCAGAGATGGTAAA CTCAACATGGCAATGGCTACTGA SACGTG 4920
             *****  *****  *****  *****
    
```

```

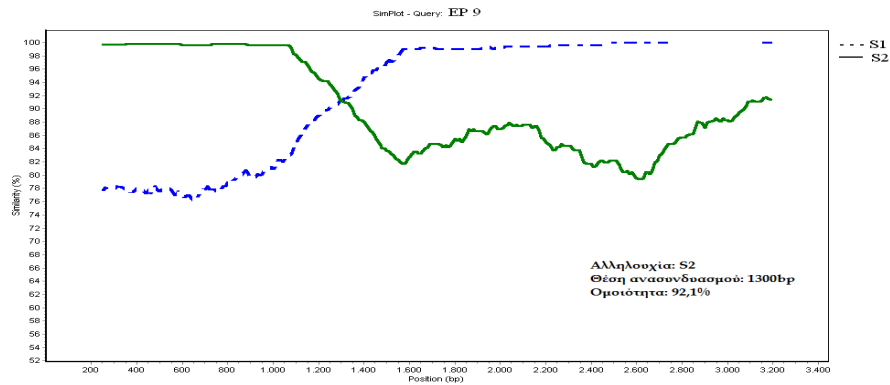
Sabin1      *****  *****  **  *****  *****  *****
EP23       GGTCAATGAAAGAGTATCTAGAGATGG GAAATGAAACATGGCCATGGCTACTGAAATGTG
Sabin3     AGTGATGGGCGAGTACTCCAGAGATGG GAAATGAAACATGGCCATGGCTACTGAAATGTG
             AGTGATGGGCGAGTACTCCAGAGATGG TAAACTCAACATGGCAATGGCTACTGAGACGTG 4920
    
```

\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

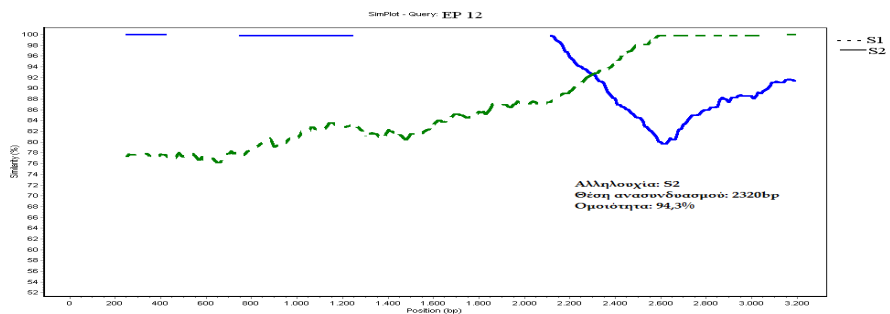
Σχήμα 3.1.1 Οι θέσεις των ανασυνδυασμού των δειγμάτων EP6:S2/S1, EP9:S2/S1, EP12:S2/S1, EP16:S3/S2 και EP23:S3/S1. Στο αριστερό τμήμα κάθε δείγματος παρουσιάζεται η προέλευση της αλληλουχίας, Sabin1,2 ή 3. Τα νουκλεοτίδια σε "bold" είναι αυτά που διαφοροποιούν τις τρεις αλληλουχίες. Τα νουκλεοτίδια στο πλαίσιο παρουσιάζουν τη θέση του ανασυνδυασμού.



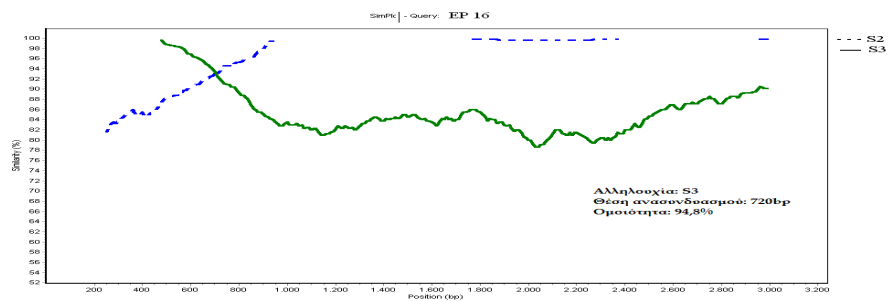
EP6:S2/ S1



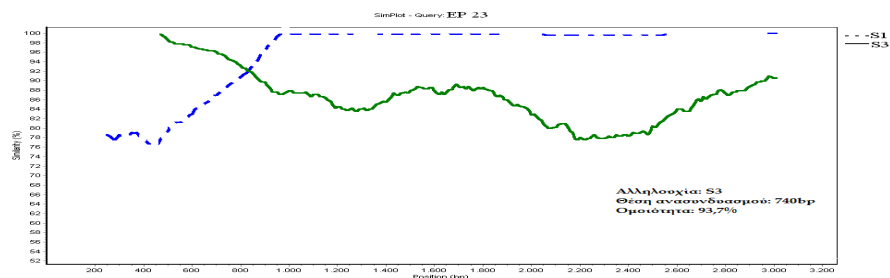
EP9:S2/S1



EP12:S2/ S1



EP16:S3/ S2



EP23:S3/ S1

Σχήμα 3.1.2. Νουκλεοτιδικά γραφήματα σύγκρισης (Simplot) από τη 2C ως την 3D της γενωμικής αλληλουχίας των πέντε ανασυνδυασμένων στελεχών EP6, EP9, EP12, EP16 και EP23 με τα αντίστοιχα δύο στελέχη αναφοράς. (S1:AY184219,S2:AY184220,S3:AY184221).

### 3.2 Διπλά και πολλαπλά ανασυνδυασμένα στελέχη *Sabin* εμβολιακής προέλευσης.

Για τον προσδιορισμό της εμβολιακής προέλευσης και του γονότυπου της 5'UTR των κλινικών στελεχών χρησιμοποιήθηκε και πάλι το ζεύγος των εκκινητών UG52/UC53 (Georgoroulou A. et al., 2000). Όλα τα στελέχη μελετήθηκαν με PCRs και τα προϊόντα τους αναλύθηκαν με RFLPs. (Πίνακας 3.2.1).

Η ανάλυση των πέντε στελεχών στη 5'UTR γενωμική περιοχή προσδιόρισε με τον ορότυπο Sabin τύπου 3. Κανένα από τα πέντε στελέχη δεν παρουσίασε μία ή περισσότερες τροποποιημένες θέσεις πέψης με κάποιο από τα ένζυμα HaeIII, HpaII και NcoI ούτε το άθροισμα των «ζωνών πέψης» ήταν μεγαλύτερο από το αναμενόμενο (433bp) στοιχεία που μπορεί να υποδηλώνουν τη παρουσία μειγμάτων πολιοιών (Georgoroulou A. et al., 2001; Karakasiliotis I. et al., 2004; Paximadi E. et al., 2006). Τα μοτίβα των RFLPs αντιστοιχούσαν με αυτά που προβλέφθηκαν από τον ορότυπο των στελεχών, ο οποίος είχε προσδιορισθεί με οροεξουδετέρωση.

Όσον αφορά το ζεύγος UG23/UC15 το οποίο ενισχύει μέρος της γενωμικής περιοχής 2C, τα δείγματα EPA, EPB και EPC παρουσίασαν το ίδιο ανάμεικτο RFLP προφίλ πέψης S2/S3 με το HinfI, S3/ απροσδιόριστο με το AluI και S3 προφίλ με το RsaI. Τα δείγματα EDP11 και EDP12 έδωσαν S3 προφίλ με τα HinfI και RsaI ενώ με το AluI το προϊόν της PCR δε πέφθηκε (Πίνακας 3.2.1)

Τέλος το ζεύγος εκκινητών UG16/UC12 το οποίο ενισχύει τμήμα της 3C-D περιοχής, χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση θέσεων ανασυνδυασμού πέραν του άκρου της 2C. Τα δείγματα EPA EPB και EPC παρουσίασαν S2 RFLP προφίλ για όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (HinfI, RsaI, DdeI). Για τα δείγματα EDP11 και EDP12 το προφίλ με τα ένζυμα HinfI και DdeI ήταν S2 καθώς και με το RsaI με έλλειψη μίας περιοχής κοπής. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.2.1.



Τα στελέχη που παρουσίασαν διαφορετικά ή απροσδιόριστα RFLP προφίλ από τα αναμενόμενα βάσει του γονότυπου της 5'UTR υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση (Paximadi E. et al 2006).

Οι αλληλουχίες εν συνεχεία στοιχίστηκαν με τα δύο στελέχη αναφοράς Sabin που συμμετείχαν στον ανασυνδυασμό και κατατέθηκαν στην γονιδιακή τράπεζα αλληλουχιών GenBank.(Accession number: AY738635, AY738636, AY738637, AY820974, AY820975).

Οι δύο αλληλουχίες συνδέθηκαν έτσι ώστε να καθορίζουν την ελάχιστη κοινή αλληλουχία ανάμεσα σε δύο ετεροτυπικά νουκλεοτιδία. Η αλληλουχία αυτή αποτελεί το σημείο ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων. Τέτοιες περιοχές βρέθηκαν και στα πέντε στελέχη που ερευνηθήκαν.

Τα κλινικά στελέχη EPA, EPB και EPC βρέθηκαν ανασυνδυασμένα σε δύο περιοχές (Σχήμα 3.2.1, Πίνακας 3.2.2). Οι πρώτες θέσεις ανασυνδυασμών εντοπίστηκαν στη περιοχή 2C και οι δεύτερες στη 3D. Και για τα τρία στελέχη το τμήμα της 5' UTR περιοχής του γενώματος αντιστοιχούσε στο γονότυπο Sabin 3, το ενδιάμεσο τμήμα σε Sabin 2 και το 3'UTR τμήμα σε Sabin 3 (S3/S2/S3). Όλα τα στελέχη παρουσίασαν ένα κοινό σημείο ανασυνδυασμού στη θέση μεταξύ 4642-4657 του γενώματος (η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αλληλουχία Sabin 3, GenBank, accession number AY184221). Η δεύτερη θέση ανασυνδυασμού στη 3D περιοχή για τα στελέχη EPA και EPB ήταν επίσης κοινή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6589-6598 (η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αλληλουχία Sabin 3, GenBank, accession number AY184221) ενώ για το στέλεχος EPC σε μία διαφορετική περιοχή από το νουκλεοτίδιο 6526-6550 (η αρίθμηση αντιστοιχεί επίσης στην αλληλουχία Sabin 3, GenBank, accession number AY184221).

Τα κλινικά στελέχη EDP11 και EDP12 βρέθηκαν επίσης ανασυνδυασμένα σε δύο κοινές θέσεις στη 2C και 3D περιοχή. Η 5'UTR περιοχή και των δύο στελεχών αντιστοιχεί σε γονότυπο Sabin 3, η ενδιάμεση περιοχή σε Sabin 2 και η 3' περιοχή σε Sabin 1 (S3/S2/S1) (Σχήμα 3.2.1, Πίνακας 3.2.2). Ο πρώτος ανασυνδυασμός βρέθηκε στη 2C περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4449-4464

(η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αλληλουχία S3, Gen Bank, accession number AY184221) και ο δεύτερος στη 3D περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 7142-7164 (η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αλληλουχία S3, GenBank, accession number AY184221).

Επιπλέον όσον αφορά το στέλεχος EDP11 εντοπίστηκε κατόπιν ταυτοποίησης με αλληλούχηση της 3D κωδικής περιοχής μέσα στο ανασυνδυσμένο S2 κομμάτι του γενώματος, ένα τμήμα 120 nt στη θέση 5900 (η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αλληλουχία S3, GenBank, accession number AY184221) το οποίο αντιστοιχούσε σε HEV-C (Πίνακας 3.2.2).

Μέσω της ανάλυσης Simplot απεικονίστηκε η ακριβής θέση των ανασυνδυσμάτων, υπολογίζοντας το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ανασυνδυσμένων στελεχών και των δυο στελεχών αναφοράς Sabin τα οποία εμπλέκονται σε αυτόν (Σχήμα 3.2.2).

Πίνακας 3.2.1 Ορότυπος, 5' UTR γονότυπος και ανάλυση RFLP ( 2C έως 3D ) των πολλαπλά ανασυνδυασμένων στελεχών Sabin.

Στέλεχος	Ορότυπος	Γονότυπος	Εκκνητές								
			UG <sub>52</sub> /UC <sub>53</sub>			UG <sub>23</sub> /UC <sub>15</sub>			UG <sub>16</sub> /UC <sub>12</sub>		
5'UTR			5' UTR ( 162-595 nt)			2C ( 4169-4965 nt)			3C-3D ( 5921-6516 nt)		
			HaeII	Nc	HpaII	HinfI	Rsa	AluI	HinfI	RsaI	Ddel
			I	oI			I				
EPA	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S2/S3	S3	S3/?	S2	S2	S2
						?					
EPB	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S2/S3	S3	S3/?	S2	S2	S2
						?					
EPC	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S2/S3	S3	S3/?	S2	S2	S2
						?					
EDP11	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	Uncut	S2	S2	S2
										έλλειψη κοψίματος	
EDP12	Polio 3	Sabin 3	S3	S3	S3	S3	S3	Uncut	S2	S2	S2
										έλλειψη κοψίματος	

S1, S2 , S3 το RFLP προφίλ των δειγμάτων που αντιστοιχούν στα πρότυπα

Sabin στελέχη, ? =Απροσδιόριστο προφίλ.

Πίνακας 3.2.2 Θέσεις και τύποι ανασυνδυσασμών, ιστορικό και αριθμός καταχώρησης στην γονιδιακή τράπεζα GenBank .

Στελέχη	Νουκλεοτιδική θέση ανασυνδυσασμού	Τύπος ανασυνδυσασμού	Ιστορικό	Αύξοντας αριθμός καταχώρησης
EPA	1 <sup>st</sup> 4642-4657 2 <sup>nd</sup> 6589-6598	S3/S2/S3	Υγιής εμβολιασμένος	AY738635
EPB	1 <sup>st</sup> 4642-4657 2 <sup>nd</sup> 6589-6598	S3/S2/S3	Υγιής εμβολιασμένος	AY738636
EPC	1 <sup>st</sup> 4642-4657 2 <sup>nd</sup> 6526-6550	S3/S2/S3	VAPP	AY738637
EDP11	1 <sup>st</sup> 4449-4464 2 <sup>nd</sup> 7142-7164	S3/S2-CAV 18 or 21-S2/S1	VAPP	AY820974
EDP12	1 <sup>st</sup> 4449-4464 2 <sup>nd</sup> 7142-7164	S3/S2/S1	VAPP	AY820975

```

Sabin2      *** ***** ***** ***** *****
EPA          ACAGGGTGTGGTTATATGGATGACCTAAACCAAAA TCCAGACGGAGCAGACATGAAACT
Sabin3      ACAAGGTGTGGTTATCATGGACGACCTAAACCAAAA TCCAGACGGAGCAGACATGAAACT 515
Sabin3      ACAAGGTGTGGTTATCATGGACGACCTAAACCAAAA CCCGATGGCGCAGATATGAAGCT 4680
*****

```

```

Sabin2      ***** ***** ***** ***** *****
EPA          TATGCAGCATTTACAAAAACCAGGAGTTGTCACTGG CAGTGCAGTTGGTTGATCCA
Sabin3      TATGCAGCATTTACAAAAACCAGGAGTTGTCACTGG TAGTGCAGTTGGATGCATCCA 6619
Sabin3      TATGCAGCATTTACAAAAACCAGGAGTTGTCACTGG TAGTGCAGTTGGATGCATCCA
*****

```

```

Sabin2      *** ***** ***** ***** *****
EPA          ACAGGGTGTGGTTATATGGATGACCTAAACCAAAA TCCAGACGGAGCAGACATGAAACT
Sabin3      ACAAGGTGTGGTTATCATGGACGACCTAAACCAAAA TCCAGACGGAGCAGACATGAAACT 514
Sabin3      ACAAGGTGTGGTTATCATGGACGACCTAAACCAAAA CCCGATGGCGCAGATATGAAGCT 4680
*****

```

```

Sabin2      ***** ***** ***** ***** *****
EPA          TCTCTATGCAGCATTTACAAAAACCAGGAGTTGTCACTGG CAGTGCAGTTGGTTGTTGA
Sabin3      TCTCTATGCAGCATTTACAAAAACCAGGAGTTGTCACTGG TAGTGCAGTTGGATGCGA 6615
Sabin3      CTTTATGCAGCATTTACAAAAACCAGGAGTTGTCACTGG TAGTGCAGTTGGATGCGA
*****

```

```

Sabin2      *** ***** ***** ***** *****
EPC          ACAGGGTGTGGTTATATGGATGACCTAAACCAAAA TCCAGACGGAGCAGACATGAAACT
Sabin3      ACAAGGTGTGGTTATCATGGACGACCTAAACCAAAA TCCAGACGGAGCAGACATGAAACT 508
Sabin3      ACAAGGTGTGGTTATCATGGACGACCTAAACCAAAA CCCGATGGCGCAGATATGAAGCT 4680
*****

```

```

Sabin2      ***** ***** ***** ***** *****
EPC          TCCAGTTTGAATGATTCAGTGGCCATGAGTGCAGTTGG TTGTGATCCAGATC
Sabin3      TCCAGTTTGAATGATTCAGTGGCCATGAGTGCAGTTGG ATGCGATCCAGACC 6563
Sabin3      TCCAGTTTGAATGATTCAGTGGCCATGAGTGCAGTTGG ATGCGATCCAGACC
*****

```

```

Sabin3      ***** ***** ***** ***** *****
EDP11 S3/S2 TAATTACA TACAGTTCAAGAGCAA ACACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTTCATGG 4500
Sabin2      TAATTACA TACAGTTCAAGAGCAA CCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGG 344
Sabin2      TAATTACG TACAGTTCAAGAGCAA GCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGG
*****

```

```

*****
Sabin2      ACATCCAGTAATGCCAATGAAGGA SATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCAG 7200
EDP11 S2/S1 ACATCCAGTAATGCCAATGAAGGA SATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCAG 551
Sabin1      TCATCCAGTAATGCCAATGAAGGA AATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCAG
*****
    
```

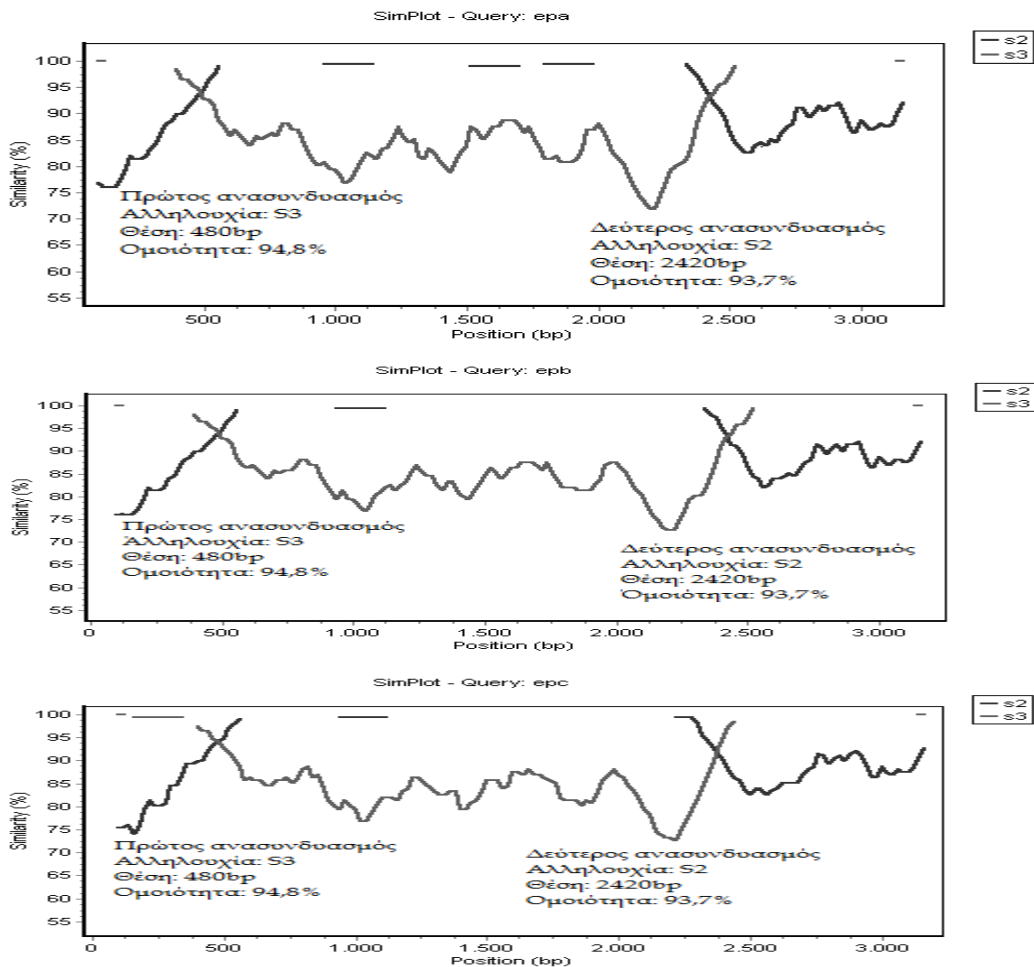
```

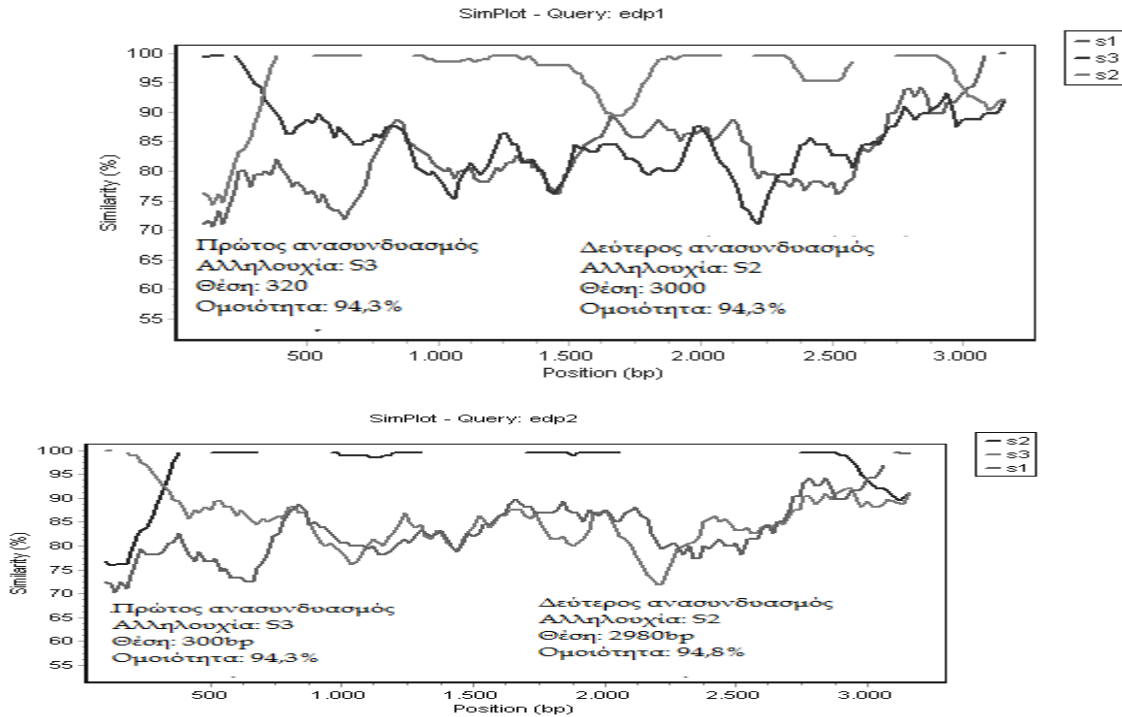
-----
*****
Sabin3      TAATTACA TACAGTTC AAGAGCAA ACACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGG 4500
EDP12 S3/S2 TAATTACA TACAGTTC AAGAGCAA GCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGG 336
Sabin2      TAATTACC TACAGTTC AAGAGCAA GCACCGTATTGAGCCAGTATGTTTGTAGTACATGG
*****
    
```

```

*****
Sabin2      ACATCCAGTAATGCCAATGAAGGA SATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCAG 7200
EDP12 S2/S1 ACATCCAGTAATGCCAATGAAGGA SATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCAG 485
Sabin1      TCATCCAGTAATGCCAATGAAGGA AATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCAG
*****
    
```

Σχήμα 3.2.1 Οι θέσεις ανασυνδυασμού των δειγμάτων EPA,B,C:S3/S2/S2 και EDP11,:S3/S2-CAV 18 ή 21-S2/S1. EDP12 :S3/S2/S1. Σημειογραφία σύμφωνα με τη λεζάντα του σχήματος 3.1.1.





Σχήμα 3.2.2 Νουκλεοτιδικά γραφήματα σύγκρισης (Simplot) από τη 2C ως τη 3D γενωμική περιοχή των ανασυνδυασμένων στελεχών EPA,EPB,EPC,EDP11(edp1) και EDP12(edp2) με τις αντίστοιχες γενωμικές περιοχές των στελεχών αναφοράς Sabin.

### 3.3 Ανασυνδυασμένα περιβαλλοντικά στελέχη Sabin σε Ελλάδα και Κύπρο

Μετά την ανάλυση των κλινικών δειγμάτων για τον εντοπισμό ανασυνδυασμών ακολούθησε ανάλυση και περιβαλλοντικών δειγμάτων, προερχόμενων από λύματα από την Ελλάδα και την Κύπρο.

Με σκοπό την εύρεση ενδοτυπικών Sabin ανασυνδυασμών, όλα τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού Πίνακας 3.3.1.

Ο γονότυπος των περιβαλλοντικών στελεχών προσδιορίστηκε και πάλι στην 5' UTR περιοχή με το ζεύγος εκκινητών UG52/UC53 (Georgoroulou *et al.*, 2000). Από τα 21 στελέχη, 13 χαρακτηρίστηκαν ως Sabin τύπου 2, έξι ως Sabin τύπου 3 και δύο ως Sabin τύπου 1 (τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3.1). Κανένα από τα 21 στελέχη δεν παρουσίασε μία ή περισσότερες τροποποιημένες θέσεις πέψης με κάποιο από τα ένζυμα περιορισμού *HaeIII*, *HpaII* και *NcoI* κί' ούτε το άθροισμα των "ζωνών πέψης" ήταν μεγαλύτερο από το

αναμενόμενο (433 bp) , στοιχεία που μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη μείγματος πολιοϊών (Paximadi *et al.*,2006).

Όσον αφορά το ζεύγος UG23/UC15 το οποίο ενισχύει τμήμα της 2C γενωμικής περιοχής, τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν το αναμενόμενο RFLP αποτέλεσμα σύμφωνα με το γονότυπό τους, εκτός από τα δείγματα A5C το οποίο παρουσίασε προφίλ S2/απροσδιόριστο με τα ένζυμα *HinfI* και *AluI* και S2 προφίλ με το *Rsa I*. Τα δείγματα LK3 και LK10 είχαν προφίλ S2/έλλειψη κοπής με το *HinfI* και S3/έλλειψη κοπής με το *AluI* ενώ είχαν το αναμενόμενο προφίλ S3 με το *RsaI*.

Το ζεύγος UG16/UC12, το οποίο ενισχύει τμήμα της περιοχής 3C-3D, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση θέσεων ανασυνδυασμού μετά τη 2C γενωμική περιοχή. Όλα τα στελέχη παρουσίασαν το αναμενόμενο προφίλ σύμφωνα το Sabin γονότυπό τους εκτός των ακολούθων δειγμάτων. Το ENP5 το οποίο παρουσίασε με τα ένζυμα *HinfI* και *DdeI*, S2/ έλλειψη κοπής ενώ με το *RsaI* παρουσίασε το αναμενόμενο S2 προφίλ, το ENP6 είχε S2/S1 προφίλ με τα *HinfI* και *DdeI* και S2 προφίλ με το *RsaI*. Το ENP7 παρουσίασε έλλειψη κοπής με τα ένζυμα *Hinf I*, *DdeI* και προφίλ S2/S1 με το *RsaI*. Το ENP8 με τα ένζυμα *HinfI* και *RsaI* παρουσίασε το αναμενόμενο S2 προφίλ ενώ με το ένζυμο *DdeI* παρουσίασε προφίλ S3/S2. Τα δείγματα της Κύπρου LK3,LK6 και LK10 με το ζεύγος UG16/UC12 παρουσίασαν S1 προφίλ και με τα 3 ένζυμα (*HinfI*,*RsaI*, *DdeI*) διαφορετικό όμως από το αναμενόμενο S3. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Πίνακα 3.3.1.

Δείγματα τα οποία παρουσίασαν διαφορετικά R.F.L.P. προφίλ από τα αναμενόμενα, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση (Paximadi et al 2006).

Οι αλληλουχίες κατατέθηκαν στη γονιδιακή τράπεζα GenBank με αριθμούς καταχώρησης A5C-DQ150696, LK3-DQ150697, LK6-DQ150698, LK10-DQ150699, ENP5-AY820970,ENP6-AY820971, ENP7-AY820972, ENP8-AY820973), στοιχίστηκαν και με τις δύο συμμετέχουσες, στο σημείο του ανασυνδυασμού Sabin αλληλουχίες και οι δύο στοιχίσεις συνδυάστηκαν έτσι



ώστε να καθορίσουν την ελάχιστη κοινή αλληλουχία η οποία ευρίσκεται μεταξύ των δύο ετεροτυπικών νουκλεοτιδίων. Αυτή η αλληλουχία περιέχει το σημείο του ανασυνδυασμού ανάμεσα στα δύο γενώματα. Τέτοιες θέσεις ανασυνδυασμού εντοπίστηκαν στα δείγματα ENP5,6,7,8 στη 3D περιοχή σε διαφορετικές νουκλεοτιδικές θέσεις.

Τα δείγματα ENP5, ENP6 και ENP8 ευρέθηκαν ανασυνδυασμένα ως S2/S1 στις νουκλεοτιδικές θέσεις από 6679-6692, 6337- 6362 και 6790-6795 αντίστοιχα, (αρίθμηση σύμφωνα με την αλληλουχία του στελέχους Sabin 2, αριθμός καταχώρισης GenBank AY184220). Η θέση ανασυνδυασμού για το στέλεχος ENP 7 ως S2/S3 βρέθηκε στη νουκλεοτιδική περιοχή 6549-6553, σύμφωνα με τη προαναφερθείσα αλληλουχία AY184220, όπως εμφανίζεται στο σχήμα 3.3.1.

Τα δείγματα LK3,LK6 και LK10 ευρέθηκαν διπλά ανασυνδυασμένα ως S3/S2/S1 με το πρώτο ανασυνδυασμό S3/S2 να εντοπίζεται στο 5' άκρο της 2C στη νουκλεοτιδική θέση 4766-4791 για το δείγμα LK3 και 4793-4803 για τα δείγματα LK6 και LK10 αντίστοιχα. Η δεύτερη θέση ανασυνδυασμού ως S2/S1 εντοπίζεται στο 3' άκρο της 2C στη νουκλεοτιδική θέση 4949-4950 σύμφωνα με την αλληλουχία του στελέχους Sabin 3 αριθμός καταχώρισης GenBank AY184221, όπως εμφανίζονται στο Σχήμα 3.3.1. Οι αριθμοί καταχώρισης των στελεχών στη GenBank καθώς και οι θέσεις των ανασυνδυασμών συνοψίζονται στον πίνακα 3.3.2

Πέραν των ανωτέρω ανασυνδυασμών μία σημειακή μετάλλαξη παρατηρήθηκε όσον αφορά το δείγμα A5C όπου μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση άλλαξε την αμινοξική αλληλουχία στη θέση 5584/S2 από G σε A (GAC, AAC από ασπαρτικό οξύ D σε ασπαραγίνη N ), έχοντας ως αποτέλεσμα το κόψιμο S2/? με τα ένζυμα *Hinfi* και *AluI* (ζεύγος UG23/UC15).

Πίνακας 3.3.1 Ορότυπος, 5' UTR γονότυπος και ανάλυση RFLP από τη 2C έως 3D γενομική περιοχή των 21 περιβαλλοντικών δειγμάτων Sabin.

Στέλεχος	Περιοχή	RT-PCR-RFLP								
		5'UTR			2C			3CD		
		UG52/UC53			UG23/UC15			UG16/UC12		
		HpaIIHaeIII			HinfI			HinfI		
		NcoI			AluI			DdeI		
A5C	Λευκωσία	S2	S2	S2	S2/?	S2	S2/?	S2	S2	S2
B2	Λευκωσία	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1
LK3	Λευκωσία	S3	S3	S3	S1/*	S3	S3/*	S1	S1	S1

LK6	Λευκωσία	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S1	S1	S1
LK7	Λευκωσία	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
LK8	Λευκωσία	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
LK10	Λευκωσία	S3	S3	S3	S1/*	S3	S3/*	S1	S1	S1
LK11	Λευκωσία	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
LK12	Λευκωσία	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
LK13	Λευκωσία	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
L8	Λεμεσός	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
ENP1	Μεταμόρφωση Αττικής	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1
ENP2	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
ENP3	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
ENP4	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
ENP5	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2/*	S2	S2/*
ENP6	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2/S1	S2	S2/S1
ENP7	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	*	S2/S1	*
ENP8	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S3/S2
ENP9	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
ENP10	Μεταμόρφωση Αττικής	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2

?:Απροσδιόριστο προφίλ, \*:έλλειψη κοπής

Πίνακας 3.3.2 Ανάλυση εντοπισμού θέσεων ανασυνδυασμού και μεταλλαγών των επτά περιβαλλοντικών στελεχών Sabin. Τύπος του ανασυνδυασμού και αύξοντας αριθμός καταχώρησης στην γονιδιακή τράπεζα GenBank.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση μεταλλαγών	Νουκλεοτιδική θέση ανασυνδυασμών	Τύπος ανασυνδυασμού	Αριθμός Καταχώρησης
A5C	G5584A/S2			DQ150696
LK3		1 <sup>st</sup> 4766-4791 2 <sup>nd</sup> 4949-4950	S3/S2/S1	DQ150697
LK6		1 <sup>st</sup> 4793-4803 2 <sup>nd</sup> 4949-4950	S3/S2/S1	DQ150698
LK10		1 <sup>st</sup> 4793-4803 2 <sup>nd</sup> 4949-4950	S3/S2/S1	DQ150699
ENP5		6679-6692/S2	S2/S1	AY820970
ENP6		6337-6362/S2	S2/S1	AY820971
ENP7		6549-6553/S2	S2/S3	AY820972
ENP8		6790-6794/S2	S2/S1	AY820973

```

*** *****
Sabin3 TAT GTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCC CATCACACC 4800
LK3 TAT GTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCC GATCACACC
Sabin2 TAC GTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCC GATCACACC

```

```

** *****

**** **
Sabin3 CTTC AA AAGA 4954
LK3 CTTC AA GAGA
Sabin1 CTTT AA GAGA
*** ** ****

** ***** **
Sabin3 CGC ATCACACCACC CAC 4806
LK6,10 CGG ATCACACCACC CAC
Sabin2 CGG ATCACACCACC TAC
*** ***** **

**** **
Sabin3 CTTC AA AAGA 4954
LK6,10 CTTC AA GAGA
Sabin1 CTTT AA GAGA
*** ** ****

*****
Sabin1 GAAGAGAAGCTGTTTGCC TTTGACTACACAGG STATGATGCATCTCTCAGCCCTGCTTGG
ENP5 GAAGAGAAGCTCTTTTGCT TTTGACTACACAGG GTATGATGCATCTCTCAGCCCTGCTTGG
Sabin2 GAAGAGAAGCTCTTTTGCT TTTGACTACACAGG TTATGATGCATCACTCAGCCCGCCTGG 6720
*****

*****
Sabin2 CACTAGTGCTGGA TACCCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAA AAAGAGAGACATCTTGAATAA 6380
ENP6 CACTAGTGCTGGA TACCCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAA GAAGAGAGATATCTTGAACAA
Sabin1 CACCAGTGCTGGC TACCCCTTATGTAGCAATGGGAAAGAA GAAGAGAGATATCTTGAACAA
*** *****

*****
Sabin2 GCCATGAGAATGGCATTGGAAATCTCTATGCAGCATTTCACAAAAC CCAGG AGTTGTC 6600
ENP7 GCCATGAGAATGGCATTGGAAATCTCTATGCAGCATTTCACAAAAC CCAGG GGTCGTC
Sabin3 AGCATGAGAATGGCATTGGAAACCTTTATGCAGCATTCCACAGGAAT CCAGG GGTCGTC
*****

*****
Sabin2 GATTACCTC AACCA TTCCACCACCTGTACAAAACAAAACCTTATTGCGTAAAGGCGGC 6840
ENP8 GATTACCTC AACCA CTACACCACCTGTACAAGAATAAAACATACTGTGTCAAGGGCGGT
Sabin1 GACTACCTA AACCA CTACACCACCTGTACAAGAATAAAACATACTGTGTCAAGGGCGGT
** ***

*** *****
Sabin3 TAT GTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCG CATCACACC 4800
LK3 TAT GTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCG GATCACACC
Sabin2 TAC GTTTTAGCCTCCACCAACTCCAGTCG GATCACACC
** *****

```

**Σχήμα 3.3.1** Οι θέσεις ανασυνδυασμού των δειγμάτων LK 3, 6, 10 (S3/S2/S1) και ENP 5, 6, 8 (S2/S1) και ENP7 (S2/S3). Στο αριστερό τμήμα κάθε δειγματος παρουσιάζεται η Sabin προέλευση της αλληλουχίας Sabin 1,2 ή 3. Τα νουκλεοτίδια σε “bold” είναι αυτά που διαφοροποιούν τις τρεις αλληλουχίες. Τα νουκλεοτίδια στο πλαίσιο παρουσιάζουν τη θέση του ανασυνδυασμού.

### 3.4 Εξέλιξη ενός πολυανασυνδυασμένου εμβολιακού στελέχους πολιοιού

Ο ορότυπος του στελέχους μετά από οροεξουδετέρωση με πολυκλωνικό αντιορό αναγνωρίστηκε ως πολιοϊός τύπου 2. Ο προσδιορισμός του γονότυπου στην 5' UTR (UG52/UC53) (Georgoroulou et al.2000) προσδιορίστηκε ως Sabin τύπου 2. Στο στέλεχος δεν εντοπίστηκε κάποια διαφοροποίηση των θέσεων περιορισμού-κόπης μέσω R.F.L.P., ούτε το άθροισμα ήταν μεγαλύτερο του αναμενόμενου των 434nt, γεγονός ενδεικτικά της παρουσίας μείγματος πολιοϊών. Το προϊόν της PCR με το ζεύγος των εκκινητών UG1/UC1, το οποίο ενισχύει ένα τμήμα της VP1, κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού HpaII, HaeIII και DdeI. Τα R.F.L.P. προφίλ τους ήταν όμοιο με εκείνα του στελέχους Sabin2. Η περιοχή που ενισχύθηκε με τα εκκινητικά μόρια UG23/UC15, κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού HinfI και RsaI. Το προφίλ τους ήταν επίσης όμοιο με εκείνο του στελέχους Sabin 2.

Η 3C-3D περιοχή που ενισχύθηκε με το ζεύγος UG16/UC12, κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού HinfI, DdeI και RsaI. Το R.F.L.P. προφίλ με το HinfI ήταν όμοιο με το προφίλ του Sabin τύπου 1. Η κοπή με το DdeI είχε σαν αποτέλεσμα προφίλ το οποίο δεν ταίριαζε με κανένα γνωστό, ενώ η πέψη με το RsaI έδωσε προφίλ όμοιο με εκείνο του Sabin τύπου 2. Τα αποτελέσματα με το ζεύγος UG16/UC12 είναι ενδεικτικά θέσης ή θέσεων ανασυνδυασμού μεταξύ των αλληλουχιών Sabin τύπου1 και 2.

Αλληλούχηση της τελευταίας αυτής γενωμικής περιοχής αποκάλυψε την παρουσία δύο θέσεων ανασυνδυασμού. Η πρώτη ως S1/S2 στη θέση μεταξύ 5995 και 6004, ενώ η δεύτερη ως S2/S1 στη θέση μεταξύ 6388 και 6389. Οι δύο θέσεις εντοπίστηκαν στη 3D γενωμική περιοχή, και ο ανασυνδυασμός ήταν τύπου S1/S2/S1.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα του R.F.L.P με το ζεύγος UG23/UC15 (προφίλ Sabin 2), περιμέναμε να εντοπίσουμε μία ακόμα θέση ανασυνδυασμού μεταξύ της 2C-3D περιοχής. Μετά από αλληλούχιση του 3' τμήματος της 2C γενωμικής περιοχής του ιού, εντοπίσαμε το τρίτο σημείο ανασυνδυασμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4985-5000 στο 3' άκρο της 2C περιοχής, (αριθμός καταχώρισης στη γονιδιακή τράπεζα GenBank AY830710, 4189-7368 nt, αρίθμηση σύμφωνα με Sabin τύπου 2) και για το 5' τμήμα της VP1 είναι AY830709. Μετά από εξονυχιστική εξέταση των χρωματογραμμάτων δεν εντοπίστηκαν αμφιλεγόμενα σημεία αλληλουχιών υποστηρίζοντας έτσι πως η αλληλουχία προήλθε από έναν και μόνο ιικό κλώνο (στελέχος I34).

### Μεταλλαγές και εξέλιξη του ιού

Σύγκριση της αλληλουχίας του στελέχους I<sub>34</sub> με αυτές των στελεχών αναφοράς Sabin αποκάλυψε έναν αριθμό μεταλλαγών και αμινοξικών αντικαταστάσεων (Πίνακας 3.4.1).

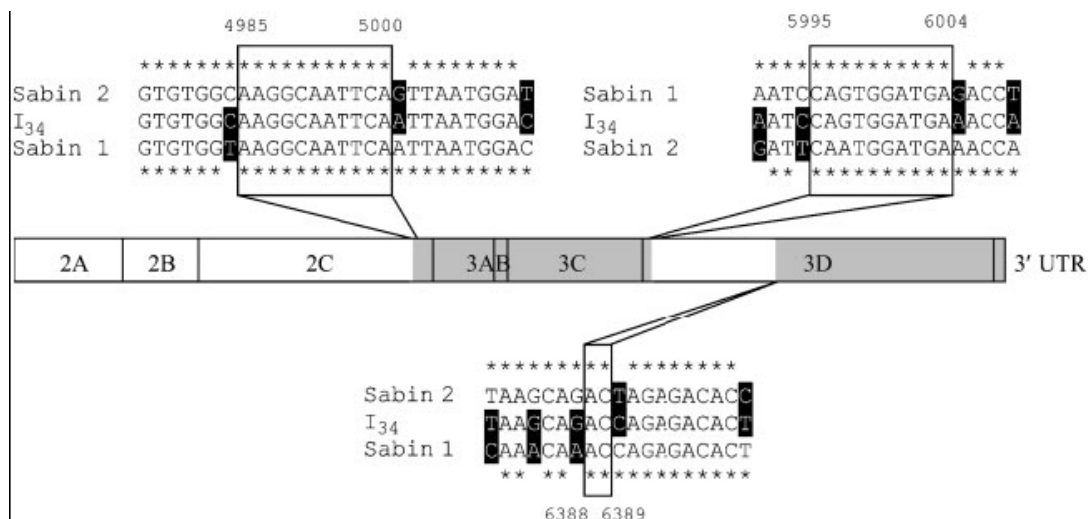
Προκειμένου να καθοριστεί ο βαθμός απόκλισης των μη-συνώνυμων και συνώνυμων νουκλεοτιδίων ξεχωριστά, έγιναν υπολογισμοί σύμφωνα με τον αλγόριθμο του Li (Li et al., 1985).

Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν για όλη την γενωμική περιοχή η οποία αλληλουχίστηκε ήταν οι εξής: το ποσοστό των μεταλλαγμένων συνώνυμων θέσεων μεταξύ όλων των συνώνυμων θέσεων (Ks), το ποσοστό των μεταλλαγμένων μη-συνώνυμων θέσεων μεταξύ όλων των μη-συνώνυμων θέσεων (Ka) και το ποσοστό των μεταλλαγμένων θέσεων μεταξύ όλων των θέσεων (Kt). Οι τιμές οι οποίες υπολογίστηκαν ήταν οι εξής: Ks 1·02%, Ka 0·11% και Kt 0·31%. Αυτές οι τιμές χρησιμοποιήθηκαν ώστε να υπολογιστεί η ηλικία του στελέχους συγκρινόμενη με τις καμπύλες αναφοράς για τη εξέλιξη των VP1,2ABC και 3D περιοχών (Gavrilin et al., 2000). Ο χρόνος των Ks, Ka και Kt

υπολογίστηκε σε 57,42 και 43 μέρες αντίστοιχα, με μέσο όρο τις 47 μέρες (7 εβδομάδες  $\pm 8$  μέρες).

Οι πλειοψηφία των θέσεων μεταλλαγών (64%) στο γένωμα (Σχήμα 3.4.1) εντοπίζεται στην περιοχή η οποία περικλείεται μεταξύ της πρώτης και της τρίτης θέσης ανασυνδυασμού (39% του συνολικού γενώματος). Οι τιμές Ks, Ka και Kt για τη περιοχή αυτή υπολογίστηκαν ως 1·6, 0·18 και 0·50% αντίστοιχα και η αντίστοιχη ηλικία προσδιορίστηκε ως 72,73 και 70 ημέρες, με αριθμητικό μέσο τις 72 ημέρες (10 εβδομάδες και  $\pm 2$  μέρες). Οι ίδιες παράμετροι υπολογίστηκαν και για τις υπόλοιπες περιοχές του γενώματος, του I34.

Θεωρώντας τις περιοχές αυτές ως μία αλληλουχία, οι τιμές για τις τρεις παραμέτρους ήταν, Ks 0·63%, Ka 0·06% και Kt 0·18%, αντιστοιχώντας σε 35 ημέρες, 23 και 25 με μέσο όρο τις 28 (4 εβδομάδες  $\pm 6$  μέρες).



**Σχήμα 3.4.1** Στο σχέδιο απεικονίζονται με λευκό χρώμα οι αλληλουχίες Sabin τύπου 1 και με γκρι οι αλληλουχίες Sabin τύπου 2 του γενώματος του ανασυνδυασμένου στελέχους I34 .



Μεταλλαγές στο Sabin τύπο 2		Μεταλλαγές στο Sabin τύπο 1	
Νουκλεοτιδική αντικατάσταση	Αμινοξική αντικατάσταση	Νουκλεοτιδική αντικατάσταση	Αμινοξική αντικατάσταση
C2448→T		C5590→T	
A2784→G		C5692→T	
A4264→C	T1173→P	T5793→C	V1684→A
T6333→C		T5989→C	
A6241→C	M1832→L	T6676→C	
A6348→G			

**Πίνακας 3.4.1** Μεταλλαγές και νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στην γενωμική περιοχή 2C έως 3D του στελέχους I34.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής επιχειρήθηκε η ανίχνευση ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων στην γενωμική από τη 2C έως τη 3D περιοχή, εμβολιακής και εν συνεχεία περιβαλλοντικής προέλευσης στελεχών πολιοϊών.

Αρχικά αλληλουχήθηκε το γένωμα πέντε απλά ανασυνδυασμένων στελεχών πολιοϊού κλινικής προέλευσης (EP6:S2/S1, EP9:S2/S1, EP12:S2S1, EP16:S3/S2, EP23:S3/S1) και συγχρόνως μελετήθηκαν σημειακές μεταλλάγες στα ανασυνδυασμένα δείγματα EP6, EP9 και EP12 (Κεφάλαιο 4.1).

Στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν τέσσερα διπλά ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊού κλινικής προέλευσης (EPA: S3/S2/S3, EPB: S3/S2/S3, EPC: S3/S2/S3 ,EDP12: S3/S2/S1) καθώς επίσης και το κλινικό στέλεχος EDP11( S3/S2-CAV 18 or 21-S2/S1) το οποίο χαρακτηρίζεται ως πολυανασυνδυασμένο (Κεφάλαιο 4.2).

Ακολούθως μελετήθηκαν τέσσερα περιβαλλοντικά απλά ανασυνδυασμένα στελέχη (ENP5: S2/S1, ENP6: S2/S1 ENP7: S2/S3, ENP8: S2/S1), καθώς και τρία διπλά (LK3: S3/S2/S1, LK6: S3/S2/S1, LK10: S3/S2/S1) (Κεφάλαιο 4.3).

Τέλος το πολυανασυνδυασμένο κλινικό στέλεχος I34 (S2/S1/S2/S1) αλληλουχήθηκε και μελετήθηκε μέσω των μεταλλαγών του (Κεφάλαιο 4.4).

#### 4.1 Γενωμική ανάλυση ανασυνδυασμένων κλινικών στελεχών τύπου Sabin

Είναι γνωστό πως το γένωμα των πολιοϊών εξελίσσεται με ταχύτατο ρυθμό (Kew *et al.*, 1998; Chetverin A.B., 1999). Οι ανασυνδυασμοί συμβαίνουν με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ των εμβολιακών στελεχών μετά την χορήγηση του τριδύναμου εμβολίου OPV. Σε υγιείς εμβολιασμένους και VAPP ασθενείς, κυρίως, οι συνηθέστεροι ανασυνδυασμοί είναι S2/S1 και S3/S2. (Cuervo *et al.*, 2001; Georgoroulou *et al.* ,2000) Αντιθέτως είναι πολύ σπάνιοι οι ανασυνδυασμοί με βάση το S1 προς το 5' άκρο του γενώματος (S1/S<sub>x</sub> όπου x Sabin 2 ή Sabin 3 ) (Cuervo *et al.*, 2001).

Στη παρούσα μελέτη επεκτείνουμε την έρευνα για πιθανές θέσεις ανασυνδυασμών στο γένωμα των πολιοϊών καλύπτοντας την γενωμική περιοχή από τη 2C έως τη 3D με σκοπό τον εντοπισμό όλων των πιθανών σημείων ανασυνδυασμού. (Πίνακας 3.1.1). Είκοσι τρία κλινικά στελέχη προερχόμενα από υγιείς εμβολιασμένους και ασθενείς με VAPP εξετάστηκαν για τον εντοπισμό θέσεων ανασυνδυασμένου.

Οι περιοχές που επιλέχθηκαν να διερευνηθούν προς εντοπισμό ανασυνδυασμένων στελεχών βασίστηκαν σε προηγούμενη μελέτη μας (Karakasiliotis *et al.*, 2004). Δεν βρέθηκαν ανασυνδυασμοί στη 5'UTR και στη VP1 γενωμική περιοχή, υποστηρίζοντας τη σπανιότητα του συμβάντος (Blomqvist *et al.*, 2003; Brown *et al* 2003;Wimmer *et a.,l* 1993;Blondel *et al.*, 1998).

Σε αυτή την έρευνα πέντε κλινικά στελέχη βρέθηκαν διατυπικά ανασυνδυασμένα Σχήμα 3.1.1 . Το πρώτο τμήμα του ανασυνδυασμού ήταν είτε Sabin τύπου 2 ή 3 , ενώ το δεύτερο τμήμα ήταν Sabin τύπου 1 ή 2. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως οι ανασυνδυασμοί τύπου S2/S1 και S3/S2 εντοπίζονται κυρίως στη 3D και 2C περιοχή αντίστοιχα (Cuervo *et al.*, 2001;Georgoroulou *et al.*, 2001;Karakasiliotis *et al.*,2004). Στη παρούσα μελέτη τα στελέχη EP6 και EP12 παρουσίασαν το μοντέλο του S2/S1 στη 3D περιοχή το στέλεχος EP16 αποδείχτηκε να είναι ανασυνδυασμένο ως S3/S2 ενώ το στέλεχος EP23 ως S3/S1 στη 2C περιοχή. Το στέλεχος EP9 βρέθηκε ανασυνδυασμένο στη 3A περιοχή ως S2/S1, γενωμική περιοχή όπου οι ανασυνδυασμοί σπανίζουν (Cuervo *et al.*, 2001). Άξιο λόγου είναι το γεγονός πως οι θέσεις των ανασυνδυασμών στα στελέχη EP12 και EP16 είναι όμοιες με αυτές που βρέθηκαν από τη Cuervo *et al.*, 2001.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν την υπόθεση των συντηρημένων τύπων και θέσεων ανασυνδυασμένων μέσα στο γένωμα των πολιοϊών, γεγονός το οποίο ενισχύει την άποψη περί συγκεκριμένων δευτεροταγών δομών, με σκοπό την υποστήριξη βιώσιμων ανασυνδυασμών και μεταλλαγών (Georgescu *et al .*, 1995). Ετεροτυπικοί ανασυνδυασμοί ανάμεσα

στους εντεροϊούς του είδους C είναι ένα σχετικά συχνό φαινόμενο, και όπως δείχνουν πρόσφατες δημοσιεύσεις μπορεί να συμμετάσχει στη διατήρηση συγκεκριμένων RNA αλληλουχιών σε συγκεκριμένες θέσεις (Brown *et al.*, 2003; Blomqvist *et al.*, 2004). Κατά συνέπεια οι ανασυνδυασμένοι ιοί μέσω των θέσεων ανασυνδυασμού συμμετέχουν στην εξέλιξη των εντεροϊών, δημιουργώντας βιώσιμους απογόνους.

Το γεγονός ότι ο γενετικός ανασυνδυασμός συγκαταλέγεται στη φυσική εξέλιξη των στελεχών Sabin επίσης υπογραμμίζεται από το υψηλό ρυθμό εντοπισμού των ανασυνδυασμένων γενωμάτων στα στελέχη OPV τα οποία ανακτώνται από υγιείς εμβολιασμένους, τις επαφές τους ή και από ασθενείς με VAPP (Furione *et al.*, 1993; Georgopoulou *et al.*, 2001).

Όσον αφορά τις σημειακές μεταλλαγές, αυτές εντοπίζονται σε συγκεκριμένα γενωμικά σημεία στα στελέχη εμβολίων τύπου Sabin των πολιοϊών, οι οποίες είναι γνωστές ως καθοριστικός παράγων ανάκλησης (Chumakov *et al.*, 1992; Equestre *et al.*, 1991; Pollard *et al.*, 1989) ή εξασθένησης (McGoldrick *et al.*, 1995; La Monica *et al.*, 1987) της μολυσματικότητας.

Στη παρούσα μελέτη, σημειακές μεταλλαγές παρατηρήθηκαν στα ανασυνδυασμένα δείγματα EP6, EP9 και EP12 (Πίνακας 3.1.2). Μεταλλαγή στη θέση 5801 αντικαθιστά το νουκλεοτίδιο A σε C αλλάζοντας έτσι το αμινοξύ από Gln (Q) σε Pro (P). Στην ίδια θέση νουκλεοτιδική αλλαγή από A σε G είχε προηγουμένως αναφερθεί από τον Blomqvist *et al.*, 2003. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως σημαντική υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι αντικαταστάσεις δεδομένων αμινοξέων σε συγκεκριμένες θέσεις μπορεί να λειτουργήσουν ως προάγγελος της ανάκλησης της εξασθένησης του ιού με αποτέλεσμα την αύξηση της μολυσματικότητάς του. Το στέλεχος EP12 επίσης παρουσιάζει νουκλεοτιδική αντικατάσταση από T σε A στη θέση 4992, έχοντας ως αποτέλεσμα την αμινοξική αλλαγή από Ser, (S) σε Thr, (T). Μεταλλαγή στη θέση 4473 του δείγματος EP9 σύμφωνα με το τύπο Sabin 2, έχει επίσης αναφερθεί (Equestre *et al.*, 1991), χωρίς αμινοξική αλλαγή (K, Lys.), ενώ στο ίδιο δείγμα

βρέθηκαν οι σιωπηλές μεταλλάξεις A4842G/S2 και C5130T/S2. Τέλος στο δείγμα EP3 η αντικατάσταση T6292C/S1 προσθέτει μία ή περισσότερες θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου RsaI. Αξίζει να σημειωθεί πως όλες οι σημειακές μεταλλάξεις προηγούνται των θέσεων ανασυνδυασμού στο γένωμα, γεγονός το οποίο μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι ο ανασυνδυασμός συμβάλλει στην αύξηση της νευρομολυσματικότητας του ανασυνδυασμένου στελέχους.

Παρακολούθηση των αλλαγών μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των πολιοϊών, μέσω των ανασυνδυασμών και των μεταλλάξεων ιδιαίτερα εκείνων των μεταλλάξεων οι οποίες εντοπίζονται στις καψιδιακές πρωτεΐνες μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση σε μοριακό επίπεδο των αλλαγών εκείνων οι οποίες θα οδηγήσουν το ανασυνδυασμένο στέλεχος προς την αύξηση της μολυσματικότητας (Kew *et al.*, 2004).

Ενδεχομένως λοιπόν για πολύ-ανασυνδυασμένα στελέχη το επίπεδο ανοσίας ενός δεδομένου πληθυσμού να μην είναι επαρκές μέσω της ανοσίας που προσφέρει το IPV ή το OPV. Μέχρι στιγμής δεν έχουν γίνει αναφορές για τέτοια στελέχη, αλλά στην περίπτωση αυτή οι συνέπειες θα είναι καταστροφικές αφού τα παρόντα εμβόλια θα ήταν αναποτελεσματικά.

Οι πρόσφατες επιδημίες από κυκλοφορούντα εμβολιο-προερχόμενα στελέχη πολιοϊών (cVDPVs) επίσης υποδηλώνουν τη σημαντικότητα του ελέγχου από εξειδικευμένα εργαστήρια ώστε να ανιχνεύονται όσο το δυνατόν συντομότερα τα cVDPVs, δεδομένου ότι αυτά αναμένεται σταδιακά να αποτελέσουν την κύρια πηγή κυκλοφορούντων εμβολιο-προερχόμενων στελεχών πολιοϊών.

4.2 Διπλά και πολλαπλά ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin εμβολιακής προέλευσης.

Πέντε στελέχη Sabin εμφάνισαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ευρέθηκαν διπλά ανασυνδυασμένα.

Είναι γνωστό πως οι ανασυνδυασμοί κατά κανόνα είναι μονοί σε κάθε στέλεχος. Ωστόσο, πολλαπλές θέσεις ανασυνδυασμού, όπως διπλά ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν παρατηρηθεί, εκφράζοντας την δυνατότητα των γεγονότων πολλαπλών ανασυνδυασμών (Cuervo *et al.*, 2001; Blomqvist *et al.* , 2003; Georgoroulou *et al.* , 2001; Georgescu *et al.*,2005;Kew *et al.*,2002; Karakasiliotis *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003).

Οι υγιείς εμβολιασμένοι εκκρίνουν πολιοϊούς για μικρό χρονικό διάστημα μετά από τον εμβολιασμό με το OPV. Η περίοδος αυτή σπάνια ξεπερνά το όριο των μερικών εβδομάδων. Ωστόσο, οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς εκκρίνουν πολιοϊούς προερχόμενους από το εμβόλιο για αρκετούς μήνες έως και χρονιά.

Κατόπιν ανάλυσης RT-PCR,RFLP και αλληλούχισης , τα πέντε δείγματα εμφάνισαν δύο θέσεις ανασυνδυασμού. Η πρώτη στη 2C περιοχή και η δεύτερη στη 3D. Όσον αφορά τα δείγματα EPA, EPB και EPC το 5' τμήμα του γονιδιώματος ήταν Sabin τύπου 3, το ενδιάμεσο Sabin τύπου 2 και το τμήμα 3' Sabin τύπου 3 (S3/S2/S3). Το γεγονός αυτό, δηλαδή η διευθέτηση των ανασυνδυασμένων στελεχών ως Sabin τύπου 3-, τύπου 2-, τύπου 3-ίσως υποδηλώνει ένα πλεονέκτημα επιλογής ομοτυπικών άκρων στο 5' και 3' τμήμα.

Για τα στελέχη EDP11 και EDP12 το 5' τμήμα του γονιδιώματος ήταν Sabin τύπου 3, το ενδιάμεσο τμήμα τύπου 2 και το 3' τμήμα τύπου 1 (S3/S2/S1).

Για τα στελέχη EPA,EPB και EPC ο πρώτος ανασυνδυασμός και για τα τρία στελέχη βρισκόταν στη 2C περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4642-4657 (αρίθμηση σύμφωνα με το S3, GenBank accession number AY184221) με μοτίβο ανασυνδυασμού S3/S2. Το δεύτερο μοτίβο ανασυνδυασμού ήταν επίσης και για τα τρία δείγματα στη 3C-D περιοχή αλλά σε διαφορετικές θέσεις. Για τα στελέχη EPA και EPB στη θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6589-6598 και για το EPC στη θέση μεταξύ 6526 -6550nt.

Τα στελέχη ERA, EPB και EPC ενδέχεται να ήταν συνεξελισσόμενα με διαφορετικό βαθμό απόκλισης από το πατρικό στέλεχος εμβολίου μιας και φέρουν τον ίδιο ανασυνδυασμό. Ακόμα ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη ενός τριμερούς διατυπικού ανασυνδυασμού, και στα τρία στελέχη, με όμοια άκρα Sabin τύπου 3.

Αυτά τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν πως μοτίβα διαφορετικών ανασυνδυασμών μπορούν να εξελιχθούν σε στελέχη προερχόμενα από κοινό τόπο και χρόνο απομόνωσης, τονίζοντας έτσι την προσαρμοστικότητα του γενώματος των πολιοϊών.

Για τα στελέχη EDP11 και EDP12, τα μοτίβα και οι θέσεις των ανασυνδυασμών ήταν κοινά. Ο πρώτος ανασυνδυασμός S3/S2 εντοπίζεται στη νουκλεοτιδική θέση μεταξύ 4449-4464nt (αρίθμηση σύμφωνα με τον Sabin τύπου 3, GenBank accession number AY184221) στη 2C περιοχή. Ο δεύτερος ανασυνδυασμός, S2/S1 βρίσκεται στη θέση 7142-7164nt στη περιοχή 3D-3'UTR. Τα αποτελέσματα αυτά κατόπιν αλληλούχησης και ανάλυσης όλου του 3' τμήματος του ιϊκού γενώματος προσδιόρισαν τον σπάνιο τριπλό ανασυνδυασμός S3/S2/S1.

Το πρόγραμμα ανάλυσης SimPlot, ανέδειξε ένα γενωμικό τμήμα στο στέλεχος EDP11 (Σχήμα 3.2.2), πλησίον της θέσεως 5900nt, όπου το στέλεχος τύπου S2 φαίνεται να ανασυνδυάζεται με στέλεχος τύπου S1. Ωστόσο, το πρόγραμμα ανάλυσης Blast N αποκάλυψε μία περιοχή 120nt (κοντά στη θέση 5900nt) όπου η ομοιότητα της αλληλουχίας με CAV18 (κλινικό στέλεχος, αριθμός καταχώρησης GenBank AB205396) ήταν 93% και με CAV21 ήταν 88% (στέλεχος Kuykendall, αριθμός καταχώρησης GenBank AF465515), δηλαδή μεγαλύτερη ομοιότητα από αυτή που αντιστοιχούσε στο S1 (87.5%). Τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι ενδιαφέροντα, καθώς οι ιοί CAV18 και CAV21 ανήκουν στο γένος C των ανθρώπινων εντεροϊών (Human Enteroviruses C- group, HEV-C) το οποίο όπως έχει αναφερθεί είναι γενωμικά παρόμοιο με τους πολιοϊούς (Oberste et al., 1999; Blomqvist et al., 2004).

Παρόλο που η αλληλούχηση γύρω από τη θέση 5900nt παρουσίασε ομοιότητα με τους CAV18 και CAV21 δεν εντοπίστηκε η ακριβής θέση ανασυνδυασμού. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός πως μέχρι στιγμής δεν έχουν αλληλουχηθεί και κατατεθεί στο GenBank στελέχη CAV18 και CAV21 που πιθανόν εμπλέκονται με τον ανασυνδυασμό με το στέλεχος Polio EDP11. Σχετικά πρόσφατη αναφορά έδειξε πως στελέχη HEV-C που απομονώθηκαν στην Μαδαγασκάρη σε συχνότητα περίπου 50% μεταξύ των στελεχών non-polio Εντεροϊών (NEPV) προτείνοντας τη πιθανή συμμετοχή των στελεχών HEV-C στην εμφάνιση ανασυνδυασμένων cVDPVS (Rakoto-Andrianarivelo *et al.*,2005) τουλάχιστον μεταξύ των εντεροϊών οι οποίοι κυκλοφορούν στις τροπικές περιοχές. Τα κυκλοφορούντα cVDPV στελέχη μπορούν κατά συνέπεια να αποτελούν πιθανές πηγές επιδημιών πολιομυελίτιδας, ιδίως σε πληθυσμούς με χαμηλή ανοσία έναντι των πολιοϊών. Πρόσφατα αναφέρθηκαν παραδείγματα τέτοιων γεγονότων, όπου η εμφάνιση επιδημιών πολιομυελίτιδας οφείλονταν σε εμβολιακά στελέχη όπως στην Αίγυπτο (Yang *et al.*,2003), στη νήσο της Δομινικανής Δημοκρατίας (Kew *et al.*,2002), στις Φιλιππίνες (Liu *et al.*, 2000)και στη Μαδαγασκάρη(Rakoto-Andrianarivelo *et al.*,2005), εμπλέκοντας την πιθανότητα σχηματισμού ανασυνδυασμών μεταξύ στελεχών εμβολίου πολιοϊών και αγρίων πολιοϊών ή και στελεχών HEV-C ή τέλος και ιδιαίτερα μεταλλαγμένων παράγωγων cVDPV (Minerato *et al.*,2005).

Στις ανωτέρω μελέτες οι περισσότεροι ανασυνδυασμοί εντοπίστηκαν στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές ενώ κανένας δεν ευρέθηκε στη 5'- UTR και στη VP1. Στη προηγούμενη μελέτη μας (Paximadi *et al.*,2006) όλοι οι ανασυνδυασμοί ήταν μονοί ενώ στη παρούσα όλοι ήταν διπλοί. Σε αυτή τη μελέτη το στέλεχος EDP11 παρουσίασε μία αλληλουχία 120 nt οι οποία φαίνεται να προέρχεται από μέλος της ομάδας των εντεροϊών HEV-C και ειδικότερα από τον ιό CAV18 ή CAV21 γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τη στενή εξελικτική σχέση μεταξύ των πολιοϊών και των μελών της ομάδας C των εντεροϊών (HEV-C) οι οποίοι μπορεί



να αναμιχθούν σε εκτεταμένα γεγονότα προσαρμοστικότητας και ανασυνδυασμών.

Μία από τις επικρατέστερες απόψεις σχετικά με την διακοπή των εμβολιασμών με το εμβόλιο OPV είναι, δεδομένου ότι, μόνο το ανθρώπινο είδος αποτελεί φυσικό ξενιστή των πολιοϊών, ότι έλλειψη παροχής του εμβολίου OPV τα εμβολιοσυνδεόμενα περιστατικά παραλυτικής πολιομυελίτιδας θα μειωθούν σημαντικότερα και θα τείνουν να εξαλειφθούν. Αυτή η άποψη αντικρούεται από την επί μακρό χρονικό διάστημα (αρκετά έτη) κυκλοφορία των εμβολιακών στελεχών OPV ιδιαίτερα όταν τα στελέχη αυτά είναι πολύ-ανασυνδυασμένα. Πρόσφατες εξάρσεις πολιομυελίτιδας που προκλήθηκαν από “εξελιγμένα” εμβολιακά στελέχη, ενισχύουν την άποψη της παρατεταμένης κυκλοφορίας εμβολιακών στελεχών ιδιαίτερα σε πληθυσμούς χαμηλού ποσοστού ανοσολογικής κάλυψης

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή αναδεικνύει την προσαρμοστικότητα του γενώματος σε περισσότερες από μία θέσεις ανασυνδυασμού. Η ανίχνευση διπλών καθώς και πολλαπλών ανασυνδυασμών εμβολιακών στελεχών θα (Karakasiliotis *et al.*, 2005) πρέπει να αποτελέσει μέρος της εργαστηριακής ρουτίνας τόσο σε πληθυσμούς όσο και στο περιβάλλον καθώς είναι αυξημένος ο κίνδυνος παρατεταμένης κυκλοφορίας αυτών των στελεχών σε πληθυσμούς χαμηλής ανοσίας με αποτέλεσμα την εξελιγή τους σε νευρομολυσματικά.

### **4.3 Ανασυνδυασμένα περιβαλλοντικά στελέχη Sabin σε Ελλάδα και Κύπρο**

Η παρακολούθηση των περιβαλλοντικών δειγμάτων αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αποτίμηση της έκτασης και της διάρκειας της κυκλοφορίας των εντεροϊών σε ευαίσθητους πληθυσμούς (Divizia *et al.*, 1999; Fiore *et al.*, 1998; Shulman *et al.*, 2000). Ο έλεγχος των λυμάτων αποδεικνύεται ως ένα ευαίσθητο και αποτελεσματικό εργαλείο για την παρακολούθηση της

κυκλοφορίας τόσο εμβολιακών όσο και αγρίων τύπων πολιοϊών και άλλων μη πόλιο εντεροϊών (Georgoroulou *et al.*, 2001; Gabow *et al.*, 1999). Αγρίου τύπου πολιοϊοί έχουν εντοπιστεί σε λύματα ακόμα και απουσία περιστατικών παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Blomqvist *et al.*, 2004; Metcalf *et al.*, 1995) και βέβαια η περιβαλλοντική παρακολούθηση συμβάλλει στον εντοπισμό αγρίων τύπων πολιοϊών σε κοινότητες που μέχρι πρότινος θεωρούντο ως ελεύθερες πολιομυελίτιδας (Cochi *et al.*, 1995). Ως εκ τούτου, ο περιβαλλοντικός έλεγχος μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την κυκλοφορία εντεροϊών σε ένα δεδομένο πληθυσμό και να αποτελέσει ένα αξιόπιστο σύστημα προειδοποίησης (Parageorgiou *et al.*, 2000). Εντεροϊοί (EVs) οι οποίοι εντοπίζονται στο τέλος της άνοιξης και στις αρχές καλοκαιριού σε λύματα είναι πολύ πιθανόν να κυκλοφορούν σε ένα δεδομένο πληθυσμό το επόμενο έτος. Καθώς πολλές λοιμώξεις εντεροϊών είναι ασυμπτωματικές ή υποκλινικές, πολύ ορότυποι οι οποίοι δεν έχουν εντοπιστεί σε κλινικά μπορεί να ανιχνευθούν στα λύματα (Divizia *et al.*, 1999; Shulman *et al.*, 2000). Ο έλεγχος του περιβάλλοντος για τους εντεροϊούς και ειδικότερα για τους πολιοϊούς αποκτά ιδιαίτερη σημασία καθώς τα προγράμματα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας πλησιάζουν προς το τελικό στάδιο τους.

Οι πρόσφατες εξάρσεις πολιομυελίτιδας στην Αίγυπτο, στη Δομινικανή Δημοκρατία, τις Φιλιππίνες και τη Μαδαγασκάρη από “εξελιγμένα” εμβολιακά στελέχη υποστηρίζουν την άποψη του υψηλού κινδύνου και της παρατεταμένης κυκλοφορίας εμβολιακών στελεχών (cVDPVs) σε πληθυσμούς με χαμηλό δείκτη ανοσίας.

Από τα τέλη Ιουνίου έως το Σεπτέμβριο του 1996, τρεις περιπτώσεις οξείας χαλαρής παράλυσης αναφέρθηκαν μεταξύ ανεμβολίαστων παιδιών αθιγγανών στην Ελλάδα έχοντας ως αιτιολογικό παράγοντα ένα άγριο στέλεχος πολιοϊού τύπου 1 το οποίο μεταδόθηκε μέσω Αλβανίας (Fiore *et al.*, 1996; Kyriakoroulou *et al.*, 2006). Σε περιβαλλοντικά δείγματα του ποταμού Λάνα στην Αλβανία την

ίδια χρονική περίοδο τα στελέχη που απομονώθηκαν εμφάνισαν ανασυνδυασμούς τύπου Sabin 2/άγριος πολιοϊός τύπου1 (Divizia *et al.*, 1999).

Το γεγονός αυτό συνηγορεί υπέρ της άποψης της κυκλοφορίας των cVDPVs και ανασυνδυασμένων Sabin/άγριος τύπος πολιοϊών από τους ανθρώπους στο περιβάλλον και αντίστροφα (Marturano *et al.*, 2002). Η έλλειψη εντοπισμού κυκλοφορίας αγρίου τύπου πολιοϊών στην Αλβανία από το 1980 έως το 1995, πριν από την έξαρση πολιομυελίτιδας το 1996, μπορεί μερικώς να εξηγηθεί από το γεγονός πως μέχρι το 1990 η Αλβανία δεν είχε επαφές με τις γείτονες χώρες περιορίζοντας έτσι την εισαγωγή αγρίων στελεχών από τις περιοχές όπου τα άγρια στελέχη πολιοϊών ενδημούσαν (Diamanti *et al.*, 1998).

Η Κύπρος βρίσκεται σε γεωγραφικό σημείο διασταύρωσης μεταξύ Ευρώπης Μέσης Ανατολής και Αφρικής.

Από τα έντεκα στελέχη πολιοϊών τρία βρέθηκαν διπλά ανασυνδυασμένα (Σχήμα 3.3.1, Πίνακας 3.3.2). Τα διπλά ανασυνδυασμένα στελέχη LK3,6,10 παρουσίαζαν ανασυνδυασμό S3/S2/S1 στη 2C γενωμική περιοχή του ιού, με τη πρώτη θέση ανασυνδυασμού S3/S2 προς το 5' άκρο της 2C και τη δεύτερη θέση ανασυνδυασμού προς το 3' άκρο της 2C. Ο εντοπισμός τέτοιου τριμερούς ανασυνδυασμένου εντός της 2C είναι σπάνιο γεγονός. Τριμερείς ανασυνδυασμοί (S3/S2/S1) συνήθως βρίσκονται στη 2C (πρώτος ως S3/S2) και στη 3D (δεύτερος ως S2/S1) (Cuervo *et al.*, 2001 Martin *et al.*, 2002).

Τα δείγματα ENP 5,6,8 βρέθηκαν με μονό ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 όπως και το στέλεχος ENP 7 με ανασυνδυασμό τύπου S2/S3. Οι θέσεις ανασυνδυασμού για τα στελέχη αυτά εντοπίστηκαν σε διαφορετικά σημεία της 3D γενωμικής περιοχής.

Το στέλεχος ENP 6 είχε το ίδιο μοτίβο ανασυνδυασμού με το στέλεχος EP 12 (Paximadi *et al.*, 2006) όπως και με ένα στέλεχος που αναφέρεται από τους Cuervo *et al.* (2001). Τα στελέχη ENP 6 και EP12 δεν μοιράζονταν μόνο το μοτίβο του ανασυνδυασμού αλλά και τη θέση ανασυνδυασμού στη 3D γενωμική περιοχή. Αξίζει να σημειωθεί πως το στέλεχος EP 12 καθώς και τα στελέχη τα

οποία αναφέρονται στην εργασία της Cuervo et al. είναι κλινικά. Το στέλεχος ENP 7 είχε επίσης ένα πανομοιότυπο μοτίβο και θέση ανασυνδυασμού με ένα από τα στέλεχη της Cuervo et al.. Ο πρώτος ανασυνδυασμός των περιβαλλοντικών στελεχών όπως το LK 3 βρέθηκε πανομοιότυπος με κλινικό δείγμα της ανωτέρω εργασίας καθώς και το μοτίβο του δευτέρου ανασυνδυασμού των δειγμάτων LK 3, LK 6 και LK10. Πρέπει να σημειωθεί πως το δείγμα μελέτης της Cuervo και συν. αποτελείτο από υγιή εμβολιασμένα παιδιά κατά τη διάρκεια μαζικής εκστρατείας εμβολιασμού την άνοιξη του 1993 στη Ρουμανία. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση της κυκλοφορίας των ανασυνδυασμένων εμβολιακών στελεχών από τον άνθρωπο στο περιβάλλον και τονίζει τη μεγάλη σημασία της επιστημονικής επιτήρησης στο περιβάλλον για τον εντοπισμό και χαρακτηρισμό cVDPVs.

Τα αποτελέσματα μας σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων (Cuervo et al., 2001; Paximadi et al., 2006), τονίζουν το γεγονός ότι στελέχη cVDPVs και VdRecs μπορούν να κυκλοφορούν για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από εμβολιασμό σε γειτονικές περιοχές και εντοπίζονται τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Η περιβαλλοντική επιτήρηση για τον εντοπισμό πολιοϊών είναι μεγάλης σημασίας ακόμα και απουσία περιπτώσεων παραλυτικής πολιομυελίτιδας, καθώς απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν cVDPVs στη Φινλανδία, το Ισραήλ και την Εσθονία (Blomqvist et al., 2004; Shulman et al., 2000; Manor et al., 1999).

Καθώς οι περισσότερες χώρες ελεύθερες πολιομυελίτιδος αλλάζουν τον εμβολιασμό από OPV σε IPV και καθώς το IPV δεν αναμένεται να προκαλεί τα ίδια ποσοστά ανοσίας όπως το OPV, η ενδεχόμενη εισαγωγή “εξελιγμένων” ανασυνδυασμένων πολιοϊών ίσως να έχει επιπτώσεις στη δημόσια υγεία αν το ποσοστό ανοσολογικής κάλυψης δεν προσεγγίζει το 100%.

Ο εντοπισμός τέτοιων ανασυνδυασμένων εμβολιακών στελεχών θα πρέπει να αποτελεί μέρος της ρουτίνας του εργαστηρίου πολιοϊών καθώς υπάρχει

σημαντικός κίνδυνος παρατεταμένης κυκλοφορίας αυτών ιδιαίτερα σε ευπαθείς πληθυσμούς.

Κατά συνέπεια η περιβαλλοντική επιτήρηση και μάλιστα υψηλού εργαστηριακού επιπέδου θα πρέπει να υλοποιείται ακατάπαυστα ακόμα και σε χώρες ελεύθερες πολιομυελίτιδας.

#### 4.4. Εξέλιξη ενός εμβολιακού πολυανασυνδυασμένου στελέχους πολιοϊού.

Το στέλεχος I<sub>34</sub> απομονώθηκε από νεογέννητο πέντε μηνών, 20 περίπου ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το OPV με κλινική εικόνα χαλαρής παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

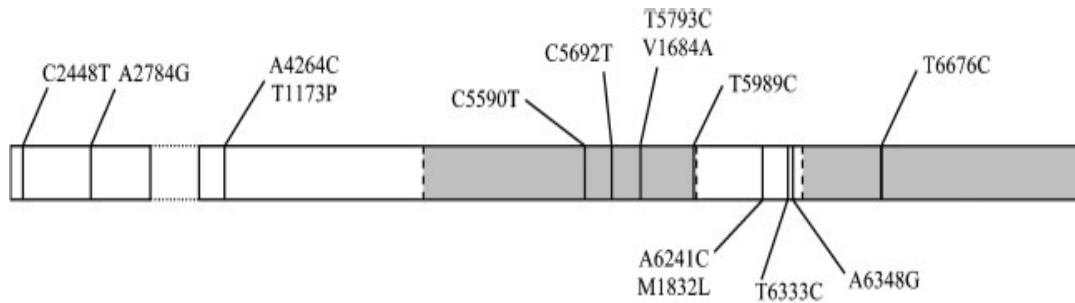
Το στέλεχος πολιοϊού απομονώθηκε από τα κόπρανα του νεογέννητου και μετά από αλληλούχηση εντοπίστηκαν δυο θέσεις ανασυνδυασμού στη 3D γενωμική περιοχή (Karakasiliotis *et al.*, 2004). Η πρώτη θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε μεταξύ των νουκλεοτιδίων 5995 και 6004 (αρίθμηση κατά S1), ως S1/S2 και η δεύτερη ως S2/S1 μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6388 και 6389 (αρίθμηση κατά S2). Ένας τρίτος ανασυνδυασμός εντοπίστηκε μέσω αλληλούχησης ολόκληρου του 3' τμήματος του γενώματος, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4985 και 5000 (αρίθμηση κατά S2), και ήταν ως αναμενόταν, ανασυνδυασμός τύπου S2/S1. Βάσει των ανωτέρω, το στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως S2/S1/S2/S1. Ο S2/S1 ανασυνδυασμός στη θέση 6388 και 6389 έχει ήδη αναφερθεί από τη Cuervo *et al.*, 2001. Η θέση ανασυνδυασμού S1/S2 στο 5' άκρο της 3D περιοχής, είναι ένας εξαιρετικά σπάνιος τύπος ανασυνδυασμού. Οι ελάχιστοι ανασυνδυασμοί που εμπλέκουν Sabin τύπου 1 ως πρώτο τμήμα είναι κυρίως τύπου S1/S3, και φανερώνουν πως τέτοιοι ανασυνδυασμοί (S1/S<sub>χ</sub>) γίνονται στην ίδια περιοχή όπως και στο στέλεχος I<sub>34</sub> (Georgescu *et al.*, 1994; Driesel *et al.*, 1995; Cuervo *et al.*, 2001) γεγονός που ενισχύει την άποψη για τη μη

τυχαία κατανομή των ανασυνδυσμάτων, ακόμη και μεταξύ σπάνιων τύπων ανασυνδυασμού.

Η αλληλουχία του στελέχους I34 ήταν σαφώς εμβολιακής προέλευσης. Για τον καθορισμό της ηλικίας του στελέχους χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες εξέλιξης που κατασκευάστηκαν από τους Gavriliu *et al.*(2000). Οι καμπύλες αυτές δείχνουν την εξέλιξη των πολιοϊών σε σχέση με το χρόνο κυκλοφορίας του στελέχους εφαρμόζοντας τις τρεις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν από τον Li *et al.*(1958), δηλ. τις  $K_s$ ,  $K_a$  και  $K_t$ . Ο υπολογισμός αυτών των παραμέτρων έδειξε μία μέση ηλικία του δείγματος επτά ( $\pm 1$ ) εβδομάδων. Αυτή η τιμή ήταν τουλάχιστον η διπλάσια της αναμενόμενης, καθώς ο ιός είχε την ευκαιρία της αντιγραφής στο επιθήλιο του εντέρου του νεογέννητου για τρεις περίπου εβδομάδες (Σχήμα 4.4.1).

Η χαρτογράφηση των μεταλλαγών έδειξε συσσώρευση αυτών στις περιοχές μεταξύ της πρώτης και της τρίτης θέσης ανασυνδυασμού. Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, υπολογίστηκαν οι τιμές  $K_s$ ,  $K_a$  και  $K_t$  για τη περιοχή εντός των σημείων ανασυνδυασμού, και των ορίων έξω από αυτά. Η μέση ηλικία προέλευσης ήταν περίπου δέκα και τέσσερις εβδομάδες ( $\pm 1$ ), αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν ώστε να προτείνουμε ένα πιθανό ιστορικό του στελέχους I34. Η ηλικία ( $\sim 4 \pm 1$  εβδομάδες) που υπολογίστηκε για τις αλληλουχίες εκτός της περιοχής που συνορεύει με τις δύο ανασυνδυασμένες περιοχές στη 3D, προσεγγίζει τις τρεις εβδομάδες της ιϊκής αντιγραφής στο νεογέννητο. Η ηλικία που υπολογίστηκε για τη περιοχή μεταξύ των θέσεων ανασυνδυασμού κατέδειξε μια διαφορετική εξελικτική πορεία για το υπόλοιπο του γενώματος ( $\sim 10$  εβδομάδες) (Σχήμα 4.4.1). Συνεπώς, ένας ανασυνδυασμένος ιός (S1/S2) ο οποίος κυκλοφορούσε στο οικογενειακό περιβάλλον του νεογέννητου, πιθανόν ανασυνδυάστηκε με ένα καινούργιο στέλεχος Sabin το οποίο εισήχθη με τον εμβολιασμό, γεγονός το οποίο οδήγησε στα δύο διαφορετικά αποτελέσματα της ηλικίας των δύο τμημάτων του γενώματος. Είναι εμφανές από την αλληλουχία του στελέχους πως ένας τύπος

Sabin 2 και ένας τύπος Sabin 1 υπήρξαν οι δότες της 5' και 3' αντίστοιχα γενωμικής του περιοχής του πολυανασυνδυασμένου στελέχους S2/S1/S2/S1 (Σχήμα 4.4.1).



Σχήμα 4.4.1. Χάρτης μεταλλαγών, αμινοξικών αντικαταστάσεων και θέσεων ανασυνδυασμού (διακεκομμένες γραμμές). Το γκρι και το λευκό χρώμα υποδηλώνουν τις αλληλουχίες Sabin τύπου 1 και 2 αντίστοιχα. Η αριθμηση αναλογεί στις αντίστοιχες θέσεις αναφοράς των στελεχών Sabin.

Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζουν την άποψη ότι η σχεδίαση μελλοντικών πρωτοκόλλων εμβολιασμού κατά της πολιομυελίτιδας, θα πρέπει να λάβει σοβαρά υπ' όψη την παρουσία πολιοϊών OPV οι οποίοι παρήχθησαν και χορηγήθηκαν σε μεγάλες ποσότητες κατά την διάρκεια μαζικών OPV εμβολιασμών των τελευταίων τεσσάρων δεκαετιών. Κατά συνέπεια τα στελέχη αυτά δύνανται να κυκλοφορούν και να ανασυνδυάζονται σε πληθυσμούς με χαμηλό ποσοστό ανοσολογικής κάλυψης έναντι των πολιοϊών (Bellmunt *et al.*, 1999; Khetsuriani *et al.*, 2003; MacLennan *et al.*, 2004), και βέβαια να κυκλοφορούν μέσω του περιβάλλοντος και να εισέρχονται σε πληθυσμούς οι οποίοι εκτός της χαμηλής ανοσολογικής κάλυψης παρουσιάζουν και χαμηλό επίπεδο δημόσιας υγιεινής. (Blomqvist *et al.*, 2004; Vinje *et al.*, 2004)

## ABSTRACT

### “Recombinant poliovirus strains- sites of genetic recombination”

**Paximadi Eleni**

Biochemistry and biotechnology department, School of health sciences  
University of Thessaly, Larissa

This thesis describes the analysis of recombinant poliovirus strains obtained from clinical and environmental samples.

Five polio/Sabin recombinant strains isolated from healthy vaccinees or from VAPP patients after OPV administration, were analysed. RT-PCR, followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) screening analysis was applied in four distant genomic regions (5' UTR, VP1, 2C and 3C-3D) in order to detect any putative recombinant. The detected recombinants were sequenced from 2C to the end of the genome (3' UTR) and the exact recombination sites were determined with computational analysis. Two of the recombinants were found in the 2C genomic region, isolates EP16:S3/S2, EP23:S3/S1, two in 3D genomic region isolates EP6:S2/S1, EP12:S2/S1 and one in 3A genomic region isolate EP9:S2/S1. Point mutations were found in strains EP3, EP6, EP9 and EP12.

Five more clinical Sabin intertypic recombinant strains were investigated. Strains EPA, EPB and EPC were found to be bi-recombinant Sabin3/Sabin2/Sabin3 (S3/S2/S3), one strain was characterized as a probable S3/S2- CAV18 or CAV21-S2/S1 multi-recombinant (EDP11) and one was identified as a tripartite one S3/S2/S1 (EDP12). Samples EPA, EPB and EPC presented a common recombination junction in the 2C genomic region. Moreover, strains EPA and EPB shared also the second recombination site in the 3D genomic region, whereas the second recombination of EPC was also determined in 3D but in a different nucleotide position. Strains EDP11 and EDP12 presented both identical recombination motifs and recombination sites. The first was detected in the 2C genomic region and the second in the 3D region. Strain EDP11 presented an interesting feature since a sequence of 120 nucleotides seems to have derived from a member of human enteroviruses species C (CAV18



or CAV21). This finding is of great importance, considering that this strain (EDP11) was isolated from an area and time period, where no Coxsackie A virus or poliovirus epidemics occurred.

Polioviruses (PVs) Sabin strains were also isolated from sewage treatment plants from Metamorphosis, Athens, Greece during the time period from May to October 1996, and from two other sites located at Nicosia and Limassol in Cyprus between April and December 2003 were investigated for the detection of recombinant PVs. Three PVs (LK3, LK 6, LK 10) isolates were found as tripartite recombinants, S3/S2/S1 in the 2C genomic viral region. The first recombination site S3/S2 was located close to the 5' end of 2C while the second recombination site S2/S1 was located towards the 3' end of 2C. Such recombination is a rare event producing a tripartite hybrid 2C protein. Three more PVs isolates (ENP 5, ENP 6 and ENP8) were characterized as bipartite S2/S1 recombinants and one ENP 7 as S2/S3 bipartite recombinant in different parts of the 3D genomic region.

Last but not least a vaccine-derived multirecombinant poliovirus strain which was isolated from a 5-month-old child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis after oral poliovirus vaccine administration is analysed. The isolate had an S2/S1/S2/S1 primary genomic structure as revealed by restriction fragment length polymorphism and sequencing analysis. Recombination of the middle S1/S2 region is extremely rare and one of the few characterized types of recombination with Sabin type 1 as a 5' partner. An evolutionary analysis of the contributing sequences was performed using the identified mutations in comparison with the original Sabin sequences.

Conclusively in this thesis recombination specific types and sites re-occurrence along with point mutations were discussed concerning the polioviruses evolution. As well as the role of specific positions and motifs of the poliovirus genomic sequences that involves recombination events with other non -polio enteroviruses as Coxsackie A viruses that might be considered as possible

counterparts of the recombination. Furthermore the detection of recombinant circulating vaccine-derived PVs (cVDPVs) is also crucial, since increased transmissibility over that of the parental Sabin strains has been proposed to be the result of recombination events. Importation of recombinant cVDPVs evolved derivatives pose a serious threat to public health and environmental surveillance should be implemented during and after PVs eradication.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaziz R, Tepfer M.** (1999) Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J Gen Virol.*,80 ( Pt 6):1339-46. *Review.*
- Acharya R., Fry E., Stuart D., Fox G., Rowlands D., and Brown F.** (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337(6209):709-716.
- Agirre A., Barco A., Carrasco L., and Nieva J.L.** (2002) Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.*, 277:40434-40441.
- Agol VI, Grachev VP, Drozdov SG, Kolesnikova MS, Kozlov VG, Ralph NM, Romanova LI, Tolskaya EA, Tyufanov AV, Viktorova EG.**(1984) Construction and properties of intertypic poliovirus recombinants: first approximation mapping of the major determinants of neurovirulence. *Virology.* ,136(1):41-55.
- Agol VI, Drozdov SG, Grachev VP, Kolesnikova MS, Kozlov VG, Ralph NM, Romanova LI, Tolskaya EA, Tyufanov AV, Viktorova EG.**(1985) Recombinants between attenuated and virulent strains of poliovirus type 1: derivation and characterization of recombinants with centrally located crossover points. *Virology.*,143(2):467-77.
- Agol V.I., Paul A.V., and Wimmer E.** (1999) Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res.*, 62(2):129-147.
- Agrez M.V., Shafren D.R., Gu X., Cox K., Sheppard D., and Barry R.D.** (1997) Integrin alpha v beta 6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology*, 239:71-77.
- Andersson P., Edman K., and Lindberg A.M.** (2002) Molecular analysis of the echovirus 18 prototype – Evidence of interserotypic recombination with echovirus 9. *Virus Res.*, 85:71– 83.
- Andino R., Rieckhof G.E., Trono D., and Baltimore D.** (1990) Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.*, 64(2):607-612.
- Arnold JJ, Ghosh SK, Cameron CE.** (1999) Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J Biol Chem.* 274(52):37060-9.
- Auvinen P., Stanway G., and Hyypia T.** (1989) Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Arch. Virol.*, 104(3-4):175-186.
- Banerjee R, Tsai W, Kim W, Dasgupta A.** (2001) Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* 280(1):41-51.
- Barton DJ, Flanagan JB.** (1997) Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol.* 71(11):8482-9.
- Bellmunt A., May G., Zell R., Pring-Akerblom P., Verhagen W. and Heim A.** (1999) Evolution of poliovirus type I during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *Virology* 265: 178-184 .
- Belnap D.M., McDermott B.M., Filman D.J., Cheng N.Q., Trus B.L., Zuccola H.J., Racaniello V.R., Hogle J.M., and Steven A.C.** (2000) Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:73-78.

**Bergelson J.M., Shepley M.P., Chan B.M., Hemler M.E., and Finberg R.W.** (1992) Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*, 255(5052):1718-1720.

**Bergelson J.M., St John N., Kawaguchi S., Chan M., Stubdal H., Modlin J. and Finberg R.W.** (1993) Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2. *J Virol.*67(11):6847-52.

**Bergelson J.M., Chan M., Solomon K.R., Stjohn N.F., Lin H.M., and Finberg R.W.** (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6245-6248.

**Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW** (1995) Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol.* 69(3):1903-6.

**Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., and Finberg R.W.** (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275(5304):1320-1332.

**Bhella D., Goodfellow I.G., Roversi P., Pettigrew D., Chaudhry Y., Evans D.J. Lea SM.** (2004) The structure of echovirus type 12 bound to a two-domain fragment of its cellular attachment protein decay-accelerating factor (CD 55). *J Biol Chem.* 279(9):8325-32.

**Bienz K., Egger D., and Pfister T.** (1994) Characteristics of the poliovirus replication complex. *Arch. Virol. Suppl.*, 9:147-157.

**Blomqvist, S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi.** (2003). Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* 84:573-580.

**Blomqvist. S., C. Savolainen, P. Laine, P. HirttiÖ, E. Lamminsalo, E. Penttilä, S. JÖks, M. Roivainen, and T. Hovi..** (2004) Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. *J. Virol.* 78: 4876-4883.

**Blondel B., Duncan G., Couderc T., Delpeyroux F., Pavio N. and Colbère-Garapin F.** (1998) Molecular aspects of poliovirus biology with special focus on the interactions with nerve cells. *J NeuroVirol* 4:1-26.

**Blyn L.B., Swiderek K.M., Richards O., Stahl D.C., Semler B.L., and Ehrenfeld E.** (1996) Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: Identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:11115-11120.

**Bolten R, Egger D, Gosert R, Schaub G, Landmann L, Bienz K.** (1998) Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol.*, 72:8578-85.

**Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A.C., Dautry F., and Jacquemin-Sablon H.** (2003). Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.*, 77(6):3353-3359.

**Brown B.A., Maher K., Oberste M.S., and Pallansch M.A.** (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the non-capsid coding region. *J. Virol.*, 77:8973-8984.

**Buxton, A. and Fraser, G,** (1977) *The animal microbiology.* 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London.

- Carson S.D., Chapman N.N., and Tracy S.M.** (1997) Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233(2):325-328.
- Casas I., Powell I., Klapper P. E. and Cleator G. M.** (1996). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 5: 525–536.
- Centers for Disease Control and Prevention.** (2002) Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus-Madagascar. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51:662.
- Centers for Disease Control and Prevention.** (2004) Progress toward global eradication of poliomyelitis, January 2003-April 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51:532-535.
- Chang KH, Auvinen P, Hyypiä T, Stanway G.**(1989) The nucleotide sequence of coxsackievirus A9; implications for receptor binding and enterovirus classification. *J Gen Virol.*,70:3269-80.
- Charini WA, Todd S, Gutman GA, Semler BL.**(1994) Transduction of a human RNA sequence by poliovirus. *J Virol.*,68(10):6547-52
- Cherkasova E.A., Korotkova E.A., Yakovenko M.L., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Chumakov K.M. and Agol V.I.** (2002) Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol.*76(13):6791-9
- Cherkasova E.A., Yakovenko M.L., Rezapkin G.V., Korotkova E.A., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Krasnoproshina L.I., Romanenkova N.I., Rozaeva N.R., Sirota L., Agol V.I. and Chumakov K.M.** (2005) Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol.* 79, 1062-70.
- Chetverin A.B.** (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett.*, 22:460(1):1-5.
- Chumakov KM, Norwood LP, Parker ML, Dragunsky EM, Ran YX, Levenbook IS.** (1992) RNA sequence variants in live poliovirus vaccine and their relation to neurovirulence *J Virol.* 66:966-970.
- Cochi, S. L., Hull H. F. and Ward N. A.** (1995) To conquer poliomyelitis forever. *Lancet* 345 : 1589–1590.
- Colonno R.J., Callahan P.L., Leippe D.M., Rueckert R.R., and Tomassini J.E.** (1989) Inhibition of rhinovirus attachment by neutralizing monoclonal antibodies and their Fab fragments. *J. Virol.*, 63(1):36-42.
- Colston E., and Racaniello V.R.** (1994) Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.*, 13:5855–5862.
- Colston E.M., and Racaniello V.R.** (1995) Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J. Virol.*, 69:4823–4829.
- Cooper P.D.** (1968) A genetic map of poliovirus temperature - sensitive mutants. *Virology*, 35:584–596.
- Costa-Mattioli M., Svitkin Y., and Sonenberg N.** (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.*, 24(15):6861-6870.

- Cuervo N.S., Guillot S., Romanenkova N., Combiescu M., Aubert-Combiescu A., Seghier M., Caro V., Crainic R., and Delpeyroux F.** (2001) Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines. *J. Virol.*, 75:5740–5751.
- Curry S., Abrams C.C., Fry E., Crowther J.C., Belsham G.J., Stuart D.I., and King A.M.** (1995) Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Virol.*, 69:430–438.
- Dasgupta A., Yalamanchili P., Clark M., Kliewer S., Fradkin L., Rubinstein S., Das S., Shen Y., Weidman M.K., Banerjee R., Datta U., Igo M., Kundu P., Barat B. and Berk A.J.** (2002) “*Molecular Biology of Picornaviruses*”. ASM Press, Washington, DC.
- da Silva E.E., Winkler M.T. and Pallansch MA.** (1996) Role of enterovirus 71 in acute flaccid paralysis after the eradication of poliovirus in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2(3):231-3.
- Dahourou G., Guillot S., Le Gall O. and Crainic R.** (2002) Genetic recombination in wildtype poliovirus. *J Gen Virol* 83 : 3103–3110.
- Das S. and Dasgupta A.** (1993) Identification of the cleavage site and determinants required for poliovirus 3CPro-catalyzed cleavage of human TATA-binding transcription factor TBP. *J Virol.*,67(6):3326-31.
- Diamanti E, Ibrahim B, Tafaj F, Mezini E, Dodbiba A, Dobi V, Catone S, Genovese D, Simeoni P, Fiore L.** (1998) Surveillance of suspected poliomyelitis in Albania, 1980-1995: suggestion of increased risk of vaccine associated poliomyelitis. *Vaccine* 16: 940-8.
- Diana G.D., and Pevear D.C.** (1997) Antipicornavirus drugs:Current status. *Antivir. Chem. Chemother.*, 8:401–408.
- Divizia M., Palombi L., Buonomo E., Donia D., Ruscio V., Equestre M., Leno L., Pana A. and Degener AM.** (1999) Genomic characterization of human and environmental polioviruses isolated in Albania. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3534-9.
- Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., van Depol S., Steinhauer D., DePolo N., and Holland J.** (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations:biological relevance-a review. *Gene*, 40(1):1-8.
- Domingo E. and Holland J. J.** (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51, 151–178. Drake, J. W. & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13910–13913. ?
- Dowdle W.R., De Gourville E., Kew O.M., Pallansch M.A. and Wood DJ.** (2003) Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol* 13:277-91. *Review.*
- Driesel G., Diedrich, S., Kunkel U., Schreier E.** (1995) Vaccine- associated cases of poliomyelitis over 30 year period in East Germany. *Eur.J. Epidemiol.* 11:647-654.
- Duggal R., and Wimmer E.** (1999) Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology*, 258:30–41.
- Dufresne A.T. and Gromeier M.** (2004) A nonpolio enterovirus with respiratory tropism causes poliomyelitis in intercellular adhesion molecule 1 transgenic mice. *PNAS* 101,13636-13641.
- Egger D., and Bienz K.** (2002) Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J. Virol.*, 76:10960–10971.
- Ehrenfeld E., and Semler B.L.** (1995) Anatomy of the poliovirus internal ribosome entry site. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 203:65-83.

- Ellard F.M., Drew J., Blakemore W.E., Stuart D.I., and King A.M.** (1999) Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Gen. Virol.*, 80:1911-1918.
- Equestre M.D., Genovese D., Cavalieri F., Fiore L., Santoro R. and Bercoff R.P.** (1991) Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of Poliovirus type 2. *J Virol* 65:2707-2710.
- Evans D.J. and Almond J.W.** (1998) Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6,198-202. *Review.*
- Fenwick M.L., and Cooper P.D.** (1962) Early interactions between poliovirus and ERK cells:some observations on the nature and significance of the rejected particles *Virology*, 18:212-223
- Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J., Minor P.D., and Hogle J.M.** (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.*, 8(5):1567-1579.
- Fiore L., Genovese D., Diamanti E., Catone S., Ridolfi B., Ibrahimi B., Konomi R., van der Avoort H.G., Hovi T., Crainic R., Simeoni P. and Amato C.** (1998) Antigenic and molecular characterization of wild type 1 poliovirus causing outbreaks of poliomyelitis in Albania and neighboring countries in 1996. *J Clin Microbiol.* 36: 112-8.
- Fricks CE, Hogle JM.** (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol.* 64(5):1934-45.
- Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A. and Crainic R.** (1993) Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* 196:199-208.
- Gamarnik AV, Andino R.** (2000) Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J Virol.*74(5):2219-26.
- Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y., Kew O.M., and Agol V.I.** (2000) Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient:a unifying model. *J. Virol.*, 74(16):7381-7390.
- Georgescu M. M., Delpeyroux F., Tardy-Panit M., Balanant J., Combiescu M., Combiescu A. A., Guillot S. and Crainic R.** (1994). High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 68, 8089-8101.
- Georgescu M.M., Delpeyroux F., and Crainic R.** (1995) Tripartite organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.*, 76:2343- 2348.
- Georgescu M. M., Balanant J., Ozden S. and Crainic, R.** (1997).Random selection: a model for poliovirus infection of the central nervous system. *J Gen Virol* 78, 1819-1828.
- Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., and Vamvakopoulos N.C.** (2000) Improved genotyping vaccine and wild-type length polymorphism analysis:clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.*, 38:4337-4342.
- Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., and Vamvakopoulos N.C.** (2001) High sequence divergence in the 50 non-coding region of reference coxsackie B and ECHO viral strains and clinical isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol. Cell. Probes*, 15:317-327.
- Goodfellow I.G, Chaudhry Y., Richardson A., Meredith J., Almond J.W., Barclay W., and Evans D.J.** (2000). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.*, 74(10):4590-4600.

- Goodfellow IG, Polacek C, Andino R, Evans DJ.** (2003) The poliovirus 2C cis-acting replication element-mediated uridylylation of VPg is not required for synthesis of negative-sense genomes. *J Gen Virol.*84(Pt 9):2359-63.
- Grabow W.O, Botma K.L, de Villiers J.C., Clay C.G. and Erasmus B.** (1999) Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull World Health Organ.*77: 973-80.
- Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Yost S.C., Marlor C.W., Kamarck M.E., and McClelland A.** (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56:839-847.
- Gromeier M, Alexander L, Wimmer E.**(1996) Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 19;93(6):2370-5.
- Guillot S., Caro V., Cuervo N., Korotkova E., Combiescu M., Persu A., Aubert-Combiescu A., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2000) Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.*, 74:8434-8443.
- Guttman N., and Baltimore D.** (1977) A plasma membrane component able to bind and alter virions of poliovirus type 1: studies on cell-free alteration using a simplified assay. *Virology*, 82:25-36.
- Harber J., Bernhardt G., Lu H.H., Sgro J.Y., and Wimmer E.** (1995) Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology*, 214:559-570.
- He Y, Janssen WG, Morrison JH.** (1998) Synaptic coexistence of AMPA and NMDA receptors in the rat hippocampus: a postembedding immunogold study. *J Neurosci Res.* 54(4):444-9.
- He Y.N., Chipman P.R., Howitt, J., Bator C.M., Whitt M.A., Baker T.S., Kuhn R.J., Anderson C.W., Freimuth P., and Rossmann M.G.** (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor *Nat. Struct. Biol.*, 8:874-878.
- He Y.N., Mueller S., Chipman P.R., Bator C.M., Peng X.Z., Bowman V.D., Mukhopadhyay S., Wimmer E., Kuhn R. J., and Rossmann M.G.** (2003) Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J. Virol.*, 77:4827-4835.
- Hellen C.U., Witherell G.W., Schmid M., Shin S.H., Pestova T.V., Gil A., and Wimmer E.** (1993) A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7642-7646.
- Hendry E., Hatanaka H., Fry E., Smyth M., Tate J., Stanway G., Santti J., Maaronen M., Hyypia T., and Stuart D.** (1999) The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure*, 7(12):1527-1538.
- Herold J., and Andino R.** (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell*, 7(3):581-591.
- Hirst G.K.** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27:303-309.
- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229(4720):1358-1365.
- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1987) The structure of poliovirus. *Sci. Am.*, 256(3):42-49.



- Hoover-Litty H. and Greve JM.** (1993) Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion. *J Virol.*,67(1):390-7.
- Hovi, T., M. Stevnik, H. Partanen, and A. Kangas.** (2001) Poliovirus surveillance by examining sewage specimens: quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. *Epidemiol. Infect.* 127: 101-106.
- Hughes P.J., North C., Minor P.D., and Stanway G.** (1989) The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J. Gen. Virol.*, 70:2943-2952.
- Hughes P.J., Horsnell C., Hyypia T., and Stanway G.** (1995) The coxsackievirus A9 RGD motif is not essential for virus viability. *J. Virol.*, 69:8035-8040.
- Hynes RO.** (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48(4):549-54. *Review.*
- Jacob T.J.** (2004) A developing country perspective on vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Bulletin of the WHO* 82 (1):53-57.
- Jimenez-Clavero M.A., Ley V., Fita I., and Verdaguer N.** (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of swine vesicular disease virus (SVDV). *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59(3):541-543.
- Joki-Korpela P., and Hyypia T.** (2001) Parechoviruses, a novel group of human picornaviruses. *Ann. Med.*, 33(7):466-471.
- Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorchis T.** (2004) Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes.* 18: 103-9.
- Kew O.** (1998) Genomic sequencing and epidemiologic tracking of Polioviruses: Part I. *Polio Lab Network Quarterly Update* V(2):1-2.
- Kew O.M., Morris-Glasgow V., Landaverde M., Burns C., Shaw J., Garib Z., Andre J., Blackman E., Freeman C.J., Jorba J., Sutter R., Tambini G., Venczel L., Pedreira C., Laender F., Shimizu H., Yoneyama T., Miyamura T., van Der Avoort H., Oberste M.S., Kilpatrick D., Cochi S., Pallansch M., and De Quadros C.** (2002) Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science*, 296:356- 359.
- Kew O.M., Wright P.F., Agol V.I., Delpeyroux F., Shimizu H., Nathanson N., et al.** (2004) Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bulletin of the WHO* 82:16-23.
- Khetsuriani N., Prevots D. R., Quick L., Elder M. E., Pallansch M., Kew O. and Sutter, R. W.** (2003). Persistence of vaccine-derived polioviruses among immunodeficient persons with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Infect Dis* 188, 1845-1852.
- Kimman T. F., Koopmans M. P. and van der Avoort H. G.** (1998) Ending polio immunization. *Science* 279:788-789
- King, A. M. Q., Brown, F. P. Christian, Hovi, T., Hyypid, T., Knowles, N. J., Lemon, S. M., Minor, P. D., Palmenberg, A. C., Skern, T., Stanway, G.**(2000) In: Van Regenmortel, C. M.Fauquet, D. H. L. Bishop, C. H. Calisher, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M.Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), M. H. V., Virus taxonomy, Picornaviridae. Seventh report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. *Academic Press, New York, N.Y. pp.* 657-673.
- Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47:433-443.

**Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., and Wimmer E.** (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291(5816):547-553.

**Kolatkar P.R., Bella J., Olson N.H., Bator C.M., Baker T.S., and Rossmann M.G.** (1999) Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. *EMBO J.* 18:6249-6259.

**Kohara M, Abe S, Komatsu T, Tago K, Arita M, Nomoto A.** (1988) A recombinant virus between the Sabin 1 and Sabin 3 vaccine strains of poliovirus as a possible candidate for a new type 3 poliovirus live vaccine strain. *J Virol.*, 62(8):2828-35.

**Kuge S, Saito I, Nomoto A.** (1986) Primary structure of poliovirus defective-interfering particle genomes and possible generation mechanisms of the particles. *J Mol Biol.*,192(3):473-87.

**Kyriakopoulou Z, Kottaridi C, Dedepsidis E, Bolanaki E, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P.** (2006) Molecular characterization of wild-type polioviruses isolated in Greece during the 1996 outbreak in Albania. *J Clin Microbiol.*, 44: 1150-2.

**Lamphear B.J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R.E.** (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* 270(37):21975-21983.

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

**Langford M.P., Kadi R.M., Ganley J.P., and Yin-Murphy M.** (1988) Inhibition of epidemic isolates of coxsackievirus type A 24 by recombinant and natural interferon alpha and interferon beta. *Intervirology*, 29:320-327.

**Lewis J.K., Bothner B., Smith T.J., and Siuzdak G.** (1998) Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6774-6778.

**Li W. H., Wu C. I. and Luo, C. C.** (1985). A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* 2, 150-174.

**Li J.P., and Baltimore D.** (1988) Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 62(11):4016-4021.

**Li J.P. Zhang L.B., Yoneyama T., Yoshida H., Shimizu H., Yoshii K., Hara M., Naomura T., Yoshikura H., Miyamura T. and Hagiware A.**(1996) Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch Virol.*,141(6):1047-54.

**Liao S., and Racaniello V.** (1997) Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J. Virol.*, 71:9770-9777.

**Lin W., Zhao Q., Bartlam M., Ding Y., Li D., Chen Y., Bao H., Xie Q., and Rao Z.** (2002) Purification, crystallization and X-ray analysis of swine vesicular disease virus. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 58:1056-1058.

**Liu H. M., Zheng D. P., Zhang L. B., Oberste M. S., Palansch M. A. and Kew O. M.** (2000) Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* 74: 11153-11161 .

- Liu H. M., Zheng D. P., Zhang L. B., Oberste M. S., Kew O. M. and Pallansch, M. A.** (2003). Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J Virol* 77, 10994–11005.
- Lublin D.M., and Atkinson J.P.** (1989) Decay accelerating factor:biochemistry, molecular biology and function. *Annu. Rev. Immunol.*, 7:35-58.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Itonen J.** (2003a) Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.*, 77:10423–10431.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Itonen J., Karganova G.G., Reznik V.I., and Hinkkanen A.E.** (2003b) Molecular epidemiology of enteroviruses causing uveitis and multisystem hemorrhagic disease of infants. *Virology*, 307:45–53.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Itonen J., and Hinkkanen A.E.** (2004) Recombination in uveitis-causing enterovirus strains. *J. Gen. Virol.*, 85:463–470.
- Lukashev A.N.** (2005a) Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev. Med. Virol.*, 15:157-167.
- Lyons T., Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J.** (2001) Poliovirus 5'-terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J Virol*. 75(22):10696-708.
- MacLennan C., Dunn G., Huissoon A. P. and 9 other authors** (2004). Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. *Lancet* 363, 1509–1513.
- McGoldrick A., Macadam A.J., Dunn G., Rowe A., Burlison J., Minor P.D., Meredith J., Evans D.J. and Almond J.W.** (1995) Role of mutations G-480 and C-6203 in the attenuation phenotype of Sabin type 1 poliovirus. *J Virol* 69:7601-5.
- Manor Y., Handsher R., Halmut T., Neuman M., Bobrov A., Rudich H., Vonsoner A., Shulman L. and Kew O.** (1999) Mendelson E., Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1670-1675.
- Martin J., Samoilovich E., Dunn G., Lackenby A., Feldman E., Heath A., Svirchevskaya E., Cooper G., Yermalovich M. and Minor PD.** (2002) Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol.* 76: 10921-8.
- Marturano J. and Fiore L.** (2002) Investigation of the presence of recombinant polioviruses in the hit population in Albania during the 1996 outbreak. *J Clin Microbiol.* 40: 316-7.
- Melnick J.L.** (1996) "Fields Virology". 3<sup>rd</sup> Ed., PA:Lippincott/Raven, Philadelphia.
- Melnick J.L.** (1996) Current status of poliovirus infections. *Clin Microbiol Rev.* 9:293-300. *Review.*
- Mendelsohn C.L., Wimmer E., and Racaniello V.R.** (1989) Cellular receptor for poliovirus:Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56(5):855–865.
- Metcalf T. G., Melnick J. L. and Estes M. K.** (1995) Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 461–487.
- Minerato A, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T. and Shimizu A.** (2005) Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. *J Virol.* 79,12650-7.
- Minor PD.** (1992)The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol* 73: 3065–

3077.

**Moce´-Llivina L., Jofre J., Me´ndez X., Akkelidou D., Lucena F. and Papageorgiou G T.** (2002) Counting cytopathogenic virus adsorbed to cellulose nitrate membrane filters as a simple method for counting viruses in raw sewage and sewage effluents. *J. Virol. Methods* 102: 83–92.

**Morasco B.J., Sharma N., Parilla J., and Flanagan J.B.** (2003) Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 77(9):5136-5144.

**Muckelbauer J.K., Kremer M., Minor I., Diana G., Dutko F.J., Groarke J., Pevear D.C., and Rossmann M.G.** (1995) The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure*, 3(7):653-667.

**Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry, T., and Weissbrich, B.** (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:202–227.

**Newcombe N.G., Andersson P., Johansson E.S., Au G.G., Lindberg A.M., Barry R.D. and Shafren D.R.** (2003) Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J Gen Virol.* 84,3041-50.

**Nomoto A.** (1993) Recombinant polioviruses as candidates for oral live poliovaccines. *Microbiol Immunol*, 37(3):169-74.

**Norder H., Bjerregaard L., Magnus L., Lina B., Aymard M., and Chomel J.J.** (2003) Sequencing of ‘untypable’ enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J. Gen. Virol.*, 84:827–836.

**Nowak-Wegrzyn A., Phipatanakul W., Winkelstein J.A., Forman M.S., and Lederman H.M.** (2001) Successful treatment of enterovirus infection with the use of pleconaril in 2 infants with severe combined immunodeficiency. *Clin. Infect. Dis.*, 32:13–14.

**Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., and Pallansch M.A.** (1999) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.*, 73:1941–1948.

**Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Uddin M., Norder H., Lau C.S., Chomel J.J., Magnus L., and Pallansch M.A.** (2004a) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV 75. *J. Gen. Virol.*, 85:3205-3212.

**Oberste M.S., Penaranda S., and Pallansch M.A.** (2004b) RNA Recombination Plays a Major Role in Genomic Change during Circulation of Coxsackie B Viruses. *J. Virol.*, 78:2948-2955.

**Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A.** (2004c) Evidence for frequent recombination within species Human Enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.*, 78:855–867.

**Ochs K., Saleh L., Bassili G., Sonntag V.H., Zeller A. and Niepmann M.** (2002) Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *J Virol.* 76(5):2113-22.

**Omata T, Kohara M, Kuge S, Komatsu T, Abe S, Semler BL, Kameda A, Itoh H, Arita M, Wimmer E, et al.** (1986) Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J Virol.* 58(2):348-58.

- Palacios G., Casas I., Cisterna D., Trallero G., Tenorio A., and Freire C.** (2002) Molecular epidemiology of echovirus 30:temporal circulation and prevalence of single lineages. *J. Virol.*, 76:4940- 4949.
- Papageorgiou G. T., Moce-Llivina L., Christodoulou C. G., Lucena F., Akkelidou D., Ioannou E. and Jofre J.** (2000) A simple methodological approach for counting and identifying cytopathogenic viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 194-198.
- Papaventsis D, Siafakas N, Markoulatos P, Papageorgiou GT, Kourtis C, Chatzichristou E, Economou C, Levidiotou S.** (2005 ) Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription-PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage. *Appl Environ Microbiol.* 71:72-9.
- Parsley T.B., Towner J.S., Blyn L.B., Ehrenfeld E., and Semler B.L.** (1997) Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA*, 3:1124-1134.
- Paximadi E., Karakasiliotis I., Mamuris Z., Stathopoulos C., Krikelis V. and Markoulatos P.** Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes.* 32 (2006) 203-10.
- Pause A., Belsham G.J., Gingras A.C., Donze O., Lin T.A., Lawrence J.C.Jr., Sonenberg N.** (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, 371:762-767.
- Pelletier J., Sonenberg N.** (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* 28:320-5.
- Pestova T.V., Hellen C.U., and Wimmer E.** (1994) A conserved AUG triplet in the 5' nontranslated region of poliovirus can function as an initiation codon in vitro and in vivo. *Virology*, 204(2):729-37.
- Petersen J.F., Cherney M.M., Liebig H.D., Skern T., Kuechler E., and James M.N.** (1999) The structure of the 2A proteinase from a common cold virus:A proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *EMBO J.*, 18:5463-5475.
- Pérez L. and Carrasco L.** (1993)Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol.*,67(8):4543-8.
- Pfister T, Wimmer E.** (1999) Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem* 274(11):6992-7001.
- Pfister T, Jones KW, Wimmer E.** (2000)A cysteine-rich motif in poliovirus protein 2C(ATPase) is involved in RNA replication and binds zinc in vitro. *J Virol.* 74(1):334-43.
- Pilipenko EV, Gmyl AP, Agol VI.** (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.*,23:1870-5.
- Pollard S.R., Dunn G., Cammack N. and Minor P.D.** (1989)Nucleotide sequence of a neurovirulent variant of the type 2 Oral Poliovirus Vaccine. *Amer Soc Microb* 63:4949-4951.
- Porter A.G.** (1993) Picornavirus nonstructural proteins:emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.*, 67(12):6917-6921.

- Pöyry T., Kinnunen L., Hyypia T., Brown B., Horsnell C., Hovi T., and Stanway G.** (1996) Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 77:1699-1717.
- Pulli T., Koskimies P., and Hyypia T.** (1995) Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes. *Virology*, 212:30-38.
- Racaniello V.R., and Baltimore D.** (1981) Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78:4887-4891.
- Rakoto-Andrianarivelo M., Raobijaona H. and Razanamparany M.** (2000) Pseudo-polio myelitis paralysis caused by Echovirus 7. *Arch Inst Pasteur Madagascar*, 66(1-2):55-7.
- Rakoto-Andrianarivelo M., Rousset D., Razafindratsimandresy R., Chevaliez S., Guillot S., Balanant J. and Delpeyroux F** (2005) High frequency of human enterovirus species C circulation in Madagascar. *J. Clin Microbiol.* 43,242-9.
- Reynolds K. A., Gerba C. P. and I Pepper. L.** (1996) Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1424-1427.
- Rezapkin G. V., Chumakov K. M., Lu Z., Ran Y., Dragunsky E. M. and Levenbook, I. S.** (1994). Microevolution of Sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine. *Virology* 202, 370-378. ??
- Rezapkin G. V., Fan L., Asher D. M., Fibi M. R., Dragunsky E. M. and Chumakov, K. M.** (1999). Mutations in Sabin 2 strain of poliovirus and stability of attenuation phenotype. *Virology* 258, 152-160.
- Rico-Hesse R., Pallansch M.A., Nottay B.K., and Kew O.M.** (1987) Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*, 160(2):311-322.
- Roberts L.** (2004) Polio endgame. The exit strategy. *Science*, 303:1969-71. Erratum in: *Science*, 304(5675):1247.
- Roivainen M., Hyypiä T., Piirainen L., Kalkkinen N., Stanway G., Hovi T.** (1991) RGD-dependent entry of coxsackievirus A9 into host cells and its bypass after cleavage of VP1 protein by intestinal proteases. *J Virol.* 65(9):4735-40.
- Romanova L.I., Tolskaya E.A., Kolesnikova M.S., and Agol V.I.** (1980) Biochemical evidence for intertypic genetic recombination of polioviruses. *FEBS Lett.*, 118:109-112.
- Romanova L.I., Blinov V.M., Tolskaya E.A., Viktorova E.G., Kolesnikova M.S., Guseva E.A., and Agol V.I.** (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*, 155:202-213.
- Rohll J.B., Moon D.H., Evans D.J., and Almond J.W.** (1995) The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.*, 69(12):7835-7844.
- Rossmann M.G.** (1989) The canyon hypothesis: Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* 264:14587-14590.
- Rotbart H.A., and Kirkegaard K.** (1992) "Seminars in VIROLOGY". *ASM Press, Washington, DC*.
- Rotbart H.A., Brennan P.J., Fife K.H., Romero J.R., Griffin J.A., McKinlay M.A., and Hayden F.G.** (1998) Enterovirus meningitis in adults. *Clin. Infect. Dis.*, 27:896-898.

- Rueckert R.R.** (1985) "Virology". *BN Fields, Raven press, New York, USA.*
- Rueckert R.R.** (1996) *Picornaviridae : The viruses and their replication.* 3<sup>rd</sup> ed. *Fields in Virology,* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 609-648
- Rusin P., Enriquez C., Johnson D. and Gerba C.** (2000) In: R. Maier, I. Pepper, and C. Gerba (ed.), *Enteric viruses, Environmental microbiology, 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, London, United Kingdom. pp. 472-484.*
- Sabin A.B., Boulger L.R.** (1973) History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *Jbiol.Stand. 1:115-118.*
- Santti J., Hyypia T., Kinnunen L., and Salminen M.** (1999) Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol., 73:8741-8749.*
- Schiff G.M., Sherwood J.R., Young E.C., and Mason L.J.** (1992) Prophylactic efficacy of WIN 54954 in prevention of experimental human coxsackievirus A21 infection and illness. *Antiviral Res., 17:92.*
- Schiff G.M., and Sherwood J.R.** (2000) Clinical activity of pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A 21 respiratory infection. *J. Infect. Dis., 181:20-26.*
- Sedmak G., Bina D. and MacDonald J.** (2003) Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from milwaukee, wisconsin, collected august 1994 to december 2002. *Appl Environ Microbiol. 69: 7181-7187.*
- Selinka H.C., Wolde A., Sauter M., Kandolf R., and Klingel K.** (2004) Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.), 193(2-3):127-131.*
- Shafren DR, Bates RC, Agrez MV, Herd RL, Burns GF, Barry RD.** (1995)Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol. 69(6):3873-7.*
- Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., and Barry RD.** (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol., 71:4736-4743.*
- Shulman L.M., Manor Y., Handsher R., Delpeyroux F., McDonough M.J., Halmut T., Silberstein I., Alfandari J., Quay J., Fisher T., Robinov J., Kew O.M., Crainic R. and Mendelson E.** (2000) Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 oral poliovaccine strain isolated from sewage in Israel. *J Clin Microbiol. 38: 3729-34.*
- Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P. and Spyrou N.** (2000) Isolation of polioviruses and other enteroviruses in south Greece between 1994 and 1998. *J Clin Lab Anal.14:157-63.*
- Smith T.J., Kremer M.J., Luo M., Vriend G., Arnold E., Kamer G., Rossmann M.G., McKinlay M.A., Diana G.D., and Otto M.J.** (1986) The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science, 233(4770):1286-1293.*
- Smith T.J., Chase E.S., Schmidt T.J., Olson N.H. and Baker T.S.** (1996) Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon. *Nature, 383:350-354.*
- Sommergruber W., Casari G., Fessl F., Seipelt J., and Skern T.** (1994) The 2A proteinase of human rhinovirus is a zinc containing enzyme. *Virology, 204:815-818.*
- Spiller O.B., Goodfellow I.G., Evans D.J., Hinchliffe S.J., and Morgan B.P.** (2002) Coxsackie B viruses that use human DAF as a receptor infect pig cells via pig CAR and do not use pig DAF (2002) *J. Gen. Virol., 83:45-52.*

- Springer T.A.** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283):425-434.
- Stanway G., Hughes PJ, Westrop GD, Evans DM, Dunn G, Minor PD, Schild GC, Almond JW.**(1986) Construction of poliovirus intertypic recombinants by use of cDNA. *J Virol.* 1986 Mar;57(3):1187-90
- Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 71 (11):2483-2501.
- Staunton D.E., Merluzzi V.J., Rothlein R., Barton R., Marlin S.D., and Springer T.A.** (1989) A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*, 56:849-853.
- Staunton D.E., Dustin M.L., Erickson H.P., Springer T.A.** (1990) The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*, 61(2):243-254.
- Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, Biellik RJ, Brink EW, Kew OM, et al.**(1992) Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin Infect Dis Micr* 14:568-579.
- Swennen B. and Levy J.** (2001) Oral poliomyelitis vaccine: time to change? *Vaccine* 21:2262-2267.
- Technical Consultative Group to the World Health Organization** (2002) On the Global Eradication of Poliomyelitis. *Clin. Infect. Dis.* 34:72-77.
- Thoelen I., Lemey P., van der Donck I., Beuselinck I., Lindberg A.M., and van Ranst M.** (2003) Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J. Med. Virol.*, 70:420-429.
- Tolskaya E.A., Romanova L.A., Kolesnikova M.S., and Agol V.I.** (1983) Intertypic recombination in poliovirus:genetic and biochemical studies. *Virology*, 124:121-132.
- Tomassini J.E., Graham D., DeWitt C.M., Lineberger D.W., Rodkey J.A., Colonno R.J.** (1989) cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(13):4907-4911.
- Tomko R.P., Xu R., Philipson L.** (1997) HCAR and MCAR:the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(7):3352-3356
- Tosteson M.T., and Chow M.** (1997) Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J. Virol.*, 71:507-511.
- Tsang S.K., McDermott B.M., Racaniello V.R. and Hogle JM.** (2001)Kinetic analysis of the effect of poliovirus receptor on viral uncoating: the receptor as a catalyst. *J Virol.* 75(11):4984-9.
- Van Vlijmen H.W., Curry S., Schaefer M., and Karplus M.** (1998) Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol.*, 275:295-308.
- Voss T., Meyer R., and Sommergruber W.** (1995) Spectroscopic characterization of rhinoviral protease 2A:Zn is essential for the structural integrity. *Protein Sci.*, 4:2526-2531.
- Wang X., and Bergelson J.M.** (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.*, 3(3):2559-2562.
- Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., and Almond J.W.** (1998) Role for beta2- microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.*, 72:5360-5365.



- Weidman M.K., Yalamanchili P., Tsai B.N.W. and Dasgupta A.** (2001) Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology*, 291:260-271.
- Westrop G.D., Wareham K.A., Evans D.M., Dunn G., Minor P.D., Magrath D.I., Taffs F., Marsden S., Skinner M.A., Schild G.C., and Almond J.W.** (1989) Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.*, 63(3):1338-1344.
- White J.M., and Littman D.R.** (1989) Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56(5):725-728.
- Wimmer E, Hellen CU, Cao X.** (1993) Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet.* 27:353-436. *Review.*
- Vinje J., Gregoricus N., Martin J. and 11 other authors** (2004). Isolation and characterization of circulating type 1 vaccine-derived poliovirus from sewage and stream waters in Hispaniola. *J Infect Dis* 189, 1168-1175.
- Xiao C., Bator-Kelly C.M., Bowman V.D., Rieder E., He Y.N., Hebert B., Bella J., Baker T.S., Wimmer E., Kuhn R.J., and Rossmann M.G.** (2001) Interaction of coxsackievirus A21 with its cellular receptor, ICAM-1. *J. Virol.*, 75:2444-2451.
- Xiao C., Bator C.M., Rieder E., Chipman P.R., Craig A., Kuhn R.J., Wimmer E., and Rossmann M.G.** (2005) The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure*, 13(7):1019-1033.
- Xiang W, Cuconati A, Hope D, Kirkegaard K, Wimmer E.** (1998) Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol.* 72(8):6732-41.
- Yalamanchili P., Harris K., Wimmer E. and Dasgupta A.** (1996) Inhibition of basal transcription by poliovirus: a virus-encoded protease (3C<sup>pro</sup>) inhibits formation of TBP-TATA box complex in vitro. *J. Virol.*, 70:2922-2929.
- Yalamanchili P., Banerjee R. and Dasgupta A.** (1997a) Poliovirus-encoded protease 2A<sup>pro</sup> cleaves the TATA-binding protein but does not inhibit host cell RNA polymerase II transcription in vitro. *J. Virol.*, 71:6881-6886.
- Yalamanchili P., Datta U. and Dasgupta A.** (1997b) Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3C<sup>pro</sup>. *J. Virol.*, 71:1220-1226.
- Yang C.F., Naguib T., Yang S.J., Nasr E., Jorba J., Ahmed N., Campagnoli R., van der Avoort H., Shimizu H., Yoneyama T., Miyamura T., Pallansch M. and Kew O.** (2003). Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol.* 77,8366-77,
- Yoshida H., Horie H., Matsuura K., Kitamura T., Hashizume S. and Miyamura T.** (2002) Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. *J Gen Virol.* 83: 1107-11.

## ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ

[http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects2000/Polio/PoliovirusPathogenesis.htm](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Polio/PoliovirusPathogenesis.htm).

<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Picornaviridae/SequenceDatabase>

Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

[http://www.ratsteachmicro.com/Picornina\\_notes](http://www.ratsteachmicro.com/Picornina_notes)

<http://www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/~trent/right.htm>

<http://www.swbic.org/.../envirusat/module6/module6.html>

<http://www.unmc.edu/Pathology/Enteroviruslab/default.htm>

<http://www.vadscorner.com/outbreak.html>

[http://www.Virology.net/Big\\_Virology/BVRNAPicornina.html](http://www.Virology.net/Big_Virology/BVRNAPicornina.html)

<http://www.virologyj.com/content/>

[http://www.whozoo.org/mac/Music/Sars\\_Protease.htm](http://www.whozoo.org/mac/Music/Sars_Protease.htm)

