

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Βάια Δ. Πλιάκα

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ - ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ
ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Βάια Δ. Πλιάκα

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ - ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ
ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΪΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

2010

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ - ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Σ. ΛΕΒΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Ν. ΚΑΤΗΣ

Καθηγητής Ιολογίας Φυτών

Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σ. ΛΕΒΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Βάια Δ. Πλιάκα

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ - ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ
ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΙΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Βάϊα Δ. Πλιάκα

2010

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ - ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ
ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 14

Συνολικός αριθμός σελίδων: 180

Αριθμός πινάκων: 26

Αριθμός σχημάτων: 39

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 303

ΣΥΝΟΨΗ

Στην παρούσα διατριβή, 13 δείγματα τα οποία απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα και άτομα με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) κατά την χρονική περίοδο 1978-2001, μελετήθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων σε ένα τμήμα της 5'-NCR περιοχής και σε ολόκληρη τη VP1 περιοχή. Ο γενότυπος των 13 κλινικών στελεχών προσδιορίστηκε ως Sabin 1 για δυο από αυτά και ως Sabin 2 για έντεκα από αυτά μέσω RFLP ανάλυσης στην 5'-NCR περιοχή. Επιπλέον όλα τα ιικά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως OPV-like ιοί καθώς εμφάνισαν < 1 % ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή από τα αντίστοιχα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν ότι η αλληλούχηση των 5'-NCR και VP1 περιοχών είναι σημαντική για την μοριακή διάγνωση των πολιοϊών. Η ανάλυση αυτών των περιοχών δείχνει ότι εμβολιοσυνδεόμενοι πολιοϊοί είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε μεταδόσιμα και μολυσματικά παθογόνα μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων τόσο σε δομικά στοιχεία της VP1 (αντιγονικές θέσεις, περιοχή πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα) όσο και σε καθοριστές της εξασθένησης των Sabin εμβολιακών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι δεν είναι σημαντικό μόνο το ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή αλλά κυρίως οι θέσεις όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις. Ο χαρακτηρισμός εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών που βασίζεται στις 5'-NCR και VP1 αλληλουχίες θα μπορούσε να δώσει επιπλέον πληροφορίες όσον αφορά την εξέλιξη των στελεχών αυτών.

Επιπλέον, επιχειρήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών με την κινητική ανάπτυξης εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 14 ιικά στελέχη εκ των οποίων 6 ιικά στελέχη έφεραν απλούς ανασυνδυασμούς, 6 ιικά στελέχη έφεραν διπλούς ανασυνδυασμούς και δύο ιικά στελέχη τα οποία δεν έφεραν ανασυνδυασμό. Ο φαινότυπος ανάπτυξης των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών προσδιορίστηκε σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 40°C) χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές μεθόδους και συγκρίθηκε με την ανάπτυξη των αντίστοιχων πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3). Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: i) το RCT τεστ (Reproductive Capacity at different Temperatures) το οποίο ορίζεται ως η διαφορά, μετά από επώαση 5 ημερών,

ανάμεσα στο \log_{10} του ιϊκού τίτλου που εκφράζεται σε TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) ανά ml, στην ευνοϊκή (37°C) και στη μη ευνοϊκή θερμοκρασία (40°C) για την ιϊκή αναπαραγωγή και ii) η καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου (one-step growth curve test) η οποία παρουσιάζει την ιϊκή ανάπτυξη κατά την διάρκεια των πρώτων 12 ωρών στους 37°C και 40°C μετά την μόλυνση κυττάρων με 10 MOI (Multiplicity Of Infection) ή 10 TCID₅₀/cell. Συμπερασματικά, στα Sabin 2 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη με απλό ανασυνδυασμό τύπου S2/S1, η μετάλλαξη στο κατάλοιπο 143 της VP1 πρωτεΐνης ευνοεί σημαντικά την ιϊκή ανάπτυξη και πιθανόν την αναστροφή προς την νευρομολυσματικότητα. Η μετάλλαξη αυτή έχει συχνά παρατηρηθεί σε Sabin 2 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP. Στα Sabin 3 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη, ο ανασυνδυασμός του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους με τα στελέχη Sabin 1 ή Sabin 2 και η απόκτηση γενωμικής δομής S3/S1 ή S3/S2 ευνοεί την ιϊκή ανάπτυξη και πιθανόν την αναστροφή προς την νευρομολυσματικότητα. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι S3/SX ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν συχνά απομονωθεί από άτομα με VAPP. Επιπλέον, η παρουσία του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους στο 3' άκρο διπλά ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών (S3/S2/S1) ευνοεί την ιϊκή ανάπτυξη και την αναστροφή τους προς νευρομολυσματικά. Αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι Sabin 2 και Sabin 3 ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν απομονωθεί συχνά από άτομα με VAPP ενώ κανένα από τα Sabin 1 στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP δεν βρέθηκαν ανασυνδυασμένα. Το γεγονός αυτό πιθανόν σχετίζεται με την αυξημένη αρμοστικότητα των SX/S1 ανασυνδυασμένων στελεχών έναντι των S1/SX στελεχών. Αντίθετα τα διπλά ανασυνδυασμένα στελέχη S3/S2/S3 και S1/S3/S2 εμφάνισαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Ο έλεγχος της θερμοευαισθησίας και η κινητική μελέτη των εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών (με απλούς και με διπλούς ανασυνδυασμούς) έδειξε ότι τόσο οι μεταλλάξεις όσο και ο ανασυνδυασμός μπορούν να επηρεάσουν τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες και να οδηγήσουν στην αναστροφή προς νευρομολυσματικά στελέχη. Επιπλέον, ο ανασυνδυασμός επιτρέπει είτε την συσσώρευση αναστροφών σε θέσεις καθοριστές της εξασθένισης και της θερμοευαισθησίας σε ένα ιϊκό γένωμα είτε

την εξάλειψη κάποιων καθοριστών εξασθένισης και θερμοευαισθησίας από ένα ιικό γένωμα.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε έλεγχος του επιπέδου ανοσίας ατόμων ηλικίας 1-40 ετών έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) και μιας συλλογής 15 ανασυνδυσασμένων και 4 μη-ανασυνδυσασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με τη μέθοδο της οροεξουδετέρωσης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους τίτλους των αντισωμάτων της ηλικιακής ομάδας 1-40 έναντι των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών σε σύγκριση με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Εξαιρέση αποτέλεσαν δυο Sabin 1 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη με το πρώτο να φέρει ανασυνδυασμό τύπου S1/S3/S2 και το δεύτερο να είναι μη-ανασυνδυασμένο. Και στους τρεις οροτύπους πολιοϊών, οι υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων παρατηρήθηκαν στην ηλικιακή ομάδα 1-10 ενώ ο χαμηλότερος τίτλος αντισωμάτων παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών οροτύπου 3. Γενικά η ορολογική κατάσταση του πληθυσμού είναι καλύτερη για τους πολιοϊούς τύπων 1 και 2 από ότι για τους πολιοϊούς τύπου 3. Η παρουσία του χαμηλότερου τίτλου αντισωμάτων στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών τύπου 3 δείχνει την αναγκαιότητα για μια ενισχυτική δόση με το μονοθενές Sabin 3 εμβολιακό στέλεχος ώστε να διασφαλιστεί η ατομική και η συλλογική ανοσία.

Η ανάπτυξη μιας multiplex RT-PCR μεθόδου για την ταυτοποίηση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών επιτεύχθηκε επίσης στην παρούσα διατριβή. Δύο multiplex PCR αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού S3/SX (SX: S2 ή S1) και S2/SX (SX: S3 ή S1) στις 2C και 3D, αντίστοιχα, γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Έντεκα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών με ανασυνδυασμούς στις 2C ή/και 3D γενωμικές περιοχές τους χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την αξιολόγηση των multiplex PCR αντιδράσεων. Επιπλέον οι multiplex PCR αντιδράσεις εφαρμόστηκαν σε τρία εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών τα οποία απομονώθηκαν από το περιβάλλον, για τον έλεγχο της παρουσίας ανασυνδυασμών στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές τους. Οι multiplex PCR αντιδράσεις επιβεβαίωσαν όλους τους τύπους ανασυνδυασμού S3/SX και S2/SX στις 2C και 3D, αντίστοιχα, περιοχές των θετικών μαρτύρων. Επιπλέον,

έδειξαν την παρουσία ανασυνδυασμού τύπου S3/S2 στην 2C περιοχή σε δυο από τα περιβαλλοντικά στελέχη καθώς και την παρουσία ανασυνδυασμού τύπου S2/S1 στην 3D περιοχή ενός στελέχους. Η αλληλούχιση της 2C-3'NCR γενωμικής περιοχής των τριών περιβαλλοντικών στελεχών επιβεβαίωσε τους ανασυνδυασμούς που ταυτοποιήθηκαν μέσω των multiplex PCR αντιδράσεων και έδειξε την παρουσία ενός επιπλέον ανασυνδυασμού στην 2A, 3C ή 3D περιοχή τους. Επιπλέον ο έλεγχος της ευαισθησίας των multiplex PCR αντιδράσεων έφτασε στο επίπεδο του 1 TCID₅₀/0.1 ml. Η ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών κρίνεται σημαντική σε μια εποχή εκρίζωσης των πολιοϊών αγρίου τύπου και αντικατάστασης του OPV (Oral Poliovirus Vaccine) από το IPV εμβόλιο (Inactivated Poliovirus Vaccine).

Τέλος, επιχειρήθηκε η ανίχνευση νοροϊών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για >90% των επιδημιών γαστρεντερίτιδας μη-βακτηριακής προέλευσης, σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Η ανίχνευση θετικών για νοροϊούς κλινικών δειγμάτων (δυο από τα 8 συνολικά δείγματα) επέτρεψε την αλληλούχιση περιοχών του γονιδιώματος τους και την μετέπειτα χρήση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης για τον σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τελικά επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας περιοχής η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του OR1, ολόκληρο το ORF2 και το 5' άκρο του ORF3 ενός στελέχους (A6) το οποίο απομονώθηκε από τα κόπρανα ατόμου με γαστρεντερίτιδα. Επιπλέον, από τα 8 περιβαλλοντικά δείγματα που αναλύθηκαν, τρία προέκυψαν θετικά για την παρουσία νοροϊών με προέλευση τους βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων. Επιπλέον, παρά την εφαρμογή όλων των εκκινητικών μορίων (νέων και ήδη υπαρχόντων από την βιβλιογραφία) τελικά επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας μόνο μικρής γενωμικής περιοχής (280-700 bp) σε κάθε ένα από τα τρία περιβαλλοντικά δείγματα και στο δεύτερο θετικό κλινικό δείγμα. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση του κλινικού στελέχους A6. Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, ένα για κάθε αναγνωστικό πλαίσιο (ORF1, ORF2, ORF3) του γενώματος. Και στα τρία φυλογενετικά δέντρα το στέλεχος A6 ομαδοποιείται με στελέχη από την GeneBank τα οποία ανήκουν στην γενετική ομάδα GII ενώ είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το στέλεχος A6 σχηματίζει υποομάδα με διαφορετικά στελέχη στα φυλογενετικά των ORF1 και ORF2. Συγκεκριμένα, στο δέντρο του ORF1 σχηματίζει

υποομάδα με ένα στέλεχος που απομονώθηκε από την περιοχή της δυτικής Σουηδίας ενώ στο δέντρο του ORF2 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος από την περιοχή της Ιαπωνίας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ανασυνδυασμού στην περιοχή ένωσης μεταξύ των ORF1 και ORF2 γεγονός που συμφωνεί με την παρατήρηση ότι οι νοροϊοί ανασυνδυάζονται σε αυτή την περιοχή. Η μικρή περιοχή αλληλούχισης των υπόλοιπων στελεχών δεν επέτρεψε την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Η αλληλούχιση όσο το δυνατόν περισσότερων γενωμικών περιοχών των νοροϊκών στελεχών που απομονώνονται κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να είναι εφικτές φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ζήση Μαμούρη, καθώς και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Σταματίνα Λεβιδιώτου-Στεφάνου, οι οποίοι με τίμησαν συμμετέχοντας στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αυτής της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Δημήτριο Κουρέτα και Νικόλαο Κατή, τον αναπληρωτή καθηγητή Δημήτριο Κομιώτη και τον λέκτορα Δημήτριο Μόσιαλο για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον διδάκτορα Ευάγγελο Δεδεψίδη για τις γνώσεις, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη κατά την διάρκεια εκπόνησης τόσο της πτυχιακής εργασίας όσο και της διδακτορικής μου διατριβής. Ένα θερμό ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου για την βοήθεια και στήριξη της κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Επίσης, ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την άριστη συνεργασία και για την εμπειρία της διδασκαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την καθοδήγηση και την επιστημονική επίβλεψη τόσο της πτυχιακής εργασίας όσο και της διδακτορικής διατριβής και κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την κατανόηση που επέδειξε σε δύσκολες στιγμές μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη και την εμπιστοσύνη της όλα αυτά τα χρόνια.

*Στους γονείς μου
Δημήτρη και Κατερίνα*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1

Γενική Εισαγωγή

1.1.1 ΡΟΛΙΟVIRUS, ΠΟΛΙΟΪΟΣ.....	1
1.1.2 NOROVIRUS, ΝΟΡΟΪΟΣ.....	1
1.2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ PICORNA ΪΩΝ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	2
1.2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ CALICI ΪΩΝ ΚΑΙ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	3
1.3.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	5
1.3.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	7
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	9
1.5 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	10
1.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	12
1.7.1 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	15
1.7.2 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	23
1.8. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	30
1.8.1 ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ ΔΟΜΕΣ ΤΟΥ ΪΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ.....	30
1.8.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ.....	32
1.9 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	34
1.10 ΚΑΨΙΔΙΩΣΗ ΪΚΟΥ RNA.....	36
1.11 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	37
1.12 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ.....	40
1.13 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	41
1.13.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ.....	41
1.13.2 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ.....	42
1.14 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	46
1.14.1 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗ ΠΑΡΑΛΥΤΙΚΗ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (VAPP) ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (VDPV).....	49
1.15 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	52
1.16 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	53

Κεφάλαιο 2.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	54
2.1.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	54
2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	54
2.1.3 ΘΕΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	58
2.1.4 ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	59
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	60
2.2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	60
2.2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.....	61
2.2.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	62
2.2.4 ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	64
2.2.5 ΣΕΪΡΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	65
2.2.6 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	66
2.2.7 ΟΡΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	67
2.2.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΓΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	68
2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΪΚΟΥ RNA.....	69
2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	69
2.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ.....	70
2.5.1 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	70
2.5.2 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	71
2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	72
2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	80
2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	81
2.9 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	81
2.10 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	85
2.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	86
2.12 ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (RCT test).....	88
2.13 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΝΟΣ ΣΤΑΔΙΟΥ (ONE-STEP GROWTH CURVE).....	89

2.14 ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΜΕ ΟΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ.....	90
---	----

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΙΣ 5'-NCR ΚΑΙ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΙΩΝ.....	93
3.1.1 RFLP ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	93
3.1.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	93
3.1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ VP1 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	95
3.1.4 ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ.....	95
3.1.5 ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ 5'-NCR ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ IRES ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ.....	97
3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	98
3.2.1 ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	99
3.2.2 ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΙΩΝ.....	100
3.2.3 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	101
3.2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	106
3.3 ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ ΟΡΟΥΣ	116
3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΗΘΩΝ ΤΥΠΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΣΤΙΣ 2C κατ 3D ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΜΕΣΩ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ.....	119
3.4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ.....	122
3.4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ.....	124
3.4.3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	125
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΟΡΟΪΩΝ.....	128
3.6 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΝΟΡΟΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	130

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση.....	133
---------------	-----

Abstract.....	153
---------------	-----

Βιβλιογραφία.....	157
-------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 POLIOVIRUS, ΠΟΛΙΟΪΟΣ

Οι πολιοϊοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ασθένεια της πολιομυελίτιδας, ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών της οικογένειας *Picornaviridae*. Είναι μικροί μη-ελυτροφόροι, εικοσαεδρικής συμμετρίας ιοί με διάμετρο ~ 30 nm. Η αρχαιότερη μαρτυρία που αφορά στην πολιομυελίτιδα προέρχεται από την αρχαία Αίγυπτο το 1400 π.χ.. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα επιδημίες πολιομυελίτιδας άρχισαν να συμβαίνουν στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη. Αυτές οι επιδημίες προκάλεσαν έκπληξη στην ιατρική κοινότητα, η οποία είδε την ασθένεια σαν μια σπανιότητα. Ο αιτιολογικός παράγοντας αυτής της ασθένειας, ο ιός της πολιομυελίτιδας (γνωστός ως πολιοϊός) αναγνωρίστηκε το 1908 από τους Landsteiner και Popper. Η έρευνα πάνω στον ιό τα επόμενα 40 χρόνια παρείχε πληροφορίες για τους αντιγονικούς τύπους, την παθογένεια και την ανοσία και οδήγησε στην ανάπτυξη δύο αποτελεσματικών εμβολίων. Το 1954 οι Salk και Younger παρήγαγαν το πρώτο επιτυχές εμβόλιο μέσω χημικής απενεργοποίησης του ιού με φορμαλδεΐδη γνωστό ως IPV: inactivated polio vaccine. Κατά τη διάρκεια της ίδιας περιόδου, πολλά εργαστήρια προσπαθούσαν να παράγουν εμβόλιο από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών. Τελικά το 1961 ο Sabin παρήγαγε ένα τέτοιο εμβόλιο, το OPV: oral polio vaccine. Το 1962 εκστρατείες μαζικής ανοσοποίησης ξεκίνησαν σε πολλές χώρες. Η ευρεία ανοσοποίηση με το IPV και από το 1963 με το OPV έχει σχεδόν εξαλείψει την πολιομυελίτιδα στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες.

1.1.2 NOROVIRUS, ΝΟΡΟΪΟΣ

Οι Νοροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Caliciviridae*, στο γένος των Νοροϊών, και είναι μικροί μη-ελυτροφόροι, εικοσαεδρικής συμμετρίας ιοί με μια διάμετρο ~ 38 nm. Οι Νοροϊοί είναι υπεύθυνοι για όλες σχεδόν (>95%) τις επιδημίες γαστρεντερίτιδας μη-βακτηριακής προέλευσης στις ΗΠΑ και στην

Ευρώπη (Billgren et al. 2002, Fankhauser et al. 1998). Το 1929 ο Zahorsky πρώτος περιέγραψε την “χειμερινή ασθένεια εμέτου” ως μία ασθένεια η οποία χαρακτηρίζονταν από την ξαφνική εμφάνιση αυτοπεριορισμένου εμέτου και διάρροιας και η οποία εμφάνιζε έξαρση κατά την διάρκεια των χειμερινών μηνών. Μέχρι το 1972, ωστόσο, ο Karikian και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν την αιτιολογία αυτού του συνδρόμου. Το 1968 κατόπιν εξέτασης με την βοήθεια της ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM) των κοπράνων μαθητών ενός σχολείου με επιδημία γαστρεντερίτιδας, ταυτοποίησαν τον ιό Norwalk, ένα από τα πρότυπα στελέχη του γένους των Νοροϊών (γνωστοί και ως “Norwalk-like viruses”). Η μοριακή κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού Norwalk το 1990 οδήγησε στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας και επιδημιολογίας των Νοροϊών και στην ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών τεχνικών (Xi et al. 1990). Καθώς οι Νοροϊοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε κάποια γνωστή κυτταρική σειρά και συνεπώς δεν είναι εφικτός ο άμεσος προσδιορισμός του ορότυπου με αντισώματα, η τεχνική RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) και η γενωμική αλληλούχιση έδειξαν ότι οι Νοροϊοί εμφανίζουν γενετική και αντιγονική ποικιλομορφία (Zheng et al. 2006).

1.2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ PICORNA ΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η οικογένεια των picorna ιών διαχωρίζεται σε 9 γένη με βάση ομοιότητες στις φυσικές ιδιότητες του ιοσωματίου, της γενωμικής αλληλουχίας και της οργάνωσης του γονιδιώματος. Ανθρώπινη παθογένεια παρουσιάζουν τα γένη των Εντεροϊών (Enterovirus), των Ρινοϊών (Rhinovirus), των Καρδιοϊών (Cardiovirus), των ιών Ηπατίτιδας Α (Hepatovirus), των Parechovirus και των Kobuvirus, ενώ τα υπόλοιπα τρία γένη των Erbovirus, Aphthovirus και Teschovirus δεν παρουσιάζουν παθογένεια σε ζωικούς οργανισμούς (King et al., 2000).

Σύμφωνα με το πιο πρόσφατο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο λαμβάνει υπόψη τόσο τις βιολογικές όσο και τις μοριακές ιδιότητες των ιών, το γένος των Εντεροϊών χωρίστηκε σε 7 είδη (King et al., 2000; Brown et al 2003). Από αυτά τα τέσσερα (Human Enterovirus A-D) εμφανίζουν ανθρώπινη παθογένεια. Έχουν αναγνωρισθεί 94 ορότυποι ανθρώπινων εντεροϊών βάση της

νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 δομικής πρωτεΐνης. Η κατανομή των οροτύπων στα 4 είδη που προαναφέρθηκαν φαίνεται στον πίνακα 1.1.

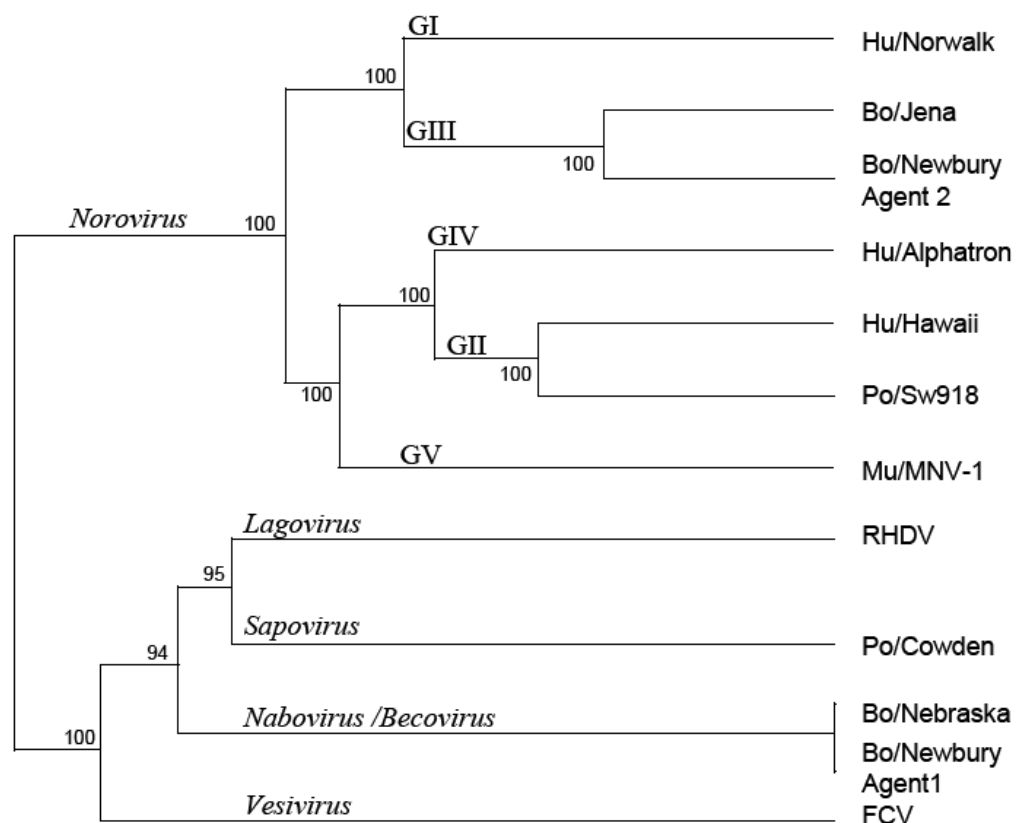
Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση των ιών του γένους των Εντεροϊών το οποίο περιλαμβάνει 5 είδη και 94 ορότυπους.

ΕΙΔΟΣ	ΟΡΟΤΥΠΟΙ
Human Enterovirus A	Coxsackieviruses A2-A8, A10, A12, A14, A16, Enterovirus 71, 76, 89-92
Human Enterovirus B	Coxsackieviruses A9, B1-B6, Echoviruses 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, Enterovirus 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101
Human Enterovirus C	Coxsackieviruses A1, A11, A13, A15, A17-22, A24, Enterovirus 95, 96, 99, 102 Poliovirus 1-3
Human Enterovirus D	Enteroviruses 68, 70, 94

1.2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ CALICI ΙΩΝ ΚΑΙ ΝΟΡΟΪΩΝ

Η οικογένεια των Calici ιών διαχωρίζεται σε 5 γένη με βάση διαφορές στην οργάνωση του γονιδιώματος, στις στρατηγικές κωδικοποίησης και στο εύρος ξενιστή (Thiel and Konig, 1999; Green et al. 2000; Oliver et al. 2006). Οι ιοί οι οποίοι ανήκουν στα γένη των Νοροϊών (Noroviruses) και των Σαποϊών (Sapoviruses), αποτελούν κυρίως παθογόνα των ανθρώπων και προκαλούν οξεία γαστρεντερίτιδα. Οι ιοί του γένους Βεσιϊών (Vesivirus) κατανέμονται ευρέως σε μία ποικιλία θηλαστικών ειδών, όπου προκαλούν συστηματικές και συχνά μόνιμες μολύνσεις, με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Οι ιοί του γένους Λαγκοϊών (Lagoviruses) περιορίζονται σε κουνέλια και λαγούς, στα οποία προκαλούν συνήθως θανατηφόρα αιμορραγική ασθένεια και ηπατίτιδα. Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκαν δύο ομάδες Calici ιών που προκαλούν διάρροια και οξείες εντερικές νόσους στα μωσχάρια (Oliver et al. 2006; Smiley et al. 2002;

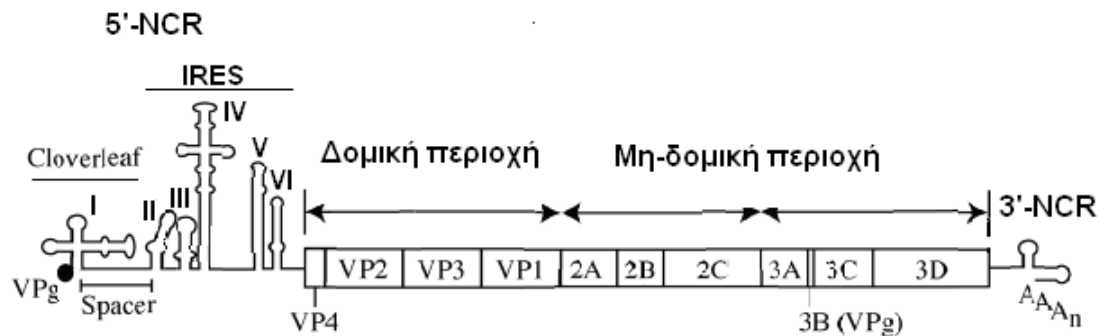
Smiley et al. 2003). Η μία ομάδα εμφανίζει συγγένεια με τους Νοροϊούς και έχει ταξινομηθεί ως γενότυπος III (genogroup III) στο γένος των Νοροϊών. Η δεύτερη ομάδα είναι γενετικά διαφορετική από τα άλλα γένη και έχει προταθεί η ταξινόμησή της ως μέλη ενός πέμπτου γένους γνωστό ως Becovirus ή Nabovirus της οικογένειας Caliciviridae (Oliver et al. 2006). Επιπλέον, ένας νέος Caliciϊός χαρακτηρίστηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας μιας θανατηφόρας ηπατίτιδας και εγκεφαλίτιδας σε ανοσοκαταστελμένα ποντίκια εργαστηρίων (Karst et al. 2003). Λόγω της γενετικής συγγένειας του με τους Νοροϊούς, έχει ταξινομηθεί ως γενότυπος V (genogroup V) στο γένος των Νοροϊών και είναι γνωστός ως MNV (murine norovirus). Στο γένος των Νοροϊών εκτός των γενοτύπων III και V ανήκουν επιπλέον οι γενότυποι I, II και IV οι αποτελούν παθογόνα των ανθρώπων (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Φυλογενετική ταξινόμηση των μελών της οικογένειας Caliciviridae η οποία έγινε με βάση την αλληλουχία της πρωτεΐνης του καψιδίου (βάσεις 1-1668) κάποιων αντιπροσωπευτικών ιϊκών στελεχών.

1.3.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

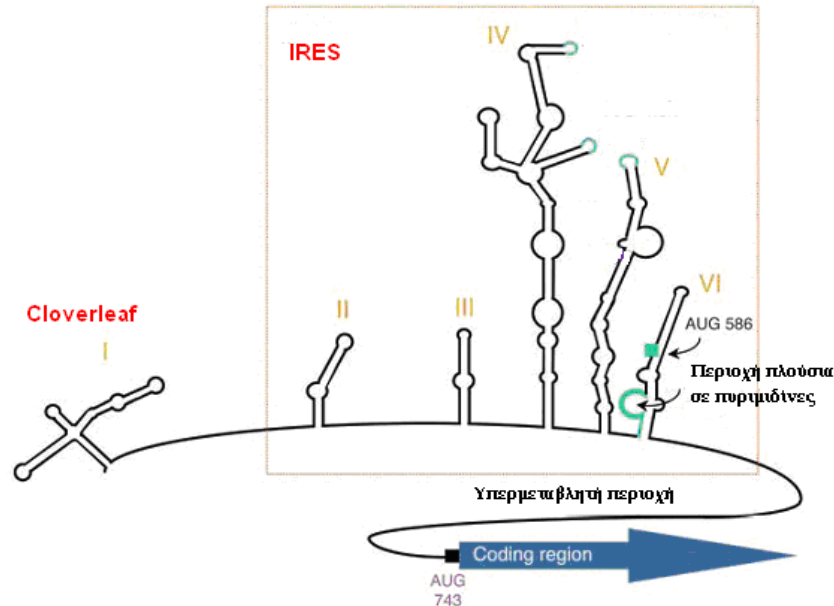
Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται από ένα ~ 7.5 Kb θετικής πολικότητας, μονόκλωνο μόριο RNA. Το ιϊκό RNA φέρει προσδεμένη στο 5' άκρο του μία μικρή ιϊκή πρωτεΐνη γνωστή ως VPg σε αντίθεση με την 7-μεθυλογουανοσίνη CAP δομή των κυτταρικών RNA (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Οργάνωση του γονιδιώματος των πολιοϊών.

Στο 5' άκρο του ιϊκού γενώματος εντοπίζεται μια μεγάλη (742 νουκλεοτίδια) και πλούσια σε δευτεροταγές δομές μη-κωδική περιοχή (5'-NCR). Η 5'-NCR περιλαμβάνει 6 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VI) και χωρίζεται σε 2 περιοχές: στο cloverleaf (δομικό στοιχείο I) και στο Internal ribosome entry site (IRES) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI (Εικόνα 1.3). Το cloverleaf έχει μήκος 88 νουκλεοτίδια και αποτελείται από 4 δομές μίσχου - θηλιάς τις a, b, c και d. Το cloverleaf διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του ιού σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε με ιϊκές είτε με κυτταρικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα παίζει ρόλο στην σταθεροποίηση του ιϊκού RNA μέσω σχηματισμού συμπλόκου με την κυτταρική πρωτεΐνη Poly(rC) binding protein 2 (PCBP 2), στην αντιγραφή του ιϊκού RNA καθώς και στην μετάβαση από την μετάφραση στην αντιγραφή. Το IRES έχει μήκος ~ 400 νουκλεοτίδια και αποτελείται από 5 διακριτά δομικά RNA στοιχεία (II-VI), μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, ένα σιωπηλό κωδικόνιο έναρξης AUG και μια υπερμεταβλητή περιοχή. Η βασική λειτουργία του IRES είναι η προαγωγή της μετάφρασης του ιϊκού RNA η οποία επιτελείται μέσω της πρόσδεσης των

ριβωσωμάτων και των κανονικών παραγόντων μετάφρασης στο εσωτερικό του IRES απουσία μιας CAP δομής στο 5' άκρο του.



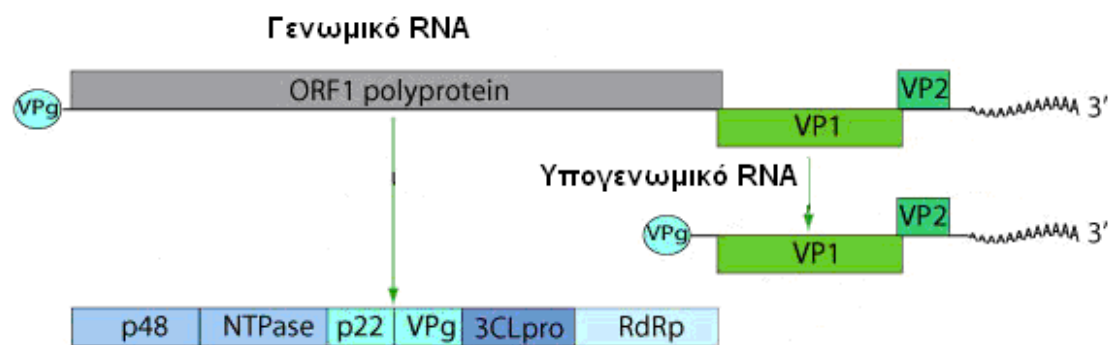
Εικόνα 1.3. Απεικόνιση της 5' μη-κωδικής περιοχής (5'-NCR) των πολιοϊών η οποία περιλαμβάνει 6 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VI) και χωρίζεται σε 2 περιοχές: στο cloverleaf (δομικό στοιχείο I) και στο Internal ribosome entry site (IRES) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI.

Η κωδική περιοχή του ιϊκού RNA μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη 247 kDa, η οποία αποτελείται από 2 περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική (Εικόνα 1.2). Ύστερα από πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης θα προκύψουν αρχικά τα πρόδρομα πολυπεπτιδικά P1, P2 και P3. Τελικά οι τέσσερις δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) καθώς και οι επτά λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού προκύπτουν ύστερα από πρωτεόλυση των προδρόμων P1 και P2-P3, αντίστοιχα (Fields Virology, 2007). Στο 3' άκρο του ιϊκού γενώματος εντοπίζεται μία μη-κωδική περιοχή (3'-NCR) μήκους ~ 62 νουκλεοτιδίων η οποία περιλαμβάνει μια χαρακτηριστική RNA δευτεροταγή δομή θηλιάς, η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιϊκού γενώματος (Jacobson et al., 1993). Το ιϊκό γένωμα φέρει επίσης στο 3' άκρο μια πολύ (A) ουρά [poly(A)tract] η οποία κωδικοποιείται από το ιϊκό RNA. Η πολύ

(A) ουρά έχει κατά μέσο όρο μήκος ~ 60 νουκλεοτίδια και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και μετάφρασης του ιϊκού γενώματος (Fields Virology, 2007).

1.3.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Το γένωμα των Νοροϊών αποτελείται από ένα ~ 7.5 Kb θετικής πολικότητας, μονόκλωνο μόριο RNA με τρία ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) τα οποία κωδικοποιούν τόσο τις δομικές όσο και τις μη-δομικές πρωτεΐνες (Εικόνα 1.4). Το ιϊκό RNA συνδέεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο του με μια ιϊκή πρωτεΐνη γνωστή ως VPg η οποία πιθανόν παίζει ρόλο στην μεταφορά του γονιδιώματος στις θέσεις σύνθεσης του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Clarke and Lambden, 2000).



Εικόνα 1.4. Οργάνωση και έκφραση του γονιδιώματος των νοροϊών. Η ονομασία των πρωτεϊνών αναφέρεται στο νοροϊκό πρότυπο στέλεχος Norwalk.

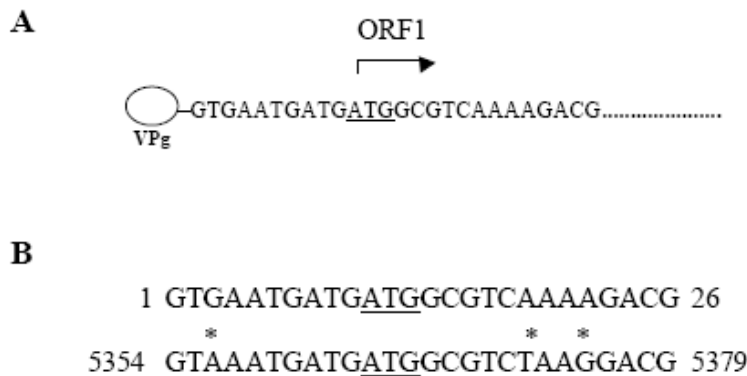
Το ORF1 είναι περίπου 5 Kb και αποτελεί τα πρώτα 2/3 του γονιδιώματος. Κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη μεγέθους ~ 200 KDa η οποία αυτοεπεξεργάζεται από μια ιϊκή πρωτεάση και παράγει τις μη-δομικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την ιϊκή αντιγραφή. Το τελευταίο 1/3 του γονιδιώματος αποτελείται από: (i) το ORF2 μεγέθους 1.8 Kb το οποίο κωδικοποιεί την κύρια δομική πρωτεΐνη VP1 (57 KDa) και (ii) το ORF3 μεγέθους 0.6 Kb το οποίο κωδικοποιεί μια μικρότερη βασική δομική πρωτεΐνη VP2 (22 KDa) η οποία πιθανόν παίζει ρόλο στο πακετάρισμα του ιϊκού RNA στα ιϊκά σωματίδια (Glass et al. 1999). Η οργάνωση του γονιδιώματος των

Caliciών διαφέρει από εκείνη των άλλων θετικής πολικότητας ssRNA ιών, όπως οι πολιοϊοί, καθώς οι μη-δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στο 5' άκρο του γονιδιώματος, ακολουθούμενες από τις δομικές πρωτεΐνες (Clarke and Lambden, 2000).

Τα ORF1 και ORF3 είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης, ενώ η γονιδιωματική οργάνωση επιτρέπει την επικάλυψη του κάθε ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης με το επόμενο του προς την πλευρά του 3' άκρου. Συγκεκριμένα, το ORF1 εκτείνεται και μέσα στο ORF2 για περίπου 17 νουκλεοτίδια, ενώ η πρώτη βάση του κωδικονίου έναρξης του ORF3 επικαλύπτεται με το τελευταίο κατάλοιπο του κωδικονίου τερματισμού του ORF2 (Carter et al., 1992; Clarke et al., 1998).

Οι δομικές πρωτεΐνες VP1 και VP2 εκφράζονται από ένα υπογενωμικό RNA του οποίου το 3' άκρο είναι το ίδιο με αυτό του γενωμικού RNA (Εικόνα 1.4) (Jiang et al. 1993). Τόσο τα γενωμικά όσο και τα υπογενωμικά RNAs φέρουν στο 3' άκρο μια πολύ (A) ουρά μήκους 110 νουκλεοτιδίων (Jiang et al. 1993). Επιπλέον τόσο τα γενωμικά όσο και τα υπογενωμικά RNAs φέρουν στο 5' άκρο μια μη-κωδική περιοχή (5'-NCR) η οποία είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με εκείνες των ευκαρυωτών και των πολιοϊών. Το τρίτο από τα τρία κωδικόνια έναρξης (AUG) του 5' άκρου το οποίο βρίσκεται στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο τόσο για το γενωμικό όσο και για το υπογενωμικό RNA των Νοροϊών βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 11 (Εικόνα 1.5) (Lambden et al. 1993). Η 5'-NCR των Caliciών δεν περιέχει κάποια εσωτερική αλληλουχία εισόδου του ριβοσωματίου αντίστοιχης εκείνης των πολιοϊών (IRES) και επειδή η αμινοτελική πρωτεΐνη του ORF1 παράγεται από το κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 11 (Clarke and Lambden, 2000), είναι απίθανο να υπάρχει κάποια αντίστοιχη του IRES δομή (Hardy and Estes, 1996). Η 5'-NCR νουκλεοτιδική αλληλουχία των γενωμικών και των υπογενωμικών RNAs είναι σχεδόν ταυτόσημη (Εικόνα 1.5) (Hardy and Estes, 1996), γεγονός το οποίο δείχνει έναν πιθανό ρόλο της περιοχής αυτής στην μετάφραση ή την αντιγραφική. Μελέτες έχουν δείξει την παρουσία μιας διπλής δομής μίσχου-θηλιάς (stem-loop) στο 5' άκρο των γενωμικών (nt 1-110) και υπογενωμικών (nt 5280-5356) RNAs. Μια παρόμοια δομή εντοπίστηκε upstream του ORF3 (nt 6848-6941) (Jiang et al. 1993). Επιπλέον στο 3' άκρο του γενωμάτος των Caliciών έχουν εντοπιστεί δομές μίσχου-θηλιάς όπως για παράδειγμα στον FCV στις

θέσεις (nt 7482-7512) και (nt 7542-7572) (Seal et al. 1994). Ωστόσο ο ρόλος των παραπάνω δομών παραμένει ακόμα άγνωστος.

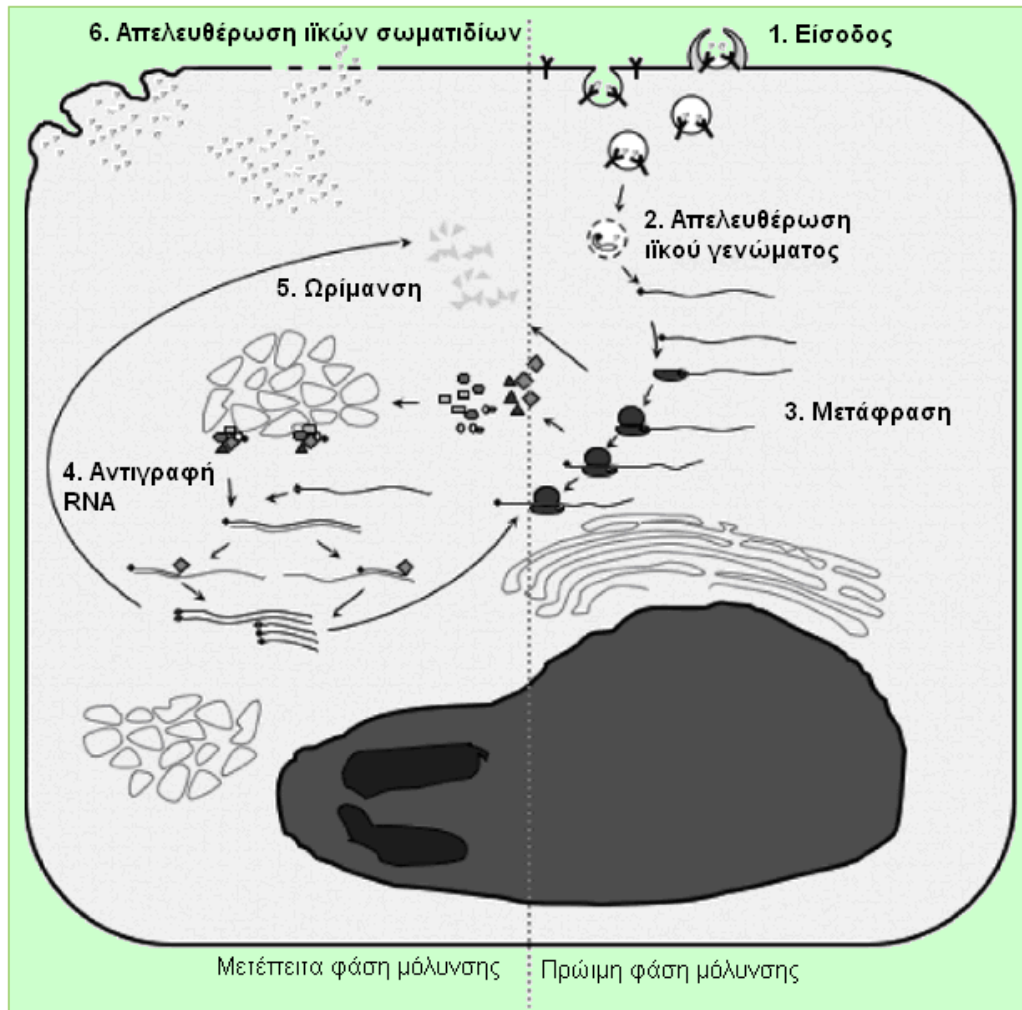


Εικόνα 1.5. Η 5' μη-κωδική περιοχή (5'-NCR) των νοροϊών έχει μήκος 11 νουκλεοτίδια και είναι 88% ταυτόσημη μεταξύ των γενωμικών και των υπογενωμικών RNAs. (A) Το κωδικόνιο έναρξης AUG βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 11 για τους νοροϊούς. Από τα τρία κωδικόνια AUG που εντοπίζονται σε αυτή τη περιοχή, το τρίτο βρίσκεται στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο. (B) Οι 5'-NCR των γενωμικών και των υπογενωμικών RNAs είναι σχεδόν ταυτόσημες στους νοροϊούς και παρόμοια πρότυπα συναντώνται και στους υπόλοιπους Calici ιούς. Οι αστερίσκοι δείχνουν νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις.

1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Τα κύρια στάδια του κύκλου ζωής των πολιοϊών και των νοροϊών είναι κοινά με αυτά των υπολοίπων θετικής πολικότητας RNA ιών (Εικόνα 1.6). Πιο συγκεκριμένα διακρίνονται τα εξής κύρια στάδια:

- 1) Πρόσδεση του ισοωματίου στον κατάλληλο κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος στο κύτταρο ξενιστή με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης.
- 2) Απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα.
- 3) Μετάφραση του ιϊκού RNA και παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών.
- 4) Αντιγραφή του ιϊκού RNA μέσω του κοινού μονοπατιού RNA(+) \rightarrow RNA(-) \rightarrow RNA (+) η οποία λαμβάνει χώρα σε ειδικές μεμβρανώδεις δομές του κυττάρου ξενιστή.
- 5) Διαδικασία ωρίμανσης των ιϊκών πρωτεϊνών και συναρμολόγηση των νέων ισοωματίων.
- 6) Απελευθέρωση των νέων ισοωματίων με λύση του κυττάρου ξενιστή.

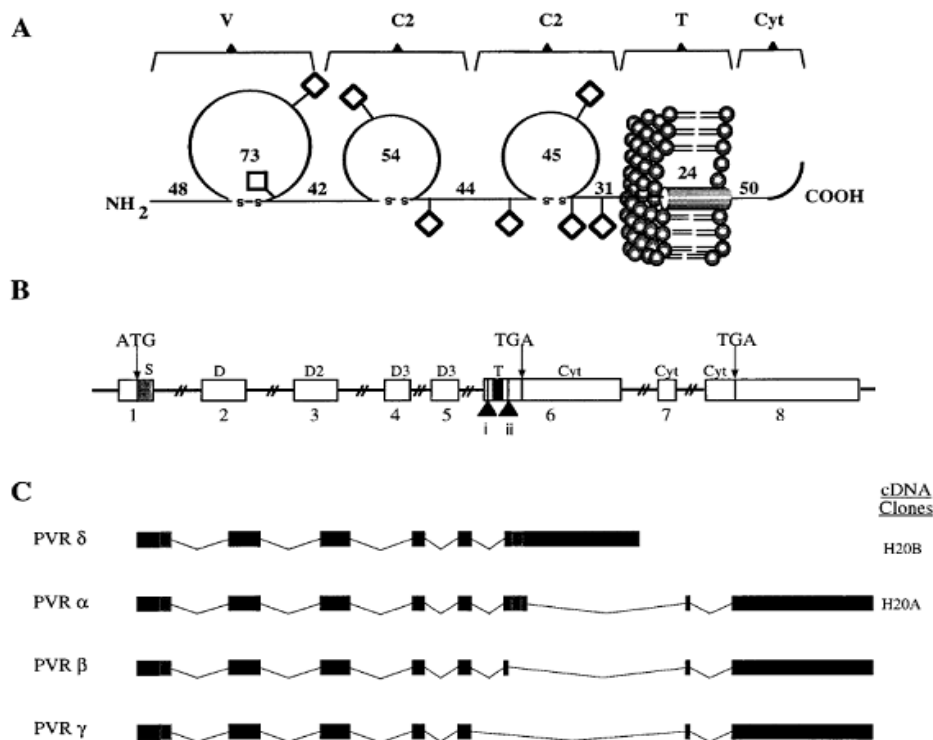


Εικόνα 1.6. Κύκλος ζωής των πολιοϊών και των νοροϊών.

1.5 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Ο υποδοχέας των πολιοϊών (hPVR) έχει ταυτοποιηθεί ως ένα μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών του οποίου ο φυσιολογικός ρόλος είναι ακόμα άγνωστος, αν και έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και αναγνώριση. Ο hPVR, μία γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 80 KDa, αποτελείται από τρεις εξωκυττάρειες περιοχές (V-C2-C2) που έχουν τη δομή αντισώματος, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά (Εικόνα 1.7 Α) (Solecki et al. 1998). Η N-τελική V περιοχή του hPVR είναι απαραίτητη για την μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς και συνεπώς για την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Το γονίδιο του hPVR έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και

περιέχει οκτώ εξόνια (Εικόνα 1.7 Β). Ο hPVR εκφράζεται ως ένα μίγμα τεσσάρων ισομορφών οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του (Εικόνα 1.7 C): δύο ενσωματωμένες στη μεμβράνη ισομορφές (hPVRα και hPVRδ) και δύο εκκρινόμενες ισομορφές από τις οποίες απουσιάζει το εξόνιο της διαμεμβρανικής περιοχής (hPVRβ και hPVRγ). Οι ισομορφές hPVRα και hPVRδ χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς του ιού και διαφέρουν μόνο στην αλληλουχία της C-τελικής κυτταροπλασματικής περιοχής τους (Pfister et al., 1999).



Εικόνα 1.7. (Α) οι λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα των πολιοϊών, (Β) το γονίδιο του υποδοχέα των πολιοϊών και (C) οι τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα.

Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (HBGAs) λειτουργούν ως υποδοχείς των Νοροϊών. Τα HBGAs είναι σύνθετοι υδρογονάνθρακες οι οποίοι εντοπίζονται στις επιφάνειες των ερυθροκυττάρων και στο βλεννογόνο επιθήλιο της αναπνευστικής, της γεννητικο-ουροποιητικής και της πεπτικής κοιλότητας (Ravn and Dabelsteen, 2000). Επίσης εντοπίζονται

ως ελεύθερα ολιγοσακχαρίδια σε βιολογικά υγρά, όπως το σάλιο, τα εντερικά περιεχόμενα, το γάλα και το αίμα. Το σύστημα HBGA ελέγχεται από οικογένειες πολλαπλών γονιδίων που περιέχουν σιωπηλά αλληλόμορφα (Marionneau et al. 2001). Οι τρεις κύριες HBGA οικογένειες οι οποίες σχετίζονται με την μόλυνση με Νοροϊούς είναι οι Lewis, secretor και ABO. Λόγω της επιστατικής φύσης της σύνθεσης των ανθρώπινων HBGA, οι HBGA φαινότυποι του ανθρώπινου πληθυσμού είναι πολυμορφικοί και περίπλοκοι. Η μονάδα σακχάρου των HBGAs είναι ο κύριος καθοριστής για την αναγνώριση του παθογόνου. Έτσι, οι γενικές βιοχημικές διαδικασίες για τον χαρακτηρισμό ενός πρωτεϊνικού υποδοχέα δεν μπορούν να εφαρμοστούν για να περιγράψουν την αλληλεπίδραση Νοροϊού-HBGA. Το γεγονός ότι οι Νοροϊοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κάποια κυτταρική σειρά ή σε κάποιο μικρό ζωικό μοντέλο, έχει περιορίσει την μελέτη των υποδοχέων τους. Η γενετική ποικιλομορφία των Νοροϊών και ο πολυμορφισμός του HBGA συστήματος αποτελούν επιπλέον δυσκολίες στην μελέτη του υποδοχέα τους. Ωστόσο, ανασυνδυασμένα ισοσώματα τα οποία είναι δομικώς και αντιγονικώς παρόμοια με τους αυθεντικούς ιούς αποτελούν πολύτιμα υλικά για τις μελέτες αλληλεπίδρασης ιού-υποδοχέα (White et al. 1996).

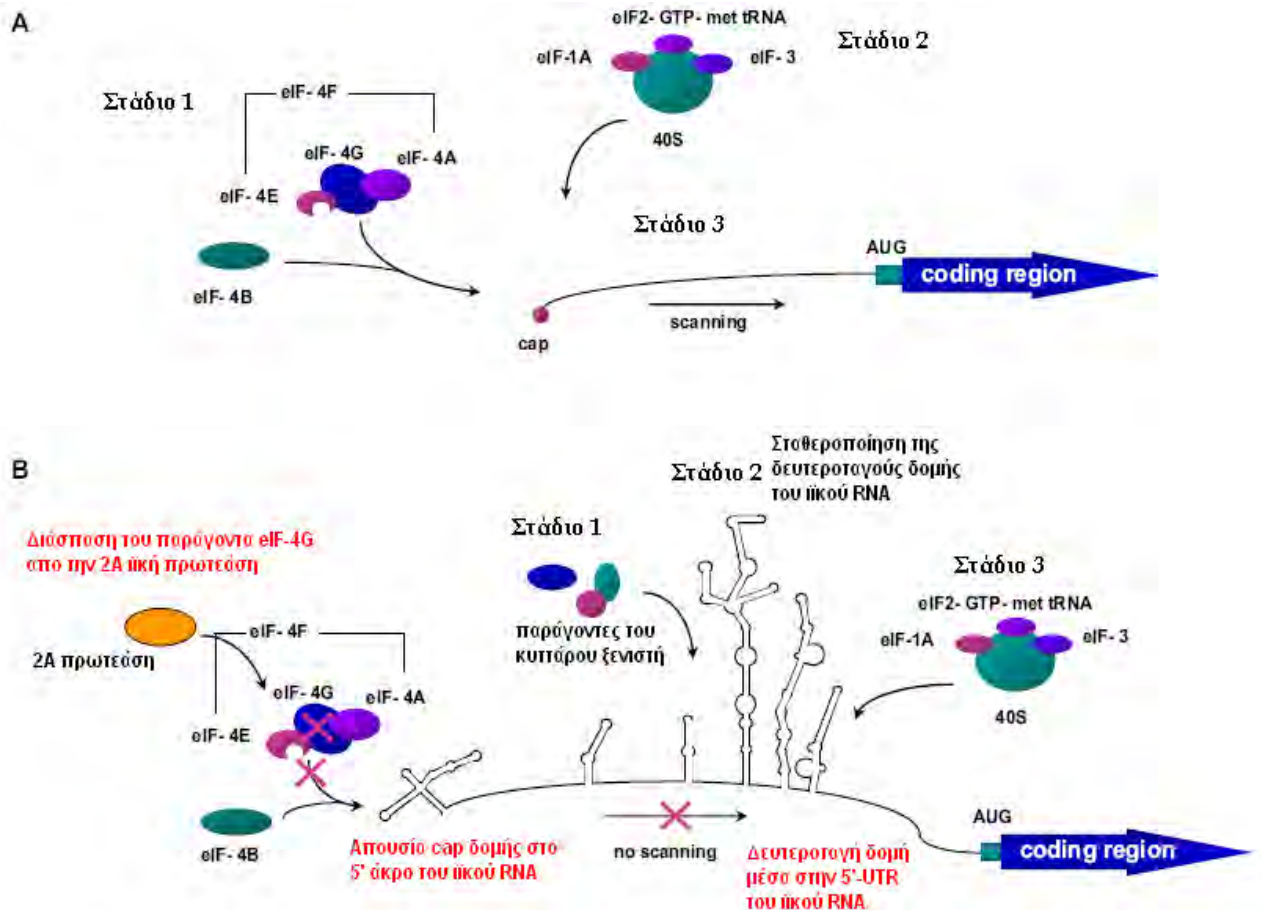
1.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Οι πολιοϊοί και οι Νοροϊοί χρησιμοποιούν μηχανισμούς έναρξης της μετάφρασης οι οποίοι διαφέρουν από την cap-εξαρτώμενη μετάφραση και επιτρέπουν την έκφραση των ιικών γονιδίων ενώ η μετάφραση του κυττάρου ξενιστή αναστέλλεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Η cap-εξαρτώμενη μετάφραση περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και RNA-πρωτεΐνης και ξεκινάει με την πρόδεση του παράγοντα έναρξης eIF4F στην 5' τελική 7-μεθυλγουανοσίνη (m⁷G) cap δομή του mRNA (Hershey and Merrick, 2000). Ο παράγοντας eIF4F αποτελείται από τις υπομονάδες eIF4E, eIF4G και eIF4A. Η στρατολόγηση του 43S προ-εναρκτήριου συμπλόκου, το οποίο αποτελείται από το τριμελές σύμπλοκο eIF2-GTP-mettRNA και τους παράγοντες eIF3 και eIF1A προσδεμένα στην 40S ριβοσωμική υπομονάδα, στο mRNA μεσολαβείται μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων eIF4G

και eIF3 (Gingras et al. 1999). Έτσι προκύπτει το 48S σύμπλοκο το οποίο σκανάρει την 5' μη-κωδική περιοχή ώσπου να συναντήσει το κατάλληλο κωδικόνιο έναρξης (Εικόνα 1.8 Α). Κατόπιν η 60S ριβοσωμική υπομονάδα προσδένεται στο σύμπλοκο, οι παράγοντες έναρξης απελευθερώνονται και πραγματοποιείται η μετάφραση του mRNA.

Οι θετικής πολικότητας RNA ιοί που ανήκουν στις οικογένειες Picornaviridae και Caliciviridae δεν διαθέτουν m⁷G cap δομές. Αντίθετα το ιϊκό RNA είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένο στο 5' άκρο του με μια μικρή ιϊκή πρωτεΐνη γνωστή ως VPg (viral protein genome linked) (Sadowy et al. 2001).

Η VPg των Picorna ιών δεν χρησιμεύει στην έναρξη της μετάφρασης του ιϊκού RNA καθώς αυτή πραγματοποιείται μέσω της δομής IRES (Jang et al. 1990). Για την μετάφραση του ιϊκού γενώματος απαιτείται η κυκλοποίηση του ιϊκού RNA, η οποία επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των PCBP2 και PABP, οι οποίες είναι προσδεδεμένες στο cloverleaf και στη poly(A) ουρά αντίστοιχα (Lyons et al., 2001). Επίσης χρειάζονται όλοι οι παράγοντες που συμμετέχουν στην μετάφραση των ευκαρυωτικών mRNA εκτός από τον eIF4E ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην δομή cap. Αρχικά το C- τελικό τμήμα του eIF4GI (το αμινοτελικό άκρο έχει αφαιρεθεί από την 2A ιϊκή πρωτεάση) προσδένεται στην δομή IRES του ιϊκού RNA και δρα σαν υπόβαθρο για την πρόσδεση των eIF4B και eIF4A μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου eIF4F. Η ακριβής θέση πρόσδεσης του eIF4GI στην δομή IRES δεν είναι ακόμα γνωστή. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η πρόσδεση γίνεται πιθανόν στην περιοχή V του στοιχείου IRES καθώς κάθε μετάλλαξη που επηρεάζει τη δομή της καθιστά το IRES στοιχείο μη-λειτουργικό (Ochs et al. 2002). Στη συνέχεια η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (40S) σε σύμπλοκο με τους παράγοντες eIF1A, eIF3 και eIF2-GTP-mettRNA προσδένεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F-ιϊκό RNA, δημιουργώντας το 43S προ-εναρκτήριο σύμπλοκο. Το προ-εναρκτήριο σύμπλοκο κινείται κατά μήκος του IRES μέχρι να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Εικόνα 1.8 Β). Κατόπιν, προσδένεται η 60S ριβοσωμική υπομονάδα, οι παράγοντες έναρξης απελευθερώνονται και πραγματοποιείται η μετάφραση του ιϊκού γενώματος (Prevot et al., 2003).



Εικόνα 1.8. Οι μηχανισμοί της cap-εξαρτώμενης και της cap-ανεξάρτητης μετάφρασης. (A) Στάδια κατά την έναρξη της cap-εξαρτώμενης μετάφρασης. (B) Προβλεπόμενα στάδια κατά την έναρξη της cap-ανεξάρτητης μετάφρασης των picorna ιών. Τα χαρακτηριστικά του ιικού RNA και τα γεγονότα κατά την διάρκεια μιας μόλυνσης τα οποία εμποδίζουν την cap-εξαρτώμενη μετάφραση του ιικού RNA τονίζονται με κόκκινο χρώμα.

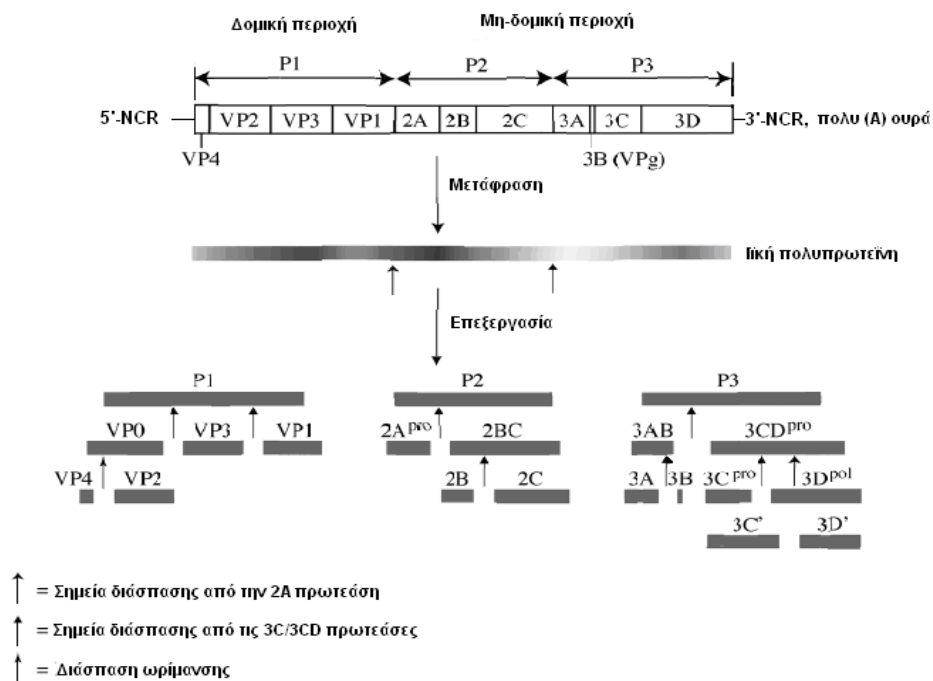
Σε αντίθεση με τους Picorna ιούς, η VPg των Calici ιών παίζει ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης του ιικού RNA. Η απομάκρυνση της VPg από το ιικό RNA οδηγεί σε απώλεια της μολυσματικότητας (Burroughs and Brown, 1978) και περιορίζει σημαντικά την μετάφραση του RNA του ιού FCV (feline calicivirus) in vitro (Herbert et al. 1997). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η VPg των Calici είναι σημαντική για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης, λειτουργώντας πιθανόν ως ανάλογο της cap δομής, όπως έχει προταθεί από τον Herbert και τους συνεργάτες του (Herbert et al. 1997). Όπως προαναφέρθηκε τόσο τα γενωμικά όσο και τα υπογενωμικά RNAs των Calici ιών φέρουν στο 5' άκρο μια πολύ μικρή 5'-NCR (μικρότερη από 20 νουκλεοτίδια). Συγκεκριμένα στην περίπτωση των Νοροϊών το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης τόσο στα

γενωμικά όσο και στα υπογενωμικά RNAs βρίσκεται στην νουκλεοτιδική θέση 11. Συνεπώς είναι αδύνατη η παρουσία κάποιας IRES δομής που θα μπορούσε να χρησιμεύσει για την έναρξη της μετάφρασης. Έχει προταθεί ότι η έναρξη της μετάφρασης του RNA των Caliciών επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ιϊκής πρωτεΐνης VPg και πρωτεϊνών του μηχανισμού μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή. Έχει αποδειχθεί ότι η VPg προσδέεται άμεσα στον παράγοντα έναρξης eIF3 (Daughenbaugh et al. 2003). Συνεπώς έχει προταθεί ότι η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της VPg και του παράγοντα eIF3 ο οποίος είναι ήδη προσδεμένος στην 40S ριβοσωμική υπομονάδα, κατευθύνει το ριβόσωμα ακριβώς στο κωδικόνιο έναρξης AUG (Herbert et al. 1997). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η VPg εντοπίζεται σε σύμπλοκα και με άλλους παράγοντες έναρξης όπως οι eIF2α, eIF4G, eIF4E και με την πρωτεΐνη S6 της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας (Daughenbaugh et al. 2003). Κατά συνέπεια, έχει προταθεί ένας εναλλακτικός μηχανισμός έναρξης της μετάφρασης ο οποίος εμπλέκει την πρόσδεση της VPg σε πολλαπλούς παράγοντες έναρξης (περιλαμβανομένης της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας) ώστε να συναρμολογηθεί ένα σύμπλοκο έναρξης που μοιάζει αρκετά με αυτό του μηχανισμού μετάφρασης των mRNA με m⁷G cap δομή (Asano et al. 2000). Είναι πιθανόν ότι οι δομές μίσχου-θηλιάς που εντοπίζονται στο 5' άκρο των τριών ORFs των Νοροϊών μέσω αλληλεπιδράσεων με παράγοντες έναρξης της μετάφρασης συμβάλουν στην συναρμολόγηση των ριβοσωμάτων και την έναρξη της μετάφρασης (Simmonds et al. 2008). Το γεγονός ότι οι Νοροϊοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κάποια κυτταρική σειρά έχει περιορίσει σημαντικά τις μελέτες που αφορούν τον μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.

1.7.1 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Μετά την είσοδο του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου, μια άγνωστη κυτταρική φωσφοδιεστεράση απομακρύνει την VPg ιϊκή πρωτεΐνη από το 5' άκρο του ιϊκού γενώματος. Μετά την διαδικασία αυτή ακολουθεί η μετάφραση του ιϊκού γενώματος από τα ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή. Η πολυπρωτεΐνη (247 KDa) η οποία κωδικοποιείται από ένα μεγάλο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και είναι ένα ασταθές μόριο, υφίσταται

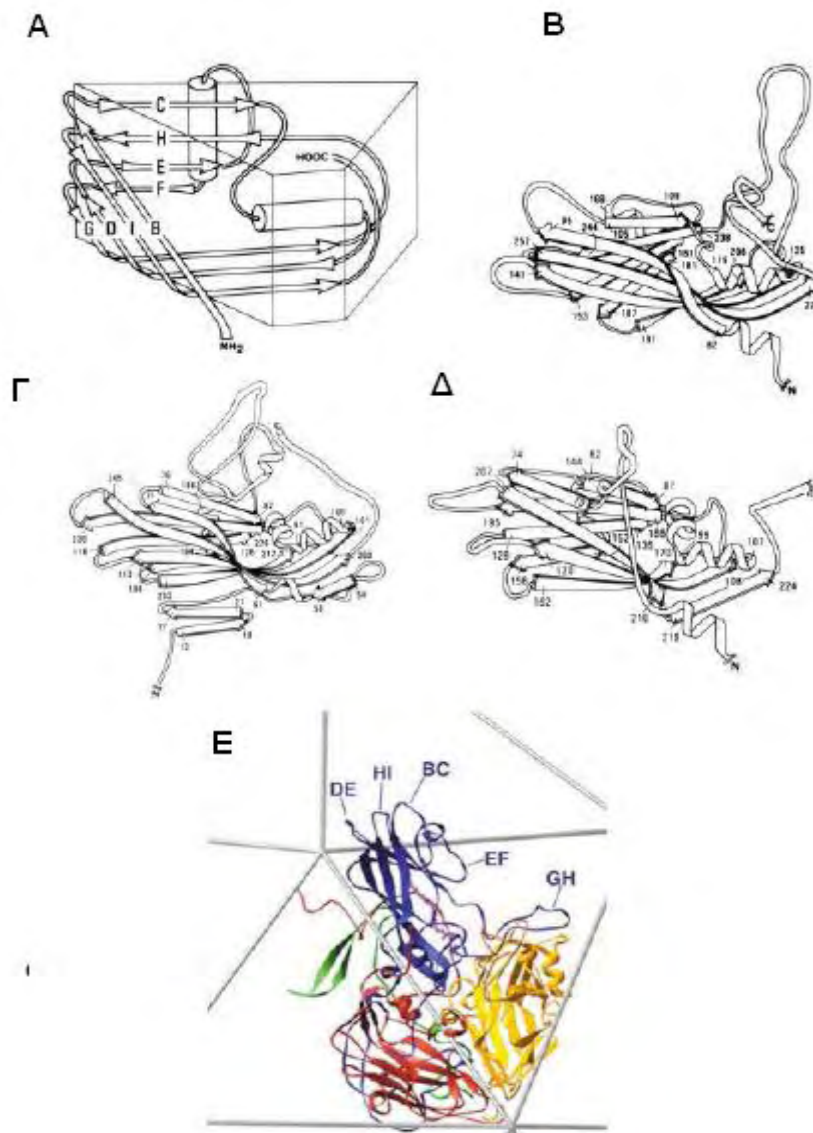
πρωτεολυτική διάσπαση από τις ιϊκές πρωτεάσες, $2A^{pro}$ και $3C^{pro}/3CD^{pro}$ in cis και in trans (Pfister et al., 1999) (Εικόνα 1.9), οδηγώντας στην παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών. Αρχικά η $2A^{pro}$ πραγματοποιεί μία cis-διάσπαση του δεσμού Tyr-Gly στο N-τελικό άκρο της και οδηγεί στην απελευθέρωση της πρόδρομης πρωτεΐνης του καψιδίου P1. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την απελευθέρωση της P3 από το πρόδρομο πολυπεπίδιο P2- P3. Αυτό πραγματοποιείται μέσω cis-διάσπασης από την $3CD^{pro}$. Σε μία αλληλουχία γεγονότων trans-διάσπασης από την $3CD^{pro}$, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), $3C^{pro}$, $3D^{pol}$ και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ιϊκών σωματιδίων και γι' αυτό αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης.



Εικόνα 1.9. Η πολυπρωτεΐνη των πολιοϊών περιέχει τις δομικές (P1) και τις μη-δομικές (P2 και P3) πρωτεΐνες οι οποίες απελευθερώνονται από την πολυπεπτιδική αλυσίδα μέσω πρωτεολυτικής επεξεργασίας που μεσολαβεί από τις ιϊκές πρωτεάσες $2A^{pro}$ και $3C^{pro}/3CD^{pro}$ ώστε τελικά να παραχθούν έντεκα ώριμες ιϊκές πρωτεΐνες. Τρία ενδιάμεσα προϊόντα της επεξεργασίας (2BC, 3CD, 3AB) εμφανίζουν λειτουργίες διαφορετικές από εκείνες των αντίστοιχων τελικών προϊόντων διάσπασης.

P1-δομικές πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες σχηματίζουν το εικοσαεδρικής συμμετρίας καψίδιο του ιού το οποίο αποτελείται από 60 αντίγραφα κάθε μιας από τις **VP1**, **VP2**, **VP3** και **VP4**. Οι τρεις μεγαλύτερες δομικές πρωτεΐνες (VP1, VP2 και VP3) εμφανίζουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση. Συγκεκριμένα, το κοινό δομικό μοτίβο που παρουσιάζουν είναι ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων (Εικόνα 1.10). Αντίθετα η VP4 υιοθετεί μια περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση (Hogle, 2002).

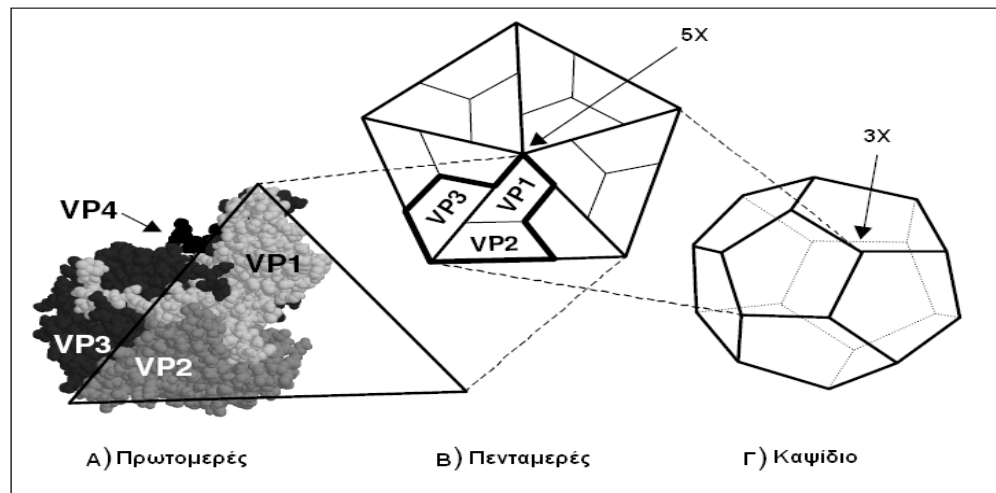


Εικόνα 1.10. Α) Αναπαράσταση του κοινού δομικού μοτίβου των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 το οποίο συνίσταται σε ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων. Β-Δ) Αναπαράσταση των VP1, VP2 και VP3 αντίστοιχα όπου φαίνεται η τριτοταγή διαμόρφωσή τους και οι διαφορετικές για κάθε πρωτεΐνη αμινοξικές θηλιές μεταξύ των β-κλώνων. Ε) Το ιικό πρωτομερές. Με μπλε η VP1, με κόκκινο η VP3, με κίτρινο η VP2 και με πράσινο η VP4.

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

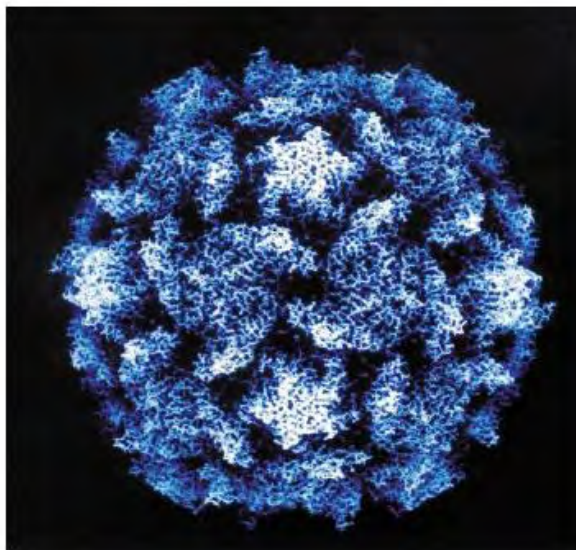
Κατά την πρωτεόλυση, η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0,VP3,VP1). Κατόπιν τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και δίνουν τα πενταμερή [(VP0,VP3,VP1)₅]. Τέλος τα πενταμερή συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν το προκαψίδιο [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA "πακετάρεται" στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2 (Pfister et al. 1999).

Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Πιο συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου (Εικόνα 1.11) (Blondel et al. 1998).



Εικόνα 1.11. Δομή του καψιδίου των πολιοϊών. Α) Κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από ένα αντίγραφο κάθε μιας από τις δομικές πρωτεΐνες VP1-VP4. Η επιφάνεια του ισοματίου σχηματίζεται από τις VP1, VP2 και VP3 ενώ η VP4 είναι εσωτερική. Β) Πέντε πρωτομερή συναρμολογούνται σε ένα πενταμερές. Ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας παρουσιάζεται. Γ) Το εικοσαεδρικής συμμετρίας καψίδιο σχηματίζεται από 12 πενταμερή. Ένας από τους 20 τριμερής (3X) άξονες συμμετρίας παρουσιάζεται.

Στο εξωτερικό του καψιδίου γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας εδράζεται μια εκτεταμένη διαμόρφωση αλάκας γνωστή και ως canyon (Εικόνα 1.12). Η αλάκα σχηματίζεται από αμινοξέα των VP1, VP2 και VP3 και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα CD155 των πολιοϊών (Colston and Racaniello 1994; Belnap et al., 2000; He et al., 2000). Στη βάση της αλάκας, στο εσωτερικό του β-βαρελιού της VP1 βρίσκεται ένα λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης, το οποίο πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου (Filman et al., 1989).



Εικόνα 1.12. Η ατομική δομή του πολιοϊού τύπου 2 ύστερα από ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Είναι εμφανής οι αυλακώσεις (canyons) που περιβάλλουν τις επιφανειακές προεξοχές (star-like) στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας.

Τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση του καψιδίου (Chow et al., 1987; Colston and Racaniello 1994). Επιπλέον έχει προταθεί ότι το αμινοτελικό άκρο της VP1 συμμετέχει στην καψιδίωση του ιϊκού RNA (Kirkegaard, 1990).

P2 μη-δομικές πρωτεΐνες

Οι πρόδρομες και οι ώριμες πρωτεΐνες της P2 περιοχής της πολυπρωτεΐνης εμπλέκονται στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, σε αναδιατάξεις μεμβρανών του κυττάρου ξενιστή και στην αντιγραφή του ιϊκού RNA και κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν πολλαπλές λειτουργίες. Η **2A** πρωτεάση παίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης και έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην αντιγραφή του ιϊκού RNA (Li et al. 2001). Επίσης αποκόπτει το αμινοτελικό άκρο των παραγόντων eIF4GI και eIF4GII, καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο της PABP με αποτέλεσμα τη διακοπή της κυτταρικής μετάφρασης (Ventoso et al., 1998). Η ιϊκή πρωτεΐνη **2B** τροποποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες και αυξάνει την διαπερατότητά τους το

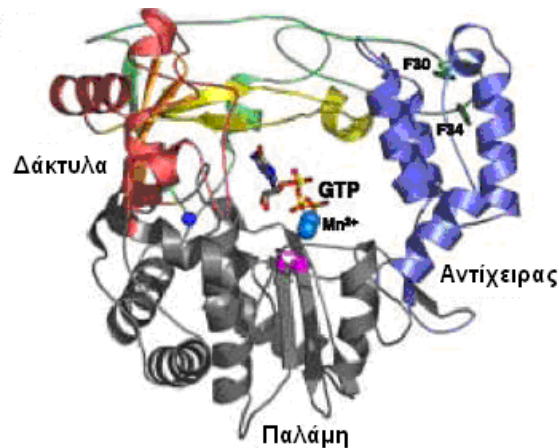
οποίο είναι σημαντικό για την απελευθέρωση των ιοσωματίων κατά την διάρκεια των τελευταίων σταδίων της μόλυνσης (Van Kuppeveld et al. 1997; Doedens and Kirkegaard, 1995). Μεταλλάξεις στην 2B κωδική περιοχή του RNA των πολιοϊών οδήγησαν σε ιικά στελέχη τα οποία χαρακτηρίζονταν από ανεπαρκή σχηματισμό πλακών (plaque assay). Συνεπώς η 2B είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού RNA (Johnson and Sarnow, 1991). Η 2C και η πρόδρομη 2BC πρωτεΐνη απαιτούνται για ενδοκυττάρειες αναδιατάξεις μεμβρανών και για τον σχηματισμό κυτταροπλασματικών κυστιδίων (Cho et al. 1994; Echeverri and Dasgupta, 1995). Επίσης η πρόσδεσή τους στην 3'-NCR περιοχή του RNA αρνητικής πολικότητας των πολιοϊών δείχνει ότι παίζουν ρόλο στην σύνθεση του θετικής πολικότητας ιικού RNA (Banerjee et al. 2001; Banerjee et al. 1997). Η 2C πρωτεΐνη περιέχει μοτίβα τα οποία είναι παρόμοια με εκείνα που συναντώνται στις RNA ελικάσες (Paul et al. 1994) και παρόλο που έχει βρεθεί ότι η 2C εμφανίζει δραστηριότητα NTPάσης, η δραστηριότητα ελικάσης της 2C δεν έχει παρατηρηθεί άμεσα (Mirzayan and Wimmer, 1994; Pfister et al. 2000). Τέλος έχει αναφερθεί ότι η 2C πρωτεΐνη των πολιοϊών απαιτείται για την σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA (Barton and Flanagan, 1997).

P3 μη-δομικές πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες της P3 περιοχής της πολυπρωτεΐνης παίζουν σημαντικούς ρόλους στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή έναντι του ιού καθώς στην αντιγραφή του ιικού RNA. Η 3A πρωτεΐνη αναστέλλει τόσο την έκφραση των παραγόντων MHC-I (major histone capability class I) οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την παρουσίαση του αντιγόνου, όσο και την ενδοκυττάρια μεταφορά πρωτεϊνών, τα οποία είναι σημαντικά για την υπεκφυγή της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των πολιοϊών (Doedens et al. 1997; Deitz et al. 2000). Η 3B πρωτεΐνη, γνωστή επίσης ως VPg, βρίσκεται ομοιοπολικώς συνδεμένη στο 5' άκρο των ιικών RNA θετικής και αρνητικής πολικότητας. Η VPg συναντάται επίσης με την μορφή VPgpUpU στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Η ουριδιλιωμένη αυτή μορφή χρησιμοποιείται σαν εκκινητικό μόριο κατά την ιική αντιγραφή (Lyle et al., 2002). Οι υπόλοιπες P3 πρωτεΐνες (3AB, 3C, 3CD, 3D) εμπλέκονται στην συναρμολόγηση των συμπλόκων έναρξης της αντιγραφής ή/και συμμετέχουν στην διαδικασία

αντιγραφής του ιικού RNA. Μελέτες που περιλάμβαναν μεταλλάξεις στην υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης **3AB** έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιικού RNA (Giachetti et al. 1992). Επιπλέον η 3AB συμβάλει στην πρόσδεση των συμπλόκων αντιγραφής σε μεμβράνες (Towner et al. 1996), διεγείρει την δραστηριότητα της 3D ιικής RNA πολυμεράσης (Paul et al. 1994) και την αυτο-διάσπαση της προδρόμου πρωτεΐνης 3CD (Molla et al. 1994). Οι **3C** και **3CD** ιικές πρωτεάσες είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται στο ιικό RNA, εμπλέκονται στην επεξεργασία των ιικών πρωτεϊνών και στην αντιγραφή του ιικού RNA. Οι αλληλουχίες στο 5' άκρο του RNA των πολιοϊών και των coxsackie ιών σχηματίζουν μια δομή τριφυλλιού, γνωστή ως cloverleaf ή stem-loop I, η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης για την πρόδρομη ιική πρωτεΐνη 3CD (Andino et al. 1990; Bell et al. 1999). Η 3C πρωτεΐνη έχει βρεθεί ότι προσδένεται στη δομή cloverleaf του RNA των rhino ιών και των coxsackie ιών (Leong et al. 1993; Zell et al. 2002). Η 3CD αλληλεπιδρά με την δομή cloverleaf του RNA των πολιοϊών σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή PCBP2 [poly r(C) binding protein 2] και χρησιμεύει στην αντιγραφή του ιικού RNA (Parsley et al. 1997). Μελέτες που περιλάμβαναν μεταλλάξεις στην δομή cloverleaf έδειξαν ότι η πρόσδεση της 3CD είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού RNA αλλά όχι για την μετάφραση ή την σταθερότητα του RNA (Andino et al. 1990; Rieder et al. 2003). Η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, **3D**, περιέχεται μέσα στην πρόδρομη P3 πρωτεΐνη και είναι υπεύθυνη για την ουριδιλίωση της VPg πρωτεΐνης και την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου RNA κλώνου κατά την διάρκεια της ιικής αντιγραφής. Η 3D είναι μια επιρρεπής σε λάθη πολυμεράση όπως και οι άλλες RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες οδηγώντας σε αύξηση της συχνότητας των μεταλλάξεων και του ρυθμού εξέλιξης. Η τρισδιάστατη δομή της 3D πολυμεράσης των πολιοϊών έχει προσδιοριστεί (Hansen et al. 1997). Η 3D εμφανίζει παρόμοια τοπολογία με τις άλλες πολυμεράσες και δομικά μοιάζει με δεξι χέρι που αποτελείται από τις περιοχές του αντίχειρα, της παλάμης και των τεσσάρων δακτύλων (Εικόνα 1.13). Η 3D δρα σαν πολυμερές και ο ολιγομερισμός της προάγεται από 2 διαφορετικά δίκτυα αλληλεπιδράσεων μεταξύ 2 μορίων 3D, των interface I και II. Το interface I δημιουργείται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πίσω μέρους του αντίχειρα του ενός μορίου και του πίσω μέρους της παλάμης του άλλου μορίου. Το

interface I αποτελεί θέση πρόσδεσης για το σύμπλοκο RNA-εκκινητικό μόριο. Το interface II δημιουργείται μεταξύ της κορυφής του αντίχειρα του ενός μορίου και της βάσης των δαχτύλων του άλλου μορίου και είναι σημαντικό για την επιμήκυνση (Lyle et al., 2002). Το ενεργό κέντρο της 3D βρίσκεται στην περιοχή της παλάμης και αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 327, ασπαραγινικό 328 και ασπαραγινικό 329 (Arnold et al., 2004).

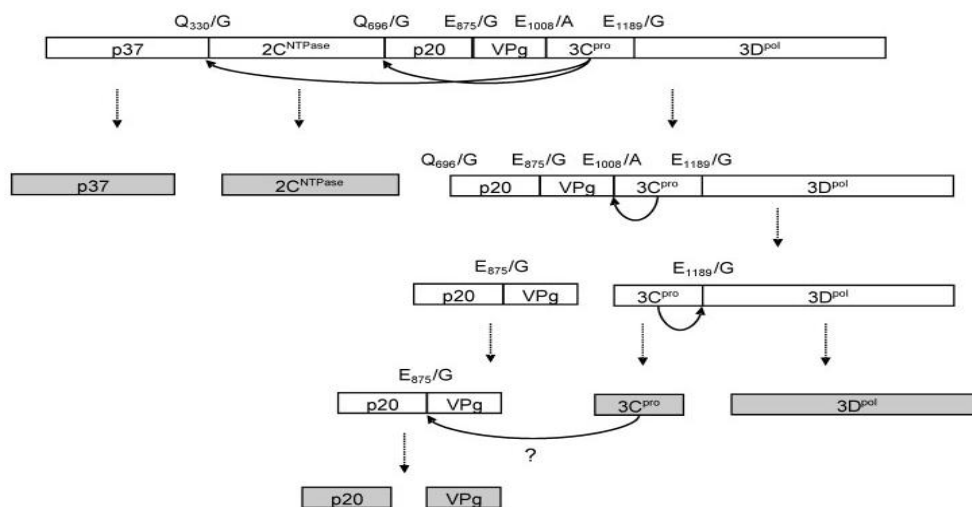


Εικόνα 1.13. Δομή της 3D πολυμεράσης των πολιοϊών. Παρουσιάζεται το σύμπλοκο 3D^{pol}-GTP με εμφανείς τις διάφορες περιοχές της ιϊκής πολυμεράσης. Η περιοχή του αντίχειρα είναι μπλε και η περιοχή της παλάμης γκρι με το συντηρημένο καταλυτικό κέντρο σε μωβ χρώμα. Η περιοχή των δακτύλων υποδιαιρείται σε τέσσερις υποπεριοχές οι οποίες παρουσιάζονται με πράσινο, πορτοκαλί, κίτρινο και ροζ χρώμα. Το αμινοτελικό άκρο της πολυμεράσης απεικονίζεται με ένα μπλε σφαιρίδιο και παρουσιάζονται επίσης διάφορα αρωματικά αμινοξέα που είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών των δακτύλων και του αντίχειρα (F30, F34).

1.7.2 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Οι μη-δομικές πρωτεΐνες των Calici ιών παράγονται από την πρωτεόλυση μιας προδρόμου πολυπρωτεΐνης η οποία κωδικοποιείται από το ORF1 του 5' άκρου του γονιδιώματος. Αυτή η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη δεν έχει απομονωθεί γεγονός το οποίο δείχνει ότι η πρωτεολυτική επεξεργασία είναι γρήγορη και πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της μετάφρασης (Sosnovtseva et al. 1999). Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται από μια ιϊκή πρωτεάση κυστεΐνης γνωστή ως 3C-like protease (3C^{pro}, 19 KDa) η οποία εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της προδρόμου πολυπρωτεΐνης, ανοδικά της ιϊκής RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (3D-like, 3D^{pol}). Η

3C^{pro} απελευθερώνεται μέσω αυτοκαταλυτικής διάσπασης από την πρόδρομη πολυπρωτεΐνη (Boniotto et al. 1994). Ωστόσο πρόσφατα βρέθηκε ότι τόσο η 3C^{pro} όσο και η πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD^{pro/pol} (3CD-like protease polymerase protein) συμμετέχουν στην πρωτεόλυση της προδρόμου πολυπρωτεΐνης (Scheffler et al. 2007). Έχει προταθεί ότι η διάσπαση της προδρόμου πολυπρωτεΐνης η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τελικών σταθερών πρωτεϊνών περιλαμβάνει τέσσερα στάδια (Εικόνα 1.14) (Scheffler et al. 2007). Αρχικά η 3C^{pro} διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς 2C/p20 και p37/2C in trans, απελευθερώνοντας τις τελικές πρωτεΐνες p37, 2C^{NTPase} και το πρόδρομο πολυπεπτιδίο p20VPg3CD^{pro/pol}. Ακολουθεί η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού VPg/3C^{pro} από την 3CD^{pro/pol} απελευθερώνοντας την 3CD^{pro/pol}. Κατόπιν η 3C^{pro} διασπά τον πεπτιδικό δεσμό 3C^{pro}/3D^{pol} in cis, απελευθερώνοντας την 3C-like πρωτεάση και την 3D-like πολυμεράση. Τέλος η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού p20/VPg εξαρτάται από την καταλυτική δραστηριότητα της 3C^{pro} αλλά και άλλων κυτταρικών παραγόντων.



Εικόνα 1.14. Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης του ORF1 του νοροϊκού πρότυπου στελέχους Lordsdale, από τις 3C^{pro} and 3CD^{pro/pol}. Στο πρώτο στάδιο, η 3C^{pro} διασπά τους 2C/p20 και p37/2C πεπτιδικούς δεσμούς in trans, απελευθερώνοντας την p37, την 2C^{NTPase} και το πρόδρομο πεπτιδίο p20VPg3CD^{pro/pol}. Ακολουθεί η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού VPg/3C^{pro} από την 3CD^{pro/pol} απελευθερώνοντας την 3CD^{pro/pol}. Τότε, η 3C^{pro} διασπά τον πεπτιδικό δεσμό 3C^{pro}/3D^{pol} in cis, απελευθερώνοντας την 3C^{pro} και την 3D^{pol}. Η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού p20/VPg δεν εξαρτάται μόνο από την καταλυτική δραστηριότητα της 3C^{pro} αλλά και άλλων κυτταρικών συστατικών. Τα τελικά σταθερά προϊόντα είναι τονισμένα με γκρι χρώμα ενώ οι πεπτιδικοί δεσμοί που διασπώνται απεικονίζονται πάνω στην πολυπρωτεΐνη.

ORF1 μη-δομικές πρωτεΐνες

Οι μη-δομικές πρωτεΐνες των Νοροϊών κωδικοποιούνται από ένα μεγάλο ανοιχτό αναγνώσιμο πλαίσιο που εντοπίζεται στο 5' άκρο του ιϊκού RNA σε αντίθεση με τις μη-δομικές πρωτεΐνες των πολιοϊών οι οποίες κωδικοποιούνται από δυο πρόδρομα πολυπεπτίδια του 3' άκρου. Συνολικά 6 μη-δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στο ORF1 των Νοροϊών και παράγονται ύστερα από πρωτεόλυση μιας πολυπρωτεΐνης ~ 200 KDa.

Η πρωτεΐνη η οποία κωδικοποιείται από το αμινοτελικό άκρο της προδρόμου πολυπρωτεΐνης των Νοροϊών εντοπίζεται σε μια θέση ισοδύναμη με αυτή της περιοχής 2AB του γενώματος των picorna ιών. Ωστόσο στην περίπτωση των Νοροϊών υπάρχει μόνο μια πρωτεΐνη, η **p48**, η οποία κωδικοποιείται σε αυτήν την περιοχή (Belliot et al. 2003). Το αμινοτελικό άκρο της p48 εμφανίζει μια μικρή ομοιότητα στην αλληλουχία με την 2A πρωτεΐνη κάποιων picorna ιών και με δύο κυτταρικές πρωτεΐνες (Tig3 και H-rev107) οι οποίες εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hughes and Stanway, 2000; Johansson et al. 2002). Το καρβοξυτελικό άκρο της p48 έχει παρόμοια λειτουργία με την 2B πρωτεΐνη των πολιοϊών καθώς συνδέεται με μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή (Fernandez-Vega et al. 2004). Η p48 αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη VAP-A (Vesicle Associated Protein A), η οποία είναι ένας ρυθμιστής των SNARE πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην σύντηξη κυστιδίων (Ettayebi and Hardy, 2003). Δεδομένου ότι η αντιγραφή του γενώματος των Νοροϊών συμβαίνει σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες, η p48 πιθανόν αλληλεπιδρά με την VAP-A για την αγκυροβόληση στην μεμβράνη των συμπλόκων αντιγραφής ή ακόμα η ίδια πρωτεΐνη ίσως λειτουργεί σαν μια πρωτεΐνη κριώμα για την συναρμολόγηση του ιϊκού συμπλόκου αντιγραφής. Η έκφραση της p48 σε κύτταρα εμποδίζει την μεταφορά πρωτεϊνών του κυττάρου (Ettayebi and Hardy, 2003) και διαταράσσει την δομή της συσκευής Golgi (Fernandez-Vega et al. 2004).

Η πρωτεΐνη **p41** εμφανίζει κοινά μοτίβα αλληλουχιών με την 2C πρωτεΐνη των picorna ιών, καθώς και με την υπεροικογένεια 3 των ελικασών. Στους picorna ιούς, η 2C έχει δραστηριότητα ελικάσης (Strauss JH and Strauss EG, 1998) και εμπλέκεται στον διαχωρισμό των RNA αλυσίδων κατά την διάρκεια της αντιγραφής (Teterina et al. 1992). Η p41 εμφανίζει δραστηριότητες πρόσδεσης και υδρόλυσης τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (NTP) αλλά δεν

εμφανίζει δραστηριότητα ελικάσης (Pfister and Wimmer, 2001). Το μοτίβο πρόσδεσης νουκλεοτιδίων GxxGxGKT/S εντοπίζεται σε μια σχεδόν παρόμοια θέση στην πρωτεΐνη p41 όπως στην 2C πρωτεΐνη των picorna ιών (Jiang et al. 1993).

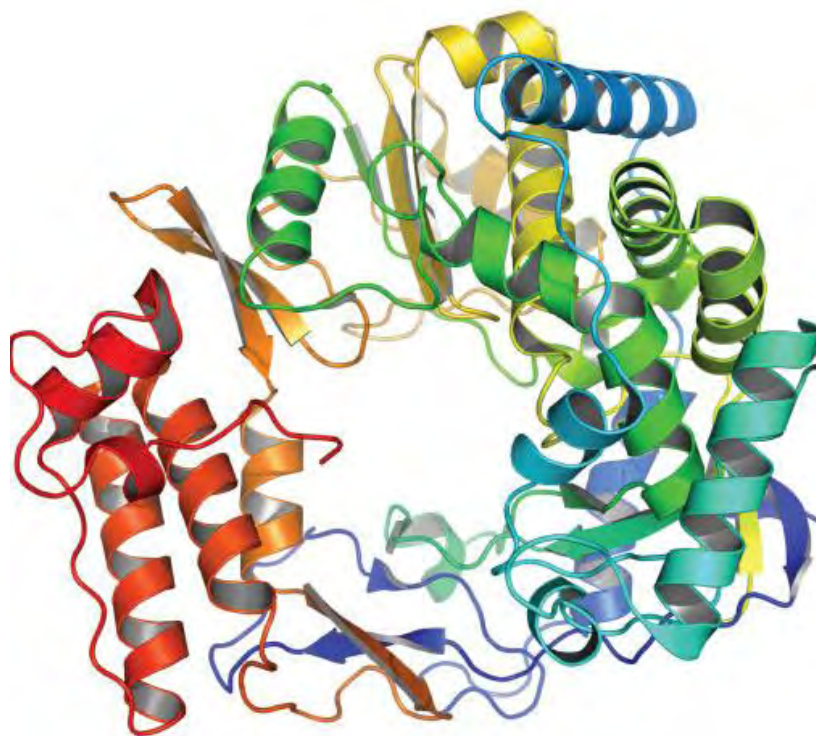
Η **p22** είναι μια μικρή πρωτεΐνη της οποίας η λειτουργία παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Εντοπίζεται σε μια θέση του γονιδιώματος των Νοροϊών ανάλογη με εκείνη της πρωτεΐνης 3A των picorna ιών. Στους picorna ιούς, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, η 3A εντοπίζεται με την πρόδρομη μορφή της (3AB) και συμβάλει στην αγκυροβόληση της VPg (3B) σε μεμβράνες όπου πραγματοποιείται η αντιγραφή του ιϊκού RNA (Giachetti and Semler, 1991). Μεταλλάξεις στην 3A πρωτεΐνη εμποδίζουν την ιϊκή αντιγραφή (Giachetti and Semler, 1991). Η p30, η αντίστοιχη της πρωτεΐνης p22 στον ιό FCV, εντοπίζεται με την πρόδρομη μορφή p30-VPg (όπως η 3AB) σε μολυσμένα κύτταρα (Sosnovtsev and Green, 2000). Επίσης, τόσο η p30-VPg όσο και η p30 εντοπίζονται σε σύμπλοκα αντιγραφής πάνω σε μεμβράνες που έχουν απομονωθεί από κύτταρα μολυσμένα με τον ιό FCV (Green et al. 2002).

Η **VPg** κατέχει στην πολυπρωτεΐνη των Νοροϊών ισοδύναμη θέση με αυτή της πρωτεΐνης 3B (VPg) των picorna ιών. Η VPg βρίσκεται ομοιοπολικώς συνδεμένη στο 5' άκρο των γενωμικών και των υπογενωμικών RNAs των Νοροϊών (Clarke and Lambden, 2000). Η VPg του ιού FCV εντοπίζεται σε σύμπλοκα αντιγραφής το οποίο δείχνει ότι παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιϊκού RNA (Green et al. 2002). Επιπλέον όπως προαναφέρθηκε η VPg είναι απαραίτητη για την μετάφραση του γενώματος των Νοροϊών (Herbert et al. 1997).

Η πρωτεάση των Νοροϊών ή **3C^{pro}**, εντοπίζεται στην πολυπρωτεΐνη σε μια θέση παρόμοια εκείνης της 3C πρωτεάσης των picorna ιών. Η 3C^{pro} μαζί με την πρόδρομη μορφή της, 3CD^{proprol}, όπως προαναφέρθηκε συμμετέχουν στην πρωτεόλυση της προδρόμου πολυπρωτεΐνης (Scheffler et al. 2007). Η 3C^{pro} των Νοροϊών μοιάζει με τις πρωτεάσες σερίνης (όπως η χυμοθρυψίνη) αλλά το κατάλοιπο σερίνης του κυτταρικού ενζύμου έχει αντικατασταθεί από μια κυστεΐνη στη θέση 1239. Μια επιπλέον ιδιότητα έχει αποδοθεί στην 3C^{pro} και περιλαμβάνει την ικανότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης να πρωτεολύει την PABP (polyA binding protein) *in vitro*, κατέχοντας πιθανόν έναν άμεσο

ρόλο στην αναστολή της σύνθεσης κυτταρικών πρωτεϊνών στα μολυσμένα κύτταρα (Kuyumcu-Martinez M. et al., 2004).

Η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (**RdRp**) των Νοροϊών εντοπίζεται στην πολυπρωτεΐνη σε μια θέση παρόμοια εκείνης της 3D^{pol} των ρικορνα ιών. Η κρυσταλλική δομή της RdRp των νοροϊών επέδειξε καταλυτικά και δομικά στοιχεία χαρακτηριστικά της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης άλλων θετικής πολικότητας RNA ιών, όπως και γενικότερα όλων των πολυμερασών και αυτά περιλαμβάνουν τις περιοχές των δακτύλων, της παλάμης και του αντίχειρα (Εικόνα 1.15). Ωστόσο μια σημαντική διαφορά της δομής της RdRp των Νοροϊών είναι ότι η καρβοξυτελική περιοχή της εντοπίζεται στην οπή του ενεργού κέντρου δημιουργώντας έτσι μια θηλιά για τη σταθεροποίηση των εκκινητών κατά την έναρξη της σύνθεσης του RNA (Ng et al., 2004). Επιπλέον είναι πιθανό ότι η ενεργός μορφή της RdRp των Νοροϊών κατά την ιϊκή μόλυνση είναι η πρόδρομη μορφή της, 3CD^{pro-pol}, καθώς η παρουσία της πρωτεάσης αυξάνει εντοπωσιακά την δραστικότητα της πολυμεράσης, όπως έχει διαπιστωθεί (Belliot et al., 2003).



Εικόνα 1.15. Δομή της 3D^{pol} των νοροϊών από το αμινοτελικό άκρο (μπλε χρώμα) μέχρι το καρβοξυτελικό άκρο (κόκκινο χρώμα). Οι τρεις κύριες περιοχές του αντίχειρα, των δακτύλων και της παλάμης είναι ορατές με την αμινοτελική προέκταση (μπλε χρώμα) να φτάνει από την κορυφή των δακτύλων στην περιοχή του αντίχειρα.

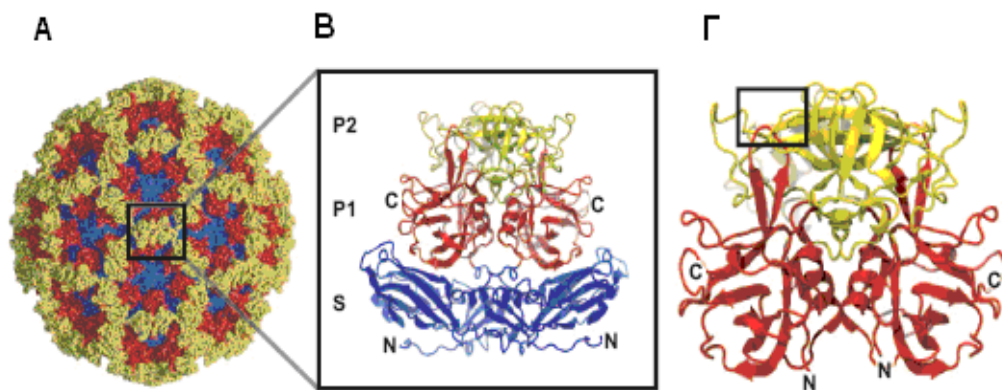
ORF2-ORF3 δομικές πρωτεΐνες

Τα δυο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια ORF2 και ORF3 κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες των Νοροϊών. Το ORF2 κωδικοποιεί την κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου (VP1) και το ORF3 κωδικοποιεί μια μικρότερη δομική πρωτεΐνη (VP2). Οι δομικές πρωτεΐνες παράγονται από την μετάφραση ενός υπογενωμικού RNA το οποίου το 3' άκρο είναι το ίδιο με αυτό του γενωμικού RNA (Jiang et al. 1993).

Η δομή του καψιδίου των Νοροϊών έχει προσδιοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ σε ανάλυση 3.4 angstrom (Prasad et al. 1999) (Εικόνα 1.16). Εξαιτίας της αδυναμίας αναπαραγωγής του ιού εργαστηριακά, μια αρκετά χρήσιμη μέθοδος για την ανάλυση της δομής του καψιδίου είναι η παραγωγή ανασυνδυασμένων σωματιδίων που ομοιάζουν προς τον ιό (recombinant virus-like particles - rVLPs) τα οποία εκφράζονται μέσω ενός συστήματος με baculovirus και μπορούν να υποκαταστήσουν τα «φυσικά» ιοσωμάτια (Jiang et al., 2000).

Το καψίδιο εμφανίζει T=3 εικοσαεδρική συμμετρία και αποτελείται από 90 διμερή ή 180 αντιγραφα της πρωτεΐνης VP1 (Prasad et al. 1999). Η πρωτεΐνη **VP1** αποτελείται από δυο δομικές περιοχές, S και P, οι οποίες συνδέονται μέσω μιας εύκαμπτης άρθρωσης (Εικόνα 1.16). Η S περιοχή αποτελείται από τα 225 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της VP1 και εμπλέκεται στο σχηματισμό του εικοσαεδρικού κελύφους. Η S περιοχή είναι σχετικά συντηρημένη μεταξύ των Νοροϊών όπως προκύπτει από συγκρίσεις αλληλουχιών και περιλαμβάνει δύο περιοχές. Οι περιοχές αυτές είναι ο αμινοτελικός βραχίονας που αποτελείται από τα αμινοξέα 10-49 και συνιστά το εσωτερικό μέρος του καψιδίου, καθώς επίσης η περιοχή που αποτελείται από τα αμινοξέα 50-225 και σχηματίζει μια κλασική δομή αντιπαράλληλης βήτα-επιφάνειας 8-κλώνων. Η P περιοχή αποτελείται από τα αμινοξέα 226-530 και σχηματίζει τις χαρακτηριστικές προεξοχές οι οποίες προεκβάλλουν από το κέλυφος (Prasad et al. 1999). Ολόκληρη η περιοχή P εμφανίζει μια σχετική μεταβλητότητα μεταξύ των Νοροϊών συγκριτικά με την S περιοχή. Η P περιοχή διαχωρίζεται σε δυο υποπεριοχές, τις P1 και P2 (Εικόνα 1.16). Η υποπεριοχή P1 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 225-278 και 406-519, ενώ η P2 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 279-405. Η υποπεριοχή P1 περιέχει β κλώνους και μια α έλικα και είναι υπεύθυνη για τις επαφές μεταξύ των διμερών και την διαφοροποίηση των ιικών στελεχών μαζί

με την υποπεριοχή P2 (Prasad et al. 1999). Η υποπεριοχή P2 εμφανίζει την υψηλότερη μεταβλητότητα αλληλουχίας ανάμεσα στα μέλη του γένους των Νοροϊών και εντοπίζεται στην επιφάνεια του καψιδίου. Η υποπεριοχή P2 σχηματίζει ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 6-κλώνων, μία διαμόρφωση παρόμοια με εκείνη της περιοχής πρόσδεσης στο RNA του παράγοντα EF-Tu (elongation factor-Tu) μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην μεταφορά των αμινοακυλο-tRNAs στο ριβόσωμα (Prasad et al. 1999). Μελέτες έχουν δείξει ότι η υποπεριοχή P2 είναι σημαντική για την εξειδίκευση στην πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα και στις αντιγονικές ιδιότητες των Νοροϊών (Nilsson et al., 2003).



Εικόνα 1.16. (A) Η T=3 δομή του καψιδίου των νοροϊών όπως προσδιορίστηκε σε ανάλυση 3.4 angstrom και η οποία αποτελείται από 90 διμερή της δομικής πρωτεΐνης VP1. Διακρίνονται η περιοχή S (αμινοξέα 1-225) και οι P1 (αμινοξέα 225-278 και 406-519) και P2 (αμινοξέα 279-405) υποπεριοχές της VP1 πρωτεΐνης με μπλε, κόκκινο και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα. (B) Παρουσιάζεται η τριτοταγής διαμόρφωση ενός διμερούς της VP1 πρωτεΐνης με τις περιοχές S, P1 και P2 να χρωματίζονται όπως στο σχήμα A. (Γ) Η περιοχή πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα επάνω στην μια υπομονάδα του διμερούς της VP1 πρωτεΐνης παρουσιάζεται (ορθογώνιο σχήμα). Οι P1 και P2 υποπεριοχές έχουν χρωματιστεί όπως και στο σχήμα B.

Η **VP2** είναι μια μικρή βασική πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 208 έως 268 αμινοξέα και εμφανίζει εκτεταμένη μεταβλητότητα αλληλουχίας μεταξύ των ιικών στελεχών (Glass et al., 2000). Η ακριβής λειτουργία της δεν είναι πλήρως γνωστή ωστόσο πειράματα έχουν δείξει ότι είναι απαραίτητη για την παραγωγή μολυσματικών ιών. Αν και η πρωτεΐνη VP1 είναι ικανή να

αυτοσυναρμολογείται στα rVLPs, η παρουσία της VP2 ενισχύει τη σταθερότητα των rVLPs που παράγονται σε ένα σύστημα έκφρασης με baculovirus. Έτσι έχει προταθεί ότι η VP2 αυξάνει τη σταθερότητα της VP1 και την προστατεύει από αποσυναρμολόγηση και πρωτεόλυση (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Επίσης, ύστερα από την συναρμολόγηση των rVLPs απουσία RNA, έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχουν οπές ικανού μεγέθους ώστε να εγκολπωθεί το γένωμα κατόπιν της συναρμολόγησης, συνεπώς το RNA γένωμα συσκευάζεται στο ισοβάτιο ταυτόχρονα με το σχηματισμό του καψιδίου. Κατά συνέπεια, ένας επιπλέον ρόλος της VP2 πρωτεΐνης είναι η συμμετοχή της στο πακετάρισμα του γενώματος, όπως υποδεικνύει και η χημική της φύση που επιτρέπει την σύνδεσή της με το αρνητικά φορτισμένο RNA.

1.8. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Η αντιγραφή του γονιδιώματος των πολιοϊών και γενικότερα των picorna ιών περιλαμβάνει διάφορες αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-πρωτεϊνών. Η αντιγραφή του RNA των πολιοϊών ακολουθεί το γενικό μονοπάτι αντιγραφής όλων των RNA θετικής πολικότητας ιών.

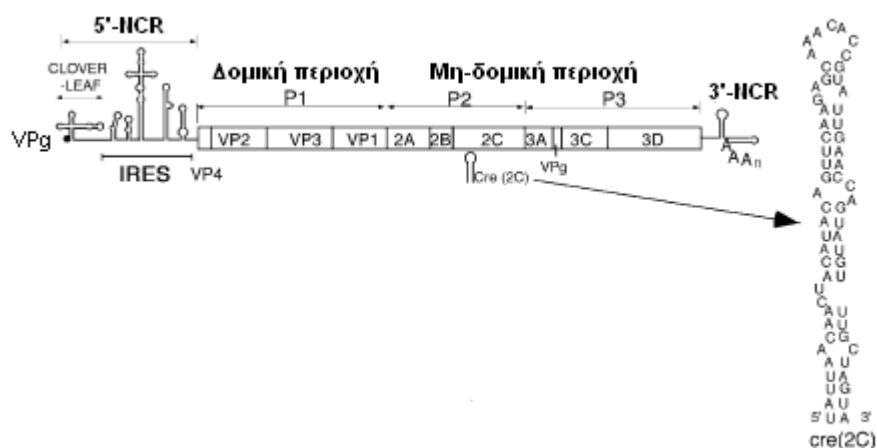
Το RNA θετικής πολικότητας χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση του συμπληρωματικού, αρνητικής πολικότητας κλώνου ο οποίος με τη σειρά του θα χρησιμοποιηθεί σαν καλούπι για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας. Η ιϊκή RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (3D^{pol}) καταλύει την σύνθεση των RNA (-) και RNA (+) αλλά επίσης δημιουργεί το εκκινητικό μόριο, VPgpUpU, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του ιϊκού RNA με μια διαδικασία γνωστή ως ουριδιλίωση της VPg (Paul et al. 1998).

1.8.1 Δευτεροταγείς δομές του ιϊκού RNA και πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αντιγραφή

Διάφορες RNA αλληλουχίες και δευτεροταγείς δομές της 5'-NCR των picorna ιών έχουν αναγνωρισθεί ως απαραίτητες για την ιϊκή αντιγραφή. Το απαραίτητο δομικό στοιχείο της 5'-NCR των εντεροϊών και κατά συνέπεια των πολιοϊών για αυτή τη διαδικασία είναι το 5' cloverleaf (stem-loop I), το οποίο

λειτουργεί ως θέση πρόσδεσης για την ιϊκή πρωτεΐνη, 3CD, και την πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή PCBP2. Συγκεκριμένα η 3CD προσδένεται στην θηλιά d ενώ η PCBP2 στη θηλιά b της δομής cloverleaf (Parsley et al. 1997; Gamarnik and Andino, 2000). Η δημιουργία του συμπλόκου των 3CD και PCBP2 με το ιϊκό RNA είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA (Walter et al. 2002). Η κυτταρική πρωτεΐνη PABP, προσδεμένη στην ιϊκή 3' πολύ(A) ουρά, αλληλεπιδρά με τις 3CD και PCBP2 πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται προσδεμένες στην δομή 5' cloverleaf. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αλληλεπίδραση των 5' και 3' άκρων του ιϊκού RNA διευκολύνοντας την έναρξη της αντιγραφής (Herold and Andino, 2001; Barton et al. 2001). Επίσης έχει βρεθεί ότι οι ιϊκές πρωτεΐνες 3AB και 3CD αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με την δομή 5' cloverleaf, μια αλληλεπίδραση που πιθανόν εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιϊκού RNA (Xiang et al. 1995a).

Μια αλληλουχία η οποία εντοπίζεται μέσα στην κωδική περιοχή του γενώματος των picorna ιών έχει αναγνωριστεί ως απαραίτητη για την ιϊκή αντιγραφή και την βιωσιμότητα του ιού. Πρόκειται για μια εσωτερική δομή φουρκέτας στο ιϊκό RNA γνωστή ως cre (cis-replicating element) (Εικόνα 1.17). Αρχικά ανακαλύφθηκε στην VP1 κωδική περιοχή του HRV14 (human rhinovirus 14) και αργότερα βρέθηκε ότι στους πολιοϊούς το cre περιέχεται στην 2C κωδική περιοχή (Goodfellow et al. 2000, Goodfellow et al. 2003). Μετά την ανακάλυψη του cre γενετικού στοιχείου, αποδείχτηκε ότι μία συντηρημένη αλληλουχία ${}^1\text{GXXXAAACXXXXXA}^{14}$ η οποία βρίσκεται στη θηλιά της φουρκέτας αντιπροσωπεύει το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg. Πιο συγκεκριμένα, η A-5 χρησιμοποιείται για την προσθήκη και των δύο νουκλεοτιδίων ουρακίλης στο -OH της τυροσίνης της VPg από την 3D^{pol} (Paul et al. 2003). Πρόσφατα έχει προταθεί ότι η cre εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg εμπλέκεται μόνο στην σύνθεση του RNA(+) και όχι του RNA(-) (Morasco et al. 2003, Murray et al. 2003). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η αντίδραση ουριδιλίωσης ενισχύεται σημαντικά σε ένα *in vitro* σύστημα από την 3CD (Murray et al. 2003). Πιστεύεται ότι η 3CD παρέχει την απαραίτητη εξειδίκευση σε αυτή την αντίδραση *in vivo*. Αλληλεπιδράσεις της 3CD με τα δομικά στοιχεία cre και cloverleaf πιθανόν προσδίδουν στο ιϊκό RNA την κατάλληλη διαμόρφωση για την αποτελεσματική αντιγραφή του.



Εικόνα 1.17. Δομή του cre γενετικού στοιχείου των πολιοϊών. Φαίνεται η συντηρημένη αλληλουχία ${}^1\text{GXXXAAACXXXXXA}^{14}$ στη κορυφαία θηλιά της δομής.

Η 3'-NCR και η πολύ(A) ουρά των picorna ιών είναι επίσης απαραίτητα για την αντιγραφή του ιϊκού RNA. Πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιϊκού RNA, σχηματίζοντας τη θέση για την σύνθεση του RNA(-). Ιικές πρωτεΐνες, όπως οι 3AB και 3CD, έχει βρεθεί ότι προσδένονται στην 3'-NCR των πολιοϊών (Harris et al. 1994; Xiang et al. 1995b). Η κυτταρική πρωτεΐνη nucleolin προσδένεται επίσης στην 3'-NCR των πολιοϊών αλλά με άγνωστη λειτουργία (Waggoner and Sarnow, 1998). Η πολύ(A) ουρά όπως προαναφέρθηκε βοηθά στην αποτελεσματική αντιγραφή του ιϊκού RNA μέσω σχηματισμού μιας αλληλεπίδρασης με το 5' άκρο του (Herold and Andino, 2001).

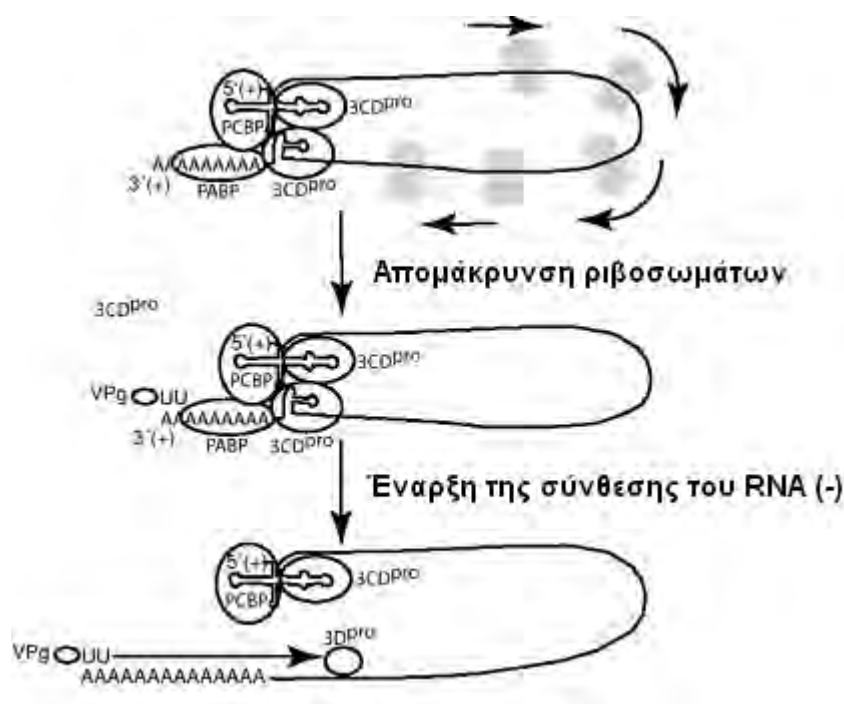
1.8.2 Μηχανισμός αντιγραφής

Η αντιγραφή του RNA συμβαίνει σε μεμβρανώδεις δομές (rosette-like) που επάγονται από την δράση των ιϊκών πρωτεϊνών 2C και 2BC και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου (Cho et al. 1994; Jurgens and Flanagan 2003; Fogg et al. 2003). Αυτές οι μεμβρανώδεις δομές προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου ξενιστή. Μία υδρόφοβη περιοχή στην ιϊκή πρωτεΐνη 3AB είναι πιθανόν να ευθύνεται για την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης σε αυτές τις μεμβρανώδεις

δομές και συνεπώς και του συμπλόκου αντιγραφής λόγω συγγένειας της 3AB προς τις 3D^{Pol} και 3CD (Lyle et al. 2002; Choe and Kirkegaard 2004).

Για την έναρξη της σύνθεσης του RNA(-) απαιτείται κυκλοποίηση του γενώματος, που επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των PCBP2 και 3CD που είναι προσδεμένες στο cloverleaf και των PABP, 3CD που είναι συνδεδεμένες στην poly(A) ουρά και 3'-NCR αντίστοιχα (Lyons et al., 2001) (Εικόνα 1.18). Στη συνέχεια, οι 3CD πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε κοντινή επαφή, αποκόπτουν την προσδεμένη σε μεμβράνες 3AB, σε 3A και VPg καθώς και την 3CD σε 3C και 3D (Murray and Barton, 2003). Στην επιφάνεια της 3D, η VPg, η poly(A) ουρά και UTP-Mg²⁺ προσδέονται σε κατάλληλη διαμόρφωση και οδηγούν στην ουριδιλίωση της VPg (Schein et al. 2006). Η VPgUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητήριο μόριο από την 3D για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Η σύνθεση του RNA(-) οδηγεί σε ένα δίκλωνο RNA ενδιάμεσο το οποίο ονομάζεται RF (replicative form). Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του RNA(-) λαμβάνει χώρα η ουριδιλίωση της VPg σε VPgUpU. Η συγκεκριμένη αντίδραση απαιτεί την πρόσδεση 2 μορίων 3CD στην περιοχή μίσχου του CRE δομικού στοιχείου καθώς και την πρόσδεση στο σύμπλοκο της VPg και της 3D. Όπως προαναφέρθηκε η 3D χρησιμοποιεί μια αλληλουχία στην περιοχή θηλιάς του CRE σαν καλούπι και ουριδιλιώνει την VPg σε VPgUpU. Το VPgUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητής για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας (Murray and Barton, 2003).

Η συναρμολόγηση του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου στο 5' cloverleaf και η επακόλουθη κυκλοποίηση του ιϊκού RNA είναι πιθανόν ότι εμποδίζουν την πρόσβαση των κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας έτσι την μετάβαση από την μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al. 1993) (Εικόνα 1.18).



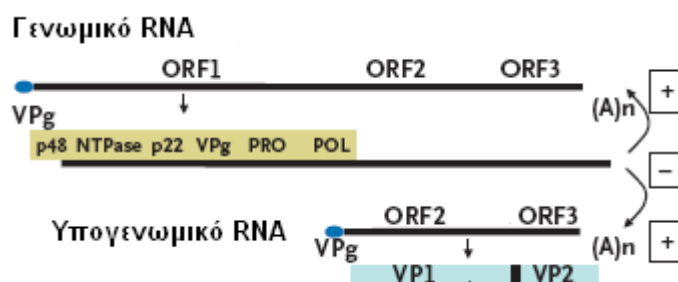
Εικόνα 1.18. Προτεινόμενο μοντέλο για την εναλλαγή μεταξύ της μετάφρασης και της σύνθεσης του RNA (-) των πολιοϊών. Οι ιϊκές πρωτεΐνες, 3CD^{pro} και VPg, και οι κυτταρικές πρωτεΐνες, PABP και PCBP2, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με τα άκρα του ιϊκού RNA ώστε να σχηματίσουν ένα κυκλικό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασης καθώς τα ριβοσώματα δεν μπορούν να προσδεθούν στο ιϊκό RNA. Μετά την απομάκρυνση των ριβοσωμάτων, η VPg-pUpU αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του ιϊκού RNA και σχηματίζει το προεναρκτητήριο σύμπλοκο της αντιγραφής. Έτσι, η σύνθεση του RNA (-) ξεκινά με την επιμήκυνση του VPg-pUpU από την 3D^{pol}.

1.9 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Ο ακριβής μηχανισμός αντιγραφής του γονιδιώματος των Νοροϊών δεν είναι ακόμα γνωστός λόγω της έλλειψης ενός συστήματος καλλιέργειας του ιού. Ωστόσο, η αντιγραφή του ιϊκού RNA ακολουθεί το γενικό μονοπάτι αντιγραφής όλων των RNA θετικής πολικότητας ιών με τη διαφορά ότι περιλαμβάνει την παραγωγή και υπογενωμικών RNAs. Συγκεκριμένα, το θετικής πολικότητας RNA γονιδίωμα χρησιμοποιείται ως καλούπι για την σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας το οποίο ακολούθως δρα σαν καλούπι για την σύνθεση των θετικής πολικότητας γενωμικών και υπογενωμικών RNAs (Clarke and Lambden, 1997) (Εικόνα 1.19). Πρόσφατες

μελέτες έδειξαν ότι η επώαση της ιϊκής πρωτεΐνης VPg με την 3D^{pol} οδηγεί στην δημιουργία VPg-poly(U) και ότι η ουριδιλιωμένη VPg πιθανόν χρησιμοποιείται ως εκκινητικό μόριο για την αντιγραφή του γενωμικού RNA(+). Αντίθετα η αντιγραφή του RNA(-) δεν απαιτεί κάποιο εκκινητικό μόριο (Rohayem et al. 2006). Μια δευτεροταγή δομή μίσχου-θηλιάς (stem-loop) η οποία αναγνωρίστηκε κοντά στο 5' άκρο της 3D^{pol} κωδικής περιοχής και η οποία εμφανίζει ένα μοτίβο αλληλουχίας (AAACG) στη θέση 3948-3952 παρόμοιο με το cre δομικό στοιχείο των picorna ιών, πιθανόν εμπλέκεται στην ουριδιλίωση της VPg (Victoria M. et al. 2009). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι πρωτεΐνες του κοττάρου ξενιστή όπως η PTB (poly-pyrimidine tract-binding protein), το αυτοαντιγόνο La και η PCBP2, αλληλεπιδρούν με τα 5' και 3' άκρα του γενώματος των Νοροϊών (Gutierrez-Escolano et al. 2000; Gutierrez-Escolano et al. 2003). Ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στην αντιγραφή ή την μετάφραση του γενώματος παραμένει άγνωστος. Ωστόσο έχει προταθεί ότι η PTB δρα ως chaperone προσδίδοντας στο RNA μια κατάλληλη διαμόρφωση η οποία επιτρέπει την αποτελεσματική αντιγραφή του (Karakasiliotis et al. 2006).

Ενώ οι Νοροϊοί που αποτελούν παθογόνα των ανθρώπων δεν καλλιεργούνται, οι Νοροϊοί των ποντικών μπορούν να αναπτυχθούν σε δενδριτικά κύτταρα *in vitro* και σε μακροφάγα *in vivo* και *in vitro* (Wobus et al. 2004). Το γεγονός αυτό μπορεί να βοηθήσει στην μελέτη του μηχανισμού αντιγραφής των Νοροϊών.



Εικόνα 1.19. Μηχανισμός αντιγραφής του γενώματος των νοροϊών σύμφωνα με τον οποίο το RNA (+) ιϊκό γένωμα αντιγράφεται σε ένα RNA (-) μόριο το οποίο με τη σειρά του χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την παραγωγή νέων γενωμικών RNA (+) καθώς και υπογενωμικών RNA (+). Το υπογενωμικό RNA (+) χρησιμοποιείται για την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών VP1 και VP2 κατά την μετάφραση.

1.10 ΚΑΨΙΔΙΩΣΗ ΙΪΚΟΥ RNA

Η καψιδίωση των RNA (+) των πολιοϊών, μια διαδικασία που αποτελεί το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής τους, φαίνεται πως είναι συζευγμένη με την αντιγραφή του RNA εφόσον και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου (Ansardi et al. 1996; Pfister et al. 1992). Η διαδικασία δημιουργίας του ιϊκού καψιδίου ξεκινάει με την διάσπαση του P1 πρόδρομου πολυπεπτιδίου από την 3CD^{pro} και την παραγωγή των πρωτεϊνών VP0, VP1 και VP3. Οι VP0, VP1 και VP3 αλληλεπιδρούν ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al. 1999). Τελικά η καψιδίωση του ιϊκού RNA (+) πραγματοποιείται είτε με την συσσωμάτωση των πενταμερών γύρω από το ιϊκό RNA (Pfister et al. 1995) είτε με είσοδο του ιϊκού RNA μέσα στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου (Jacobson and Baltimore, 1968). Η διάσπαση της VP0 στις πρωτεΐνες VP2 και VP4, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ολοκληρώνει την συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων σταθεροποιώντας το καψίδιο και μετατρέποντας το προκαψίδιο σε ένα ώριμο, μολυσματικό ισοσμάτιο (Hogle 2002).

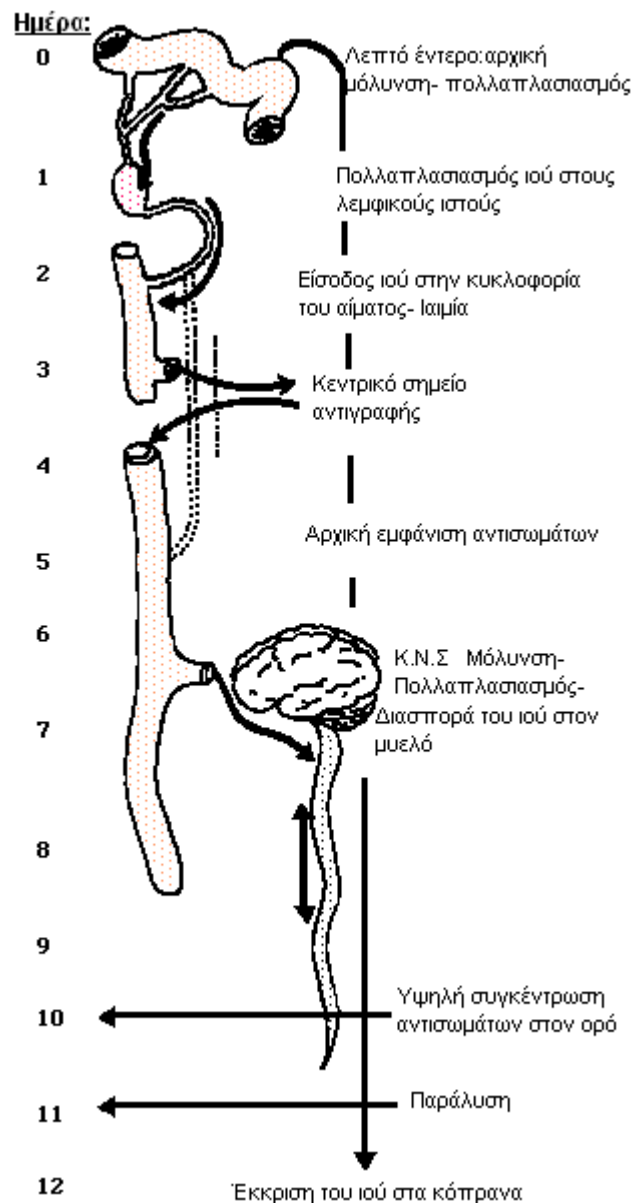
Το στάδιο της καψιδίωσης του RNA (+) των Νοροϊών δεν είναι ακόμα κατανοητό. Πειράματα έχουν δείξει ότι τα γενωμικά και υπογενωμικά RNAs των Νοροϊών δεν συσκευάζονται μαζί στο ίδιο ισοσμάτιο, αφού βρέθηκε να υπάρχει το κάθε είδος μορίου σε σωματίδια διαφορετικών πυκνοτήτων (Neill J.D., 2002). Παρόλο που η δομική πρωτεΐνη VP1 είναι ικανή να αυτοσυναρμολογείται σε rVLPs, η μικρότερη βασική δομική πρωτεΐνη VP2 είναι απαραίτητη για την παραγωγή μολυσματικών ισοσωματίων καθώς αυξάνει την σταθερότητα της VP1 και την προστατεύει από αποσυναρμολόγηση και πρωτεόλυση (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Πειράματα συναρμολόγησης rVLPs απουσία RNA έχουν δείξει ότι δεν υπάρχουν οπές ικανού μεγέθους ώστε να εγκολπωθεί το γένωμα μετά την συναρμολόγηση, συνεπώς το RNA γένωμα συσκευάζεται στο ισοσμάτιο ταυτόχρονα με το σχηματισμό του καψιδίου (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Κατά συνέπεια, ένας επιπλέον πιθανός ρόλος της VP2 πρωτεΐνης είναι η συμμετοχή της στο πακετάρισμα του γενώματος, όπως υποδεικνύει και η χημική της φύση που

επιτρέπει την σύνδεσή της με το αρνητικά φορτισμένο RNA. Επιπλέον, πειραματικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι το γενωμικό RNA πακετάρεται σε ιϊκά σωματίδια όταν συν-εκφράζεται με το υπογενωμικό RNA ενώ το υπογενωμικό RNA δεν πακετάρεται σε ιϊκά σωματίδια όταν εκφράζεται μόνο του (Asanaka et al. 2005). Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι το σήμα για την καψιδίωση του ιϊκού γενώματος πιθανόν εντοπίζεται στο ORF1 ή/και ότι οι μη-δομικές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την διαδικασία της καψιδίωσης.

1.11 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Ο τροπισμός των πολιοϊών περιορίζεται στους ανθρώπους και στα μη-ανθρώπινα πρωτεύοντα θηλαστικά. Οι πολιοϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού (Εικόνα 1.20). Μετά την είσοδο του ιού στον οργανισμό και τον αρχικό πολλαπλασιασμό του στα επιθήλια της στοματοφαρυγγικής και εντερικής κοιλότητας, η πλειοψηφία των μολυσμένων ατόμων εμφανίζει μια μικρή, παροδική ιαιμία. Καθώς η μόλυνση εξελίσσεται, ο ιός διασπείρεται και σε άλλες θέσεις του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Κατά συνέπεια, η πλειοψηφία των μολύνσεων, περίπου το 95% είναι ασυμπτωματικές. Στο 4-8% των μολυσμένων ατόμων την αρχική ελαφριά ιαιμία θα ακολουθήσει μια μεγαλύτερη ιαιμία η οποία είναι χαρακτηριστικό της ανεπιτυχούς πολιομυελίτιδας (abortive poliomyelitis). Αυτή η ασθένεια περιλαμβάνει συμπτώματα όπως πονόλαιμο, πυρετό, διάρροια, μυαλγία, πονοκέφαλο και γενικευμένη κούραση. Ένα πολύ μικρό ποσοστό των μολυσμένων ατόμων μετά την κύρια ιαιμία θα εμφανίσουν συμπτώματα που σχετίζονται με την είσοδο του ιού στο ΚΝΣ και χαρακτηρίζονται ως μη-παραλυτική ασηπτική μηνιγγίτιδα και παραλυτική πολιομυελίτιδα (Racaniello 2006). Η μη-παραλυτική ασηπτική μηνιγγίτιδα εμφανίζεται στο 1-2% των μολυσμένων ατόμων και χαρακτηρίζεται από ακαμψία του λαιμού, της πλάτης και των κάτω άκρων καθώς επίσης από αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων και μη φυσιολογικά επίπεδα πρωτεϊνών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CDC 2006). Η παραλυτική πολιομυελίτιδα εμφανίζεται στο 0.1-1% των μολυσμένων ατόμων και διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα: i) στη νωτιαία, η οποία χαρακτηρίζεται από καταστροφή των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού, ii) στη βολβοειδή, η οποία χαρακτηρίζεται

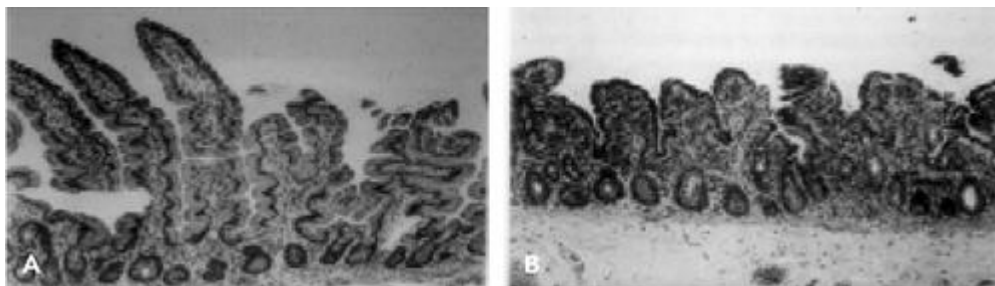
από παράλυση νευρώνων που ελέγχουν τους μύες των πνευμόνων και ii) στη νωτιαιοβολβοειδή, η οποία χαρακτηρίζεται από συνδυασμό συμπτωμάτων και των δύο ανωτέρω μορφών (CDC 2006).



Εικόνα 1.20. Παθογένεια πολιομυελίτιδας.

Οι Νοροϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού όπως και οι πολιοϊοί. Ωστόσο, η έλλειψη ενός ζωικού μοντέλου και η μη ικανότητα καλλιέργειας του ιού, έχουν περιορίσει τις μελέτες που αφορούν την παθογένεια και οι πληροφορίες που υπάρχουν προέρχονται από μελέτες που έγιναν σε εθελοντές. Η περίοδος επώασης του ιού μέχρι την εμφάνιση των

συμπτωμάτων, μπορεί να διαρκέσει από 10 έως 51 ώρες με μέσο όρο τις 24 ώρες, όπως καταγράφηκε σε μελέτες εθελοντών με τον Norwalk ιό (Blacklow et al., 1972). Όσον αφορά τη θέση της αρχικής αναπαραγωγής του ιού, πιστεύεται πως συμβαίνει στην άνω εντερική οδό. Μετά την αναπαραγωγή των ιικών σωματιδίων, οι ιοί απελευθερώνονται από το σώμα μέσα από την εντερική οδό στα κόπρανα. Βιοψίες νήστιδας από εθελοντές που παρουσίασαν γαστρεντερίτιδα μετά από στοματική χορήγηση των Norwalk και Hawaii ιών έδειξαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Παρατηρήθηκε άμβλυση και διεύρυνση των λαχνών στο εγγύς λεπτό έντερο αν και ο βλεννογόνος παρέμεινε ιστολογικά άθικτος (Agus et al., 1973) (Εικόνα 1.21). Τα κλινικά συμπτώματα που χαρακτηρίζουν την μόλυνση με Νοροϊούς περιλαμβάνουν κοιλιακό πόνο με ή χωρίς ναυτία, έμετο και διάρροια (Treanor and Dolin, 2000). Η υψηλή συχνότητα εκρηκτικού έμετου είναι ένα κλινικό χαρακτηριστικό της Νοροϊκής ασθένειας, το οποίο την διαχωρίζει από άλλες νόσους που προκαλούνται από εντερικούς ιούς ή βακτηριακά παθογόνα, όπως *Salmonella*, *Shigella* και *S.aureus*. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων μπορεί να είναι σταδιακή ή απότομη. Στους ενήλικες η ασθένεια χαρακτηρίζεται κυρίως από διάρροια ενώ στα παιδιά από ναυτία και έμετο. Άλλα συμπτώματα τα οποία συνήθως συνοδεύουν την μόλυνση στο 25-50% των ατόμων είναι πονοκέφαλος, πυρετός, ρίγος και μυαλγία (LeBaron et al. 1990). Παρόλο που τα συμπτώματα συνήθως εξαφανίζονται μέσα σε 12-72 ώρες, ο ιός αποβάλλεται στα κόπρανα μέχρι 22 μέρες (Rockx et al. 2002).



Εικόνα 1.21. (A) Φυσιολογική εμφάνιση ιστού νήστιδας από βιοψία ασθενούς πριν μολυνθεί με ιό Norwalk, (B) Αλλοίωση εντερικών λαχνών σε βιοψία ιστού νήστιδας από τον ίδιο εθελοντή.

1.12 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Οι πολιοϊοί και γενικότερα οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες με κακές συνθήκες υγιεινής, ενώ σε αναπτυγμένες χώρες μεταδίδονται μέσω αναπνευστικών εκκρίσεων. Σε περιοχές εύκρατων κλιμάτων οι μολύνσεις είναι εποχιακές και συμβαίνουν κυρίως το καλοκαίρι και το φθινόπωρο ενώ αντίθετα σε περιοχές τροπικού κλίματος μολύνσεις συμβαίνουν όλο το χρόνο (Sabin, 1985). Οι πολιοϊοί αντιγράφονται στην ανθρώπινη εντερική κοιλότητα και απεκκρίνονται στα κόπρανα για αρκετές εβδομάδες (συνήθως 2-4 εβδομάδες) ανάλογα με την κατάσταση ανοσίας του ατόμου (Zaoutis and Klein, 1998). Κατά συνέπεια οι πολιοϊοί και γενικά οι εντεροϊοί συχνά εντοπίζονται σε αστικά απόβλητα ή και σε επιφανειακά νερά (WHO, 1999; CDC, 2002). Η επιβίωση των Εντεροϊών στο περιβάλλον περιορίζεται σε λίγες εβδομάδες. Ωστόσο, οι εντεροϊοί στο περιβάλλον μπορούν να επιβιώσουν για μήνες κάτω από ευνοϊκές συνθήκες οι οποίες περιλαμβάνουν ουδέτερο pH, υγρασία, χαμηλές θερμοκρασίες και παρουσία οργανικού υλικού (Feachem et al. 1981).

Οι Νοροϊοί αποτελούν τον πιο κοινό αιτιολογικό παράγοντα επιδημιών ιϊκής γαστρεντερίτιδας. Σε μια ανάλυση, από τα 233 κρούσματα μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας που καταγράφηκαν από τον Ιούλιο του 1997 έως τον Ιούνιο του 2000, τα 217 (93%) σχετιζόνταν με Νοροϊό (Fankhauser et al., 2002). Οι μολύνσεις που σχετίζονται με Νοροϊούς είναι εποχιακές και έχουν παρατηρηθεί δύο διαφορετικά εποχιακά πρότυπα στο βόρειο και νότιο ημισφαίριο. Στο βόρειο ημισφαίριο οι μολύνσεις είναι πιο συχνές το χειμώνα και νωρίς την άνοιξη ενώ στο νότιο ημισφαίριο την άνοιξη και το καλοκαίρι (Marshall et al. 2003). Οι Νοροϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού ή μέσω του σχηματισμού αεροσταγονιδίων μετά από εκρηκτικό έμετο. Η πρωτογενής μόλυνση προέρχεται από την κατάποση επιμολυσμένου φαγητού ή νερού (Estes et al. 2000). Δευτερογενείς μολύνσεις μπορούν να προκύψουν μέσω επαφών ατόμου με άτομο, αερολυμάτων που ακολουθούν τον εκρηκτικό έμετο των ασθενών και μολυσμένων χειριστών φαγητού (Fankhauser et al. 2002). Η μετάδοση των Νοροϊών είναι πολύ αποτελεσματική καθώς κάποια χαρακτηριστικά τους αυξάνουν την ικανότητα τους να διασπείρονται κατά την διάρκεια των επιδημιών: i) Ο ιός είναι πολύ μολυσματικός και μόνο 10-100

ιοσωμάτια είναι επαρκή ώστε να προκαλέσουν την μόλυνση, ii) Τα μολυσμένα άτομα εξακολουθούν να μπορούν να μεταδώσουν την ασθένεια και μετά την εξαφάνιση των συμπτωμάτων καθώς ο ιός απεκκρίνεται στα κόπρανα για τουλάχιστον 3 εβδομάδες και iii) Ο ιός είναι σχετικά σταθερός στο περιβάλλον και μπορεί να επιβιώνει στην κατάψυξη, στην θέρμανση στους 60°C και στην έκθεση στην χλωρίνη (Schaub and Oshiro, 2000; Rockx et al. 2002). Συνεπεία των παραπάνω χαρακτηριστικών τους, οι Νοροϊοί έχουν ανιχνευθεί σε νερά ψυχαγωγικών πάρκων και σε βοθρολύματα, αλλά και στην επιφάνεια διαφόρων αντικειμένων (Schvoerer et al., 2000).

1.13 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.13.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Όπως όλοι οι RNA ιοί, οι πολιοϊοί και οι νοροϊοί χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος λόγω: i) της επιρρεπούς σε λάθη RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης η οποία υπολογίζεται ότι ενσωματώνει 10^{-4} έως 10^{-5} νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής και ii) της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή. Η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα όλοι οι RNA ιοί να αντιγράφονται κοντά στο όριο της καταστροφής λόγω μεταλλάξεων, να υπάρχουν ως πληθυσμοί πολλών διαφορετικών γενοτύπων (quasi-species) και να μπορούν να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον (Wimmer et al. 1993, Holland et al., 1992).

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

Δαρβίνου. Αντίθετα, μεταλλάξεις που παρέχουν ένα επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται μέσω της αρνητικής επιλογής (Domingo and Holland, 1997).

Ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης των πολιοϊών και των νοροϊών αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του ιικού RNA. Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών (π. χ στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων). Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της υψηλής αντιγονικής πίεσης που υφίστανται (Chakravarty et al. 2005; Yakovenko et al. 2006). Επίσης, δευτεροταγείς δομές του ιικού RNA που εμπλέκονται στην ιϊκή αντιγραφή (π.χ cloverleaf και CRE στους πολιοϊούς) ή στην ιϊκή μετάφραση (IRES στους πολιοϊούς) συσσωρεύουν ακόμα πιο λίγες μεταλλάξεις. Μάλιστα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής τους (Wimmer et al. 1993).

1.13.2 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

Ο γενετικός ανασυνδυασμός ο οποίος περιλαμβάνει την ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ δύο διαφορετικών RNA μορίων, αρχικά περιγράφηκε για τους πολιοϊούς (Hirst 1962) και αργότερα βρέθηκε ότι συμβαίνει και σε άλλους RNA ιούς περιλαμβανομένων των νοροϊών. Μελέτες έδειξαν ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων. Για παράδειγμα ο διατυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ πολιοϊών τύπου 1 και 2 συμβαίνει περίπου 100 φορές λιγότερα συχνά από ότι ο ομοτυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ πολιοϊών τύπου 1 (οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών διαφέρουν περίπου 15% στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία) (King 1988).

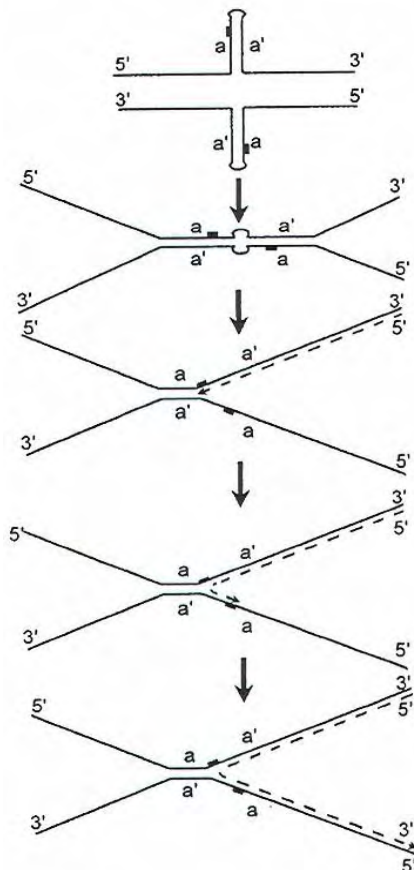
Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί μηχανισμοί ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard and Baltimore 1986) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl et al., 1999).

Μηχανισμός αλλαγής μήτρας: κατά την ιϊκή αντιγραφή, το ιϊκό RNA(+) γένωμα χρησιμοποιείται από την 3D^{pol} ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός RNA(-) κλώνου επάγοντας έτσι την δημιουργία ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστού ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του RNA(-) η 3D^{pol} δύναται να συναντήσει κάποιο «εμπόδιο», με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της ίδιας, καθώς και του νεοσυντιθέμενου RNA(-), από τον RNA(+) κλώνο που χρησιμοποιείται σαν καλούπι (Kirkegaard and Baltimore, 1986). Το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια δευτεροταγής RNA δομή (Romanova et al., 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου από την 3D^{pol} στον νεοσυντιθέμενο RNA(-) κλώνο (Piliipenko et al., 1995). Η αποδέσμευση της 3D^{pol} σε σύμπλοκο με τον νεοσυντιθέμενο RNA(-) κλώνο οδηγεί στην δέσμευση της 3D^{pol}, καθώς και του ημιτελούς RNA(-) κλώνου, σε περιοχή υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού RNA(+) κλώνου που θα λειτουργήσει τώρα σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του RNA(-) κλώνου.

Ένας παράγοντας που ενδεχομένως μπορεί να φέρει κοντά τις κατάλληλες περιοχές των δύο RNA(+) εκμαγείων είναι ο σχηματισμός ενός ετεροδιμερούς από ανεστραμμένες επαναλήψεις που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές φουρκετών (Εικόνα 1.22) (Agol 1997). Επιπλέον ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των RNA(-) κλώνων για δύο κυρίως λόγους : i) η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι RNA(+) κλώνοι σε σύγκριση με τους RNA(-) κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο μολυσμένο κύτταρο, ii) οι RNA(-) βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (αντιγραφικό ενδιάμεσο) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία (Agol 1997). Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς (Romanova et al., 1986, King et al., 1988).

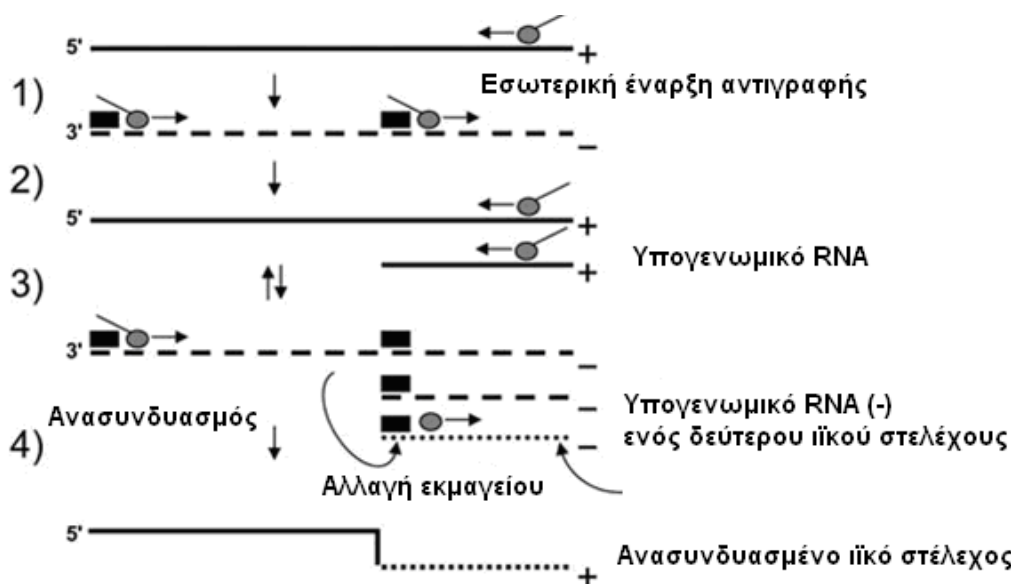
Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης: Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από την σύνδεση RNA τμημάτων προερχόμενων από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Έχουν προταθεί δύο χημικοί μηχανισμοί που επιτρέπουν την διάσπαση δύο RNA ανασυνδυαζόμενων μορίων και την επακόλουθη ένωση του 5' άκρου του ενός, με το 3' άκρο του άλλου μορίου. Σύμφωνα με τον πρώτο, οι

φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των δύο διαφορετικών μορίων δέχονται επίθεση από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο H_2O με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Στο δεύτερο χημικό μηχανισμό, ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός σε κάθε ανασυνδυαζόμενο μόριο δέχεται επίθεση από το παρακείμενο 2' OH, το οποίο παίζει το ρόλο του εσωτερικού νουκλεόφιλου. Το αποτέλεσμα σε κάθε μόριο είναι η παραγωγή ενός άκρου που περιέχει ένα κυκλικό 2', 3' φωσφορικό ενδιάμεσο και ενός 5' άκρου που φέρει OH. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω αντίδρασης τρανσεστεροποίησης (Gmyl et al., 1999).



Εικόνα 1.22. Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ δυο RNA γενωμάτων στους πολιοϊούς. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτοσυμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως *a* και *a'*. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντιθέμενο RNA μόριο.

Ένα ιϊκό στέλεχος νοροϊού μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανασυνδυασμένο όταν η φυλογενετική ανάλυση σε δυο διαφορετικές περιοχές (συνήθως η περιοχή του καψιδίου και της ιϊκής πολυμεράσης) ομαδοποιήσουν το στέλεχος σε δυο διαφορετικές γενετικές ομάδες (Bull et al., 2005). Ανασυνδυασμένα ιϊκά στελέχη έχουν εντοπιστεί σε τρεις από τους πέντε γενοτύπους των νοροϊών (GI, GII και GIII) (Han et al., 2004; Hardy et al., 1997; Katayama et al., 2002). Όλα τα ανασυνδυασμένα στελέχη νοροϊών, με εξαίρεση ένα μόνο της γενετικής ομάδας GII, είχαν τη θέση ανασυνδυασμού μέσα ή κοντά στο σημείο επικάλυψης των ORF1 και ORF2. Γενικά στους RNA ιούς, ο ανασυνδυασμός απαιτεί νουκλεοτιδική ομολογία, μια RdRp με περιορισμένη πιστότητα αντιγραφής ή περίπλοκες δευτεροταγείς δομές όπως οι δομές μίσχου-θηλιάς, που θα οδηγήσουν στην αλληλεπίδραση των δύο πατρικών RNA κλώνων (Kim and Kao, 2001). Η περιοχή επικάλυψης των ORF1 και ORF2 περιλαμβάνει μια δευτεροταγή δομή μίσχου-θηλιάς η οποία είναι 100% συντηρημένη σε κάθε γενετική ομάδα των νοροϊών (Bull et al. 2005). Έτσι έχει προταθεί ένα μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο ο ανασυνδυασμός συμβαίνει όταν η ιϊκή πολυμεράση κατά την διάρκεια της αντιγραφής του ιϊκού RNA συναντήσει την δευτεροταγή δομή μίσχου-θηλιάς στην αρχή του ORF2 με αποτέλεσμα να αλλάζει εκμαγείο (Εικόνα 1.23) (Bull et al. 2005). Η ικανότητα της πολυμεράσης των νοροϊών να αλλάζει εκμαγείο στην αρχή του ORF2 είναι επωφελής καθώς βοηθάει τον ιό να ξεφεύγει από εξελικτικούς στενωπούς (Coyne et al. 2006; Muller 1964). Αυτό συμβαίνει επειδή το ORF2 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καψιδίου, VP1, η οποία περιέχει τις αντιγονικές θέσεις. Κατά συνέπεια, οι ιοί είναι ικανοί να ανταλλάσσουν το καψιδιακό τους περίβλημα και έτσι να διαφεύγουν της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.



Εικόνα 1.23. Μηχανισμός ανασυνδυασμού μεταξύ δυο RNA γενωμάτων στους νοροϊούς. 1) Η αντιγραφή του γενωμικού RNA(+) από την ιϊκή πολυμεράση (γκρι κύκλος) οδηγεί στην δημιουργία ενός RNA(-) μορίου (διακεκομμένες γραμμές), 2) Η πρόσδεση της ιϊκής πολυμεράσης σε σχεδόν ταυτόσημες αλληλουχίες (μαύρα τετράγωνα) οδηγεί στην παραγωγή γενωμικών RNA(+) και υπογενωμικών RNA(+), 3) Αυτά τα εκμαγεία κατευθύνουν την σύνθεση RNA από το 3' άκρο τους οδηγώντας στην δημιουργία ενός γενωμικού RNA(-) και ενός υπογενωμικού RNA(-), 4) Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει όταν η πολυμεράση ξεκινάει την σύνθεση του RNA(+) στο 3' άκρο ενός γενωμικού RNA(-), σταματά στην περιοχή του υπογενωμικού προαγωγέα και αλλάζει εκμαγείο σε ένα διαθέσιμο υπογενωμικό RNA(-) προερχόμενο από άλλο ιϊκό στέλεχος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένας ανασυνδυασμένος ιός που έχει αποκτήσει νέες αλληλουχίες για τα ORF2 και ORF3.

1.14 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Το πρώτο εμβόλιο που αναπτύχθηκε για την αντιμετώπιση των πολιοϊών, το 1955 από τον Jonas Salk, ήταν το **IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine)**, το οποίο περιείχε αδρανοποιημένα άγριου τύπου ιϊκά σωματίδια και των τριών οροτύπων των πολιοϊών. Για την παραγωγή του IPV, τα άγριου τύπου στελέχη Mahoney (πολιοϊός τύπου 1), MEF-1 (πολιοϊός τύπου 2) και Saukett (πολιοϊός τύπου 3) αναπτύσσονται σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από νεφρά πράσινου πιθήκου (T- Vero cells) και απενεργοποιούνται με φορμαλδεΰδη. Το IPV είναι ασφαλές καθώς περιέχει αδρανοποιημένα ιϊκά στελέχη και αποδείχθηκε ότι επάγει προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα έναντι της πολιομυελίτιδας. Ωστόσο, μειονεκτήματα του IPV αποτελούν η ακριβή τιμή του και το σημαντικότερο, η μη πρόκληση

ανοσίας στην περιοχή του εντέρου η οποία αποτελεί και το κύριο σημείο πολλαπλασιασμού των πολιοϊών (Ferguson et al., 1993).

Το δεύτερο εμβόλιο που αναπτύχθηκε για την αντιμετώπιση των πολιοϊών, το 1963 από τον Albert Sabin, ήταν το **OPV (Oral Poliovirus Vaccine)**, το οποίο περιείχε ζωντανά εξασθενημένα ιϊκά σωματίδια και των τριών οροτύπων των πολιοϊών (Sabin et al., 1960). Τα εξασθενημένα ιϊκά στελέχη που περιλαμβάνονται στο OPV ονομάζονται Sabin 1 (πολιοϊός τύπου 1), Sabin 2 (πολιοϊός τύπου 2), Sabin 3 (πολιοϊός τύπου 3) και στο εμβόλιο βρίσκονται σε αναλογία 10:1:3 αντίστοιχα. Τα στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 προέρχονται από τα νευρομολυσματικά αγρίου τύπου στελέχη LS-c, P712 και Leon 12 αντίστοιχα, τα οποία ύστερα από αρκετά περάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες και μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, απώλεσαν τον νευρομολυσματικό τους φαινότυπο (Kew et al., 2005). Το OPV εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με το IPV. Το OPV είναι ένα φθηνό εμβόλιο και χορηγείται από το στόμα και όχι σε ενέσιμη μορφή όπως γίνεται στην περίπτωση του IPV. Επιπλέον το OPV επάγει μία ισχυρή και μεγάλης διάρκειας ανοσολογική απόκριση περιλαμβανομένης τοπικής ανοσίας στο έντερο. Συγκεκριμένα το OPV πυροδοτεί δύο διαφορετικές άνοσες αποκρίσεις: την χυμική άνοση απόκριση, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον και των τριών οροτύπων του ιού και την επιθηλιακή άνοση απόκριση, που περιλαμβάνει παραγωγή ιντερφερόνης και αντισωμάτων IgA, ειδικών για τον ιό, κατά μήκος του επιθηλίου του φάρυγγα και του γαστρεντερικού σωλήνα. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του OPV μπορεί να θεωρηθεί η διασπορά των ζωντανών στελεχών του εμβολίου από τα εμβολιασμένα άτομα σε άλλα άτομα του στενού περιβάλλοντός τους με αποτέλεσμα την επίτευξη ευρύτερης ανοσοποίησης (Dowdle et al. 2003).

Η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των Sabin στελεχών και των αντίστοιχων νευρομολυσματικών πατρικών στελεχών αποκάλυψε μια σειρά μεταλλάξεων, κάποιες από τις οποίες είναι υπεύθυνες για τους εξασθενημένους φαινοτύπους των Sabin στελεχών. Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους Sabin1 διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P1/Mahoney/41) σε 54 βάσεις. Οι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου του Sabin 1 βρέθηκαν ότι κατανέμονται σε όλο το γένωμα καθιστώντας την ανάλυσή τους πιο περίπλοκη

από αυτή των άλλων δύο οροτύπων. Μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 480 της 5'-NCR περιοχής και πιθανόν μία δεύτερη στη θέση 189 της ίδιας περιοχής έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Τέσσερις επιπλέον αμινοξικές υποκαταστάσεις στην περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Οι δύο από αυτές (τα αμινοξέα 65 της VP4 και 134 VP1) βρίσκονται στο εσωτερικό του ιϊκού καψιδίου ενώ οι άλλες δύο (τα αμινοξέα 106 της VP1 και 225 της VP3) βρίσκονται στο εξωτερικό του. Επιπλέον μια αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 73 της 3D^{pol} καθώς και μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 7441 της 3'-NCR αποτελούν καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου του Sabin1 (Bouchard et al. 1995; Georgescu et al. 1995; Tardy-Panit et al. 1993; McGoldrick et al. 1995). Στην περίπτωση του εμβολιακού στελέχους Sabin2, μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 481 της 5'-NCR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 143 της VP1 περιοχής είναι οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου (Macadam et al. 1991). Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους Sabin3 διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P3/Leon/37) σε 11 βάσεις από τις οποίες όμως μόνο οι δύο είναι ισχυροί καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου: μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 472 της 5'-NCR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 91 της VP3 περιοχής (Westrop et al. 1989; Minor et al. 1989; Guest et al. 2004). Επίσης, η αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 6 της VP1 πιθανόν παίζει κάποιο ρόλο στον εξασθενημένο φαινότυπο (Georgescu et al. 1997; Martin and Minor, 2002).

Τα Sabin εμβολιακά στελέχη εμφανίζουν επίσης θερμοευαίσθητους φαινότυπους δηλαδή αναπτύσσονται στους 37°C αλλά όχι στους 40°C σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου στελέχη τα οποία αναπτύσσονται εξίσου αποτελεσματικά τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C. Οι καθοριστές του θερμοευαίσθητου φαινότυπου εντοπίζονται στην 5'-NCR περιοχή (και για τους τρεις τύπους Sabin), στην P1 περιοχή του καψιδίου (και για τους τρεις τύπους Sabin) καθώς και στην κωδική περιοχή της 3D^{pol} (για τον τύπο Sabin1) και συμπίπτουν με τους αντίστοιχους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου (Bouchard et al. 1995; Georgescu et al. 1995; Tardy-Panit et al. 1993; McGoldrick et al. 1995; Macadam et al. 1991; Westrop et al. 1989; Minor et al. 1989; Guest et al. 2004). Ο θερμοευαίσθητος φαινότυπος θεωρείται το πιο σημαντικό

χαρακτηριστικό των εμβολίων και συμβάλει στην εμφάνιση του εξασθενημένου φαινότυπου.

1.14.1 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗ ΠΑΡΑΛΥΤΙΚΗ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ (VAPP) ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (VDPV)

Το 1988 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ) ξεκίνησε το πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, το οποίο αποσκοπούσε στην εξάλειψη των άγριων στελεχών πολιοϊών παγκοσμίως μέχρι το έτος 2000. Το εμβόλιο που επιλέχθηκε ήταν το OPV λόγω της ισχυρής άνοσης απόκρισης που προκαλεί και λόγω του χαμηλού του κόστους. Η χρήση του OPV σε μαζικούς εμβολιασμούς οδήγησε σε σημαντική μείωση των περιστατικών πολιομυελίτιδας οφειλόμενες σε αγρίου τύπου πολιοϊούς από 350.000 περιστατικά σε 125 ενδημικές χώρες το 1988 σε 1.310 περιστατικά σε 4 χώρες το 2007 (CDC 2008). Ωστόσο ένα σημαντικό μειονέκτημα του OPV είναι η γενετική αστάθεια του, ένα χαρακτηριστικό που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περιπτώσεων εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: vaccine-associated paralytic poliomyelitis). Η εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα συμβαίνει σπάνια (1 περιστατικό ανά 750.000 εμβολιασμένα άτομα) είτε σε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε σε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα.

Η εμφάνιση περιπτώσεων VAPP σχετίζεται με την συσσώρευση μεταλλάξεων σε θέσεις καθοριστές του εξασθενημένου και θερμοευαίσθητου φαινότυπου των Sabin στελεχών και την παραγωγή εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών (VDPVs: vaccine-derived polioviruses) με αυξημένη νευρομολυσματικότητα (Furione et al. 1993; Georgescu et al. 1997; Cherkasova et al. 2005). Εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών τύπων 2 και 3 έχουν απομονωθεί πιο συχνά από περιπτώσεις VAPP από ότι εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη τύπου 1 γεγονός το οποίο πιθανόν σχετίζεται με τον μεγαλύτερο αριθμό καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου στο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 (Guillot et al. 2000; Wood and Thorley, 2003; Martin and Minor, 2002). Επιπλέον εμβολιοσυνδεόμενα ιικά στελέχη τα οποία φέρουν γενετικό ανασυνδυασμό έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις VAPP χωρίς ωστόσο να είναι ακόμα

γνωστή η άμεση συνεισφορά του ανασυνδυασμού στην αύξηση της νευρομολυσματικότητας (Lipskaya et al. 1991; Macadam et al. 1993; Furione et al. 1993; Georgescu et al. 1994; Georgescu et al. 1997; Li et al. 1996; Friedrich 2000).

Η τρισθενής φύση του OPV παρέχει ιδανικές συνθήκες για διατυπικό ανασυνδυασμό μεταξύ των τριών εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών πολιοϊών (Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3), ωστόσο ανασυνδυασμός έχει παρατηρηθεί μεταξύ Sabin και αγρίου-τύπου πολιοϊών (Georgescu et al. 1995; Dahourou et al. 2002) καθώς και μεταξύ πολιοϊών και άλλων εντεροϊών (Kew et al. 2002; Brown et al. 2003). Η ταυτόχρονη μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου ενός εμβολιασμένου ατόμου με τα τρία στελέχη Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3 και τα μικτά σύμπλοκα αντιγραφής που εντοπίζονται σε λίγες θέσεις γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου προάγουν τον διατυπικό ανασυνδυασμό (Egger and Bienz, 2002). Περίπου το 79% των πολιοϊών που απομονώνονται από τα κόπρανα ατόμων μετά από εμβολιασμό είναι ανασυνδυασμένα (Cuervo et al. 2001). Ένα μεγάλο ποσοστό εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών τύπου 2 (50% των περιπτώσεων) και τύπου 3 (67% των περιπτώσεων) που απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα και περιπτώσεις VAPP βρέθηκαν ανασυνδυασμένα (Furione et al. 1993). Η παρουσία του Sabin 1 στελέχους σε ανασυνδυασμούς τύπου S1/Sx (X: Sabin 2 ή Sabin 3) είναι πολύ σπάνια. Ωστόσο τμήματα του Sabin 1 εμφανίζονται πολύ συχνά σε άλλους οροτύπους κυρίως Sabin 2. Αυτό σημαίνει 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. Επιπλέον η χρονική σειρά με την οποία εκκρίνονται στα κόπρανα οι τρεις ορότυποι (πρώτα ο ορότυπος 1, μετά ο ορότυπος 2 και τελικά ο ορότυπος 3) αποτελεί μια ερμηνεία για την συχνότητα συμμετοχής των Sabin στελεχών στους ανασυνδυασμούς (Cuervo et al. 2001).

Ο διατυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ των Sabin στελεχών συμβαίνει συνήθως στην μη-δομική περιοχή του γενώματος (P2 και P3). Έχει παρατηρηθεί ότι στη 2C γενωμική περιοχή συναντώνται, σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα, ανασυνδυασμοί τύπου Sabin 3/Sabin X (X: Sabin 1 ή Sabin 2), ενώ στην 3D συναντώνται με πολύ μεγάλη συχνότητα ανασυνδυασμοί τύπου Sabin 2/Sabin

X (X: Sabin 1 ή Sabin 3) (Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006; Paximadi et al., 2007). Επιπλέον, οι διατοπικοί ανασυνδυασμοί στην περιοχή του καψιδίου (P1) είναι ένα πολύ σπάνιο γεγονός και έχουν αναφερθεί ελάχιστες περιπτώσεις (Martin et al., 2002; Blomqvist et al., 2003; Dedepsidis et al., 2008). Ωστόσο το γεγονός της εντόπισης συγκεκριμένων τύπων ανασυνδυασμών σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος παραμένει ανεξήγητο. Έχει προταθεί ότι δευτεροταγείς RNA δομές στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές είναι υπεύθυνες για την προαγωγή του συγκεκριμένου φαινομένου (Georgoroulou et al. 2000; Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006).

Εκτός από τους απλούς ανασυνδυασμούς έχουν παρατηρηθεί και πολλαπλοί ανασυνδυασμοί κυρίως με τη συμμετοχή του ορότυπου 3. Και σε αυτούς εκδηλώνεται μια προτίμηση στην σειρά με την οποία ανασυνδυάζονται. Πιο συχνοί είναι οι τριπλοί ανασυνδυασμοί S3/S2/S3 (Cuervo et al. 2001; Blomqvist et al. 2003) και S3/S2/S1 (Martin et al. 2002; Cuervo et al. 2001).

Το % ποσοστό απόκλισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 γενωμικής περιοχής ενός εμβολιοσυνδεόμενου πολιοϊού από την νουκλεοτιδική αλληλουχία του αντίστοιχου πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin χρησιμοποιείται ως δείκτης για την διάκριση των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών σε δυο κύριες κατηγορίες: i) στα OPV-like ιικά στελέχη όταν το ποσοστό απόκλισης είναι <1% και ii) στα VDPV ιικά στελέχη όταν το ποσοστό απόκλισης είναι ≥ 1%. Ποσοστό απόκλισης 1% σημαίνει ότι ο ιός κυκλοφορεί στον πληθυσμό για τουλάχιστον 1 χρόνο (Dowdle et al. 2003).

Τα VDPV ιικά στελέχη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα VDPV στελέχη που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPV), τα κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (cVDPV) και τα αμφιλεγόμενα VDPV (aVDPV). Τα iVDPV προέρχονται από ασθενείς με ανοσοανεπάρκειες Β-κυττάρων και μπορούν να προκαλέσουν παραλυτική νόσο στον ασθενή (Centers for Disease Control and prevention, 2006). Η αυξημένη ικανότητα μετάδοσης και η αυξημένη ικανότητά τους να προκαλούν πολιομυελίτιδα είναι οι σημαντικότερες ιδιότητες των cVDPV. Η πλειοψηφία των cVDPV που έχουν απομονωθεί από ασθενείς, έχουν βρεθεί ανασυνδυασμένα με εντεροϊούς της ομάδας C στη μη δομική περιοχή του γενώματός τους. Τα cVDPV στελέχη είναι υπεύθυνα για πολλές επιδημίες

πολιομυελίτιδας τα τελευταία χρόνια. Τέτοιες επιδημίες σημειώθηκαν στις Φιλιππίνες το 2000-2001, στην Αϊτή το 2001, στη Μαγαδασκάρη το 2002 και στην Κίνα το 2004 (Kew et al., 2002; Rousset et al., 2003; Shimizu et al., 2004; Liang et al., 2006). Τα aVDPV στελέχη απομονώνονται είτε από ασθενείς χωρίς ανοσοανεπάρκειες είτε από το περιβάλλον, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η προέλευσή τους (Centers for Disease Control and prevention, 2006).

1.15 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Η υψηλή συχνότητα μολύνσεων με νοροϊούς κυρίως σε παιδιά και ηλικιωμένους δείχνουν την αναγκαιότητα ανάπτυξης εμβολίου κατά των νοροϊών. Οι πληθυσμιακές ομάδες που έχουν μεγαλύτερη ανάγκη ενός τέτοιου εμβολίου περιλαμβάνουν τα νήπια, τους ηλικιωμένους, τους χειριστές τροφίμων, τον στρατό, τους ταξιδιώτες, και άτομα που εργάζονται σε υπηρεσίες υγείας. Η ανάπτυξη ενός εμβολίου κατά των νοροϊών θα μείωνε σημαντικά την θνησιμότητα παιδιών κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες.

rVLPs (recombinant virus-like particles) τα οποία χορηγήθηκαν σε ποντίκια από το στόμα ή ενδορηνικά ως εμβόλια, αποδείχθηκαν αποτελεσματικά ανοσογόνα (Periwal et al. 2003; Guerrero et al. 2001). Σε εθελοντές, rVLPs τα οποία εκφράστηκαν σε διαγονιδιακά φυτά ή σε σύστημα baculovirus και χορηγήθηκαν από το στόμα αποδείχθηκαν ασφαλή και ανοσογόνα (Ball et al. 1999; Tacket et al. 2003). Ωστόσο πολλές δυσκολίες περιορίζουν την ανάπτυξη εμβολίου κατά των νοροϊών όπως η ανεπαρκής γνώση των μηχανισμών ανοσίας έναντι του ιού, η έλλειψη καλής μακροπρόθεσμης ανοσίας και ετεροτυπικής προστασίας έναντι διαφορετικών ιικών στελεχών και η ύπαρξη πολλαπλών γενετικών και αντιγονικών τύπων του ιού. Επιπλέον, η συνεχιζόμενη και η γρήγορη εξέλιξη του ιού που οδηγεί στην εμφάνιση νέων ιικών στελεχών, όπως συμβαίνει με τον ιό της γρίπης, απαιτεί ενδεχομένως την ανάπτυξη εμβολίου ειδικά έναντι των κυκλοφορούντων για κάθε φορά ιικών στελεχών.

1.16 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανίχνευση νοροϊών και πολιοϊών σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα με μοριακές τεχνικές και η γενωμική ανάλυση των ανωτέρω ομάδων ιών.

Αρχικά στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων και γενετικών ανασυνδυασμών με την θερμοευαισθησία και την κινητική ανάπτυξης εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εντοπισμός των μεταλλάξεων στις 5'-NCR, VP1 και 2C-3'-NCR γενωμικές περιοχές στις οποίες εδράζονται οι κύριοι καθοριστές του θερμοευαίσθητου και εξασθενημένου φαινοτύπου των Sabin εμβολιακών στελεχών καθώς και εντοπισμός των γενετικών ανασυνδυασμών στην 2A-3'-NCR γενωμική περιοχή. Εν συνεχεία προσδιορίστηκε η ανάπτυξη των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών στους 37°C και 40°C, ιδανική και μη-ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης αντίστοιχα, κατά την διάρκεια των πρώτων 12 ωρών (ανά 2 ώρες) του ιϊκού μολυσματικού κύκλου.

Ένα επόμενο στάδιο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη μιας multiplex RT-PCR μεθόδου για τον εντοπισμό των συνηθών τύπων ανασυνδυασμού S3/SX (SX: S1 ή S2) και S2/SX (SX: S1 ή S3) στις 2C και 3D, αντίστοιχα, γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών.

Ακολούθως προσδιορίστηκε το επίπεδο ανοσίας του ανθρώπινου πληθυσμού έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών πολιοϊών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) καθώς και έναντι των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με την τεχνική της οροεξουδετέρωσης.

Τελευταίο στάδιο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ενίσχυση και η αλληλούχιση όσο το δυνατόν περισσότερων γενωμικών περιοχών νοροϊκών στελεχών με εκκινητικά μόρια ήδη γνωστά από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και μέσω νέων πιο ειδικών εκκινητικών μορίων τα οποία και σχεδιάσαμε. Πραγματοποιήθηκε επίσης φυλογενετική ανάλυση των νοροϊκών στελεχών και εντοπισμός των πιθανών θέσεων γενετικών ανασυνδυασμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 ελήφθησαν από το NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom). Τα πρότυπα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες και οι αλληλουχίες τους έχουν κωδικούς καταχώρησης στην παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών (GenBank) AY184219, AY184220 και AY184221 αντίστοιχα.

2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Τα ιικά στελέχη πολιοϊών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διατριβή απομονώθηκαν στο Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur και περιλαμβάνουν: i) κλινικά στελέχη που προέρχονται από κόπρανα υγιών εμβολιασμένων ατόμων ή ατόμων με VAPP και ii) ιικά στελέχη που προέρχονται από περιβαλλοντικά δείγματα από την Ελλάδα (Μεταμόρφωση Αττικής, Απρίλιος-Οκτώβριος 1997) και από την Κύπρο (Απρίλιος-Δεκέμβριος 2003, Εργαστήριο Μικροβιολογίας Υδάτων και Περιβαλλοντικής Ιολογίας, Γενικό Κρατικό Εργαστήριο Κύπρου).

Τα ιικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν διακρίνονται σε πειραματικές κατηγορίες: i) στα στελέχη που μελετήθηκαν για μεταλλάξεις στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές, ii) στα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για συσχέτιση των μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών τους με φαινοτυπικές ιδιότητες όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξης, iii) στα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του επιπέδου ανοσίας πληθυσμού της νότιας Ελλάδας κατά την χρονική περίοδο 2008-2009 και iv) στα στελέχη των οποίων οι αλληλουχίες και τα σημεία ανασυνδυασμού χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μιας νέας multiplex RT-PCR μεθόδου που επιτρέπει την ανίχνευση

των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών.

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

Πίνακας 2.1. Δείγματα που μελετήθηκαν για μεταλλάξεις στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές. Ο πρώτος κωδικός καταχώρησης GenBank αναφέρεται στην 5'-NCR περιοχή και ο δεύτερος στην VP1 περιοχή του εκάστοτε δείγματος.

Στέλεχος	Ορότυπος	Κλινικές εκδηλώσεις	Πηγή προέλευσης	Έτος απομόνωσης	Κωδικός καταχώρησης GenBank
I1	Polio 1	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1978	DQ792910, DQ787783
I2	Polio 1	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1979	DQ792911, DQ787784
I3	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1980	DQ792912, DQ787785
I4	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1980	DQ792913, DQ787786
I5	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1981	DQ792914, DQ787787
I6	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1982	DQ792915, DQ787788
I7	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1983	DQ792916, DQ787789
I8	Polio 2	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1984	DQ792917, DQ787790
I9	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1985	DQ792918, DQ787791
I10	Polio 2	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1985	DQ792919, DQ787792
I11	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1985	DQ792920, DQ787793
I12	Polio 2	V.A.P.P	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	1999	DQ792921, DQ787794
I13	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur	2001	DQ792922, DQ787795

Πίνακας 2.2. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για συσχέτιση των μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών (ένα σημείο ανασυνδυασμού) με φαινοτυπικές ιδιότητες όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξης. Η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 περιοχών όλων των ιικών στελεχών πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Τα ιικά στελέχη II και 729 δεν αλληλουχήθηκαν στην 2C-3'NCR περιοχή καθώς δεν εμφάνισαν "ύποπτους" ανασυνδυασμούς στην συγκεκριμένη περιοχή.

Στέλεχος	Ορό- τυπος	Κλινικές Εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδυασμού/ Σημείο ανασυνδυασμού	Δημοσίευση	Κωδικός πρόσβασης GenBank 5'NCR/VP1/2C-3'NCR
II	Polio 1	Λευχαιμία	-	Karakasiliotis et al. 2004	EU598476/FJ609769/-
EP9	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3A S2/S1 5314-5318	Paximadi et al. 2006	EU598464/EU598478 /AY736178
IF	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6247-6281	Karakasiliotis et al. 2004	FJ609757/FJ609772 /AY297764 (2C), AY297760 (3D)
ID	Polio 2	V.A.P.P	3C S2/S1 5521-5526	Karakasiliotis et al. 2004	FJ609758/FJ609773 /EU715814
EP12	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6337-6362	Paximadi et al. 2006	EU598465/EU598479 /AY736179
EP16	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4892-4914	Paximadi et al. 2006	EU598466/FJ609775 /AY736180
EP23	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S1 4880-4887	Paximadi et al. 2006	EU598468/EU598480 /AY736181
729	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	-	Παρούσα μελέτη	EU598477/FJ609778/-

Πίνακας 2.3. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για συσχέτιση των μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών (δύο σημεία ανασυνδυασμού) με φαινοτυπικές ιδιότητες όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξης. Η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 περιοχών όλων των ιικών στελεχών καθώς και της 2A-3'NCR περιοχής του ιικού στελέχους 742 πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Τα ιικά στελέχη II και 729 δεν αλληλουχήθηκαν στην 2C-3'NCR περιοχή καθώς δεν εμφάνισαν "ύποπτους" ανασυνδυασμούς στην συγκεκριμένη περιοχή.

Στέλεχος	Ορό- τυπος	Κλινικές Εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδυασμού/ Σημείο ανασυνδυασμού	Δημοσίευση	Κωδικός πρόσβασης GenBank 5'NCR/VP1/2C-3'NCR
742	Polio 1	-(Λόματα-Αιτική)	2A S1/S3 3461-3465 2C S3/S2 4511-4527	Παρούσα μελέτη	EU598472/ FJ609767 /EU598488
II	Polio 1	Λευχαιμία	-	Karakasiliotis et al. 2004	EU598476/FJ609769/-
EPA	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605	Paximadi et al. 2007	EU598469/EU598481 /AY738635
EPB	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605	Paximadi et al. 2007	EU598470/EU598482 /AY738636
LK3	Polio 3	- / (Λόματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4766-4791 2C S2/S1 4942-4958	Paximadi et al. 2008	FJ609747/FJ609761 /DQ150697
LK6	Polio 3	- / (Λόματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4942-4958	Paximadi et al. 2008	FJ609748/ FJ609762 /DQ150698
LK10	Polio 3	- / (Λόματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4942-4958	Paximadi et al. 2008	FJ609749/FJ609763 /DQ150699
729	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	-	Παρούσα μελέτη	EU598477/FJ609778/-

Πίνακας 2.4. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του επιπέδου ανοσίας πληθυσμού της νότιας Ελλάδας έναντι των πολιϊών κατά την χρονική περίοδο 2008-2009. Οι κωδικοί πρόσβασης των ιικών στελεχών 7/b/97 και K/2002 αναφέρονται σε όλο το γένωμα και η αλληλούχισή τους πραγματοποιήθηκε σε άλλη εργασία. Η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 περιοχών όλων των ιικών στελεχών καθώς και της 2A-3'-NCR περιοχής των ιικών στελεχών 742, 584 και 738 πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Τα ιικά στελέχη 522, II, 152 και 8001 δεν αλληλουχίστηκαν στην 2C-3'-NCR περιοχή καθώς δεν εμφάνισαν "όποιτους" ανασυνδυασμούς στην συγκεκριμένη περιοχή.

Στέλεχος	Ορότυπος	Κλινικές Εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδυασμού/ Σημείο ανασυνδυασμού	Δημοσίευση	Κωδικός πρόσβασης GenBank 5'-NCR/VP1/2C-3'-NCR
742	Polio 1	-(Λόματα-Αττική)	2A S1/S3 3461-3465 2C S3/S2 4511-4527	Παρούσα μελέτη	EU598472/ FJ609767 /EU598488
7/b/97	Polio 1	-(Λόματα-Αττική)	2A S1/EVC	Dedepsidis et al. 2007	EF456706
522	Polio 1	Υγιής εμβολιασμένος	-	Παρούσα μελέτη	FJ609754/FJ609768/-
II	Polio 1	Λευχαιμία	-	Karakasiliotis et al. 2004	EU598476/FJ609769/-
152	Polio 1	Υγιής εμβολιασμένος	-	Παρούσα μελέτη	FJ609755/FJ609770/-
I34	Polio 2	V.A.P.P	2C S2/S1 4985-5000, 3D S1/S2 5995-6004 3D S2/S1 6388-6389	Karakasiliotis et al. 2005	FJ60975/FJ609771 /AY830710
EP9	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3A S2/S1 5314-5318	Paximadi et al. 2006	EU598464/EU598478 /AY736178
EP12	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6337-6362	Paximadi et al. 2006	EU598465/EU598479 /AY736179
ID	Polio 2	V.A.P.P	3C S2/S1 5521-5526	Karakasiliotis et al. 2004	FJ609758/FJ609773 /EU715814
IF	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	3D S2/S1 6247-6281	Karakasiliotis et al. 2004	FJ609757/FJ609772 /AY297764 (2C), AY297760 (3D)
8001	Polio 2	Υγιής εμβολιασμένος	-	Παρούσα μελέτη	FJ609759/FJ609774/-
EPC	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6526-6550	Paximadi et al. 2007	EU598471/EU598483 /AY738637
EPB	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605	Paximadi et al. 2007	EU598470/EU598482 /AY738636
738	Polio 3	-(Λόματα-Αττική)	3C S3/S2 5804-5814 3D S2/S1 6901-6909	Παρούσα μελέτη	EU598474/EU598485 /EU598487
584	Polio 3	-(Λόματα-Αττική)	2C S3/S2 4449-4464 3D S2/S1 7150-7172	Παρούσα μελέτη	EU598473/EU59484 /EU598486
EPA	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605	Paximadi et al. 2007	EU598469/EU598481 /AY738635
K/2002	Polio 3	V.A.P.P	VP1 S3/S2 3275-3285	Dedepsidis et al. 2008	EF456707
EP16	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4892-4914	Paximadi et al. 2006	EU598466/FJ609775 /AY736180
EP23	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S1 4880-4887	Paximadi et al. 2006	EU598468/EU598480 /AY736181

Πίνακας 2.5. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την ανάπτυξη μιας νέας multiplex RT-PCR μεθόδου που επιτρέπει την ανίχνευση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 περιοχών όλων των ιικών στελεχών πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Στέλεχος	Ορό- τυπος	Κλινικές Εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδυασμού/ Σημείο ανασυνδυασμού	Δημοσίευση	Κωδικός πρόσβασης GenBank 5'NCR/VP1/2C-3'NCR
EPA	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605	Paximadi et al. 2007	EU598469/EU598481 /AY738635
EPB	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4643-4656, 3D S2/S3 6598-6605	Paximadi et al. 2007	EU598470/EU598482 /AY738636
EPC	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6526-6550	Paximadi et al. 2007	EU598471/EU598483 /AY738637
EP16	Polio 3	Υγής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4892-4914	Paximadi et al. 2006	EU598466/FJ609775 /AY736180
EP23	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S1 4880-4887	Paximadi et al. 2006	EU598468/EU598480 /AY736181
ENP5	Polio 2	- / (Λόματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6679-6692	Paximadi et al. 2008	FJ60975/FJ609764 /AY820970
ENP7	Polio 2	- / (Λόματα- Κύπρος)	3D S2/S3 6549-6553	Paximadi et al. 2008	GU256636/GU256637 /AY820972
ENP8	Polio 2	- / (Λόματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6790-6794	Paximadi et al. 2008	FJ609752/FJ609766 /AY820973
LK3	Polio 3	- / (Λόματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4766-4791 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2008	FJ609747/FJ609761 /DQ150697
LK6	Polio 3	- / (Λόματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2008	FJ609748/FJ609762 /DQ150698
LK10	Polio 3	- / (Λόματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2008	FJ609749/FJ609763 /DQ150699

2.1.3 ΘΕΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΝΟΡΟΪΩΝ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας απομόνωσης νοροϊών, στάλθηκαν από την Αγγλία με πηγή λήψης στρατιώτες στο Αφγανιστάν οι οποίοι είχαν μολυνθεί από νοροϊό. Η κωδικοποίησή τους παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.6. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες κατά την απομόνωση νοροϊών.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ I (GI)	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ II (GII)
GI 1	GII 1
GI 2	GII 2
GI 3	GII 3

2.1.4 ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΝΟΡΟΪΩΝ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για την απομόνωση νοροϊών περιλαμβάνουν: i) κλινικά δείγματα κοπράνων τα οποία προέρχονται από άτομα με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας και ii) περιβαλλοντικά δείγματα τα οποία προέρχονται από λύματα από τις περιοχές Λάρισας, Τρικάλων και Ιωαννίνων. Στους πίνακες 2.7 και 2.8 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση καθώς και η προέλευση των δειγμάτων.

Πίνακας 2.7. Κωδικοποίηση και προέλευση των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση νοροϊών.

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση δείγματος
A6	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A7	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A10	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A12	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A15	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
Δ1	Νοσοκομείο Λάρισας
Δ2	Νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 2.8. Κωδικοποίηση και προέλευση των περιβαλλοντικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση νοροϊών.

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση δείγματος
LR6	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
LRB2	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
GNI	Βιολογικός καθαρισμός Ιωαννίνων
LR2	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
TRI	Βιολογικός καθαρισμός Τρικάλων
LR7	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
TR3	Βιολογικός καθαρισμός Τρικάλων
LR13	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

2.2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η πλειοψηφία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πολιοϊών (πίνακες 2.1-2.5) προέρχεται από κόπρανα υγιών εμβολιασμένων ατόμων ή ατόμων με VAPP. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επεξεργασία των κοπράνων ήταν η προτεινόμενη από την Π.Ο.Υ. (Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας).

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

Η επεξεργασία των κοπράνων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση νοροϊών πραγματοποιήθηκε επίσης σε θάλαμο βιολογικής προστασίας επιπέδου 2. Συγκεκριμένα, σε πλαστικούς σωλήνες των 15 ml (τύπου falcon) προστέθηκαν 10 ml ατελούς PBS και περίπου 2 gr κόπρανα (σε κάθε σωλήνα εισάγεται διαφορετικό δείγμα κοπράνων). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) για περίπου 20 min, μέχρι να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο του σωλήνα. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση των σωληνίων για 20 min, στις 1500 g, στους 20°C. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -20°C και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο στάδιο απομόνωσης του ιϊκού RNA.

Διαλύματα :

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

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

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

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

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

2.2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Για την επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι: i) η μέθοδος διαχωρισμού δυο φάσεων και ii) η μέθοδος των φίλτρων. Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση νοροϊών, πραγματοποιήθηκε και με τις δύο μεθόδους. Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν τα ιικά στελέχη πολιοϊών 584, 738 και 742 στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων.

Μέθοδος διαχωρισμού 2 φάσεων: 1000 ml δειγματος φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 g για 10 min. Το ίζημα κρατήθηκε στους 4°C και το pH του υπερκείμενου προσαρμόστηκε στο 7,2. Σε 500 ml υπερκείμενου προστέθηκαν 39,5 ml 22% (w/v) dextran, 287 ml 29% (w/v) PEG6000 και 35 ml NaCl 5N (Sigma, USA). Το μείγμα αναδεύτηκε για 1 h στους 4°C και στη συνέχεια εισήχθη σε φιάλη διαχωρισμού, όπου και επώαστηκε στους 4°C για 18 h. Η κάτω φάση συλλέχθηκε σε πλαστικό σωλήνα των 50 ml στον οποίο ήδη βρισκόταν το ίζημα από το αρχικό στάδιο. Ακολούθησε προσθήκη χλωροφορμίου 20% v/v, ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 1500 g για 20 min. Η πάνω φάση συλλέχθηκε

και τοποθετήθηκε σε άλλο πλαστικό σωλήνα, στον οποίο προστέθηκαν πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/ml και 100µg/ml (WHO environmental guidelines for polio surveillance, 2003).

Μέθοδος φίλτρων: Δείγμα όγκου 500 ml φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ρυθμίζεται το pH στο 3,8 με την προσθήκη 3 N HCl. Στην συνέχεια, τα υκά σωματίδια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με την προσθήκη $MgCl_2^{2+}$ (Merck Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05 M. Ακολουθεί αργή ανάδευση και φιλτράρισμα σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF - Millipore), διαμέτρου 47mm και μέγεθος πόρου 3µm, στην επιφάνεια του οποίου προσροφούνται τα υκά σωματίδια. Το φίλτρο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως 250 ml, όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος 0,05 M Tris με pH=9, εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα, η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβάνεται. Το φίλτρο φυλάσσεται στους 4°C, ενώ ρυθμίζεται το pH του συγκεντρωμένου δείγματος στο 7 με τη χρήση διαλύματος 3 N HCl. Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG. Συγκεκριμένα, σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μείγμα αναδεύεται για 18h στους 4°C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειών (MM).

2.2.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την απομόνωση των ιικών στελεχών πολιϊών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Hep-2 (Human epidermoid carcinoma) η οποία είναι μια από τις προτεινόμενες από την Π.Ο.Υ. κυτταρικές σειρές. Όλες οι διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο βιολογικής προστασίας επιπέδου 2. Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το μέσο καλλιέργειας για ανάπτυξη (Growth Medium, GM), ενώ για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το μέσο καλλιέργειας για διατήρηση (Maintenance medium, MM). Το πρώτο διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε ορό (συνήθως 10%) και επάγει την γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ το δεύτερο έχει περιεκτικότητα σε ορό περίπου 2% και

χρησιμοποιείται για την διατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών σε στάσιμη κατάσταση αργής κυτταρικής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ιών.

Η ανάπτυξη των Hep-2 κυττάρων επιτυγχάνεται στους 37°C σε ειδικό κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών. Τα Hep-2 κύτταρα αναπτύσσονται προσκολλόμενα στην εσωτερική επιφάνεια ειδικών πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιιεργειας (flasks 25 cm²), επιφανείας 25 cm².

Για τον αναδιπλασιασμό των κυττάρων πραγματοποιούνται 2 διαδοχικές επώασεις διάρκειας 30 sec με διάλυμα τρυψίνης-EDTA και επώαση 2 min στους 37°C. Αφού διαπιστωθεί, μέσω του ανάστροφου μικροσκοπίου, η αποκόλληση των κυττάρων προστίθενται στην πλαστική φιάλη 21 ml μέσου καλλιιεργειας GM και ακολουθεί το μοίρασμα των κυττάρων σε 3 πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειας, οι οποίες τοποθετούνται για ανάπτυξη στους 37°C. Πρέπει να σημειωθεί ότι η θρυψίνη 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).

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα από δύο πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειας αποκολλώνται με τη διαδικασία της τρυψινοποίησης που προαναφέρθηκε και αιωρούνται σε 1 ml μέσου καλλιιεργειας (μέσο καλλιιεργειας για διατήρηση χωρίς ορό) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% DMSO και 20% ορό (Fetal Calf Serum, Sigma, USA). Το αιώρημα κυττάρων μεταφέρεται σε ειδική αμπούλα η οποία τοποθετείται μέσα σε συσκευή ισοπροπανόλης στους -80°C γεγονός που επιτρέπει την σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας. Μετά από 4 ώρες η αμπούλα απομακρύνεται από την συσκευή ισοπροπανόλης και φυλάσσεται στους -80°C.

Για την απόψυξη των κυττάρων, μια αμπούλα κυττάρων μεταφέρεται από τους -80°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 καλλιιεργειας) μεταφέρεται σε πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιιεργειας. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα GM (10 ml) για την παραγωγή κυτταρικής μονοστιβάδας (αν η αμπούλα περιέχει 4 x 10⁶ κύτταρα/ml, τότε 1 ml αραιωμένων κυττάρων επαρκεί για την παραγωγή 1-2 πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιιεργειας). Στη συνέχεια, οι πλαστικές

φιάλες επωάζονται για 2h περίπου σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C. Στην συνέχεια γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού της φιάλης των κυττάρων με 10 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού GM και η φιάλη επανατοποθετείται στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

Διαλύματα :

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

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

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

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

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

Τρυψίνη-EDTA : διάλυμα τρυψίνης-EDTA (10X, Biosera) αραιώνεται 1/10 με διάλυμα Hank's Balanced Salts (Na Bicarbonate) (Biosera).

2.2.4 ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Περίπου 200 μl είτε από το υπερκείμενο που προέκυψε κατά την επεξεργασία των κοπράνων, είτε από την πάνω φάση, η οποία συλλέχθηκε κατά την επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων, ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες Her-2 κυττάρων (25 cm²) οι οποίες περιείχαν 5 ml MM

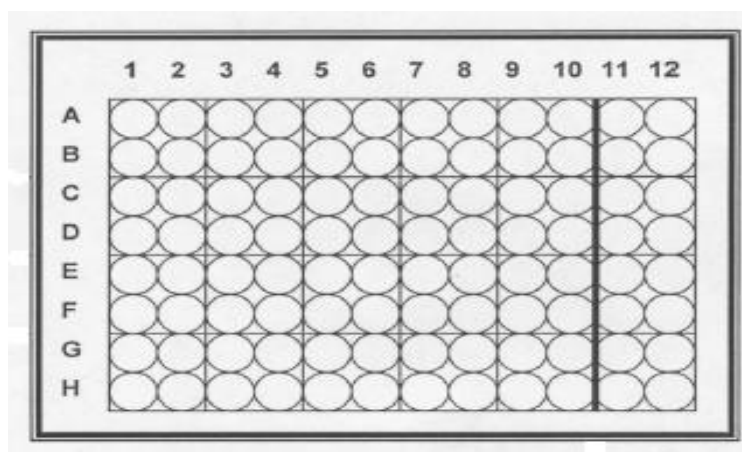
(maintenance medium). Οι πλαστικές φιάλες μεταφέρθηκαν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C όπου παρέμειναν για 2-3 μέρες. Οι πλαστικές φιάλες εξετάζονταν καθημερινά, μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου, για την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Όταν παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση οι πλαστικές φιάλες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

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

2.2.5 ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΙΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες ενδεχομένως να υπάρχουν μίγματα διαφορετικών ιϊκών γονότυπων. Προκείμενου να διαχωριστούν τα εν λόγω μίγματα και να απομονωθεί το στέλεχος εκείνο που βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση μέσα στα μίγματα, ακολουθήθηκε η διαδικασία των σειριακών αραιώσεων.

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (Εικόνα 2.1) προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) σε κάθε θέση. Για κάθε δείγμα, σε 9 πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (ependorf) τοποθετήθηκαν 900μl MM. Στη συνέχεια, 100 μl από κάθε ιϊκό δείγμα ενοφθαλμίστηκαν στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10^{-1} αραιώση του ιϊκού δείγματος. 100 μl από την 10^{-1} αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10^{-2} αραιώση του ιϊκού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι να δημιουργηθεί η 10^{-10} αραιώση του ιϊκού δείγματος. Στη συνέχεια, 100 μl από τους πλαστικούς σωλήνες που αντιπροσωπεύουν τις αραιώσεις από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις A1 με A10 αντίστοιχα. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις 8 ιϊκών δειγμάτων. Οι στήλες 11 και 12 αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 37°C για επώαση. Η μεγαλύτερη αραιώση κάθε δείγματος στην οποία παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση ενοφθαλμίστηκε σε πλαστική φιάλη κυττάρων Hep-2. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε το απόθεμα (stock) των ιϊκών στελεχών.



Εικόνα 2.1. Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων.

2.2.6 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

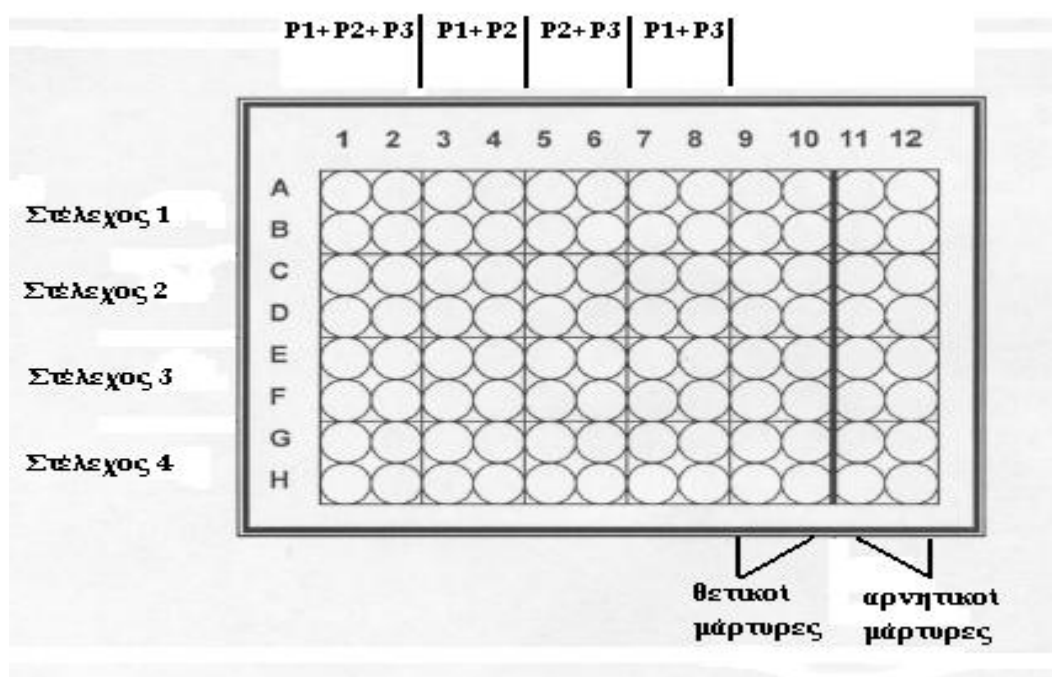
Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100 μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιικός τίτλος υπολογίστηκε για όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και για τα πρότυπα Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3.

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στις πλάκες, για κάθε ιικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10⁻⁶. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπολογίστηκε ο τίτλος 2 διαφορετικών ιικών στελεχών. Συγκεκριμένα, για κάθε ιικό στέλεχος, σε 6 πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (τύπου erpendorf) τοποθετήθηκαν 900 μl MM. Στη συνέχεια, 100 μl από το απόθεμα κάθε ιικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10⁻¹ αραιώση του ιικού δείγματος· 100 μl από την 10⁻¹ αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10⁻² αραιώση του ιικού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι τη δημιουργία της 10⁻⁶ αραιώσης. Στη συνέχεια, 400 μl της 10⁻¹ αραιώσης του πρώτου ιικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις B2-B5 (100 μl/θέση), ενώ 400 μl της 10⁻¹ αραιώσης του δεύτερου ιικού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις B6-B9 (100 μl/θέση). Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι και τον ενοφθαλμισμό της 10⁻⁶ αραιώσης στην πλάκα. Στις στήλες 10 και 11 δεν

προστέθηκε ιικό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Η πλάκα τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C και η παρακολούθησή της για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκησε 5 μέρες. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι: $\log_{10}TCID_{50} = L - d(S - 0,5)$. L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση, d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων και S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

2.2.7 ΟΡΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Η οροταυτοποίηση των ιικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων P1, P2 και P3, ειδικών έναντι των πολιοϊών τύπου 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Τα αντισώματα προέρχονται από το National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands. Κατά την οροταυτοποίηση τα αντισώματα δεσμεύονται πάνω στο ιικό καψίδιο εμποδίζοντας το να προσεγγίσει τον υποδοχέα και συνεπώς εμποδίζοντας τον ιό να προσβάλλει το κύτταρο. Η διαδικασία της οροταυτοποίησης έλαβε χώρα σε πλάκα μικροτιλοποίησης και σε κάθε πλάκα ταυτοποιήθηκαν 4 στελέχη. Αρχικά, κάθε αμπούλα αντισωμάτων αραιώθηκε 1:128 φορές μέσω προσθήκης MM και δημιουργήθηκαν τα μείγματα αντισωμάτων 1: P1+P2+P3, 2: P1+P2, 3: P2+P3 και 4: P1+P3, από τα οποία 50 μl τοποθετήθηκαν στις θέσεις που φαίνονται στην εικόνα 2.2. Στις θέσεις που εδράζονται οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες προστέθηκαν 50 μl MM. Στις θέσεις A1-A10 και B1-B10 προστέθηκαν 50 μl, που περιέχουν 100 TCID₅₀ του πρώτου ιικού στελέχους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα στελέχη. Η πλάκα επώαστηκε για περίπου 2 h στους 37°C υπό ανάδευση για την πρόσδεση ιού-αντισώματος. Στη συνέχεια σε όλες τις θέσεις προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (10.000 κύτταρα/θέση) και η πλάκα επώαστηκε στους 37°C μέχρι και 24 ώρες μετά την εμφάνιση πλήρους CPE στον θετικό μάρτυρα (δηλαδή στη θέση που περιέχει μόνο ιό αλλά όχι αντιορό). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τον πίνακα 2.9.



Εικόνα 2.2. Πλάκα οροταυτοποίησης.

Πίνακας 2.9. Ερμηνεία αποτελεσμάτων οροταυτοποίησης

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

2.2.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΓΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο διαχωρισμός των αγρίου-τύπου (wild-type) και εμβολιακής προέλευσης (Sabin) πολιοϊών έγινε βάση της δημοσίευσης των Georgorouli & Markoulatos, 2000, η οποία περιλαμβάνει την πραγματοποίηση RFLP ανάλυσης στην υψηλά συντηρημένη 5'-NCR γενωμική περιοχή. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει επιπλέον την ταυτοποίηση του γενοτύπου των εμβολιακής προέλευσης πολιοϊών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3).

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΪΚΟΥ RNA

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

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml εισήχθησαν 200 µl από το απόθεμα κάθε ιικού στελέχους, 600 µl GuSCN και 10 µl γλυκογόνο (100 mg/ml). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των πρωτεϊνικών καψιδίων, ώστε να απελευθερωθεί το ιικό RNA. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 800 µl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και ύστερα από ισχυρή ανάδευση, οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για 30 min στους -20°C. Οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 g για 10 min. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml παγωμένης (-20°C) αιθανόλης 70%, ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 14.000 g για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 µl διπλά αποιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα RNA των ιικών στελεχών αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η εκχύλιση του RNA των νοροϊών τόσο από το υπερκείμενο των κοπράνων όσο και από τα περιβαλλοντικά δείγματα (κατόπιν επεξεργασίας τους με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν) έγινε με το QIAamp® Viral RNA Mini Kit της εταιρείας Qiagen (Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, καθώς η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης δεν ήταν αποδοτική.

Διαλύματα :

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

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Για την μετατροπή του RNA των πολιοϊών και των νοροϊών σε cDNA (complementary DNA) ακολουθήθηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής. Η παραγωγή του cDNA γίνεται για να ακολουθήσει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα DNA.

Αρχικά, 5 μ l τυκού RNA και 2 μ l τυχαίων εκκινητικών μορίων (100 μ mol/ μ l) (Random primers, d(N9) Takara, Japan), προστέθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 500 μ l και επώαστηκαν στους 70°C για 5 min ώστε τα μόρια του RNA να αποδιαταχθούν και τα εναρκτήρια μόρια να υβριδοποιηθούν πάνω τους. Μετά το πέρας της επώασης, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 min και στη συνέχεια προστέθηκε το μείγμα της αντίδρασης που για κάθε δείγμα αποτελείται από 5 μ l 5x M-MLV RT buffer, 5 μ l dNTPs (10mM), 0,5 μ l (40units/ μ l) Ribonuclease Inhibitor, 1 μ l (200units/ μ l) MMLV Reverse Transcriptase και 6,5 μ l ddH₂O ελεύθερου ριβονουκλεασών. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την Promega Corporation, Madison WI, USA. Ακολούθησε επώαση 1 h στους 37°C για τη σύνθεση cDNA και επώαση για 15 min στους 70°C για απενεργοποίηση του ενζύμου.

2.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

2.5.1 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε ένα μέρος της παρούσας διατριβής ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή της 5'-NCR και σε ολόκληρη τη VP1 καψιδιακή περιοχή εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), των παραπάνω περιοχών προέρχονται από προηγούμενες εργασίες και παρουσιάζονται στον πίνακα 2.10.

Επιπλέον ένα άλλο μέρος της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη μιας νέας multiplex RT-PCR μεθόδου για την ανίχνευση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό τα εκκινητικά μόρια που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.11 σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 (<http://www.genome.wi.-mit.edu/genomesoftware/other>) και των αλληλουχιών των πρότυπων στελεχών Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221). Συγκεκριμένα τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2

και Sa23C2 χρησιμοποιήθηκαν σε μια PCR αντίδραση για την ταυτοποίηση των τύπων ανασυνδυασμού S3/S1 και S3/S2 στην 2C γενωμική περιοχή δίνοντας PCR προϊόντα μεγέθους 1280 και 1227 bp, αντίστοιχα. Τα εκκινητικά μόρια S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 χρησιμοποιήθηκαν σε μια δεύτερη PCR αντίδραση για την ταυτοποίηση των τύπων ανασυνδυασμού S2/S1 και S2/S3 στην 3D γενωμική περιοχή δίνοντας PCR προϊόντα μεγέθους 733 και 803 bp, αντίστοιχα.

Η εφαρμογή της multiplex RT-PCR μεθόδου στα τρία ιϊκά στελέχη (584, 742 και 738) τα οποία όπως προαναφέρθηκε απομονώθηκαν από το περιβάλλον, έδειξε την παρουσία ανασυνδυασμού στις 2C ή/και 3D γενωμικές περιοχές τους. Κατά συνέπεια το τμήμα του γονιδιώματος από την 2A μέχρι και την 3'-NCR των τριών αυτών ιϊκών στελεχών αλληλουχήθηκε για τον ακριβή εντοπισμό των θέσεων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D περιοχές καθώς και την πιθανή ύπαρξη επιπλέον ανασυνδυασμού σε άλλα τμήματα της μη-δομικής περιοχής του γονιδιώματος. Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση του γενωμικού τμήματος από την 2A μέχρι και την 3'-NCR προέρχονται από προηγούμενες εργασίες και παρουσιάζονται στον πίνακα 2.12.

2.5.2 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΝΟΡΟΪΩΝ

Αρχικά επιχειρήθηκε η ανίχνευση νοροϊών σε κλινικά δείγματα κοπράνων. Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό προέρχονται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και επιτρέπουν την ανίχνευση των δυο πιο συνηθισμένων γενετικών ομάδων νοροϊών (GI και GII) (πίνακας 2.13). Η ανίχνευση νοροϊών στα κλινικά δείγματα επέτρεψε τον σχεδιασμό μέσω του προγράμματος Primer 3 επιπλέον εκκινητικών μορίων (πίνακας 2.14) τα οποία αναγνωρίζουν πιο ειδικά τις αλληλουχίες ιϊκών στελεχών που κυκλοφορούν στην Ελλάδα. Τα νέα αυτά εκκινητικά μόρια επέτρεψαν την ενίσχυση μέσω PCR περισσότερων τμημάτων του γονιδιώματος των κλινικών στελεχών και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα. Επιπλέον, η παρουσία αναστολέων της RT-PCR τόσο στα κλινικά όσο και στα περιβαλλοντικά δείγματα προσδιορίστηκε με την εφαρμογή μιας PCR με το

ζεύγος εκκινητικών μορίων P11P/P13P το οποίο στοχεύει στο βακτηριακό 16S rRNA (πίνακας 2.13).

2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μετά την παραγωγή του cDNA ακολουθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η οποία επιτρέπει την ενίσχυση *in vitro* ενός τμήματος cDNA, το οποίο οριοθετείται από τα εκάστοτε εκκινητικά μόρια. Συγκεκριμένα για την ενίσχυση των 5'-NCR, VP1 και 2A-3'NCR γενωμικών περιοχών των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA πολυμεράση Biotaq (Biotaq, Moscow, Russia) ενώ για την ενίσχυση των 2C και 3D περιοχών, μέσω δύο multiplex PCR αντιδράσεων, χρησιμοποιήθηκε η Paq DNA πολυμεράση Paq5000 (Stratagene).

Στις PCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω της Biotaq το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 3 μ l του εκάστοτε cDNA δείγματος, 2 μ l εκκινητών (1 μ l από τον καθένα με συγκέντρωση 50 μ mol), 5 μ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μ l μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2 μ l MgCl₂ (50mM), 2 units Taq DNA πολυμεράσης (Biotaq, Moscow, Russia) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μ l. Για κάθε PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 5 min και ακολούθησε η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης για 40 κύκλους (Πίνακες 2.10 και 2.12). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλάμβανε επώαση για 10 min στους 74°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Στις multiplex PCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω της Paq5000 το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 3 μ l του εκάστοτε cDNA δείγματος, 2 μ l του sense εκκινητή (50 μ mol), 1 μ l από κάθε antisense εκκινητή (50 μ mol), 5 μ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq reaction buffer), 5 μ l μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2.5 units Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000 Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μ l. Για κάθε multiplex PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο

αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 5 min. Ακολούθησε η εφαρμογή ίδιων συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης για 40 κύκλους και για τις δυο multiplex PCR αντιδράσεις (Πίνακας 2.11). Το τελικό στάδιο και στις δυο αντιδράσεις περιλάμβανε επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Στην περίπτωση των νοροϊών, όλες οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω της Paq DNA πολυμεράσης Paq5000 (Stratogene). Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl του εκάστοτε cDNA δείγματος, 2μl εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq reaction buffer), 5 μl μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2.5 units Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000 Stratogene) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl ενώ σε ορισμένες PCR προσθέσαμε επιπλέον MgCl₂ για να ενισχύσουμε την αντίδραση. Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 5 min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Στην περίπτωση των νοροϊών κάποιες από τις PCR αντιδράσεις είναι nested δηλαδή το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα σε μία δεύτερη αντίδραση PCR στην οποία και τα δυο εκκινητικά μόρια είναι εσωτερικά των πρώτων εκκινητών. Επιπλέον κάποιες αντιδράσεις PCR είναι seminested δηλαδή το προϊόν μιας πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα σε μία δεύτερη αντίδραση PCR στην οποία το ένα εκ των δύο εκκινητικών μορίων είναι εσωτερικό του πρώτου ζεύγους εκκινητών. Όλες οι υπόλοιπες PCR αντιδράσεις είναι autonested δηλαδή το προϊόν της πρώτης PCR αντίδρασης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα σε μία δεύτερη PCR αντίδραση με το ίδιο ζεύγος εκκινητικών μορίων. Σε όλες τις περιπτώσεις η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια όπως και στην απλή PCR με τη διαφορά ότι τη θέση του cDNA παίρνουν 5 μl PCR προϊόντος της πρώτης αντίδρασης. Οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζεύγος εκκινητών, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.15.

Πίνακας 2.10. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 5'-NCR και VP1 περιοχών των στελεχών πολιϊτών. Για τους εκκινητές UG52, UC53, UG1 και 222 με κόκκινο φαίνονται οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 1 (AY184219), με μπλε οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 2 (AY184220) και με πράσινο οι θέσεις πρόσδεσής τους σε στελέχη τύπου Sabin 3 (AY184221). κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
UG52 κ.	162-CAAGCACTTCTGTTCCTCCCGG-182 162-CAAGCACTTCTGTTCCTCCCGG-182 164-CAAGCACTTCTGTTCCTCCCGG-184	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 45°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Georgopoulou et al., 2000
UC53 α.	577-ACCGACCAATACCACTGTT-595 578-ACCGACCAATACCACTGTT-596 580-ACCGACCAATACCACTGTT-598		
UG1 κ.	2402-TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2421 2404-TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2423 2399-TTTGTGTCAGCGTGTTAATG-2418	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 45°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Balanant et al., 1991
222 α.	2982- CICCIGGIGGIAYRWACA-3000 2984- CICCIGGIGGIAYRWACA-3002 2979- CICCIGGIGGIAYRWACA-2997		Oberste et al., 2000
S ₁ 37 κ.	2837- AGGAAATTGGAGTTCCTCACC-2857	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2006
S ₁ 688 α.	3488- ACATGACGTTCACTGCGTTTT -3468		Dedepsidis et al., 2006
S ₂ 30 κ.	2830- CAACTGAGACGCAAACCTGGA -2849	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2006
S ₂ 688 α.	3488- CACATGACACTCACGGCATT -3469		Dedepsidis et al., 2006
S ₃ 26 κ.	2826- GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC -2847	Αποδ.: 95°C 20sec Υβριδ.: 55°C 20sec Επιμ.: 74°C 20sec	Dedepsidis et al., 2006
S ₃ 651 α.	3451- CTCCTTAGTGGCGAGATGGTAG -3430		Dedepsidis et al., 2006

Πίνακας 2.11. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των συνηθών τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές των ιικών στελεχών πολιϊτών 584, 742 και 738 μέσω μιας νέας multiplex RT-PCR μεθόδου. Τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other>) και των αλληλουχιών των πρότυπων στελεχών Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221).

Εκκινητικά μόρια	Γενωμική περιοχή	Ανιχνεύσιμος τύπος ανασυνδυασμού, μέγεθος PCR προϊόντος	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR
S3sC2b κ.	2C		4088-TTGGAGATCCCTATGTTATTAG-4110 ^c	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 55°C 30sec Επιμ.: 72°C 1 min
Sa13C2 α.		S3/S1, 1280 bp	5350-GTGTCCAGCAAACAGTTTA-5368 ^a	
Sa23C2 α.		S3/S2, 1227 bp	5295-AAAGTAGTACTGCTTGTAGG-5315 ^b	
S2s3dmp κ.	3D		6430-GGAATTAACCTACCGCTTGTA-6450 ^b	Αποδ.: 95°C 30sec Υβριδ.: 55°C 30sec Επιμ.: 72°C 1 min
S1a3dmp α.		S2/S1, 733 bp	7141-GCATTACTGGATGAATAAGAAAT-7163 ^a	
S31aD3 α.		S2/S3, 803 bp	7213-GACACAAGGAGCGTACATGG-7232 ^c	

^a Οι θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 1 (AY184219)

^b Οι θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 2 (AY184220)

^c Οι θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 3 (AY184221)

Πίνακας 2.12. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής 2A-3'NCR στα δείγματα 584, 738 και 742 για τον εντοπισμό των θέσεων ανασυνδυασμού. Πρόθεμα S₁ : θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 1 (AY184219), πρόθεμα S₂ : θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 2 (AY184220), πρόθεμα S₃ : θέσεις πρόσδεσης αναφέρονται στο Sabin 3 (AY184221). Οι θέσεις των υπόλοιπων εκκινητικών μορίων αναφέρονται στο Sabin 1 (AY184219). κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Ζευγάρια εκκινητών	Θέση-Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Δημοσίευση
71935 κ.	3206-GTCAATGATCACAACCC-3222	Αποδ.: 95°C 20sec	Mulders et al., 1995
EUC2 α.	4454-TTTGCACTTGAACCTGTATGTA-4474	Υβριδ.: 50°C 1 min Επιμ.: 74°C 1 min	Caro et al., 2001
UG23 κ.	4169-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4188	Αποδ.: 95°C 20sec	Guillot et al., 2000
UC15 α.	4948-CATCTCTTGAAGTTTGCT-4965	Υβριδ.: 50°C 15sec Επιμ.: 74°C 20se	Guillot et al., 2000
S ₂ 97 κ.	4717-TTAGCCTCCACCACCTCCAG-4737	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2007
S ₂ 598 α.	5195-TGATGTTCCICICIGTTTGAACC-5218	Υβριδ.: 50°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2007
S ₂ 48 κ.	4968-TCCTTTAGTGTGTGGCAAGG-4988	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2007
S ₂ 911 α.	5812-GTTTGTCTCCACCGAGATT-5832	Υβριδ.: 50°C 15sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2007
S ₁ 42 κ.	4962-GATGCTGTCCTTTAGTGTGTGG-4984	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2007
S ₁ 952 α.	5853-GATGCTGTCCTTTAGTGTGTGG-5873	Υβριδ.: 58°C 30sec Επιμ.: 74°C 1 min	Paximadi et al., 2007
UG16 κ.	5921-GTTGGTGGGAACGGTTCACA-5940	Αποδ.: 95°C 20sec	Guillot et al., 2000
UC12 α.	6494-TCAATTAGTCGGATTTCCCTG-6516	Υβριδ.: 53°C 10sec Επιμ.: 74°C 20sec	Guillot et al., 2000
S ₃ 64 κ.	5763-GTATGTTCCIGTCGGTGTGT-5784	Αποδ.: 95°C 30sec	Paximadi et al., 2007
S ₂ 380 α.	6800-TGGGAATGGTTGAGGTAATC-6780	Υβριδ.: 50°C 30sec Επιμ.: 74°C 1 min	Paximadi et al., 2007
S ₂ 107 κ.	6647-TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA-6668	Αποδ.: 95°C 20sec	Paximadi et al., 2007
S ₂ 872 α.	7393-ACAACAGCATGACCCAATCC-7413	Υβριδ.: 50°C 15sec Επιμ.: 74°C 20sec	Paximadi et al., 2007

Πίνακας 2.13. Εκκνητικά μόρια από προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γενωμικών περιοχών των νοροϊών. Επίσης, παρουσιάζεται η αλληλουχία των εκκνητικών μορίων P11P/P13P που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της παρουσίας αναστολέων στα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Οι θέσεις πρόοδωσης των εκκνητικών μορίων αναφέρονται στο πρότυπο στέλεχος Lordsdale (X86557) για την γενετική ομάδα GII και στο πρότυπο στέλεχος Norwalk (M87661) για την γενετική ομάδα GI. κ.: κωδικός, α.: αντικωδικό

Εκκνητικά μόρια	Θέση (5'→3') -Αλληλουχία	Γενωμική περιοχή	Γενετική ομάδα	Δημοσίευση
JV12Y κ.	4552-ATACCACTATGATGCAGAYTA-4572/GI 4279-ATACCACTATGATGCAGAYTA-4299/GII	RdRp	GI/GII	Vennema et al. 2002
JV13I α.	4858-TCATCATCACCATAGAAIGAG-4878/GI 4586-TCATCATCACCATAGAAIGAG-4605/GII	RdRp	GI/GII	Vennema et al. 2002
mon381 κ.	5362-CCAGAATGTACAATGGTTATGC-5383	ORF2	GII	Noel et al. 1997
mon383 α.	5661-CAAGAGACTGTGAAGACATCATC-5683	ORF2	GII	Noel et al. 1997
SRI-2 κ.	5344-AAATGATGATGGCGTCTA-5361	ORF2	GI	Hafliger et al. 1997
SRI-1 α.	5640-CCAACCCARCCATTRTACAT-5659	ORF2	GI	Hafliger et al. 1997
SRI-3 α. (seminested)	5566-AAAAYRTCACCGGGKGTAT-5584	ORF2	GI	Hafliger et al. 1997
SRII-2 κ.	4844-TWCTCYTTYTATGGTIGATGATGA-4866	RdRp	GII	Hafliger et al. 1997
SRII-1 α.	5339-CGCCATCTTCATTCACAAA-5357	RdRp	GII	Hafliger et al. 1997
SRII-3 α. (seminested)	5028-TTWCCAAACCAACCWGCTG-5046	RdRp	GII	Hafliger et al. 1997
P290 κ.	4568-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-4590/GI 4295-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-4317/GII	RdRp	GI/GII	Jiang et al. 1999
P289 α.	4865-TGACAATGTAATCATCACCATA-4886/GI 4592-TGACAATGTAATCATCACCATA-4613/GII	RdRp	GI/GII	Jiang et al. 1999
P11P κ.	1173-GAGGAAGGTGGGGATGACGT-1192	16S rRNA	-	Widjoatmodjo et al. 1995
P13P α.	1370-AGGCCCGGGAACGTATTCAC-1389	16S rRNA	-	Widjoatmodjo et al. 1995
Calman-1 κ.	4193-GCACACTGTGTACACTTCC-4213	RdRp	GII	Rohayem et al. 2004
Calman-2 α.	4997-ACATGGCTCTTGTCTGG-5015	RdRp	GII	Rohayem et al. 2004
Calman-29 κ.	4868-TATGGTIGATGAAATAGTGTC-4891	RdRp	GI	Rohayem et al. 2004
Calman-32 α.	5338-ATTCGGGCAGAAGATTG-5356	RdRp	GI	Rohayem et al. 2004
P78 κ.	1682-GGGCCCCCTGGTATAGGTAA-1701	2C	GI	Wang et al. 1994
P80 α.	1943-TGGTIGATGACTATAGCATCAGACACAAA-1970	2C	GI	Wang et al. 1994
GV6 κ.	6874-TTTATCAATNAAGCCTG-6891	ORF3	GI	Vinje et al. 2000
GV5 κ.	6700-TNTAATGGCTGGAGCTTT-6717	ORF3	GII	Vinje et al. 2000
GV7 α.	7079-NATCATCTCNTTNTCATG-7096/GI 6878-NATCATCTCNTTNTCATG-6895/GII	ORF3	GI/GII	Vinje et al. 2000
G1SKF κ.	5342-CTGCCCGAATTYGTAATGA-5361	ORF2	GI	Kojima et al. 2002
G1SKR α.	5653-CCAACCCARCCATTRTACA-5671	ORF2	GI	Kojima et al. 2002
G2SKF κ.	5046-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-5064	ORF2	GII	Kojima et al. 2002
G2SKR α.	5367-CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT-5389	ORF2	GII	Kojima et al. 2002
MR3 κ.	4212-CCGTCAGAGTGGGTATGAA-4230	RdRp	GII	Lew et al. 1994
MR4 α.	4664-AGTGGGTTGAGGCCGTA-4681	RdRp	GII	Lew et al. 1994
YURI22F κ. (nested)	4232-ATGAATGAGGATGGACCCAT-4251	RdRp	GII	Saito et al. 1998
YURI22R α. (nested)	4585-CATCATCCCCGTAGAAAGAT-4604	RdRp	GII	Saito et al. 1998

Πίνακας 2.14. Εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη για την ενίσχυση γενωμικών περιοχών των νοροϊών. Οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητικών μορίων αναφέρονται στο στέλεχος με κωδικό καταχώρησης GeneBank (AB084071) το οποίο είναι γενετικής ομάδας GII. κ.: κωδικός, α.: αντικωδικός

Εκκινητικά μόρια	Θέση (5'→3') -Αλληλουχία	Γενωμική περιοχή
NVL R 52 κ.	4559-GTCCAAGCCCACTCCTGTT-4577	RdRp
NLVR 871 α.	5258-AGACGGTAAACTCGCCCTGT-5277	ORF2
NLV R 58 κ.	4565-GCCCACTCCTGTTTTTCATT-4584	RdRp
NLV R 756 α.	5143-TGCCATAACCTCATITGTTGG-5162	ORF2
NLV R 166 κ.	4673-ACCCGACCTGACAAAAATGA-4692	RdRp
NLV ORF 1041 α.	5529-GGCAAAAACACTGGCTCAAG-5548	ORF2
NLV R 166 κ.	4673-ACCCGACCTGACAAAAATGA-4692	RdRp
NLV ORF 1262 α.	5751-GGATGGGGAGTGTGAAAGG-5769	ORF2
NLV ORF 1955 κ.	6471-CAGGAATGGGTTACGCACTT-6490	ORF2
NLV ORF 2902 α.	7403-CTTTGGGGACGGTTGAGAC-7421	ORF3
NLV ORF 2029 κ.	6545-TCCTGACACTGGGAGAAACA-6564	ORF2
NLV ORF 2902 α.	7403-CIT TGG GGA CGG TTG AGA C-7421	ORF3
NLV ORF 941 κ.	5448-GTTCCACCACATTTCCCTGT-5467	ORF2
NLV ORF 1928 α.	6425-ACCCATAACCACCAGCAGAT-6444	ORF2
NLV ORF 769 κ.	5276-TTACCAAGGAACTCACCTG-5295	ORF2
NLV ORF 1753 α.	5511-GGGCTGTCCATCATCAAAAT-5531	ORF2
NLV ORF 1290 κ.	5797-GATCCCCGCTCCAATAGAC-5816	ORF2
NLV ORF 1974 α.	6471-AAGTGCTGAACCCATTCCTG-6490	ORF2
NLV ORF 2029 κ.	6545-TCCTGACACTGGGAGAAACA-6564	ORF2
NLV ORF 2703 α.	7203-CGTTGAATGGGTTGATTGTG-7222	ORF3
NLV ORF 1252 κ.	5759-ACTCCCCATCCTGACTCTTG-5778	ORF2
NLV ORF 1974 α.	6471-AAGTGCTGAACCCATTCCTG-6490	ORF2
NLV H 144 κ.	4173-TGACCAAGATACAGGAAGATTGC-4195	RdRp
NLV H 901 α.	5146-TCAAGTGCCATAACCTCATTGT-5167	ORF2
NLV H 297 κ.	4563-AAGCCCACTCCTGTTTTTCA-4582	RdRp
NLV H 896 α.	5143-TGCCATAACCTCATITGTTGG-5162	ORF2
NLV C 463 κ.	5541-CTTCTGCCCTCCCTGATA-5559	ORF2
NLV C 1430 α.	6489-GGTGCTGCTTCTGGTAAAA-6508	ORF2
NLV C 560 κ.	5638-GGGCTAACTCTGGTGAGGAT-5657	ORF2
NLV C 1522 α.	6581-TGAGGAACCTTCTCTGTGC-6600	ORF2
NLV C 775 κ.	5853-CAACCCCAAAATGGTAGGTG-5872	ORF2
NLV C 1489 α.	6548-AGATGTTACGCCAGTATCG-6567	ORF2
NLV C 615 κ.	5693-CGCCCCAGATTTTGTGTTTC-5711	ORF2
NLV C 1376 α.	6435-ATGTAGCCAGACCCGTAGCC-6454	ORF2

Πίνακας 2.15. Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR με τα εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση γενωμικών περιοχών των νοροϊών. Επίσης, παρουσιάζονται οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR με τα εκκινητικά μόρια P11P/P13P για τον έλεγχο της παρουσίας αναστολέων στα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες PCR	Κύκλοι	Συνθήκες Autonested PCR	Κύκλοι
JV12Y - JV13I	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 37°C για 1 min Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
SRII-1 SRII-2 SRII-3	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec (SRII-2- SRII-1)	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (SRII-2 - SRII-3)	40 κύκλοι
P78 - R80	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
G2SKR - G2SKF	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
G1SKR - G1SKF	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
CALMAN 1 - 2	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
CALMAN 29 - 32	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50 °C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
MR3 - MR4 YURI22F - YURI22R	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec (MR3 - MR4)	25 κύκλοι	Nested PCR Ομοίως με PCR (YURI22F-YURI22R)	40 κύκλοι
P289 - P290	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 43°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
MON 381 - 383	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 43°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
SRI-2 SRI-1 SRI-3 (seminested)	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 40 °C για 30sec Επιμήκυνση: 72 °C για 30sec (SRI-2- SRI-1)	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (SRI-2 SRI-3)	40 κύκλοι
GV6- GV7 GV5- GV7	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 40°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 2029 - 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 941 - 1928	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 53°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 2029 - 2703	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 58 - 756	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι

NLVC 463 - 1430	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVH 297 - 896	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 166 - NLVORF 1262	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 166 - NLVORF 1041	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 52 - 871	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 1955 - 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 769 - 1753	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 52°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 1290 - 1974	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 1252 - 1974	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 560 - 1522	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 775 - 1489	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 615 - 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVH 144 - 901	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 166 - NLVORF 1262 & NLVR 166 - NLVORF 1041	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVR 166 -NLVORF 1041)	40 κύκλοι
NLVR 52 - NLVORF 871 & NLVR 58 - 756	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Nested PCR Ομοίως με PCR (NLVR 58 - 756)	40 κύκλοι
NLVORF 1955 -2902 & NLVORF 2029 - 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVORF 2029 - 2902)	40 κύκλοι
NLVC 463 - 1430 & NLVC 615 - 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Nested PCR Ομοίως με PCR (NLVC 615 - 1376)	40 κύκλοι

NLVC 560 - 1522 & NLVC 615 - 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Nested PCR Ομοίως με PCR (NLVC 615 - 1376)	40 κύκλοι
NLVH 144 - 901 & NLVH 297 - 896	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Nested PCR Ομοίως με PCR (NLVH 297 - 896)	40 κύκλοι
P11P-P13P	Αποδιάταξη: 95°C για 20sec Υβριδοποίηση: 63°C για 20sec Επιμήκυνση: 72°C για 20sec	30 κύκλοι		

2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

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

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στην πηκτή ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 1 h. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε με Olympus digital camera.

Διαλύματα :

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

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

2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

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

2.9 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Πριν την μοριακή κλωνοποίηση των PCR προϊόντων των νοροϊών είναι απαραίτητα τα εξής στάδια: i) ο καθαρισμός των PCR προϊόντων (με την διαδικασία που προαναφέρθηκε) για την απομόνωση των ειδικών ζωνών, ii) η πραγματοποίηση autonested PCR με την GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega, USA) η οποία επιτρέπει την προσθήκη συμπληρωματικών με την περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης πολύ (A) μονόκλωνων άκρων και iii) καθαρισμός των προϊόντων της autonested GoTaq PCR για την απομόνωση των ειδικών ζωνών.

Το μίγμα της GoTaq PCR αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της autonested, seminested ή nested PCR το οποίο έχει καθαριστεί από το πήκτωμα αγαρόζης, 2μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 10μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος (Colorless Go Taq Flexi Buffer), 5μl μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 1.25 units GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega, USA), 4μl MgCl₂ 25mM και ddH₂O ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA) μέχρι τελικό όγκο 50μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης στους 95°C για 1 min, υβριδοποίησης για 30 sec (η θερμοκρασία εξαρτάται από το ζεύγος των

εκκινητών, πίνακας 2.15) και επιμήκυνσης στους 72°C για 1 min, για 20 κύκλους. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C.

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της *autonested* GoTaq PCR ακολούθησε η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα κύρια στάδια.

Αντίδραση λιγάσης: Η αντίδραση αυτή επιτρέπει την ενσωμάτωση του ενισχυμένου γενωμικού τμήματος από τις αντιδράσεις PCR στο πλασμίδιο - φορέα κλωνοποίησης. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA), ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση PCR προϊόντων (Εικόνα 2.3). Ο φορέας αυτός περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker) όπου υπάρχει η θέση ενσωμάτωσης με μονόκλωνες ουρές poly(T). Τα PCR προϊόντα που πρόκειται να κλωνοποιηθούν έχουν στα άκρα τους poly(A) μονόκλωνες ουρές (συμπληρωματικά άκρα) από την αντίδραση της *autonested* GoTaq PCR. Συνεπώς, η T4 DNA Ligase βακτηριοφάγου (Promega, USA) που χρησιμοποιήθηκε καταλύει την σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων, η συμπληρωματικότητα των οποίων επιτρέπει στα δύο δίκλινα μόρια DNA να ενωθούν μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών που δημιουργεί η λιγάση ανάμεσα στο 3' υδροξύλιο και την διπλανή 5' φωσφορική ομάδα του DNA, καταλήγοντας στην ένθεση του PCR προϊόντος στην περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης.

Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μl pGEM®-T Easy Vector 50ng, 3μl προϊόντος της *autonested* GoTaq PCR, 5 μl 2x Rapid Ligation Buffer και 3 units T4 DNA Ligase (Promega, USA).

Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο - CaCl₂): Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5α. Η φ80 lacZ ΔM15 μετάλλαξη στην αλληλουχία του γενόματός των, επιτρέπει ασυμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (τμήμα α) που κωδικοποιείται από τον φορέα κλωνοποίησης. Το τμήμα Ω της β-γαλακτοσιδάσης κωδικοποιείται από το βακτηριακό γένωμα, ωστόσο απαιτείται και το τμήμα α για τον σχηματισμό ενεργού ενζύμου, το οποίο κωδικοποιείται από τον φορέα και μέσα στον οποίο υπάρχει η περιοχή

πολυσυνδέτη, η παρουσία της οποίας όμως δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο.

Αρχικά, από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα, μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1 ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA) και ακολούθησε επώαση για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, 1 ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50 ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λήψη 1 ml από την καλλιέργεια έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση σε OD_{600} και να σταματήσουμε την κυτταρική ανάπτυξη όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450-0,550A. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και στο τέλος της φυγοκέντρησης αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 10 ml παγωμένου CaCl_2 συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C , στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2 ml παγωμένου CaCl_2 0,1M. Διάλυμα 0,1M CaCl_2 : 0,55g CaCl_2 (Sigma, USA) διαλύονται σε ddH₂O μέχρι όγκο 50ml.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων: Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200 μl από τα δεκτικά κύτταρα σε πλαστικούς σωλήνες των 500 μl. Ακολούθησε προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στον αντίστοιχο πλαστικό σωλήνα και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min. Έπειτα οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και ακολούθως μεταφέρθηκαν γρήγορα στον πάγο για 2 min (heat shock). Στη συνέχεια, 200 μl των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 15 ml (falcon) με 800 μl LB Broth και επώαστηκαν στους 37°C στις 180 στροφές/λεπτό για 1h (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων «επούλωση»). Εν συνεχεία, 300 μl από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τριβλίο που περιείχε LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη 1,5 μl/ml LB Agar

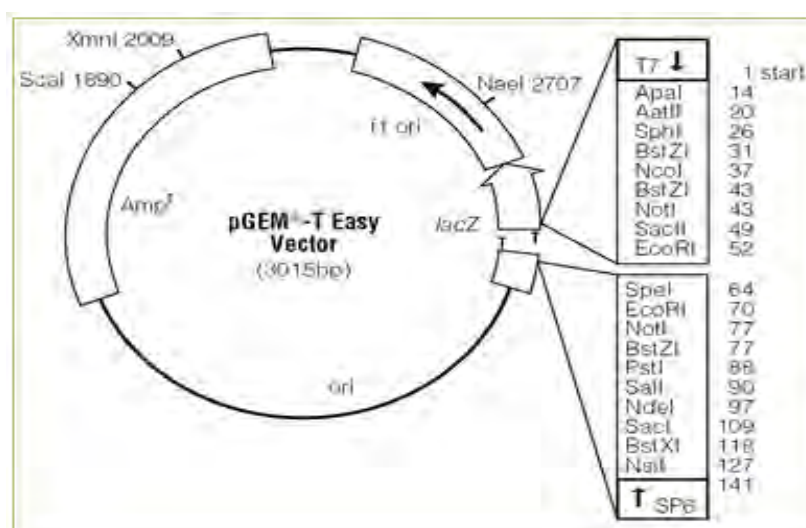
(6,6 mg/ml) και προστέθηκαν 12 μ l X-gal (50 mg/ml, Promega, USA), ενώ ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C.

Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβάινει στη διασύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, αποκλείεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας πέραν όσων έχουν μετασχηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ- β -D-γαλακτοσίδιο (X-gal), η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β -γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, το τμήμα α της β -γαλακτοσιδάσης παράγεται, σχηματίζεται το ενεργό ένζυμο και το X-gal διασπάται παράγοντας αποικίες μπλε χρώματος. Όταν όμως έχει γίνει ένθεση του PCR προϊόντος στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος α της β -γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι άχρωμες (λευκές).

Βάσει της παραπάνω αρχής, έγινε συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα τριών από κάθε τριβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα. Έπειτα, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη 1,5 μ l/ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες.

Πέψη με EcoRI: Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 4 μ l από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2 μ l 10x Buffer, 1 μ l Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 13 μ l ddH₂O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μ l. Ακολούθησε επώαση στους

37°C για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3 μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Τα 23 μl που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, ο 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 120 Volts, 50mA για περίπου 1h. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε με Olympus digital camera.



Εικόνα 2.3. Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής της EcoRI.

2.10 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε, οι πολιοϊοί και οι νοροϊοί ως RNA ιοί συνυπάρχουν ως μίγματα διαφορετικών γενοτύπων (quasi-species). Κατά συνέπεια είναι απαραίτητη μια διαδικασία που να επιτρέπει την απομόνωση ενός ιικού στελέχους. Το στάδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο όταν πρόκειται να ακολουθήσει αλληλούχηση κάποιων περιοχών του ιικού γενώματος. Για παράδειγμα η παρουσία μίγματος ιικών στελεχών έχει ως αποτέλεσμα την

εμφάνιση διπλών κορυφών στο χρωματογράφημα της αλληλούχισης καθιστώντας αδύνατη την επεξεργασία των αλληλουχιών. Στην περίπτωση των πολιοϊών η αποφυγή μιγμάτων ιϊκών στελεχών επιτεύχθηκε με την διαδικασία των σειριακών αραιώσεων. Κατά συνέπεια τα PCR προϊόντα που προέκυψαν αντιστοιχούσαν σε ένα ιϊκό στέλεχος καθιστώντας δυνατή την άμεση αλληλούχισή τους. Στην περίπτωση των νοροϊών η αδυναμία καλλιέργειας του ιού δεν επιτρέπει την διαδικασία των σειριακών αραιώσεων. Έτσι στην περίπτωση αυτή η αποφυγή μιγμάτων ιϊκών στελεχών επιτεύχθηκε με την διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης των PCR προϊόντων σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς.

Η αλληλούχιση των PCR προϊόντων (απλών και κλωνοποιημένων) πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen Inc. (Seoul, Korea). Στην περίπτωση των πολιοϊών (απλά PCR προϊόντα) για κάθε αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες PCR αντιδράσεις. Στην περίπτωση των νοροϊών (κλωνοποιημένα PCR προϊόντα) η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με εκκινητές τους προαγωγείς T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης του PCR προϊόντος (Εικόνα 2.3).

2.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Μετά την απόκτηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από προγράμματα βιοπληροφορικής για την επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

BLAST: Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Ο αλγόριθμος BLAST αναζητά στη GenBank κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοιχίσης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs - high scoring segment pairs) καταγράφονται με μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός

παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειούμενης βαθμολογίας συσχέτισης, κι επομένως ομολογίας.

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

Επίσης, με το πρόγραμμα ClustalW πραγματοποιήθηκαν οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των στελεχών νοροϊών που απομονώθηκαν από τα κλινικά και τα περιβαλλοντικά δείγματα, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών με τα οποία εμφανίζουν την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας το καθένα, καθώς επίσης με των προτύπων στελεχών Norwalk (AF093797.1) ή Chiba (AB042808.1) όταν αναμένεται το στέλεχος να ανήκει στην γενετική ομάδα GI και Lordsdale (X86557.1) όταν αναμένεται να ανήκει στην γενετική ομάδα GII.

GeneRunner V. 3.05: Μέσω του προγράμματος GeneRunner ανακτήθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες των ιϊκών στελεχών πολιοϊών που μελετήθηκαν.

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

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

Simplot V. 3.5.1: Το Simplot (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/Simplot>) είναι ένα πρόγραμμα ανάλυσης ομοιογένειας-ετερογένειας μεταξύ αλληλουχιών. Στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των ανασυνδυασμών, οι οποίοι

ανιχνεύθηκαν στα ιϊκά στελέχη πολιοϊών που μελετήθηκαν. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα υπολογίζει την εκατοστιαία αναλογία ομοιότητας μεταξύ μιας πρότυπης αλληλουχίας και της προς μελέτη αλληλουχίας.

MEGA V. 3: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των στελεχών νοροϊών που απομονώθηκαν. Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη μέθοδο Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining-NJ) χρησιμοποιώντας την παράμετρο p-distance.

Η μέθοδος Neighbor Joining είναι μέθοδος πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν χρησιμοποιεί κάποιο υποθετικό μοριακό ρολόι, με αποτέλεσμα να αποδίδει πιο σωστά την φυλογένεση, όταν διαφορετικές γενιές (lineages) παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τον εξελικτικό τους ρυθμό.

Η παράμετρος p-distance ή observed distance (παρατηρούμενη απόσταση), όπως διαφορετικά ονομάζεται, εκφράζει την αναλογία των διαφορετικών ομόλογων θέσεων μεταξύ των διαφορετικών αλληλουχιών και εκφράζεται ως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση. Στηρίζεται στην αρχή της απλούστερης προσέγγισης για τον υπολογισμό της απόκλισης μεταξύ δύο στοιχισμένων DNA αλληλουχιών, η οποία είναι η μέτρηση των θέσεων όπου αυτές διαφέρουν.

2.12 ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (RCT test)

Η αναπαραγωγική ικανότητα των ιϊκών στελεχών πολιοϊών σε διαφορετικές θερμοκρασίες αξιολογήθηκε μέσω ενός τεστ γνωστό ως RCT (Reproductive Capacity at different Temperatures). Η τιμή RCT ορίζεται ως η διαφορά, μετά από επώαση 5 ημερών, ανάμεσα στο \log_{10} του ιϊκού τίτλου που εκφράζεται σε TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) ανά ml, στην ευνοϊκή (37°C) και στη μη ευνοϊκή θερμοκρασία (40°C) για την ιϊκή αναπαραγωγή. Ο προσδιορισμός του ιϊκού τίτλου έγινε σε Hep-2 κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπολογίστηκε ο τίτλος δύο διαφορετικών ιϊκών στελεχών. Συνολικά προσδιορίστηκε η θερμοευαισθησία 14 εμβολιοσυνδεδεμένων πολιοϊών (εκ των οποίων 6 ιϊκά στελέχη έφεραν απλό ανασυνδυασμό, 6 διπλό ανασυνδυασμό και 2 τα οποία

δεν έφεραν ανασυνδυασμό). Επιπλέον ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα θερμοευαίσθητα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3).

Αρχικά μεταφέρθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση στην πλάκα μικροτιτλοποίησης. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στις πλάκες, για κάθε ιικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10^{-6} . Κατόπιν 100μl από κάθε αραιώση μεταφέρθηκαν σε τέσσερις θέσεις σε κάθε μια από δυο πλάκες μικροτιτλοποίησης. Στις στήλες 10 και 11 δεν προστέθηκε ιικό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Η μια πλάκα επώαστηκε στους 37°C και η δεύτερη στους 40°C. Μετά από επώαση 5 ημερών προσδιορίστηκε ο τίτλος για κάθε ιικό δείγμα εκφραζόμενος σε \log_{10} 50% TCID₅₀ (tissue culture infective dose units) ανά ml. Τα ιικά στελέχη θεωρούνται θερμοευαίσθητα (temperature sensitive, ts) όταν η τιμή RCT (διαφορά ανάμεσα στους 37°C και 40°C) είναι μεγαλύτερη ή ίση με 2.00 και θερμοανθεκτικά (non ts) όταν η τιμή RCT είναι μικρότερη του 2.00.

2.13 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΝΟΣ ΣΤΑΔΙΟΥ (ONE-STEP GROWTH CURVE)

Οι καμπύλες ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα Hep-2 στους 37°C και 40°C, μετά από μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) κάθε ιικού δείγματος το οποίο αντιστοιχεί σε 10 TCID₅₀/cell. Συνολικά κατασκευάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης για 14 εμβολιοσυνδεόμενους πολιοϊούς (εκ των οποίων 6 ιικά στελέχη έφεραν απλό ανασυνδυασμό, 6 διπλό ανασυνδυασμό και 2 τα οποία δεν έφεραν ανασυνδυασμό). Η καμπύλη ανάπτυξης του κάθε εμβολιοσυνδεόμενου πολιοϊού συγκρίθηκε με την καμπύλη ανάπτυξης του πρότυπου εμβολιακού στελέχους (Sabin 1, Sabin 2 ή Sabin 3) του ίδιου γενοτύπου στην 5'-NCR περιοχή. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δυο πειράματα όπου στο ένα μελετήθηκε η κινητική ανάπτυξης των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με απλούς ανασυνδυασμούς ενώ στο δεύτερο των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με διπλούς ανασυνδυασμούς. Τα δυο ιικά στελέχη τα οποία δεν έφεραν ανασυνδυασμούς χρησιμοποιήθηκαν και στα δυο

πειράματα προκειμένου να συγκριθεί η κινητική ανάπτυξή τους με τη κινητική ανάπτυξης των ανασυνδυσμένων πολιοϊών.

Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση κυττάρων Herp-2 (WHO polio laboratory manual, 2004) και 100 μl κυττάρων τοποθετήθηκαν ανά θέση σε 14 πλάκες μικροτιτλοποίησης (96 θέσεων). Την επομένη μέρα αφού είχαν προσκολληθεί τα κύτταρα στις πλάκες το κάθε ιικό δείγμα (10 ΜΟΙ) ενοφθαλμίστηκε σε πέντε θέσεις σε κάθε μία από τις 14 πλάκες μικροτιτλοποίησης. Συνολικά σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκαν 12 ιικά δείγματα. Αφού οι πλάκες ανακινήθηκαν για δυο ώρες στους 37°C για είσοδο του ιού στα κύτταρα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν προσεκτικά δύο φορές, κάθε φορά με 300 μl θρεπτικού υλικού (Eagle MEM) για να απομακρυνθούν τα ιικά σωματίδια που δεν προσδέθηκαν στα κύτταρα. Σε κάθε θέση προστέθηκαν 100 μl Eagle MEM και οι πλάκες επώαστηκαν, οι επτά στους 37°C και οι υπόλοιπες επτά στους 40°C για 0, 2, 4, 6, 8, 10 και 12 ώρες. Οι πλάκες υποβλήθηκαν σε τρεις συνεχείς κύκλους ψύξης-απόψυξης για την διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση των ισοσωματίων και ο ιικός τίτλος του υπερκείμενου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε σε Herp-2 κύτταρα στους 37°C για κάθε μια από τις προαναφερθείσες ώρες μετά τη μόλυνση.

2.14 ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΜΕ ΟΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

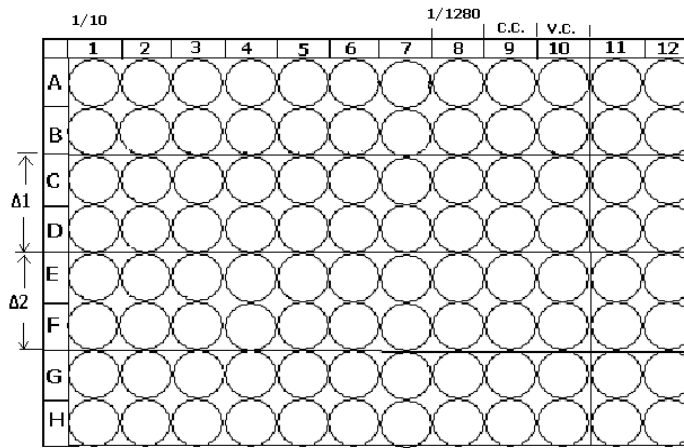
Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκε κατά τη χρονική περίοδο 2008-2009 το επίπεδο ανοσίας πληθυσμού της νότιας Ελλάδας έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) και μιας συλλογής 15 ανασυνδυσμένων και 4 μη-ανασυνδυσμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 40 δείγματα ορών ηλικίας 1-10 ετών, 40 δείγματα ηλικίας 11-20 ετών, 40 δείγματα ηλικίας 21-30 ετών και 40 δείγματα ηλικίας 31-40 ετών. Οι οροί από κάθε μία από τις παραπάνω ηλικιακές ομάδες (age groups) αναμιχθηκαν μεταξύ τους και έτσι δημιουργήθηκαν 4 μίγματα (pool) ορών όπου το καθένα αναλογεί στην αντίστοιχη ηλικιακή ομάδα. Το κάθε ένα από τα τέσσερα μίγματα ορών αραιώθηκε 1/10 σε θρεπτικό υλικό Eagle MEM και επώαστηκε στους 56°C για 50 λεπτά με σκοπό την

αδρανοποίηση του συμπληρώματος. Η οροεξουδετέρωση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων και σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκαν 2 διαφορετικά μίγματα ορού (π.χ μίγματα ορών 1-10 και 11-20 σε μια πλάκα και 21-30 και 31-40 σε μια δεύτερη πλάκα). Σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκαν εις διπλούν στη θέση 1 200 μl του αραιωμένου (1/10) και αδρανοποιημένου ορού και στις θέσεις 2 μέχρι και 7 τοποθετήθηκαν 100 μl θρεπτικού υλικού Eagle MEM. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν 100 μl ορού από τη θέση 1 στη θέση 2 και κατόπιν αναμιγνύοντας διαδοχικά μέχρι τη θέση 8. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε αραιώση του ορού από 1/10 (θέση 1) μέχρι 1/1280 στη θέση 8 (Εικόνα 2.4). Στη θέση 9 τοποθετήθηκαν 100 μl υλικό Eagle MEM και 100 μl αραιωμένου ορού και στη θέση 10 η οποία αποτελεί το virus control δηλ. τον θετικό μάρτυρα, 100 μl υλικό Eagle MEM. Έπειτα προστέθηκαν σε όλες τις θέσεις 100 μl από το αντίστοιχο ιικό δείγμα τα οποία περιέχουν 100 TCID₅₀ εκτός της θέσεως 9 που αποτελεί το cell control (αρνητικό μάρτυρα). Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα υπό αργή ανάδευση για πρόσδεση ιού-αντισώματος. Κατόπιν σε όλες τις θέσεις προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (10.000 κύτταρα/θέση) και οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C μέχρι και 24 ώρες μετά την εμφάνιση πλήρους CPE στον θετικό μάρτυρα (virus control). Η μεγαλύτερη αραιώση κάθε μίγματος ορού στην οποία δεν παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων. Έτσι οι τίτλοι των αντισωμάτων εκφράστηκαν ως log₁₀ της μεγαλύτερης αραιώσης στην οποία δεν παρατηρήθηκε CPE (π.χ log₁₀ 1:10 =1).

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του τεστ οροεξουδετέρωσης. Το Student's t-test (Paired samples test) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκρίνουμε τον μέσο όρο του τίτλου αντισωμάτων της ηλικιακής ομάδας 1-40 (μέσος όρος των τίτλων αντισωμάτων των 4 ηλικιακών ομάδων 1-10, 11-20, 21-30 και 31-40) που παρατηρήθηκε έναντι κάθε πρότυπου εμβολιακού στελέχους (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) με τους μέσους όρους που παρατηρήθηκαν έναντι κάθε εμβολιοσυνδεδεμένου πολιοϊού του ίδιου οροτύπου. Το Oneway ANOVA test (Duncan's Multiple Range Test) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκρίνουμε τους μέσους όρους των τίτλων αντισωμάτων έναντι του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin και

των εμβολιοσυνδεόμενων πολιτών του ίδιου οροτύπου μεταξύ των ηλικιακών ομάδων 1-10, 11-20, 21-30 και 31-40.



Εικόνα 2.4. Πλάκα οροεξουδετέρωσης , σε κάθε πλάκα εξετάζονται δυο διαφορετικά μίγματα ορού ($\Delta 1, \Delta 2$) τα οποία καταλαμβάνουν το καθένα από 2 οριζόντιες σειρές (C&D, E&F αντίστοιχα). Το pool των ορών με συγκέντρωση 1/10 που αντιστοιχεί στη θέση 1 υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την αραιώση 1/1280 που αντιστοιχεί στη θέση 8. Στις θέσεις 9 και 10 βρίσκονται οι μάρτυρες: cell control (c.c) και virus control (v.c) αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΙΣ 5'-NCR ΚΑΙ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών τα οποία μελετήθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές, στις οποίες εδράζονται οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου φαινοτύπου των Sabin εμβολιακών στελεχών, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

3.1.1 RFLP ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα ιικά στελέχη I1, I2 και I3-I13 των οποίων ο ορότυπος είχε προσδιοριστεί ως P1 (Poliovirus type 1) και P2 (Poliovirus type 2), αντίστοιχα, μελετήθηκαν για τον καθορισμό του γενότυπου τους στην 5'-NCR περιοχή βάσει της δημοσίευσης των Georgoroulou & Markoulatos, 2000. Όλα τα ιικά στελέχη (I1-I13) ήταν εμβολιακής προέλευσης και συγκεκριμένα ο γενότυπος των I1, I2 προσδιορίστηκε ως Sabin 1 ενώ των I3-I13 ως Sabin 2 (πίνακας 3.1).

3.1.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Για την ταυτοποίηση των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές, πραγματοποιήθηκε στοίχιση των 5'-NCR και VP1 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ιικών στελεχών I1-I13 με τις 5'-NCR και VP1 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αντίστοιχων πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1 και Sabin 2). Για την ταυτοποίηση των αμινοξικών υποκαταστάσεων στην VP1 πρωτεΐνη του καψιδίου, πραγματοποιήθηκε στοίχιση των VP1 αμινοξικών αλληλουχιών των ιικών στελεχών I1-I13 με τις VP1 αμινοξικές αλληλουχίες των αντίστοιχων πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1 και Sabin 2). Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές των ιικών στελεχών I1-13 παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις 5'-NCR και VP1 περιοχές των ιικών στελεχών I1-I13. Με * φαίνονται οι μεταλλάξεις που οδήγησαν σε αμινοξική αλλαγή. Το % ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στην VP1 περιοχή του κάθε ιικού δείγματος με το μήκος της VP1 περιοχής (σε bp) του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 (AY184219) ή Sabin 2 (AY184220) στο οποίο αντιστοιχεί το δείγμα.

Στέλεχος	Γενότοπος στην 5'-NCR	Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην 5'-NCR	Νουκλεοτιδικές και αμινοξικές μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή	% απόκλιση από την VP1 του Sabin 1 ή 2
I1	Sabin 1	U525C C583G	A2623G A2749G* Ile90Met	0,22%
I2	Sabin 1	C583G	A3022G	0,11%
I3	Sabin 2	G302A A481G C584G	A2908G* Ile143Val	0,11%
I4	Sabin 2	A481G U575A C584G	A2906U	0,11%
I5	Sabin 2	U398C U437C A481G C576U C584G	U2909A* Ile143Asn C3252U	0,22%
I6	Sabin 2	C584G	-	0%
I7	Sabin 2	A481G C584G U597A	A2859G U2888G* Phe136Cys U2909C* Ile143Thr	0,33%
I8	Sabin 2	A481G C584G	A2908G* Ile143Val U3330C	0,22%
I9	Sabin 2	A481G C584G	-	0%
I10	Sabin 2	A481G U567A	-	0%
I11	Sabin 2	U398C A481G C584G	-	0%
I12	Sabin 2	U398C A481G C584G	U2909C* Ile143Thr	0,11%
I13	Sabin 2	U398C A481G C584G	U2736C U2909C* Ile143Thr	0,22%

3.1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ VP1 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Όλα τα ιϊκά στελέχη (I1-13) εμφάνισαν < 1 % ποσοστό νουκλεοτιδικής απόκλισης στην VP1 περιοχή σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin και κατά συνέπεια χαρακτηρίστηκαν ως OPV-like ιοί. Συγκεκριμένα, μεταξύ των I1-I13 ιϊκών στελεχών, παρατηρήθηκαν τα ποσοστά απόκλισης 0.22 % (4 στελέχη), 0.11 % (4 στελέχη), 0 % (4 στελέχη) και 0.33 % (1 στέλεχος) (πίνακας 3.1).

3.1.4 ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ

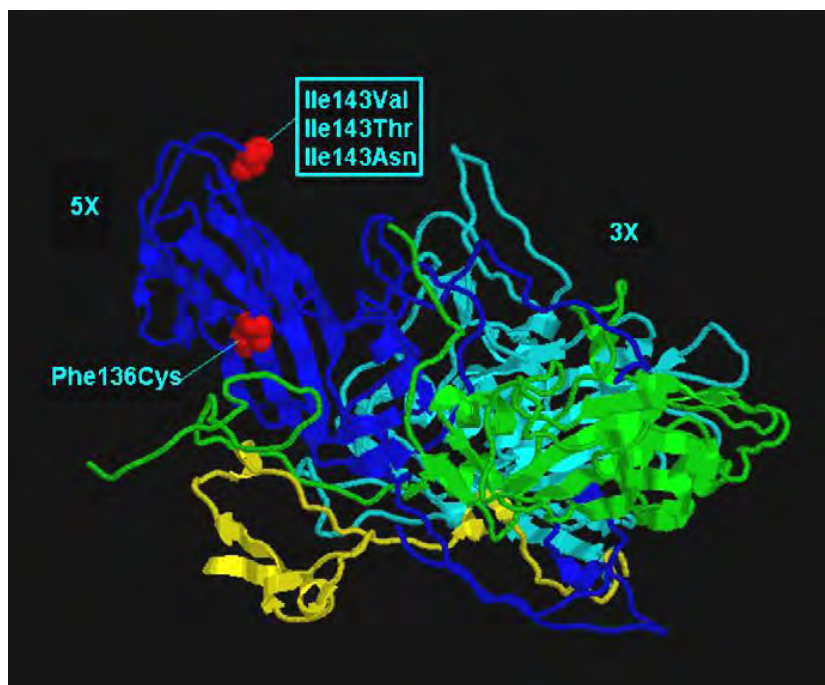
Οι αμινοξικές υποκαταστάσεις, οι οποίες προέκυψαν από μη-συνώνυμες μεταλλάξεις, απεικονίστηκαν στην τρισδιάστατη δομή του πρωτομερούς (1 ASJ.pdb) ώστε να εντοπίσουμε την ακριβή τους θέση και να προσδιορίσουμε τον πιθανό τους ρόλο στην αρμοστικότητα του ιού.

Ιϊκά στελέχη γενότυπου Sabin 1

Το ποσοστό των συνώνυμων μεταλλάξεων στην VP1 περιοχή των Sabin 1 ιϊκών στελεχών ήταν 67 % το οποίο είναι σύμφωνο με το γενικό πρότυπο μεταλλάξεων των πολιοϊών σύμφωνα με το οποίο οι συνώνυμες μεταλλάξεις υπερτερούν των μη-συνώνυμων (Cherkasova et al. 2002; Figlerowicz et al. 2003). Επιπλέον, το ποσοστό των μεταπτώσεων (transitions) ήταν 100 % το οποίο συμφωνεί με την τάση της ιϊκής 3D^{pol} να εισάγει κυρίως μεταπτώσεις (A ↔ G, T ↔ C) κατά την διάρκεια της ιϊκής αντιγραφής (Agol 2002). Στα Sabin 1 ιϊκά στελέχη, μόνο μία αμινοξική υποκατάσταση εντοπίστηκε το οποίο πιθανόν οφείλεται στον μικρό αριθμό των στελεχών που μελετήθηκαν (I1, I2). Συγκεκριμένα, στο ιϊκό στέλεχος I1 εντοπίστηκε η αμινοξική υποκατάσταση Ile90Met ενώ στο ιϊκό στέλεχος I2 δεν εντοπίστηκαν αμινοξικές υποκαταστάσεις. Η αμινοξική υποκατάσταση Ile90Met εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου, στην αντιγονική θέση N-AgI.

Ίικά στελέχη γενότυπου Sabin 2

Το ποσοστό των συνώνυμων μεταλλάξεων στην VP1 περιοχή των Sabin 2 ιϊκών στελεχών ήταν 42 %. Κατά συνέπεια, αυτά τα ιϊκά στελέχη εμφάνισαν μια προτίμηση στις μη-συνώνυμες μεταλλάξεις με άμεση επίδραση στην αρμοστικότητα του ιού, παρά στις συνώνυμες μεταλλάξεις οι οποίες αλλάζουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία χωρίς να αλλάζουν την αρμοστικότητα (χωρίς άμεση φαινοτυπική επίδραση). Επιπλέον το ποσοστό των μεταπτώσεων ήταν 75 % το οποίο συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Cherkasova et al. 2002). Έξι ιϊκά στελέχη τύπου Sabin 2 εμφάνισαν μετάλλαξη στη θέση 143 στην οποία η ισολευκίνη (Ile) αντικαταστάθηκε από βάλινη (Val), ασπαραγίνη (Asn) ή θρεονίνη (Thr). Το κατάλογο 143 της VP1 εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου στην θηλιά DE (DE loop) η οποία συνδέει τους β-κλώνους D και E της VP1 (Εικόνα 3.1). Το ιϊκό στέλεχος I7 εμφάνισε επίσης την μετάλλαξη Phe136Cys. Το κατάλογο 136 της VP1 εντοπίζεται στην περιοχή πρόσδεσης ενός μορίου σφιγγοσίνης όπου η αρωματική πλευρική αλυσίδα της φαινυλαλανίνης (Phe) αλληλεπιδρά με το μόριο της σφιγγοσίνης (Εικόνα 3.1). Τα ιϊκά στελέχη I6, I9, I10 και I11 δεν εμφάνισαν νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή.



Εικόνα 3.1. Απεικόνιση αμινοξικών αλλαγών των Sabin 2 στελεχών στο καψιδιακό πρωτομερές. Χρησιμοποιήθηκε η δομή 1ASJ.pdb (Wien et al., 1997). Αρίθμηση σύμφωνα με AY184220. Η VP1 πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με μπλε, η VP2 με κυανό, η VP3 με πράσινο και η VP4 με κίτρινο. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο σε κόκκινο χρώμα.

3.1.5 ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ 5'-NCR ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ IRES ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ

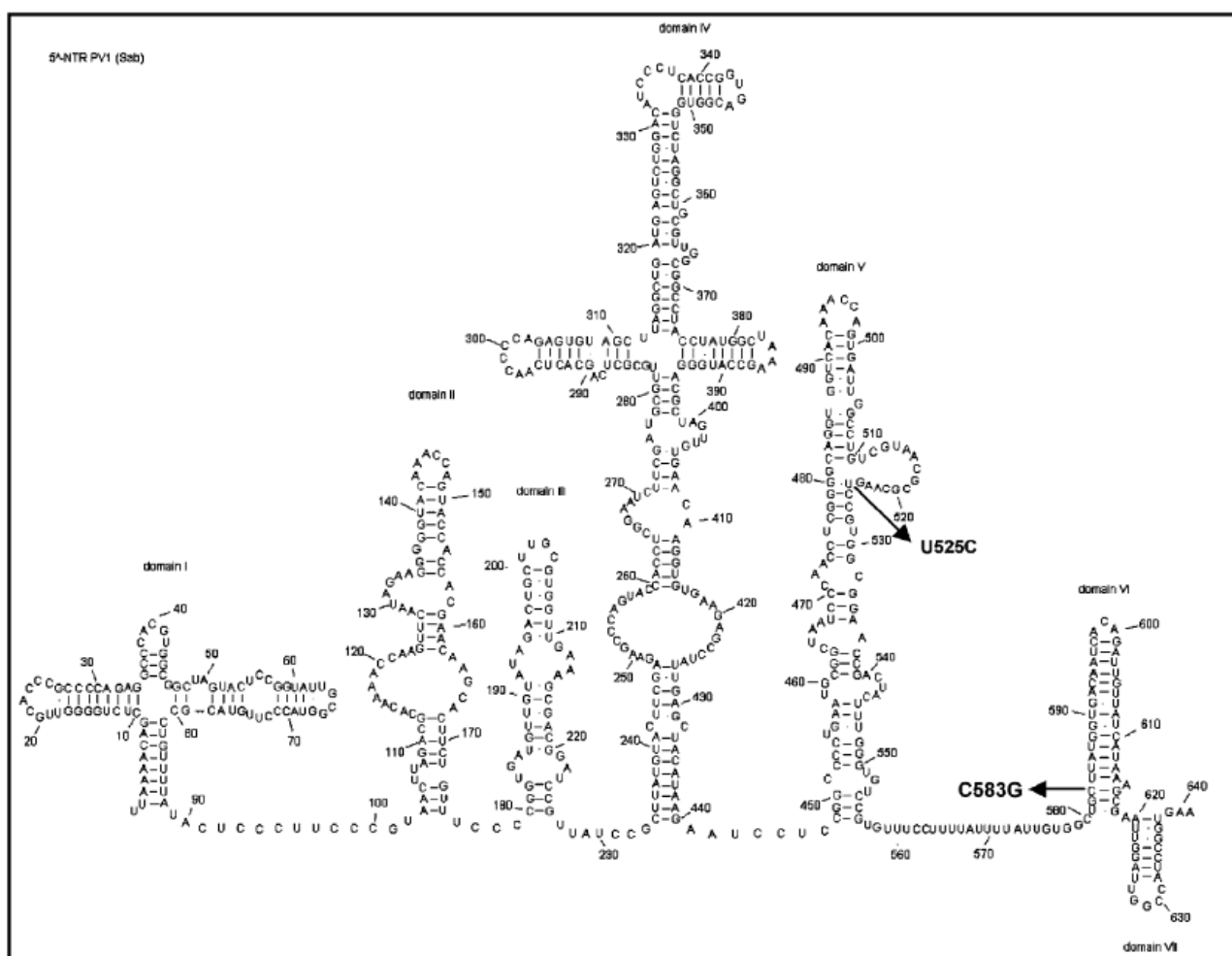
Οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στην 5'-NCR περιοχή των ιϊκών στελεχών (I1-I13) απεικονίστηκαν στην δευτεροταγή δομή του IRES γενετικού στοιχείου των αντίστοιχων πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin, προκειμένου να προσδιορίσουμε την ακριβή θέση τους και τον πιθανό ρόλο τους στην αρμοστικότητα του ιού.

Ιϊκά στελέχη γενότυπου Sabin 1

Το ποσοστό των μεταπτώσεων στην 5'-NCR περιοχή ήταν 33% και πιθανόν οφείλεται στον μικρό αριθμό των ιϊκών στελεχών που μελετήθηκαν (I1, I2). Και στα δυο ιϊκά στελέχη βρέθηκε η μετάλλαξη C583G η οποία εντοπίζεται στην περιοχή VI του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (Εικόνα 3.2). Επιπλέον, η μετάλλαξη U525C βρέθηκε στο ιϊκό στέλεχος I1. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται στην περιοχή V του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (Εικόνα 3.2).

Ιϊκά στελέχη γενότυπου Sabin 2

Το ποσοστό των μεταπτώσεων στην 5'-NCR περιοχή ήταν 57% το οποίο συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Cherkasova et al. 2002). Σε όλα σχεδόν τα Sabin 2 ιϊκά στελέχη βρέθηκε η μετάλλαξη A481G εκτός του ιϊκού στελέχους I6. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται στην περιοχή V του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου. Επιπλέον, η μετάλλαξη U398C βρέθηκε σε τέσσερα ιϊκά στελέχη. Η μετάλλαξη U398C καθώς και η μετάλλαξη U437C η οποία βρέθηκε στο ιϊκό στέλεχος I5 εντοπίζονται σε ένα δίκλωνο τμήμα της περιοχής IV του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου. Είναι αξιοσημείωτη η παρουσία της μετάλλαξης C584G σε δέκα ιϊκά στελέχη. Η μετάλλαξη C584G καθώς και η μετάλλαξη U597A η οποία βρέθηκε στο ιϊκό στέλεχος I7 εντοπίζονται σε ένα δίκλωνο τμήμα του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στον μίσχο (stem) της VI περιοχής. Τέλος οι μεταλλάξεις U567A στο στέλεχος I10, U575A στο στέλεχος I4 και C576U στο στέλεχος I5 εντοπίζονται σε μονόκλινα τμήματα του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στην μεταβλητή περιοχή (Xm) του συντηρημένου μοτίβου Yn-Xm-AUG.



Εικόνα 3.2. Οι μεταλλάξεις των Sabin 1 ιικών στελεχών που μελετήθηκαν, απεικονίζονται στην δευτεροταγή δομή της 5'-NCR περιοχής του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1.

3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταλλάξεων (σε θέσεις καθοριστές του εξασθενημένου και θερμοευαίσθητου φαινοτύπου των Sabin εμβολιακών στελεχών) και ανασυνδυασμών με φαινοτυπικές ιδιότητες όπως η θερμοευαισθησία (RCT test) και η κινητική ανάπτυξης (one-step growth curve test). Συνολικά μελετήθηκαν 14 ιικά στελέχη εκ των οποίων 6 ιικά στελέχη φέρουν απλούς ανασυνδυασμούς, 6 ιικά στελέχη φέρουν διπλούς ανασυνδυασμούς και δύο ιικά στελέχη τα οποία δεν φέρουν ανασυνδυασμό (πίνακες 2.2 και 2.3).

3.2.1 ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ίικά στελέχη με απλό ανασυνδυασμό

Οι γενότυποι των ιϊκών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές προσδιορίστηκαν μέσω αλληλούχισης. Έτσι συνολικά μελετήθηκαν ένα ιϊκό στέλεχος γενοτύπου Sabin 1, τέσσερα ιϊκά στελέχη γενοτύπου Sabin 2 και τρία ιϊκά στελέχη γενοτύπου Sabin 3 (πίνακας 3.4). Μεταξύ των 8 ιϊκών στελεχών, δύο (II και 729) είναι μη-ανασυνδυασμένα. Τα υπόλοιπα ιϊκά στελέχη (EP9, IF, ID, EP12, EP16 και EP23) είναι απλά ανασυνδυασμένα (φέρουν μία θέση ανασυνδυασμού). Ο τύπος ανασυνδυασμού είναι S2/S1 για 4 ιϊκά στελέχη (EP9, IF, ID, EP12) και η θέση ανασυνδυασμού εντοπίζεται στην 3D περιοχή για τα στελέχη IF και EP12, στην 3C περιοχή για το στέλεχος ID και στην 3A περιοχή για το στέλεχος EP9. Τα ιϊκά στελέχη EP16 και EP23 φέρουν S3/S2 και S3/S1 ανασυνδυασμούς αντίστοιχα και η θέση ανασυνδυασμού εντοπίζεται στην 2C περιοχή (πίνακας 2.2).

Ίικά στελέχη με διπλό ανασυνδυασμό

Οι γενότυποι των ιϊκών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές προσδιορίστηκαν μέσω αλληλούχισης. Συνολικά μελετήθηκαν δυο ιϊκά στελέχη γενοτύπου Sabin 1 και έξι ιϊκά στελέχη γενοτύπου Sabin 3 (πίνακας 3.6). Μεταξύ των 8 ιϊκών στελεχών, δυο (II και 729) είναι μη-ανασυνδυασμένα και έξι φέρουν διπλό ανασυνδυασμό (δυο θέσεις ανασυνδυασμού). Οι θέσεις ανασυνδυασμού του ιϊκού στελέχους 742 προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία ενώ οι θέσεις ανασυνδυασμού των υπολοίπων στελεχών (EPA, EPB, LK3, LK6 και LK10) προσδιορίστηκαν σε προηγούμενες εργασίες (πίνακας 2.3). Το ιϊκό στέλεχος 742 φέρει διπλό ανασυνδυασμό τύπου S1/S3/S2 με την πρώτη θέση ανασυνδυασμού να εντοπίζεται στην 2A περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3461-3465 και την δεύτερη θέση να εντοπίζεται στην 2C περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4511-4527. Τα ιϊκά στελέχη EPA και EPB φέρουν διπλό ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S3 με τις θέσεις ανασυνδυασμού να εντοπίζονται στις 2C και 3D περιοχές ενώ τα ιϊκά στελέχη LK3, LK6 και LK10 φέρουν διπλό ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S1 με τις θέσεις ανασυνδυασμού να εντοπίζονται στην 2C περιοχή (πίνακας 2.3).

3.2.2 ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Το RCT τεστ βασίζεται σε μια σύγκριση του θερμοευαίσθητου πολλαπλασιασμού των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin και του μη-θερμοευαίσθητου πολλαπλασιασμού νευρομολυσματικών ιικών στελεχών.

Ιικά στελέχη με απλό ανασυνδυασμό

Το μη-ανασυνδυασμένο Sabin 1 ιικό στέλεχος (II) εμφάνισε μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμή ίση με 2.0 μονάδες. Τρία από τα ανασυνδυασμένα Sabin 2 ιικά στελέχη (EP9, IF, ID: S2/S1) εμφάνισαν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 0.0-0.75 μονάδες ενώ ένα ιικό στέλεχος (EP12: S2/S1) εμφάνισε μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμή ίση με 1.75 μονάδες. Και τα δυο ανασυνδυασμένα Sabin 3 ιικά στελέχη (EP16: S3/S2) και (EP23: S3/S1), εμφάνισαν μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμές 1.0 και 1.5 μονάδων, αντίστοιχα. Το μη-ανασυνδυασμένο Sabin 3 ιικό στέλεχος (729) εμφάνισε θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμή ίση με 3.5 μονάδες (πίνακας 3.2).

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin1, Sabin2, Sabin3) εμφάνισαν, όπως ήταν αναμενόμενο, RCT τιμές μεγαλύτερες των 2.0 μονάδων (πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Αναπαραγωγική ικανότητα των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με απλούς ανασυνδυασμούς και των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) στους 37°C και 40°C (RCT τεστ). Επίσης προσδιορίστηκε η αναπαραγωγική ικανότητα δυο ιικών στελεχών (II και 729) τα οποία δεν φέρουν ανασυνδυασμούς.

Ιικό στέλεχος	Τίτλος (log TCID ₅₀ /0.1ml)		Rct τιμή (Δ log TCID ₅₀ /0.1ml)
	37°C	40°C	
II	3,5	1,5	2,0
EP9	4,5	3,75	0,75
IF	3,25	3,25	0,0
ID	3,5	3,5	0,0
EP12	3,5	1,75	1,75
EP16	4,25	3,25	1,0
EP23	4,0	2,5	1,5
729	5,0	1,5	3,5
Sabin 1	6,0	2,5	3,5
Sabin 2	5,0	2,0	3,0
Sabin 3	6,0	2,5	3,5

Ίικά στελέχη με διπλό ανασυνδυασμό

Και τα δυο Sabin 1 Ίικά στελέχη (742: S1/S3/S2 και II: μη-ανασυνδυασμένο) εμφάνισαν μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμές ίσες με 2.0 μονάδες. Δυο από τα ανασυνδυασμένα Sabin 3 Ίικά στελέχη (EPA και EPB: S3/S2/S3) και το μη-ανασυνδυασμένο 729 εμφάνισαν θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμές ίσες με 3.5 μονάδες. Τρία από τα ανασυνδυασμένα Sabin 3 Ίικά στελέχη (LK3, LK6, LK10: S3/S2/S1) εμφάνισαν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο με RCT τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 0.0-0.75 μονάδες (πίνακας 3.3).

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin1, Sabin2, Sabin3) εμφάνισαν, όπως ήταν αναμενόμενο, RCT τιμές μεγαλύτερες των 2.0 μονάδων (πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3. Αναπαραγωγική ικανότητα των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με διπλούς ανασυνδυασμούς και των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1 και Sabin 3) στους 37°C και 40°C (RCT τεστ). Επίσης προσδιορίστηκε η αναπαραγωγική ικανότητα δυο Ίικών στελεχών (II και 729) τα οποία δεν φέρουν ανασυνδυασμούς.

Ίικό στέλεχος	Τίτλος (log TCID ₅₀ /0.1ml)		Rct τιμή (Δ log TCID ₅₀ /0.1ml)
	37°C	40°C	
742	4,75	2,75	2,0
II	3,5	1,5	2,0
EPA	7,0	3,5	3,5
EPB	6,75	3,25	3,5
LK3	6,25	6,25	0
LK6	6,25	6,25	0
LK10	4,75	4,0	0,75
729	5,0	1,5	3,5
Sabin 1	6,0	2,5	3,5
Sabin 3	6,0	2,5	3,5

3.2.3 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Για να προσδιορίσουμε εάν ο θερμοευαίσθητος φαινότυπος, όπως αυτός καθορίζεται μέσω του RCT τεστ, σχετίζεται με ελαττώματα πολλαπλασιασμού του ιού, πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής ανάπτυξης για κάθε Ίικό στέλεχος μέσω της κατασκευής γραφικών παραστάσεων ανάπτυξης ενός

σταδίου (one-step growth curve test). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ρυθμών ανάπτυξης και των ιικών τίτλων στους 37°C και 40°C για 0-12 ώρες μετά την μόλυνση καθενός από τα εμβολιοσυνδεόμενα ιικά στελέχη με τους ρυθμούς ανάπτυξης και τους ιικούς τίτλους του αντιστοιχού γενοτύπου των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 ή Sabin 3).

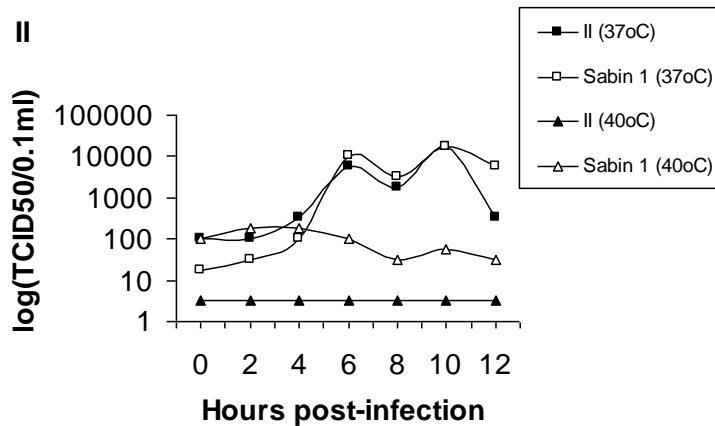
Ιικά στελέχη με απλό ανασυνδυασμό

Το μη-ανασυνδυασμένο Sabin 1 ιικό στέλεχος (II) αναπτύχθηκε με κινητική παρόμοια με εκείνη του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 (Εικόνα 3.3). Στους 37°C, το στέλεχος II εμφάνισε μια πρώτη κορυφή στις 6 ώρες μετά την μόλυνση και έφτασε στον ίδιο μέγιστο τίτλο με το Sabin 1 πρότυπο εμβολιακό στέλεχος στις 10 ώρες μετά την μόλυνση. Στους 40°C, η ανάπτυξη του παρεμποδίστηκε όπως και του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1.

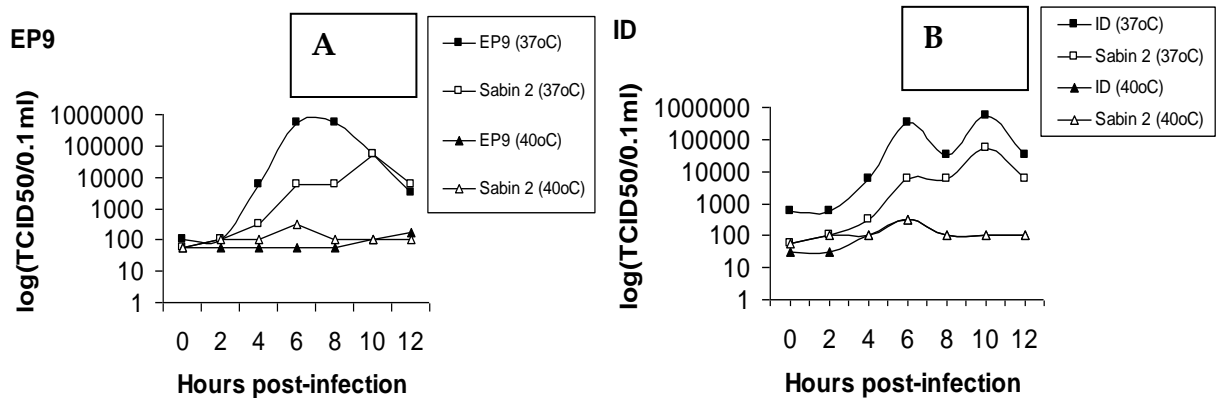
Δυο από τα ανασυνδυασμένα Sabin 2 ιικά στελέχη (EP9 και EP12) εμφάνισαν διαφορετική κινητική ανάπτυξης από εκείνη του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 2. Συγκεκριμένα, τα στελέχη EP9 (Εικόνα 3.4) και EP12 έφτασαν στον μέγιστο τίτλο νωρίτερα (6 ώρες μετά την μόλυνση) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 (10 ώρες μετά την μόλυνση). Επιπλέον, τα στελέχη EP9 και EP12 εμφάνισαν 1.0-2.0 log₁₀ μονάδες υψηλότερο ιικό φορτίο σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 στις 4, 6 και 8 ώρες μετά την μόλυνση. Τα υπόλοιπα δυο ανασυνδυασμένα Sabin 2 ιικά στελέχη, IF και ID (Εικόνα 3.4), εμφάνισαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2. Ωστόσο, το στέλεχος ID εμφάνισε υψηλότερο ιικό φορτίο από ότι το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 σε κάθε χρονική στιγμή μετά την μόλυνση. Στους 40°C, η ανάπτυξη όλων των Sabin 2 ιικών στελεχών παρεμποδίστηκε όπως και του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 2.

Όλα τα Sabin 3 ιικά στελέχη εμφάνισαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης με εκείνη του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 3 φτάνοντας στον μέγιστο τίτλο στις 10 ώρες μετά την μόλυνση. Ωστόσο, το στέλεχος EP16 εμφάνισε 1.0-2.0 log₁₀ μονάδες υψηλότερο ιικό φορτίο στις 4 και 6 ώρες μετά την μόλυνση και 1 log₁₀ μονάδα υψηλότερο τελικό ιικό φορτίο (12 ώρες μετά την μόλυνση) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3. Επίσης, το στέλεχος EP23 εμφάνισε 2.0-2.5 log₁₀ μονάδες υψηλότερο ιικό φορτίο στις 0, 2, 4 και 6 ώρες μετά την μόλυνση σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3

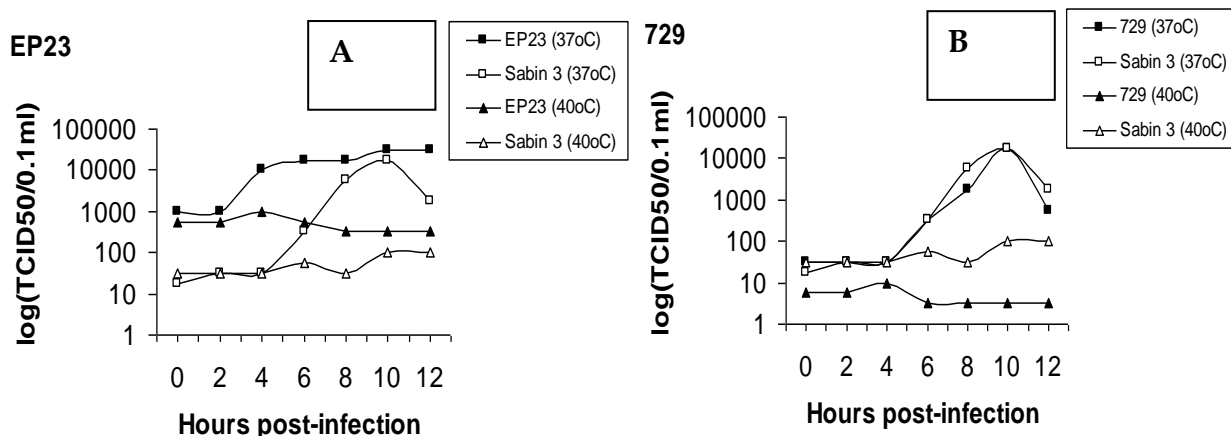
(Εικόνα 3.5). Αντίθετα, το μη-αναασυνδασμένο Sabin 3 ιικό στέλεχος (729) αναπτύχθηκε όπως το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 (Εικόνα 3.5), εμφανίζοντας τον ίδιο τίτλο σε κάθε χρονική στιγμή μετά την μόλυνση. Στους 40°C, η ανάπτυξη όλων των Sabin 3 ιικών στελεχών παρεμποδίστηκε όπως και του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 3.



Εικόνα 3.3. Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου του Sabin 1 ιικού στελέχους II σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 σε Hep2 κύτταρα. Παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης στους 37°C και 40°C για 0-12 ώρες μετά την μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) ή 10 TCID₅₀/cell.



Εικόνα 3.4. Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου των Sabin 2 ιικών στελεχών EP9 (A) και ID (B) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 σε Hep2 κύτταρα. Παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης στους 37°C και 40°C για 0-12 ώρες μετά την μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) ή 10 TCID₅₀/cell.

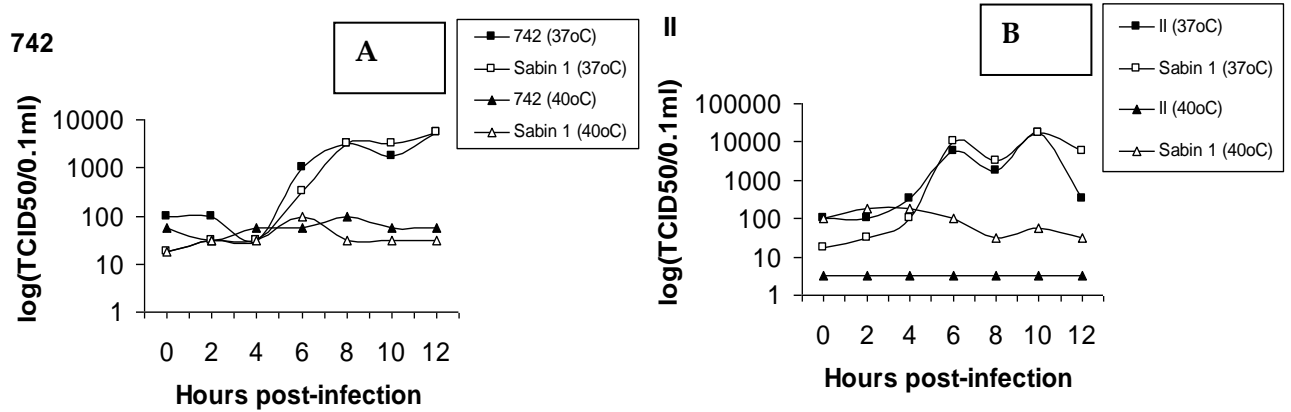


Εικόνα 3.5. Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου των Sabin 3 ιϊκών στελεχών EP23 (A) και 729 (B) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 σε Hep2 κύτταρα. Παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης στους 37°C και 40°C για 0-12 ώρες μετά την μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) ή 10 TCID₅₀/cell.

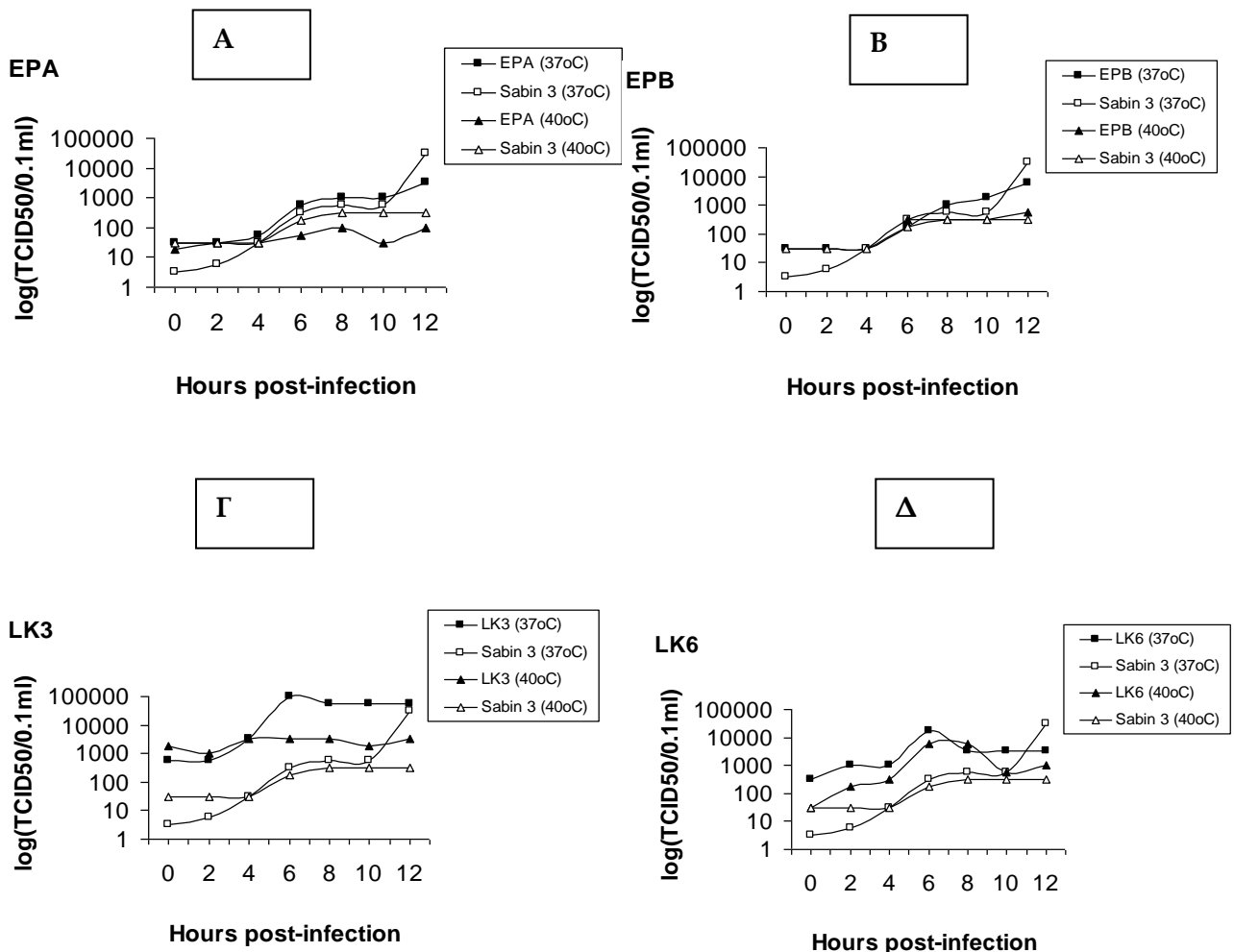
Ιϊκά στελέχη με διπλό ανασυνδυασμό

Και τα δυο Sabin 1 ιϊκά στελέχη (742: S1/S3/S2 και II: μη-ανασυνδυασμένο) αναπτύχθηκαν με κινητική παρόμοια με εκείνη του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 εμφανίζοντας αύξηση του ιϊκού φορτίου μετά τις 4 ώρες μόλυνσης στους 37°C ενώ στους 40°C η ανάπτυξή τους παρεμποδίστηκε όπως και του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 (Εικόνα 3.6).

Δυο από τα ανασυνδυασμένα Sabin 3 ιϊκά στελέχη (EPA: S3/S2/S3 και EPB: S3/S2/S3) (Εικόνα 3.7) και το μη-ανασυνδυασμένο στέλεχος 729 εμφάνισαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C. Τρία από τα ανασυνδυασμένα Sabin 3 ιϊκά στελέχη (LK3, LK6, LK10: S3/S2/S1) (Εικόνα 3.7) εμφάνισαν κινητική ανάπτυξης διαφορετική από εκείνη του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 3. Συγκεκριμένα, τα στελέχη LK3, LK6 και LK10 εμφάνισαν 1.0-3.0 και 1.0-2.0 log₁₀ μονάδες υψηλότερο ιϊκό φορτίο σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 σε κάθε χρονική στιγμή μετά την μόλυνση στους 37°C και 40°C, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.6. Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου των Sabin 1 ιικών στελεχών 742 (A) και II (B) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 σε Hep2 κύτταρα. Παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης στους 37°C και 40°C για 0-12 ώρες μετά την μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) ή 10 TCID₅₀/cell.



Εικόνα 3.7. Καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου των Sabin 3 ιικών στελεχών EPA (A), EPB (B), LK3 (Γ) και LK6 (Δ) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 σε Hep2 κύτταρα. Παρουσιάζεται η κινητική ανάπτυξης στους 37°C και 40°C για 0-12 ώρες μετά την μόλυνση με 10 MOI (multiplicity of infection) ή 10 TCID₅₀/cell.

3.2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Σε μια προσπάθεια να συσχετισθούν οι φαινοτυπικές ιδιότητες των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με μοριακούς δείκτες, αναλύθηκαν οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες των ιϊκών στελεχών προκειμένου να εντοπισθούν μεταλλάξεις σε θέσεις που αποτελούν καθοριστές του εξασθενημένου και θερμοευαίσθητου φαινοτύπου των Sabin εμβολιακών στελεχών.

Οι αλληλουχίες των 5'-NCR, VP1, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D γενωμικών περιοχών αναλύθηκαν και μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια του εξασθενημένου και θερμοευαίσθητου φαινοτύπου των Sabin εμβολιακών στελεχών ταυτοποιήθηκαν στο γένωμα όλων των ιϊκών στελεχών.

Ιϊκά στελέχη με απλό ανασυνδυασμό

Στο μη-ανασυνδυασμένο Sabin 1 ιϊκό στέλεχος (II), ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη U525C (Πίνακας 3.4). Η μετάλλαξη U525C αποκαθιστά τη σταθερότητα ενός ζεύγους βάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων 480 και 525 (AU στο στέλεχος αγρίου τύπου Mahoney, GU στο πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 και GC στο στέλεχος II) στην περιοχή V της 5'-NCR και έχει συσχετιστεί με την αναστροφή προς τη νευρομολυσματικότητα (Christodoulou et al., 1990; Rezarikin et al., 1994). Το στέλεχος II εμφάνισε επίσης την μετάλλαξη C583G στην 5'-NCR περιοχή. Ταυτοποιήθηκε επίσης, στην VP1 κωδική περιοχή, η αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 2795 (A→G [Thr-106-Ala]), που είναι ένας γνωστός καθοριστής εξασθένισης (Christodoulou et al., 1990; Bouchard et al., 1995). Το αμινοξικό κατάλοιπο 106 εντοπίζεται στο εξωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα στην BC θηλιά της VP1, και εμπλέκεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με ένα κατάλοιπο στη θέση 90 (Cherkasova et al., 2002). Επιπλέον, οι αμινοξικές υποκαταστάσεις Ala-96-Thr και Lys-99-Asn ταυτοποιήθηκαν στο στέλεχος II. Και οι δυο αυτές μεταλλάξεις εκτίθενται στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου και εντοπίζονται στην αντιγονική θέση N-AgI καθώς και στην BC θηλιά της VP1 η οποία συμμετέχει στον σχηματισμό του βόριου τμήματος της αύλακας και εμπλέκεται στην πρόσδεση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα CD155 (Minor et al., 1986; Harber et al., 1995; He et al., 2000). Η αμινοξική υποκατάσταση Glu-168-Gly εκτίθεται επίσης στην

εξωτερική πλευρά του καψιδίου και εντοπίζεται στην EF θηλιά της VP1 η οποία εμπλέκεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα CD155 (Harber et al., 1995; He et al., 2000). Η αμινοξική υποκατάσταση Gln-220-Arg εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου, στην αντιγονική θέση N-AgIIa site (Minor et al., 1986).

Όλα τα Sabin 2 ιικά στελέχη (EP9, EP12, IF, ID) παρουσίασαν τη μετάλλαξη A481G στην 5'-NCR (Πίνακας 3.4). Αυτή η αντικατάσταση αποτελεί αναστροφή προς τον γενότυπο αγρίου τύπου και έχει συνδεθεί με αυξημένη νευρομολυσματικότητα και θερμοανθεκτικότητα (Macadam et al., 1991; Georgescu et al., 1995; Muzychenko et al., 1991; Macadam et al., 1993; Minor et al., 1993; Guillot et al., 1994; Georgescu et al., 1994), πιθανόν μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού ενός νέου ζεύγους βάσεων μεταξύ των καταλοίπων 481 και 511, το οποίο θα προκαλούσε εξασθένιση στη δομή της 5'-NCR. Επιπλέον, η μετάλλαξη U398C ταυτοποιήθηκε σε δύο (EP9, IF) στελέχη και η μετάλλαξη U437C ταυτοποιήθηκε σε ένα (EP9) στέλεχος. Αυτές οι αντικαταστάσεις έχουν επίσης κάποια επίδραση στην εξασθένιση και την θερμοευαισθησία του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους αν και μικρότερη (Friedrich F, 1996). Και οι δύο αυτές μεταλλάξεις εντοπίζονται σε ένα δίκλωνο τμήμα της περιοχής IV του cis-acting γενετικού στοιχείου IRES και ειδικότερα μετατρέπουν ένα ζεύγος βάσεων GU σε GC. Είναι αξιοσημείωτη η παρουσία της μετάλλαξης C584G σε τρία Sabin 2 ιικά στελέχη (EP9, IF, EP12). Στη VP1 κωδική περιοχή, αμινοξικές αντικαταστάσεις στο κατάλοιπο 143 ταυτοποιήθηκαν σε δύο Sabin 2 ιικά στελέχη (EP9 και EP12). Το κατάλοιπο 143 εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια του ιικού καψιδίου στην DE θηλιά και η αντικατάσταση της Ile από Val, Thr ή Asn έχει συσχετιστεί με αυξημένη νευρομολυσματικότητα (Macadam et al., 1991; Georgescu et al., 1995; Muzychenko et al., 1991; Macadam et al., 1993; Georgescu et al., 1994; Equestre et al., 1991). Στο ιικό στέλεχος EP12 ταυτοποιήθηκε επίσης η αμινοξική υποκατάσταση Phe-136-Cys. Το κατάλοιπο 136 εντοπίζεται στην περιοχή πρόσδεσης ενός μορίου σφιγγοσίνης στην VP1.

Όλα τα Sabin 3 ιικά στελέχη (EP16, EP23, 729) παρουσίασαν τη μετάλλαξη U472C στην 5'-NCR (Πίνακας 3.4). Αυτή η αντικατάσταση αποτελεί αναστροφή προς τον γενότυπο αγρίου τύπου και έχει συνδεθεί με αυξανόμενη νευρομολυσματικότητα και θερμο-ανθεκτικότητα (Macadam et al., 1989;

Westrop et al., 1989; La Monica et al., 1987; La Monica et al., 1989; Chumakov et al., 1991). Τα νουκλεοτίδια 472 και 537 δημιουργούν ζεύγος στην 5'-NCR σε μια προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή. Η παρουσία της U στο νουκλεοτίδιο 472 της 5'-NCR του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους οδήγησε στην αντικατάσταση του ζεύγους βάσεων C-G (nt 472-537) του νευρομολυσματικού αγρίου τύπου στελέχους P3/Leon/37 από το ζεύγος βάσεων U-G του εμβολιακού στελέχους Sabin 3, φανερώνοντας ότι ο φαινότυπος εξασθένησης είναι μερικώς συνδεδεμένος με την εξασθένηση του ζευγαρώματος σε μια ιδιαίτερα διατηρημένη δευτεροταγή δομή. Είναι αξιοσημείωτη η παρουσία της μετάλλαξης C586G σε όλα τα Sabin 3 ιικά στελέχη. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται σε ένα δίκλωνο τμήμα της περιοχής VI του cis-acting γενετικού στοιχείου IRES και οδηγεί στην μετατροπή ενός ζεύγους βάσεων C-G σε G-G (mismatch) όπως και οι μεταλλάξεις C583G στο Sabin 1 ιικό στέλεχος (II) and C584G σε τρία Sabin 2 ιικά στελέχη (EP9, IF, EP12). Αυτές οι μεταλλάξεις πιθανόν παρέχουν ένα επλεκτικό πλεονέκτημα στα εμβολιοσυνδεδεμένα ιικά στελέχη καθώς παρατηρούνται συχνά (Pliaka et al. 2007). Στην VP1 κωδική περιοχή, όλα τα Sabin 3 ιικά στελέχη εμφάνισαν την αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 2493 (C→U [Thr-6-Ile] το οποίο είναι ένας καθοριστής εξασθένησης του εμβολιακού στελέχους Sabin 3 (Weeks-Levy et al., 1991; Tatem et al., 1992; Mento et al., 1993). Το κατάλοιπο 6 βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της VP1 στο εσωτερικό του καψιδίου και η αντικατάσταση της Thr από Ile πιθανόν ενισχύει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της VP1 και των ενδοσωμικών κυτταρικών μεμβρανών κατά τη διάρκεια της εισόδου του ιού στο κύτταρο (Tatem et al., 1992; Fricks et al., 1990). Στο ιικό στέλεχος EP23, ταυτοποιήθηκε επίσης η αμινοξική υποκατάσταση Ile-258-Val, η οποία είναι μερικώς εκτεθειμένη στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου και βρίσκεται κοντά στην αντιγονική θέση N-AgI.

Στην 2C-3D μη-δομική περιοχή του γενώματος των ιικών στελεχών, ταυτοποιήθηκαν επίσης νουκλεοτιδικές και αμινοξικές υποκαταστάσεις (Πίνακας 3.5). Ωστόσο, μόνο η αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 6203 (C→U [His-73-Tyr]) της κωδικής περιοχής της 3D πολυμεράσης έχει συσχετιστεί με τον εξασθενημένο και θερμοευαίσθητο φαινότυπο του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους (Christodoulou et al., 1990; Georgescu et al., 1995; Tardy-Panit et al., 1993; Georgescu et al., 1997; Martin et al., 1991; McGoldrick et al., 1995). Η

μετάλλαξη C6203U ταυτοποιήθηκε σε δύο Sabin 2 ανασυνδυασμένα ιικά στελέχη (EP9: S2/S1 και ID: S2/S1) σε Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο αλλά δεν ταυτοποιήθηκε στο ανασυνδυασμένο στέλεχος EP23 (S3/S1) το οποίο έχει επίσης Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο στην 3D περιοχή. Η 2C κωδική περιοχή είναι γνωστό ότι περιέχει μια διατηρημένη δευτεροταγή δομή μίσχου-θηλιάς (νουκλεοτίδια 4443-4504 σε πολιοϊό τύπου 2) η οποία λειτουργεί ως ένα απαραίτητο *cis-acting* στοιχείο αντιγραφής (CRE) που εμπλέκεται στην ουρυδιλίωση της ιϊκής πρωτεΐνης VPg (Paul et al., 2000; Rieder et al., 2000). Η αντικατάσταση οποιουδήποτε από τα τρία νουκλεοτίδια A μιας συντηρημένης αλληλουχίας AAACA (σε πολιοϊό τύπου 1 και 3) στη θηλιά του στοιχείου CRE μειώνει τόσο την ουρυδιλίωση της VPg όσο και την ιϊκή παραγωγή (Rieder et al., 2000). Η αντικατάσταση G4473A στο Sabin 2 ιικό στέλεχος EP9 (S2/S1), μετατρέπει την διατηρημένη αλληλουχία AAGCA του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους στη διατηρημένη αλληλουχία AAACA του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους. Έχει προταθεί ότι η παρουσία G στο νουκλεοτίδιο 4473 εμπλέκεται στον εξασθενημένο φαινότυπο του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους (Rieder et al., 2000).

Πίνακας 3.4. Μεταλλάξεις στις 5'-NCR και VP1 περιοχές των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με απλούς ανασυνδυασμούς και σύγκριση με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις των πρότυπων εμβολιακών στελεχών. Η αρίθμηση είναι σύμφωνα με τα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221). Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε περισσότερα του ενός ιικά στελέχη είναι υπογραμμισμένες.

Γενότυπος	Περιοχή	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin	Στέλεχος	Αμινοξική θέση	Sabin	Στέλεχος	Κωδικός καταχώρησης GeneBank		
Sabin 1	5'-NCR	II	525	U	C				EU598476		
			583	C	G						
Sabin 2		EP9	398	U	C				EU598464		
			437	U	C						
			<u>481</u>	A	G						
			<u>584</u>	C	G						
			576	C	U						
		IF	398	U	C				FJ609757		
			<u>481</u>	A	G						
			<u>584</u>	C	G						
		ID	481	A	G				FJ609758		
			567	U	A						
EP12		481	A	G				EU598465			
		597	U	A							
		<u>584</u>	C	G							
Sabin 3		EP16	472	U	C			EU598466			
			<u>586</u>	C	G						
		EP23	472	U	C			EU598468			
			<u>586</u>	C	G						
729	248	G	A			EU598477					
	<u>472</u>	U	C								
	<u>586</u>	C	G								
Sabin 1	VP1	II	2605	G	A	-	-	-	FJ609769		
			2765	G	A	96	Ala	Thr			
			2776	G	U	99	Lys	Asn			
			2795	A	G	106	Thr	Ala			
			2917	C	U	-	-	-			
			2982	A	G	168	Glu	Gly			
			3138	A	G	220	Gln	Arg			
			Sabin 2	EP9	<u>2909</u>	U	A	143	Ile	Asn	EU598478
					3252	C	U	-	-	-	
			IF	-	-	-	-	-	-	FJ609772	
			ID	-	-	-	-	-	-	FJ609773	
EP12	2859	A	G	-	-	-	EU598479				
	2888	U	G	136	Phe	Cys					
	<u>2909</u>	U	C	143	Ile	Thr					
Sabin 3	EP16	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609775			
		2608	A	G	-	-	-				
		3259	A	G	-	-	-				
	EP23	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	EU598480			
		3248	A	G	258	Ile	Val				
		3352	A	G	-	-	-				
		729	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609778		
2659	G	A	-	-	-						
2716	A	G	-	-	-						

Πίνακας 3.5. Μεταλλάξεις στην 2C-3D γενωμική περιοχή των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με απλούς ανασυνδυασμούς και σύγκριση με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις των πρότυπων εμβολιακών στελεχών. Η 2C-3D γενωμική περιοχή των μη-ανασυνδυασμένων στελεχών Π και 729 δεν αλληλουχίστηκε. Η αρίθμηση είναι σύμφωνα με τα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221). Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε περισσότερα του ενός ιϊκά στελέχη είναι υπογραμμισμένες.

Γενότυπος	Περιοχή	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin	Στέλεχος	Αμινοξική θέση	Sabin	Στέλεχος	Κωδικοί καταχώρησης GeneBank
S2	2C	EP9	4473	G	A	-			AY736178
S2		IF	4842	G	A	-			AY297764 (2C) AY297760 (3D)
S2		ID	4456	G	A	112	Val	Ile	EU715814
S2		EP12	4773 4174 4992	C C U	U	- 18 -	- Leu -	- Val -	AY736179
S3/S2	3A	EP16	-			-			AY736180
S3/S1		EP23	-			-			AY736181
S2/S1		EP9	5130/S2 ^a	U	C	-			
S2		IF	-			-			
S2		ID	-			-			
S2		EP12	-			-			
S2		EP16	-			-			
S1		EP23	5191	A	G	-			
S1		EP9	5389	A	U	-			
S2		IF	-			-			
S2	ID	-			-				
S2	EP12	-			-				
S2	EP16	-			-				
S1	EP23	-			-				
S1	3C	EP9	5665	U	C	-			
			5698	A	C	87	Arg	Ser	
			5720	A	C	95	Thr	Pro	
			5760	A	G	108	Lys	Arg	
			5959	G	A	-			
S2	3D	IF	-			-			
S2/S1		ID	-			-			
S2		EP12	-			-			
S2		EP16	-			-			
S1		EP23	5791	U	C	-			
S1		EP9	<u>6203</u> 6217	C A	U G	73 -	His	Tyr	
S2/S1		IF	-			-			
S1		ID	<u>6203</u> 6373	C U	U C	73 -	His	Tyr	
S2/S1		EP12	6781/S1 ^a	C	U	-			
S2		EP16	6219 6327	G U	A C	- -			
S1	EP23	6474 6484	G A	A U	163 -	Arg	Lys		

^a Η αρίθμηση είναι σύμφωνα με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 2 (AY184220) ή Sabin 1 (AY184219).

Ίικά στελέχη με διπλό ανασυνδυασμό

Οι μεταλλάξεις των ιϊκών στελεχών II και 729, τα οποία δεν φέρουν ανασυνδυασμούς, αναφέρθηκαν στο προηγούμενο τμήμα καθώς αυτά τα ιϊκά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν και στα δυο ανεξάρτητα πειράματα μελέτης της κινητικής ανάπτυξης (ιϊκά στελέχη με απλούς ανασυνδυασμούς και ιϊκά στελέχη με διπλούς ανασυνδυασμούς). Η μετάλλαξη G480A ταυτοποιήθηκε στην 5'-NCR περιοχή του Sabin 1 ιϊκού στελέχους 742 (πίνακας 3.6). Η μετάλλαξη αυτή όπως και η μετάλλαξη U525C του στελέχους II, αποκαθιστούν τη σταθερότητα ενός ζεύγους βάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων 480 και 525 (AU στο στέλεχος αγρίου τύπου Mahoney, GU στο πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 και AU στο στέλεχος 742) στην περιοχή V της 5'-NCR και έχουν συσχετιστεί με την αναστροφή προς τη νευρομολυσματικότητα (Christodoulou et al., 1990; Bouchard et al., 1995; Georgescu et al., 1995; Rezapkin et al., 1994; McGoldrick et al., 1995). Επιπλέον το στέλεχος 742 εμφάνισε την μετάλλαξη C583G της οποίας ο πιθανός ρόλος αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα καθώς ταυτοποιήθηκε και στο στέλεχος II. Στην VP1 κωδική περιοχή, η αμινοξική υποκατάσταση Lys-99-Asn ταυτοποιήθηκε στο στέλεχος 742 της οποίας ο ρόλος αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα καθώς αυτή η μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε και στο στέλεχος II.

Όλα τα Sabin 3 ιϊκά στελέχη (EPA, EPB, LK3, LK6, LK10, 729) εμφάνισαν την μετάλλαξη U472C στην 5'-NCR περιοχή (πίνακας 3.6), της οποίας ο ρόλος αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα. Είναι αξιοσημείωτη η παρουσία της μετάλλαξης C586G σε όλα τα Sabin 3 ιϊκά στελέχη η οποία επίσης αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα. Επιπλέον οι μεταλλάξεις C438U και A439G ταυτοποιήθηκαν σε τρία Sabin 3 ιϊκά στελέχη (LK3, LK6 και LK10). Και οι δυο αυτές μεταλλάξεις εντοπίζονται σε ένα δίκλωνο τμήμα της περιοχής IV του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου και μετατρέπουν τα ζεύγη βάσεων GC και UA σε GU and UG, αντίστοιχα. Στην VP1 κωδική περιοχή, όλα τα Sabin 3 ιϊκά στελέχη εμφάνισαν την αναστροφή στο νουκλεοτίδιο 2493 (C→U [Thr-6-Ile] της οποίας ο ρόλος αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα. Οι μεταλλάξεις C2637U→[Ala-54-Val] και U2790C→[Met-105-Thr] ταυτοποιήθηκαν σε τρία Sabin 3 ιϊκά στελέχη (LK3, LK6 και LK10). Το κατάλοιπο 54 εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου και θεωρείται ότι συμμετέχει σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών πρωτεϊνών VP1 και VP3

(Cherkasova et al., 2002). Το κατάλοιπο 105 εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου, στην BC θηλιά της VP1 και κοντά στην αντιγονική θέση N-AgI, η οποία συμμετέχει στον σχηματισμό του βόρειου τμήματος της αύλακας και εμπλέκεται στην πρόσδεση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα CD155 (Minor et al., 1986; Harber et al., 1995; He et al., 2000). Επιπλέον οι μεταλλάξεις C2855A και U2857A ταυτοποιήθηκαν σε τρία Sabin 3 ιικά στελέχη (LK3, LK6 και LK10). Οι μεταλλάξεις αυτές δεν οδηγούν σε αμινοξικές υποκαταστάσεις αλλά ίσως παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα για μια πιθανή δευτεροταγή RNA δομή σε αυτή την περιοχή η οποία χρησιμεύει ως cis-acting στοιχείο αντιγραφής. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από προηγούμενες μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν με την αναγνώριση cis-acting στοιχείων αντιγραφής στο γένωμα των picorna ιών (Lobert et al., 1999; McKnight and Lemon, 1996).

Στην 2C-3D μη-δομική περιοχή του γενώματος των ιικών στελεχών, ταυτοποιήθηκαν επίσης νουκλεοτιδικές και αμινοξικές υποκαταστάσεις (Πίνακας 3.7). Η αναστροφή C6203U→[His-73-Tyr] στην κωδική περιοχή της 3D πολυμεράσης, η οποία έχει συσχετισθεί με τον εξασθενημένο και θερμοευαίσθητο φαινότυπο του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους (Christodoulou et al., 1990; Georgescu et al., 1995; Tardy-Panit et al., 1993; Georgescu et al., 1997; Martin et al., 1991; McGoldrick et al., 1995), ταυτοποιήθηκε σε τρία ανασυνδυασμένα Sabin 3 ιικά στελέχη (LK3, LK6 and LK10: S3/S2/S1) σε ένα Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο. Είναι αξιοσημείωτη η παρουσία κάποιων μεταλλάξεων με άγνωστο λειτουργικό ρόλο σε περισσότερα από ένα ιικά στελέχη οι οποίες ίσως παρέχουν κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη A4171G ταυτοποιήθηκε στην 2C κωδική περιοχή δυο στελεχών (EPB και LK3) σε ένα Sabin 3 γενετικό υπόβαθρο. Στην 3A κωδική περιοχή, η μετάλλαξη U5214C ταυτοποιήθηκε σε δυο στελέχη (EPA και EPB) σε ένα Sabin 2 γενετικό υπόβαθρο και η μετάλλαξη A5269G ταυτοποιήθηκε επίσης σε δυο στελέχη (LK3 and LK10) σε ένα Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο. Στην 3C κωδική περιοχή, οι μεταλλάξεις C5641U και A5769U→[Asn-111-Ile] ταυτοποιήθηκαν σε τρία (LK3, LK6 και LK10) και δυο (LK3 και LK6) στελέχη, αντίστοιχα, σε ένα Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο. Στην 3D κωδική περιοχή, οι μεταλλάξεις A6019G και G6151A ταυτοποιήθηκαν σε τρία στελέχη (LK3, LK6 και LK10) ενώ οι μεταλλάξεις U6732C→[Leu-249-Pro] και

C6947U ταυτοποιήθηκαν σε δυο στελέχη (LK3 και LK10) σε ένα Sabin 1 γενετικό υπόβαθρο.

Πίνακας 3.6. Μεταλλάξεις στις 5'-NCR και VP1 περιοχές των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με διπλούς ανασυνδυασμούς και σύγκριση με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις των πρότυπων εμβολιακών στελεχών. Η αρίθμηση είναι σύμφωνα με τα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221). Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε περισσότερα του ενός τύκα στελέχη είναι υπογραμμισμένες.

Γενότυπος	Περιοχή	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin	Στέλεχος	Αμινοξική θέση	Sabin	Στέλεχος	Κωδικοί καταχώρησης GeneBank	
Sabin 1	5'-NCR	742	480	G	A				EU598472	
			<u>583</u>	C	G					
		II	525	U	C				EU598476	
			<u>583</u>	C	G					
		Sabin 3	EPA	472	U	C				EU598469
				<u>586</u>	C	G				
			EPB	472	U	C				EU598470
				<u>586</u>	C	G				
			LK3	438	C	U				FJ609747
				<u>439</u>	A	G				
<u>472</u>	U			C						
<u>586</u>	C			G						
LK6	438			C	U				FJ609748	
	<u>439</u>			A	G					
Sabin 1	VP1	742	2502	G	A	8	Ser	Asn	FJ609767	
			<u>2776</u>	G	U	99	Lys	Asn		
		2833	A	G	-					
		2904	U	G	142	Phe	Cys			
		II	2605	G	A	-			FJ609769	
			2765	G	A	96	Ala	Thr		
		<u>2776</u>	G	U	99	Lys	Asn			
		2795	A	G	106	Thr	Ala			
		2917	C	U	-					
		2982	A	G	168	Glu	Gly			
Sabin 3	EPA	3138	A	G	220	Gln	Arg			
		<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	EU598481		
		<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	EU598482		
		<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609761		
		<u>2637</u>	C	U	54	Ala	Val			
		<u>2790</u>	U	C	105	Met	Thr			
		<u>2855</u>	C	A	-					
		<u>2857</u>	U	A	-					

LK6	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609762
	<u>2637</u>	C	U	54	Ala	Val	
	<u>2790</u>	U	C	105	Met	Thr	
	<u>2855</u>	C	A	-			
	<u>2857</u>	U	A	-			
LK10	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609763
	<u>2637</u>	C	U	54	Ala	Val	
	<u>2790</u>	U	C	105	Met	Thr	
	<u>2855</u>	C	A	-			
	<u>2857</u>	U	A	-			
729	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609778
	2659	G	A	-			
	2716	A	G	-			

Πίνακας 3.7. Μεταλλάξεις στην 2C-3D γενωμική περιοχή των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με διπλούς ανασυνδυασμούς και σύγκριση με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές και αμινοξικές θέσεις των πρότυπων εμβολιακών στελεχών. Η 2C-3D γενωμική περιοχή των μη-ανασυνδυασμένων στελεχών II και 729 δεν αλληλουχίστηκε. Η αρίθμηση είναι σύμφωνα με τα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220) και Sabin 3 (AY184221). Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε περισσότερα του ενός υικά στελέχη είναι υπογραμμισμένες.

Γενότυπος	Περιοχή	Στέλεχος	Νουκλεοτιδική θέση	Sabin	Στέλεχος	Αμινοξική θέση	Sabin	Στέλεχος	Κωδικοί καταχώρησης GeneBank
S3/S2	2C	742	4929/S2	C	U	-			EU598488
			5029/S2	A	G	303	Ile	Val	
S3/S2		EPA	-	-	-	-			AY738635
S3/S2		EPB	4167/S3	U	G	18	Leu	Trp	AY738636
			<u>4171/S3</u>	A	G	-			
S3/S2/S1	LK3		<u>4171/S3</u>	A	G	-			DQ150697
				4213/S3	A	G	-		
				4332/S3	A	U	73	Gln	Leu
				4907/S2	U	G	262	Met	Arg
				5032/S1	U	C	-		
S3/S2/S1	LK6		-	-	-	-			DQ150698
S3/S2/S1	LK10		4316/S3	C	U	68	Pro	Ser	DQ150699
				4800/S2	G	U	-		
S2	3A	742	-	-	-	-			
S2			EPA	<u>5214</u>	U	C	-		
S2			EPB	<u>5214</u>	U	C	-		
S1			LK3	<u>5269</u>	A	G	-		
				5270	A	G	-		
			5272	G	A	54	Arg	Gly	
S1	3B	LK6	-	-	-	-			
S1		LK10	<u>5269</u>	A	G	-			
S2			742	-	-	-	-		
S2			EPA	-	-	-	-		
S2			EPB	-	-	-	-		
S1			LK3	-	-	-	-		
S1		LK6	-	-	-	-			
S1		LK10	-	-	-	-			

S2	3C	742	-	-	-	-			
S2		EPA	5781	C	U	-			
S2			5784	U	C	-			
		EPB	-	-	-	-			
S1		LK3	<u>5641</u>	C	U	-			
			<u>5769</u>	A	U	111	Asn	Ile	
S1		LK6	<u>5641</u>	C	U	-			
			<u>5769</u>	A	U	111	Asn	Ile	
			5911	C	U	-			
S1	3D	LK10	<u>5641</u>	C	U	-			
S2			742	U	A	-			
S2/S3			EPA	6071/S2	C	U	29	Ala	Val
S2/S3			EPB	-	-	-	-		
S1			LK3	<u>6019</u>	A	G	-		
				<u>6151</u>	G	A	-		
				<u>6203</u>	C	U	73	His	Tyr
				<u>6732</u>	U	C	249	Leu	Pro
				6784	C	U	-		
				<u>6947</u>	C	U	-		
				<u>6019</u>	A	G	-		
S1			LK6	<u>6151</u>	G	A	-		
				<u>6203</u>	C	U	73	His	Tyr
			6492	A	G	169	Glu	Gly	
			6493	G	A	-			
			6495	A	C	170	Gln	Pro	
			6496	G	A	-			
			6741	U	G	252	Val	Gly	
			6779	A	U	265	Ile	Phe	
			5991	A	G	2	Glu	Gly	
S1		LK10	<u>6019</u>	A	G	-			
			<u>6151</u>	G	A	-			
			<u>6203</u>	C	U	73	His	Tyr	
			6499	G	A	-			
			6607	U	G	-			
			<u>6732</u>	U	A	249	Leu	His	
			6733	A	C	-			
			<u>6947</u>	C	U	-			
			7051	U	C	-			

3.3 ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ ΟΡΟΥΣ

Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκε κατά τη χρονική περίοδο 2008-2009 το επίπεδο ανοσίας πληθυσμού της νότιας Ελλάδας έναντι των πολιοϊών. Χρησιμοποιήθηκαν 40 δείγματα ορών ηλικίας 1-10 ετών, 40 δείγματα ηλικίας 11-20 ετών, 40 δείγματα ηλικίας 21-30 ετών και 40 δείγματα ηλικίας 31-40 ετών. Οι οροί από κάθε μία από τις παραπάνω ηλικιακές ομάδες αναμιχθηκαν μεταξύ τους και έτσι δημιουργήθηκαν 4 μίγματα ορών όπου το καθένα αναλογεί στην αντίστοιχη ηλικιακή ομάδα. Ο τίτλος αντισωμάτων κάθε ηλικιακής ομάδας έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) και μιας συλλογής 15 ανασυνδυασμένων και 4 μη-

ανασυνδυσασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της οροξουδετέρωσης.

Ο ορότυπος των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών προσδιορίστηκε ως P1 (Poliovirus type 1) για 5 ιικά στελέχη, ως P2 (Poliovirus type 2) για 6 ιικά στελέχη και ως P3 (Poliovirus type 3) για 8 ιικά στελέχη. Οι ορότυποι και οι τύποι ανασυνδυσασμών των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.4 (Κεφάλαιο 2, υλικά και μέθοδοι). Η πλειοψηφία των ιικών στελεχών χαρακτηρίστηκε ως OPV-like ιοί καθώς εμφάνισαν <1% ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή από τα αντίστοιχα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3). Ωστόσο, ένα ιικό στέλεχος (7/b/97) ορότυπου P1 χαρακτηρίστηκε ως VDPV σε προηγούμενη μελέτη (Dedepsideis et al., 2007). Συγκεκριμένα, το στέλεχος 7/b/97 εμφάνισε 1.87% απόκλιση στην VP1 περιοχή σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 και επιπλέον μια θέση ανασυνδυσασμού στην 2A περιοχή μεταξύ του εμβολιακού στελέχους Sabin 1 και ενός μέλους της ομάδας C των εντεροϊών.

Οι τίτλοι των αντισωμάτων των ηλικιακών ομάδων 1-10, 11-20, 21-30 και 31-40 έναντι των ιικών στελεχών εκφράστηκαν ως \log_{10} της μεγαλύτερης αραιώσης στην οποία δεν παρατηρήθηκε CPE (π.χ \log_{10} 1:10 =1). Οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin και των 19 εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών ύστερα από στατιστική επεξεργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.8. Το Student's t-test (Paired samples test) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκρίνουμε τον μέσο όρο του τίτλου αντισωμάτων της ηλικιακής ομάδας 1-40 (μέσος όρος των τίτλων αντισωμάτων των 4 ηλικιακών ομάδων 1-10, 11-20, 21-30 και 31-40) που παρατηρήθηκε έναντι κάθε πρότυπου εμβολιακού στελέχους (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) με τους μέσους όρους που παρατηρήθηκαν έναντι κάθε εμβολιοσυνδεόμενου πολιοϊού του ίδιου ορότυπου. Το Oneway ANOVA test (Duncan's Multiple Range Test) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκρίνουμε τους μέσους όρους των τίτλων αντισωμάτων έναντι του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin και των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών του ίδιου ορότυπου μεταξύ των ηλικιακών ομάδων 1-10, 11-20, 21-30 και 31-40.

Ο ανθρώπινος πληθυσμός της ηλικιακής ομάδας 1-40 εμφανίζει στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο τίτλο αντισωμάτων έναντι δυο Sabin 1 ιικών στελεχών (742 και 522) σε σύγκριση με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1. Δεν

παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους τίτλους των αντισωμάτων της ηλικιακής ομάδας 1-40 έναντι των Sabin 2 και Sabin 3 ιικών στελεχών σε σύγκριση με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 2 και Sabin 3, αντίστοιχα (πίνακας 3.8).

Μια διαδοχική μείωση στους τίτλους αντισωμάτων παρατηρήθηκε από την ηλικιακή ομάδα 1-10 στις ομάδες 11-20 και 21-30 σε όλους τους οροτύπους πολιοϊών (P1, P2 και P3) (πίνακας 3.8). Συγκεκριμένα, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε από την ηλικιακή ομάδα 1-10 στην ομάδα 11-20 στους πολιοϊούς οροτύπου 1 και από την ομάδα 1-10 στις ομάδες 11-20 και 21-30 στους πολιοϊούς οροτύπου 2 και 3. Μια αύξηση στους τίτλους αντισωμάτων παρατηρήθηκε από την ηλικιακή ομάδα 21-30 στην ομάδα 31-40 στους πολιοϊούς οροτύπου 1 και 3 αλλά όχι στους πολιοϊούς οροτύπου 2. Ωστόσο, αυτή η αύξηση είναι στατιστικώς σημαντική μόνο στους πολιοϊούς οροτύπου 3. Και στους τρεις οροτύπους πολιοϊών, οι υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων παρατηρήθηκαν στην ηλικιακή ομάδα 1-10 δείχνοντας μια καλή απόκριση στον εμβολιασμό. Ο χαμηλότερος τίτλος αντισωμάτων παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών οροτύπου 3. Αυτό δείχνει ένα μη ικανοποιητικό επίπεδο ανοσίας έναντι των πολιοϊών οροτύπου 3 στους νεαρούς ενήλικες.

Πίνακας 3.8. Οι μέσοι όροι του \log_{10} των τίτλων αντισωμάτων των 4 ηλικιακών ομάδων 1-10, 11-20, 21-30 και 31-40 έναντι κάθε ιικού στελέχους (εμβολιοσυνδεόμενα και Sabin εμβολιακά στελέχη πολιοϊών) παρουσιάζονται. Επιπλέον, οι μέσοι όροι του \log_{10} των τίτλων αντισωμάτων έναντι όλων των ιικών στελεχών του ίδιου οροτύπου (P1, P2 ή P3) σε κάθε μία από τις ηλικιακές ομάδες 1-10, 11-20, 21-30 ή 31-40 παρουσιάζονται.

Οροτύπος	Ιικό στελέχος	Μέσος όρος στην ηλικιακή ομάδα 1-40*	Μέσος όρος στην ηλικιακή ομάδα†			
			1-10	11-20	21-30	31-40
1	Sabin1	2,8061800 ^a				
	742	2,3546350 ^b (p=0,014)				
	7/b/97	2,8061800 ^a (p=1,0)	3,0068666 ^b (p=1,0)	2,4549783 ^a (p=0,087)	2,1037767 ^a (p=0,087)	2,4048067 ^a (p=0,087)
	522	2,3546350 ^b (p=0,014)				
	II	2,4298925 ^a (p=0,080)				
	152	2,2041200 ^a (p=0,066)				

2	Sabin2	2,3546350 ^a				
	I34	2,3546350 ^a (p=1,0)				
	EP9	2,4298925 ^a (p=0,761)	3,0212014 ^c (p=1,0)	2,5481543 ^b (p=1,0)	2,1611157 ^a (p=1,0)	2,1611157 ^a (p=1,0)
	EP12	2,5804075 ^a (p=0,215)				
	ID	2,5051500 ^a (p=0,182)				
	IF	2,5051500 ^a (p=0,182)				
	8001	2,5804075 ^a (p=0,058)				
3	Sabin3	2,2793775 ^a				
	EPC	2,4298925 ^a (p=0,495)				
	EPB	2,1288625 ^a (p=0,182)	2,9943238 ^d (p=1,0)	2,2417488 ^c (p=1,0)	1,6396888 ^a (p=1,0)	1,8654613 ^b (p=1,0)
	738	1,9783475 ^a (p=0,092)				
	584	2,2793775 ^a (p=1,0)				
	EPA	2,1288625 ^a (p=0,182)				
	K/2002	1,9783475 ^a (p=0,092)				
	EP16	2,2793775 ^a (p=1,0)				
EP23	2,1288625 ^a (p=0,182)					

* Οι μέσοι όροι με το ίδιο αλφαβητικό γράμμα σε κάθε ορότυπο πολιοϊών δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Student's t-test (Paired samples test).

† Οι μέσοι όροι με το ίδιο αλφαβητικό γράμμα σε κάθε ορότυπο πολιοϊών δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το ANOVA test (Duncan's Multiple Range Test).

3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΗΘΩΝ ΤΥΠΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΣΤΙΣ 2C και 3D ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΜΕΣΩ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ

Ένα μέρος της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη μιας νέας multiplex RT-PCR μεθόδου για την ανίχνευση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Συγκεκριμένα τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 χρησιμοποιήθηκαν σε μια PCR αντίδραση για την ταυτοποίηση των τύπων ανασυνδυασμού S3/S1 και S3/S2 στην 2C γενωμική περιοχή δίνοντας PCR

προϊόντα μεγέθους 1280 και 1227 bp, αντίστοιχα. Τα εκκινητικά μόρια S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 χρησιμοποιήθηκαν σε μια δεύτερη PCR αντίδραση για την ταυτοποίηση των τύπων ανασυνδυασμού S2/S1 και S2/S3 στην 3D γενωμική περιοχή δίνοντας PCR προϊόντα μεγέθους 733 και 803 bp, αντίστοιχα. Οι θέσεις των εκκινητικών μορίων πάνω στο γένωμα των πολιοϊών παρουσιάζονται στην εικόνα 3.8.

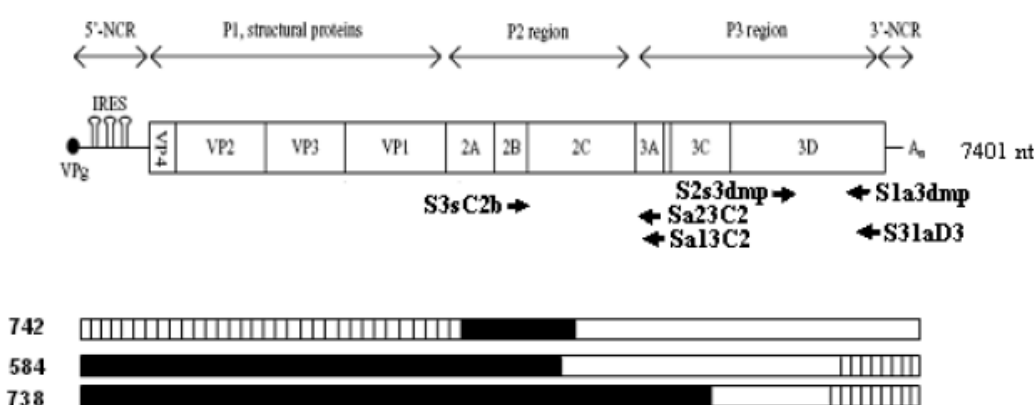
Έντεκα στελέχη ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών από προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την ανάπτυξη της multiplex RT-PCR μεθόδου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 6 ιϊκά στελέχη (EPA, EPB, EPC, LK3, LK6, LK10) τα οποία φέρουν διπλούς ανασυνδυασμούς και 5 ιϊκά στελέχη (EP16, EP23, ENP5, ENP7, ENP8) με απλούς ανασυνδυασμούς. Τα ιϊκά στελέχη EPA, EPB και EPC φέρουν ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S3 με την θέση του πρώτου ανασυνδυασμού να εντοπίζεται στο 5' άκρο της 2C περιοχής ενώ του δεύτερου ανασυνδυασμού στο μέσο της 3D περιοχής. Τα στελέχη LK3, LK6 και LK10 φέρουν ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S1 με την θέση του πρώτου ανασυνδυασμού να εντοπίζεται στο 5' άκρο της 2C περιοχής και του δεύτερου ανασυνδυασμού στο 3' άκρο της ίδιας περιοχής. Τα στελέχη EP16 και EP23 φέρουν ανασυνδυασμούς τύπων S3/S2 και S3/S1 αντίστοιχα στο 3' άκρο της 2C περιοχής ενώ τα στελέχη ENP5, ENP8 και ENP7 φέρουν ανασυνδυασμούς τύπων S2/S1 και S2/S3 αντίστοιχα στο μέσο της 3D περιοχής. Οι ακριβείς θέσεις ανασυνδυασμών των ιϊκών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες παρουσιάζονται στον πίνακα 2.5 (Κεφάλαιο 2, υλικά και μέθοδοι).

Η multiplex RT-PCR μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D περιοχές τριών στελεχών εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών τα οποία απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά δείγματα στην παρούσα διατριβή. Ο γενότυπος των τριών ιϊκών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές προσδιορίστηκε μέσω αλληλούχισης. Έτσι ο γενότυπος ταυτοποιήθηκε ως Sabin 1 για ένα ιϊκό στέλεχος (742) και ως Sabin 3 για δυο ιϊκά στελέχη (584 και 738) (πίνακας 3.9).

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) καθώς και 7 στελέχη της ομάδας C των εντεροϊών (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17, CAV18, CAV21) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες στην multiplex RT-PCR μέθοδο.

Πίνακας 3.9. Θέσεις ανασυνδυασμού των τριών περιβαλλοντικών στελεχών 584, 738 και 742. Οι τύποι ανασυνδυασμού και οι κωδικοί καταχώρησης των 2A-3'UTR αλληλουχιών στην GenBank παρουσιάζονται. Ο γενότυπος των ιϊκών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές επίσης παρουσιάζεται.

Ιϊκό στέλεχος	Θέσεις ανασυνδυασμών	Τύπος ανασυνδυασμού	Κωδικοί καταχώρησης GeneBank	Γενότυπος στην 5'-NCR περιοχή	Γενότυπος στην VP1 περιοχή
584	2C S3/S2 4449-4464/S3 3D S2/S1 7150-7172/S2	S3/S2/S1	EU598486	Sabin 3	Sabin 3
738	3C S3/S2 5804-5814/S3 3D S2/S1 6901-6909/S2	S3/S2/S1	EU598487	Sabin 3	Sabin 3
742	2A S1/S3 3461-3465/S1 2C S3/S2 4511-4527/S3	S1/S3/S2	EU598488	Sabin 1	Sabin 1



Εικόνα 3.8. Σχηματική αναπαράσταση του γενώματος των πολιοϊών. Η θέση και η κατεύθυνση των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στις multiplex PCR αντιδράσεις παρουσιάζονται με μαύρα βέλη. Οι θέσεις ανασυνδυασμού των τριών περιβαλλοντικών στελεχών επίσης παρουσιάζονται κάτω από το γένωμα. Οι ράβδοι συμβολίζουν την προέλευση των αλληλουχιών των στελεχών 742, 584 και 738. Οι γραμμωτοί ράβδοι αντιστοιχούν στις αλληλουχίες Sabin 1 εμβολιακής προέλευσης, οι άσπροι ράβδοι στις αλληλουχίες Sabin 2 εμβολιακής προέλευσης και οι μαύροι ράβδοι στις αλληλουχίες Sabin 3 εμβολιακής προέλευσης.

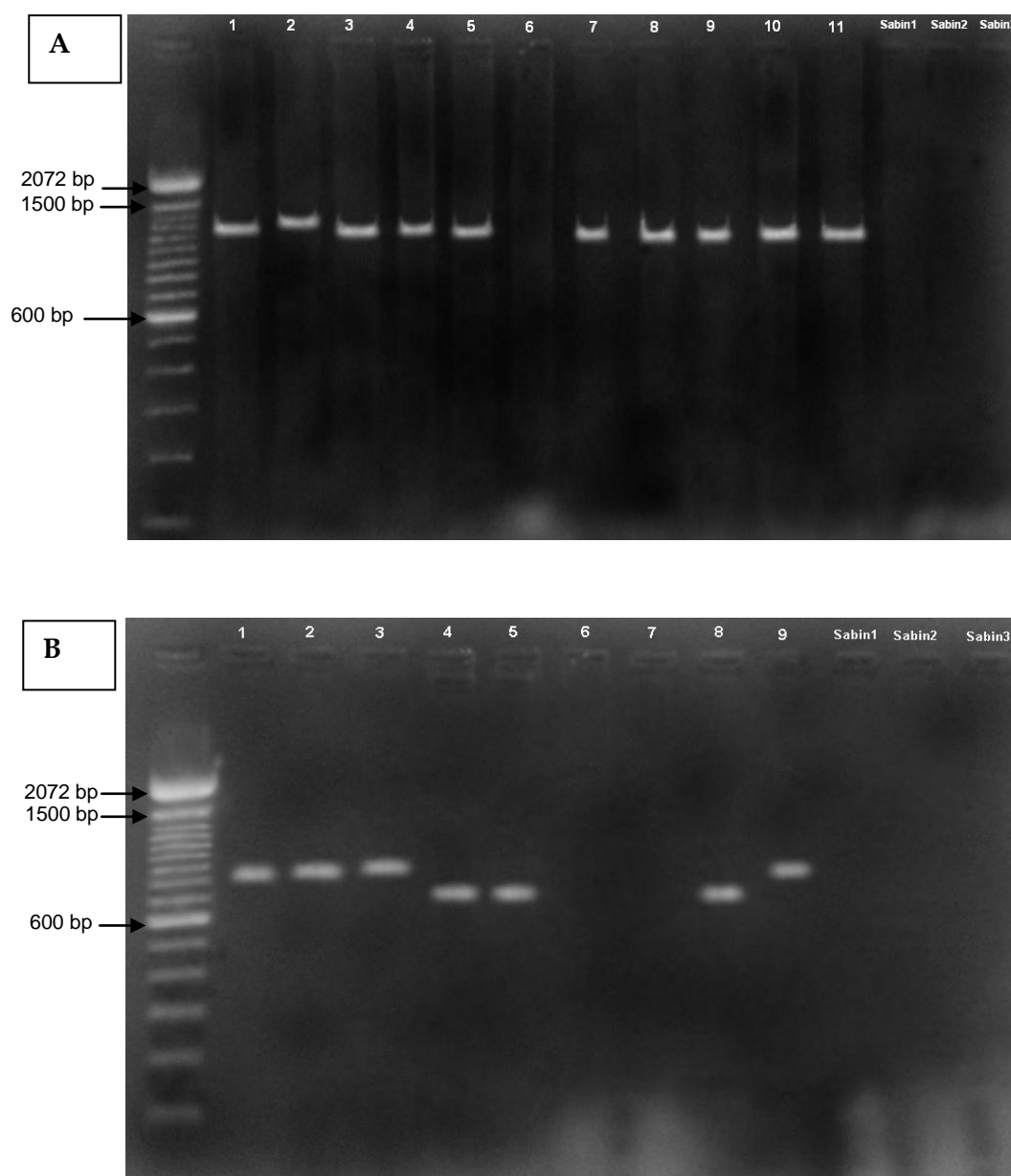
3.4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ

Η χρησιμοποίηση των εκκινητικών μορίων S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 σε μια PCR αντίδραση επιβεβαίωσε τους τύπους ανασυνδυασμού S3/S1 ή S3/S2 στην 2C περιοχή όλων των θετικών μαρτύρων παράγοντας PCR προϊόντα 1280 και 1227 bp, αντίστοιχα (Εικόνα 3.9A). Στα στελέχη LK3, LK6 και LK10, μόνο ο πρώτος από τους δυο ανασυνδυασμούς (S3/S2/S1) στην 2C περιοχή επιβεβαιώθηκε παράγοντας PCR προϊόν 1280 bp. Η παρουσία του δεύτερου ανασυνδυασμού S2/S1 στην 2C περιοχή είναι σπάνιο γεγονός και θα μπορούσε να ανιχνευθεί σχεδιάζοντας ένα επιπλέον ζεύγος εκκινητικών μορίων.

Η χρησιμοποίηση των εκκινητικών μορίων S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 σε μια δεύτερη PCR αντίδραση επιβεβαίωσε τους τύπους ανασυνδυασμού S2/S1 και S2/S3 στην 3D περιοχή όλων των θετικών μαρτύρων παράγοντας PCR προϊόντα 733 και 803 bp, αντίστοιχα (Εικόνα 3.9B).

Δυο από τα περιβαλλοντικά στελέχη (742 και 584) που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή, παρήγαγαν ένα PCR προϊόν 1227 bp στην PCR αντίδραση με τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 το οποίο αντιστοιχεί σε ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 στην 2C περιοχή (Εικόνα 3.10). Επιπλέον, ένα από τα περιβαλλοντικά στελέχη (738) παρήγαγε ένα PCR προϊόν 733 bp στην PCR αντίδραση με τα εκκινητικά μόρια S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 το οποίο αντιστοιχεί σε ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 στην 3D περιοχή (Εικόνα 3.9B).

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) καθώς και τα 7 στελέχη της ομάδας C των εντεροϊών δεν παρήγαγαν PCR προϊόντα και στις δυο multiplex PCR αντιδράσεις (Εικόνες 3.9A, 3.9B).

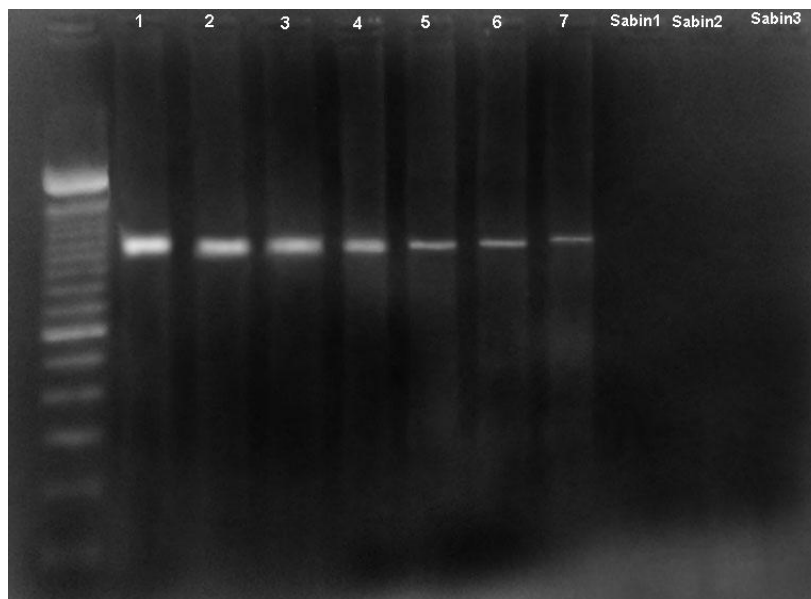


Εικόνα 3.9. Παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της multiplex PCR αντίδρασης, Α) στην 2C γενωμική περιοχή. Οι αριθμοί 1-11 αντιστοιχούν στα PCR προϊόντα των στελεχών EP16, EP23, EPA, EPB, EPC, 738, 742, 584, LK3, LK6 και LK10, αντιστοίχα και Β) στην 3D γενωμική περιοχή. Οι αριθμοί 1-9 αντιστοιχούν στα PCR προϊόντα των στελεχών EPA, EPB, EPC, ENP5, 738, 584, 742, ENP8 και ENP7, αντιστοίχα. Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες και στις δυο multiplex PCR αντιδράσεις. Η θέση κάποιων ζωνών του μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA ladder) επίσης παρουσιάζεται στο αριστερό άκρο κάθε εικόνας.

3.4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ

Σειριακές αραιώσεις ($10^{5.5-1}$ TCID₅₀/0.1 ml) του ιϊκού στελέχους EPA πραγματοποιήθηκαν σε υλικό Eagle MEM. Μετά την εκχύλιση του ιϊκού RNA και την σύνθεση του cDNA, πραγματοποιήθηκαν δυο PCR αντιδράσεις με τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2 και S2s3dmp, S1a3dmp, S31aD3 στις 2C και 3D περιοχές αντίστοιχα, προκειμένου να προσδιορίσουμε το όριο ευαισθησίας της multiplex RT-PCR μεθόδου. Το όριο ευαισθησίας έφτασε στο επίπεδο του 1 TCID₅₀/0.1 ml και στις δυο multiplex PCR αντιδράσεις (Εικόνα 3.10).

Τίτλοι της τάξεως του $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1 ml καθενός από τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) και καθενός από τα 7 στελέχη της ομάδας C των εντεροϊών χρησιμοποιήθηκαν και στις δυο αντιδράσεις ελέγχου της ευαισθησίας της multiplex RT-PCR μεθόδου χωρίς να παράγουν PCR προϊόντα (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της multiplex PCR αντίδρασης στην 2C περιοχή του ιϊκού στελέχους EPA για τον έλεγχο της ευαισθησίας της αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του ανασυνδυασμένου στελέχους EPA (S3/S2) δίνοντας PCR προϊόντα 1227 bp μέχρι το επίπεδο του 1 TCID₅₀/0.1 ml. Οι αριθμοί 1-7 αντιστοιχούν στις διαδοχικές αραιώσεις $10^{5.5}$, $10^{4.5}$, $10^{3.5}$, $10^{3.0}$, $10^{2.0}$, 10 και 1 TCID₅₀/0.1 ml, αντίστοιχα. Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες με τίτλους της τάξεως των $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1 ml.

3.4.3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των τριών περιβαλλοντικών στελεχών (742, 584, 738) από την 2A έως την 3'-NCR περιοχή προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τις ακριβείς θέσεις ανασυνδυασμού. Πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών των ιικών στελεχών 742, 584 και 738 με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των δυο πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabín τα οποία εμπλέκονται στον πιθανό ανασυνδυασμό. Οι δυο στοίχισεις συνδυάστηκαν ώστε να προσδιορίσουμε την ελάχιστη κοινή αλληλουχία η οποία πλαισιώνεται από δυο ετεροτυπικά νουκλεοτίδια. Αυτή η αλληλουχία αποτελεί την θέση ανασυνδυασμού μεταξύ των δυο ιικών γενωμάτων.

Και τα τρία περιβαλλοντικά στελέχη βρέθηκε ότι φέρουν ανασυνδυασμούς σε δυο θέσεις (Εικόνες 3.8, 3.11A, πίνακας 3.9). Η πρώτη θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε στην 2C περιοχή (νουκλεοτίδια 4449-4464) για το στέλεχος 584, στην 2A περιοχή (νουκλεοτίδια 3461-3465) για το στέλεχος 742 και στην 3C περιοχή (νουκλεοτίδια 5804-5814) για το στέλεχος 738. Η δεύτερη θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε στην 2C περιοχή (νουκλεοτίδια 4511-4527) για το στέλεχος 742 και στην 3D περιοχή για τα στελέχη 584 και 738 (νουκλεοτίδια 7150-7172 και 6901-6909, αντίστοιχα). Τα στελέχη 584 και 738 φέρουν ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S1 ενώ το στέλεχος 742 ανασυνδυασμό τύπου S1/S3/S2.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SimPlot (similarity plotting) προκειμένου να απεικονίσουμε τις θέσεις ανασυνδυασμού, υπολογίζοντας το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του ανασυνδυασμένου περιβαλλοντικού ιικού στελέχους και των δυο πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabín που εμπλέκονται στον ανασυνδυασμό (Εικόνες 3.11B-Δ).

A

```

Sabin2      *****
584          ATTACG  TACAGTTCAAGAGCAA  GCACCGT  4479
Sabin3      ATTACA  TACAGTTCAAGAGCAA  GCACCGT  274
            ATTACA  TACAGTTCAAGAGCAA  ACACCGT  4471
            *****

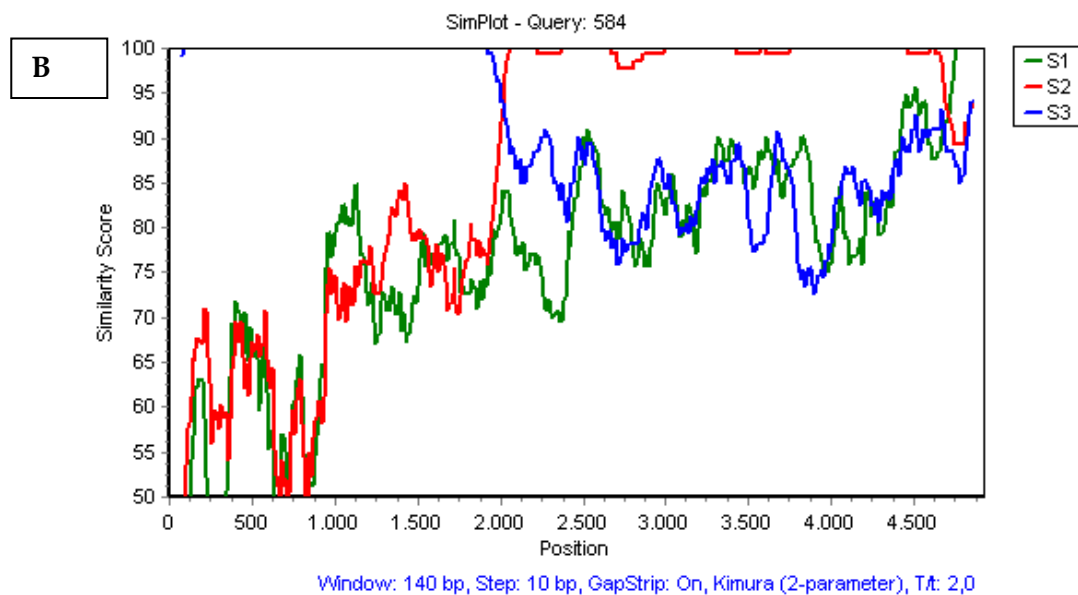
Sabin2      *****
584          TTCCTCATA  CATCCAGTAATGCCAATGAAGGA  GATTCATG  7180
Sabin1      TTCCTCATA  CATCCAGTAATGCCAATGAAGGA  AATTCATG  495
            TTTCTTATT  CATCCAGTAATGCCAATGAAGGA  AATTCATG  7181
            *****

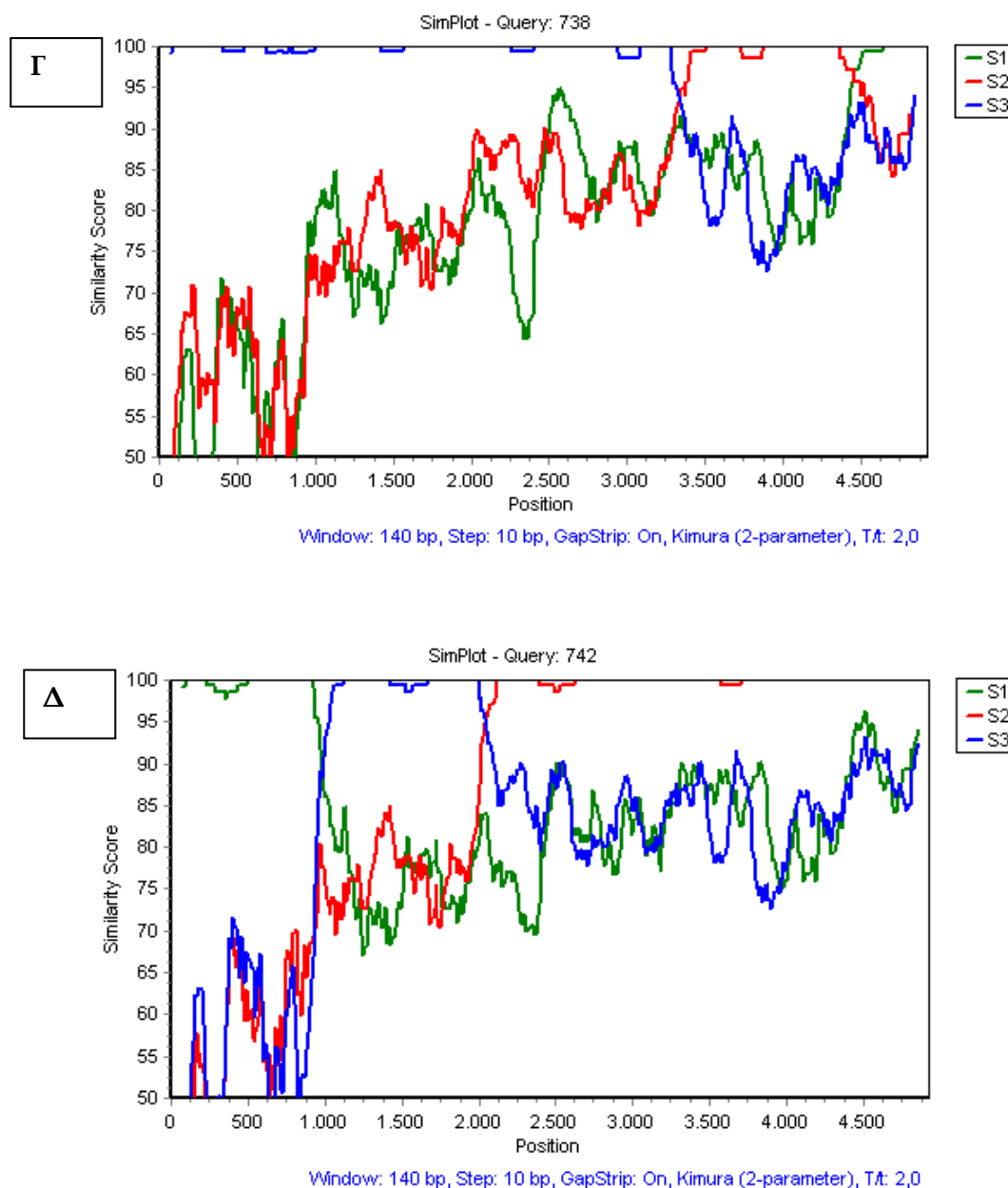
Sabin3      *****
742          AAGGGG  GATTT  ACAA  3461
Sabin1      CAGGGA  GATTT  ACAA  228
            CAGGAA  GATTT  GCAA  3470
            *****

Sabin3      *****
742          CCAGGT  ACAGGAAAATCAGTTGC  GACT  4531
Sabin2      CCAGGG  ACAGGAAAATCAGTTGC  AACC  417
            CCAGGG  ACAGGAAAATCAGTTGC  AACC  4539
            *****

Sabin3      ***
738          CTA  AATCTCGGTGG  GCGC  5818
Sabin2      CTA  AATCTCGGTGG  ACGA  821
            CTT  AATCTCGGTGG  ACGA  5826
            **

Sabin2      *****
738          CATT  AGGACACTC  CTA  6912
Sabin1      CATT  AGGACACTC  TTA  270
            TATC  AGGACACTC  TTA  6913
            **
    
```





Εικόνα 3.11. (Α) Θέσεις ανασυνδυασμού των ιικών στελεχών 584 (S3/S2/S1), 738 (S3/S2/S1) και 742 (S1/S3/S2). Στην αριστερή πλευρά της κάθε στοιχίσης παρουσιάζεται η εμβολιακή προέλευση της αλληλουχίας. Τα τονισμένα νουκλεοτίδια είναι εκείνα που διαφοροποιούν τις τρεις αλληλουχίες. Τα νουκλεοτίδια μέσα στα πλαίσια αποτελούν τις θέσεις ανασυνδυασμού. Επιπλέον ανάλυση μέσω του προγράμματος SimPlot της VP1-3D περιοχής των στελεχών 584 (B), 738 (Γ) και 742 (Δ) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες περιοχές των Sabin εμβολιακών στελεχών (Sabin 1: AY184219, Sabin 2: AY184220 και Sabin 3: AY184221) παρουσιάζεται.

3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΟΡΟΪΩΝ

Έπειτα από την λήψη του χρωματογραφήματος, την επεξεργασία της αλληλουχίας και την αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας, αποδείχθηκε ότι κάποια από τα κλωνοποιημένα PCR προϊόντα από τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφάνιζαν καμία ομοιότητα στην αλληλουχία τους με κάποιο κατατεθειμένο στην γενετική βάση δεδομένων (GeneBank) στέλεχος νοροϊού. Τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα των οποίων τα κλωνοποιημένα PCR προϊόντα εμφάνισαν ομοιότητα με κατατεθειμένες στην GeneBank αλληλουχίες νοροϊών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.10. Επιπλέον παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια με τα οποία ενισχύθηκαν τα PCR προϊόντα.

Συνολικά δύο κλινικά (A6 και Δ1) και τρία περιβαλλοντικά (GN1, TR3, LR6) δείγματα προέκυψαν θετικά για την παρουσία νοροϊών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση και των τριών περιβαλλοντικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των φίλτρων. Στο στέλεχος που απομονώθηκε από το κλινικό δείγμα A6 επιτεύχθηκε αλληλούχιση από το 3' άκρο του ORF1 έως το ενδιάμεσο του ORF3 (νουκλεοτίδια 4387-7456). Στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα Δ1, GN1, TR3 και LR6 επιτεύχθηκε αλληλούχιση ενός μόνο μικρού γενωμικού τμήματος (280~700 bp) (πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10. Κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα των οποίων τα κλωνοποιημένα PCR προϊόντα εμφάνισαν ομοιότητα με κατατεθειμένες στην GeneBank αλληλουχίες νοροϊών. Παρουσιάζονται επίσης τα εκκινητικά μόρια με τα οποία ενισχύθηκαν τα PCR προϊόντα, η μέθοδος PCR που χρησιμοποιήθηκε (autonested, seminested ή nested) καθώς και η περιοχή του γενώματος που ενισχύθηκε. Η επεξεργασία και των τριών περιβαλλοντικών δειγμάτων τα οποία εμφανίστηκαν θετικά για την παρουσία νοροϊών, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των φίλτρων.

Κωδικοποίηση και προέλευση δείγματος	Εκκινητικά μόρια	Περιοχή στο γένομα
A6 (κλινικό)	Autonested PCR NLVR 58 - NLVR 756	4460-5162
	Nested PCR NLVR 52 -NLVORF 871 NLVR 58 - 756	4564-5287
	Seminested PCR SRII-2 - SRII-3	4583-4787
	Autonested PCR NLVH 297-NLVH 896	4891-5492
	Autonested PCR G2SKF - G2SKR	5040-5340
	Autonested PCR mon381 - mon383	5361-5674
	Autonested PCR NLVORF 941-NLVORF 1928	5535-6415
	Autonested PCR NLVC 463-NLVC 1430	5571-6455
	Seminested PCR NLVORF 1955-NLVORF 2902 NLVORF 2029-NLVORF 2902	6512-7441
	Autonested PCR NLVORF 2029-NLVORF 2703	6546-7227
	Autonested PCR NLVORF 2029-NLVORF 2902	6565-7420
	Autonested PCR NLVORF 1955-NLVORF 2902	6605-7421
Δ1 (κλινικό)	Autonested PCR P78-P80	1491-1747
GN1 (περιβάλλον-Μέθοδος φίλτρων)	Autonested PCR P78-P80	1491-1747
TR3 (περιβάλλον-Μέθοδος φίλτρων)	Autonested PCR mon381 - mon383	5361-5674
LR6 (περιβάλλον-Μέθοδος φίλτρων)	Autonested PCR NLVORF 1290-NLVORF 1974	5796-6482

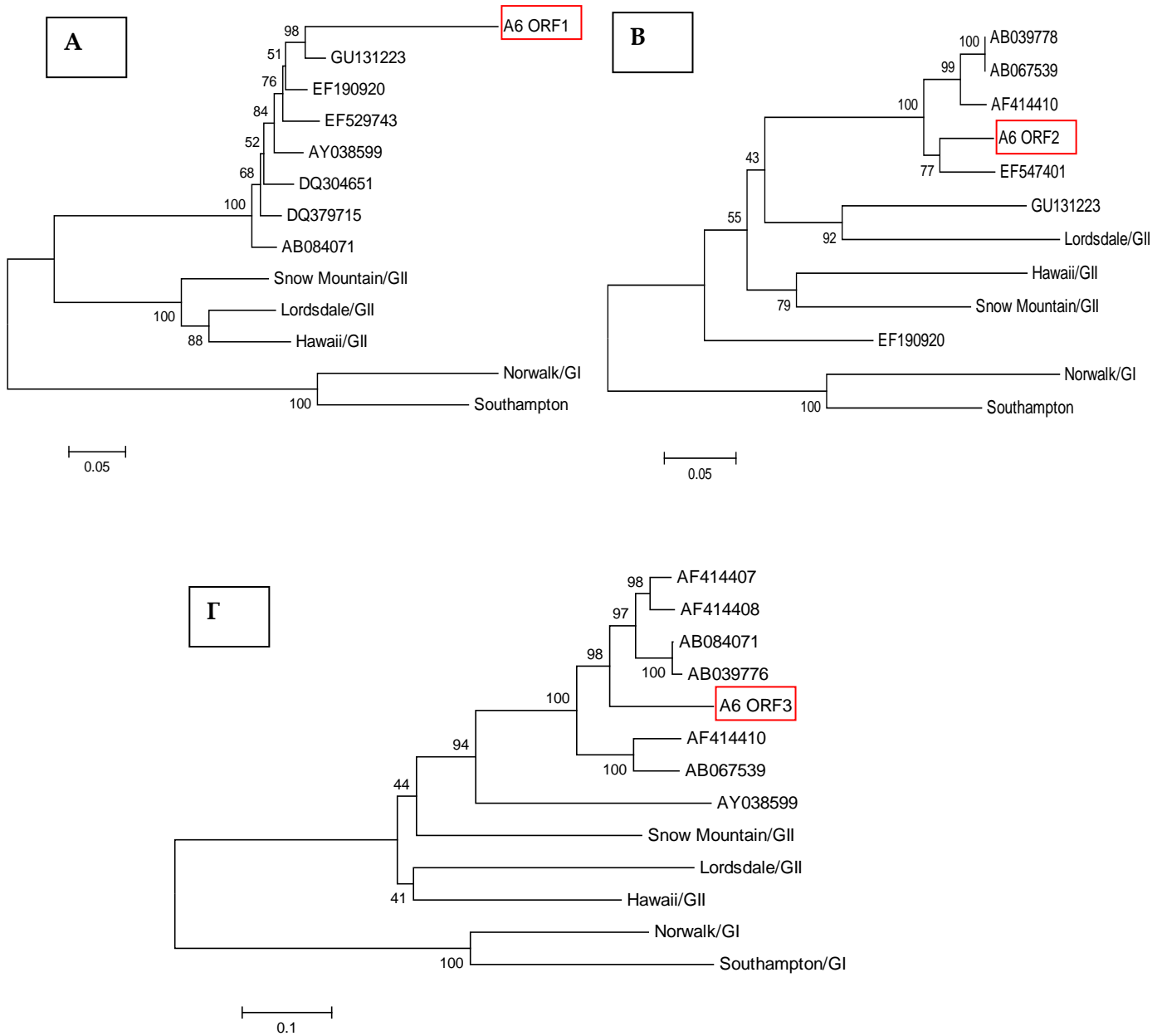
3.6 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, ένα για κάθε αναγνωστικό πλαίσιο (ORF1, ORF2, ORF3) του γενώματος του στελέχους A6. Στο φυλογενετικό δέντρο του ORF1 το στέλεχος A6 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος γενετικής ομάδας GII που απομονώθηκε στην δυτική Σουηδία και το οποίο έχει κωδικό καταχώρησης στην GeneBank GU131223 (Εικόνα 3.12A). Επίσης στο δέντρο του ORF1 το στέλεχος A6 είναι φυλογενετικά κοντά με τα στελέχη με αριθμούς καταχώρησης EF190920 και EF529743 τα οποία απομονώθηκαν από τις περιοχές της Αφρικής και της Γαλλίας, αντίστοιχα. Επιπλέον, το στέλεχος A6 ταξινομείται στην γενετική ομάδα GII μαζί με τα πρότυπα στελέχη Lordsdale, Snow Mountain και Hawaii όπως και επτά άλλα στελέχη με τα οποία εμφανίζει κοντινή φυλογενετική σχέση. Ωστόσο, το στέλεχος A6 μαζί με τα επτά αυτά στελέχη σχηματίζουν μια διαφορετική υποομάδα από εκείνη των GII πρότυπων στελεχών. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανόν τα στελέχη αυτά προέρχονται από ένα κοινό προγονικό στέλεχος.

Στο φυλογενετικό δέντρο του ORF2 το στέλεχος A6 σχηματίζει υποομάδα με ένα διαφορετικό στέλεχος από ότι στο φυλογενετικό δέντρο του ORF1. Συγκεκριμένα σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος με αριθμό καταχώρησης στην GeneBank EF547401 το οποίο απομονώθηκε από την περιοχή της Ιαπωνίας (Εικόνα 3.12B). Επιπλέον τα στελέχη με αριθμούς καταχώρησης GU131223 και EF190920 με τα οποία το στέλεχος A6 είναι φυλογενετικά κοντινότερα στο δέντρο του ORF1, σχηματίζουν διαφορετικές υποομάδες και είναι φυλογενετικά μακριά με το στέλεχος A6 στο δέντρο του ORF2. Επίσης στο δέντρο του ORF2 τα στελέχη A6 και EF547401 σχηματίζουν υποομάδα με τα στελέχη με αριθμούς καταχώρησης AB039778, AB067539 και AF414410 τα οποία απομονώθηκαν από την περιοχή της Ιαπωνίας τα δυο πρώτα και από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής το τρίτο. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανόν τα στελέχη αυτά προέρχονται από ένα κοινό προγονικό στέλεχος. Το στέλεχος A6, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη με τα οποία είναι φυλογενετικά κοντά, ταξινομούνται στην γενετική ομάδα GII μαζί με τα πρότυπα στελέχη Lordsdale, Snow Mountain και Hawaii.

Στο δέντρο του ORF3 το στέλεχος A6 εμφανίζει μονοφυλετική σχέση με τα άλλα στελέχη καθώς δεν σχηματίζει υποομάδα με κάποιο από αυτά (Εικόνα 3.12Γ). Τα κοντινότερα φυλογενετικά στελέχη με αυτό είναι εκείνα με αριθμούς καταχώρησης στην GenBank AB084071, AB039776, AF414407 και AF414408 τα οποία απομονώθηκαν από την περιοχή της Ιαπωνίας τα δυο πρώτα και από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής τα δυο τελευταία. Τα τέσσερα αυτά στελέχη σχηματίζουν μια υποομάδα με το στέλεχος A6. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανόν τα στελέχη αυτά προέρχονται από ένα κοινό προγονικό στέλεχος. Το στέλεχος A6, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη με τα οποία είναι φυλογενετικά κοντά, ταξινομούνται στην γενετική ομάδα GII μαζί με τα πρότυπα στελέχη Lordsdale, Snow Mountain και Hawaii.

Για τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα Δ1, GN1, TR3 και LR6 δεν κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα καθώς αυτά αλληλουχήθηκαν σε μία μόνο μικρή περιοχή του γονιδιώματος. Ωστόσο, η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών στην GenBank έδειξε ότι τα στελέχη Δ1 και GN1 εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα GI ενώ τα στελέχη TR3 και LR6 εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα GII.



Εικόνα 3.12. Φυλογενετικά δέντρα του στελέχους A6 κατασκευασμένα από τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν, Α) στο 3' άκρο του ORF1, Β) σε ολόκληρο το ORF2 και Γ) στο 5' άκρο του ORF3. Οι κωδικοί καταχώρησης στην GeneBank των πρότυπων στελεχών Snow Mountain/GII, Lordsdale/GII, Hawaii/GII, Norwalk/GI και Southampton/GI είναι U70059, X86557, U07611, M87661 και L07418, αντιστοίχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η ανίχνευση μεταλλάξεων στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Η 5'-NCR περιοχή φέρει δευτεροταγείς δομές απαραίτητες για την αντιγραφή και την μετάφραση του γενώματος των πολιοϊών ενώ η VP1 δομική πρωτεΐνη φέρει δομικά στοιχεία απαραίτητα για τον κύκλο ζωής των πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό, 13 δείγματα τα οποία απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα και άτομα με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) κατά την χρονική περίοδο 1978-2001, μελετήθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων σε ένα τμήμα της 5'-NCR περιοχής και σε ολόκληρη τη VP1 περιοχή. Ο γενότυπος των 13 κλινικών στελεχών (I1-I13) προσδιορίστηκε ως Sabin 1 για δυο από αυτά και ως Sabin 2 για έντεκα από αυτά μέσω RFLP ανάλυσης στην 5'-NCR περιοχή. Επιπλέον όλα τα ιϊκά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως OPV-like ιοί καθώς εμφάνισαν < 1 % ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή από τα αντίστοιχα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Οι αμινοξικές υποκαταστάσεις στην VP1 περιοχή, οι οποίες προέκυψαν από μη-συνώνυμες μεταλλάξεις, απεικονίστηκαν στην τρισδιάστατη δομή του ιϊκού πρωτομερούς (1 ASJ.pdb) ενώ οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις στην 5'-NCR περιοχή απεικονίστηκαν στην δευτεροταγή δομή του IRES γενετικού στοιχείου των αντίστοιχων πρότυπων εμβολιακών στελεχών.

Και τα δυο ιϊκά στελέχη γενοτύπου Sabin 1 (I1, I2) απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα. Και στα δυο στελέχη ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη C583G στην 5'-NCR περιοχή η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων C-G από το G-G. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μια δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στον μίσχο της περιοχής VI η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του κυτταρικού πεπτιδίου p52, ενός παράγοντα απαραίτητου για την μετάφραση του γενώματος των πολιοϊών (Equestre et al. 1991). Ωστόσο, η αρνητική επίδραση που θα μπορούσε να έχει αυτή η μετάλλαξη στην δευτεροταγή δομή του IRES γενετικού στοιχείου, πιθανόν αποφεύγεται μέσω του φαινομένου της συν-μεταβλητότητας. Επιπλέον, η μετάλλαξη U525C ταυτοποιήθηκε στο ιϊκό

στέλεχος I1. Αυτή η μετάλλαξη η οποία εντοπίζεται στην περιοχή V του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα αποκαθιστώντας την σταθερότητα ενός ζεύγους βάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων 480 και 525 (AU στο στέλεχος αγρίου-τύπου Mahoney, GU στο στέλεχος Sabin-1 και GC στο στέλεχος I1). Η αποσταθεροποίηση αυτού του ζεύγους βάσεων στο γένωμα του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους σχετίζεται με την μείωση της νευρομολυσματικότητας (Christodoulou et al. 1990; Kawamura et al. 1989).

Στην VP1 περιοχή των Sabin 1 ιϊκών στελεχών ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη Pe90Met η οποία αποτελεί αναστροφή στο γενότυπο του αγρίου-τύπου στελέχους Mahoney (Cherkasova et al. 2002) και περιλαμβάνει ένα κατάλοιπο που εντοπίζεται στον β-κλώνο B της VP1. Το κατάλοιπο Pe-90 συμμετέχει σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο Thr-106 στον β-κλώνο C γεγονός το οποίο συμβάλει στην χαρακτηριστική αναδίπλωση της VP1 (αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων) πρωτεΐνης. Επιπλέον, το κατάλοιπο 106 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένισης του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους και μετάλλαξη σε αυτή τη θέση έχει συσχετισθεί με την αύξηση της νευρομολυσματικότητας σε εμβολιοσυνδεόμενα Sabin 1 στελέχη (Bouchard et al. 1995). Κατά συνέπεια, η μετάλλαξη Pe90Met μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την νευρομολυσματικότητα. Το κατάλοιπο 90 επίσης συμμετέχει στον σχηματισμό της αντιγονικής θέσης N-AgI, η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα 90-105 της VP1 (Herremans et al. 2000). Γενικά η συσσώρευση μεταλλάξεων στις αντιγονικές θέσεις (N-Ags) είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο επειδή αυτές οι θέσεις είναι οι πιο εκτεθειμένες στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου και υφίστανται υψηλή αντιγονική πίεση. Επιπλέον, ο εντοπισμός μεταλλάξεων στις αντιγονικές θέσεις πιθανόν αποτελεί μέρος μιας στρατηγικής του ιού που στοχεύει στην διαφυγή του από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή.

Οκτώ από τα Sabin 2 ιϊκά στελέχη απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα ενώ τρία στελέχη απομονώθηκαν από άτομα με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP). Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP και επτά από τα στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα εμφάνισαν την μετάλλαξη A481G στην 5'-NCR περιοχή. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται στην περιοχή V του IRES γενετικού στοιχείου

και η παρουσία της A στη θέση 481 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένισης του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους (Friedrich 1996). Αυτή η επίδραση στον φαινότυπο σχετίζεται με την εξασθενημένη πρόσδεση του παράγοντα eIF4G στην περιοχή V του IRES γενετικού στοιχείου (Ochs et al. 2003). Έχει βρεθεί ότι στα εμβολιασμένα άτομα, η αδενίνη στη θέση 481 υφίσταται γρήγορα αναστροφή σε γουανίνη του αγρίου-τύπου προγονικού στελέχους. Ωστόσο, μόνο το 50% των εμβολιασμένων ατόμων απεκκρίνουν ιικά στελέχη Sabin 1 με αναστροφή στη θέση 480 η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένισης του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους (Minor 1999). Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς σε όλα σχεδόν τα Sabin 2 ιικά στελέχη η μετάλλαξη A481G ταυτοποιήθηκε ενώ κανένα από τα Sabin 1 ιικά στελέχη δεν εμφάνισε την αντίστοιχη μετάλλαξη A480G. Επιπλέον, η μετάλλαξη U398C ταυτοποιήθηκε σε τρία Sabin 2 ιικά στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα και σε ένα στέλεχος που απομονώθηκε από άτομο με VAPP. Έχει προταθεί ότι η μετάλλαξη U398C και η μετάλλαξη U437C η οποία ταυτοποιήθηκε στο στέλεχος I5, έχουν επίσης κάποια συμβολή στον εξασθενημένο φαινότυπο του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους και στην αναστροφή Sabin 2 ιικών στελεχών προς νευρομολυσματικά (Friedrich 1996). Επιπλέον, η μετάλλαξη U398C έχει παρατηρηθεί συχνά σε Sabin 2 ιικά στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP (Muzychenko et al. 1991; Macadam et al. 1991). Οι μεταλλάξεις U398C και U437C εντοπίζονται σε ένα δίκλωνο τμήμα της περιοχής IV του IRES γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα μετατρέπουν ένα ζεύγος βάσεων GU σε GC. Είναι αξιοσημείωτη η παρουσία της μετάλλαξης C584G σε όλα τα Sabin 2 ιικά στελέχη εκτός του I10. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται στον μίσχο της περιοχής VI του IRES γενετικού στοιχείου και μετατρέπει ένα ζεύγος βάσεων C-G σε G-G. Ωστόσο, η αρνητική επίδραση αυτής της μετάλλαξης πιθανόν αποφεύγεται μέσω του φαινομένου της συν-μεταβλητότητας. Η μετάλλαξη U597A στο στέλεχος I7 δρα με τον ίδιο τρόπο όπως και η μετάλλαξη C584G. Οι μεταλλάξεις U567A στο στέλεχος I10, U575A στο στέλεχος I4 και C576U στο στέλεχος I5 εντοπίζονται σε μονόκλωνες περιοχές του IRES γενετικού στοιχείου και συγκεκριμένα στην μεταβλητή περιοχή (Xm) του συντηρημένου μοτίβου Υn_Xm_AUG το οποίο είναι απαραίτητο για την μετάφραση του ιικού RNA. Κατά συνέπεια, αυτές οι μεταλλάξεις είναι απίθανο να επηρεάζουν την

δευτεροταγή δομή του IRES γενετικού στοιχείου και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης.

Τα Sabin 2 ιϊκά στελέχη χαρακτηρίζονται από έναν ασυνήθιστα υψηλό ρυθμό μη-συνώνυμων μεταλλάξεων στην VP1 περιοχή. Το πρότυπο μεταλλάξεων αυτών των στελεχών έρχεται σε αντίθεση με τα πρότυπα μεταλλάξεων που έχουν παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες όπου οι συνώνυμες μεταλλάξεις υπερτερούν των μη-συνώνυμων μεταλλάξεων στην VP1 περιοχή (Cherkasova et al. 2002; Bellmunt et al. 1999; Georgescu et al. 1997; Kew et al. 1998). Μια υπόθεση σχετικά με αυτό το πρότυπο μεταλλάξεων θα μπορούσε να είναι η αναγκαιότητα της συσσώρευσης μη-συνώνυμων μεταλλάξεων ώστε να κατασταλεί η δράση άλλων μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για την εξασθένηση του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους.

Έξι Sabin 2 ιϊκά στελέχη εμφάνισαν μετάλλαξη στο κατάλοιπο 143 της VP1 το οποίο αντικαταστάθηκε από βαλίνη (Val), ασπαραγίνη (Asn) ή θρεονίνη (Thr). Τέσσερα από αυτά τα στελέχη απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα και δυο από άτομα με VAPP. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη P143Thr αποτελεί αναστροφή στο προγονικό στέλεχος αγρίου-τύπου. Επιπλέον, το κατάλοιπο 143 της VP1 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένησης του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους και μετάλλαξη σε αυτή τη θέση έχει συσχετισθεί με την αύξηση της νευρομολυσματικότητας σε Sabin 2 ιϊκά στελέχη (Friedrich 1996). Το κατάλοιπο 143 της VP1 εντοπίζεται στην θηλιά DE της VP1 πρωτεΐνης. Η θηλιά DE αλληλεπιδρά με την θηλιά BC της VP1 ώστε να σχηματισθεί η αντιγονική θέση 1 (Wieggers et al. 1989) και επιπλέον η θηλιά BC θεωρείται ότι επηρεάζει το εύρος ξενιστή των πολιοϊών μέσω γεγονότων που περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (Moss and Racaniello, 1991). Έτσι, είναι πιθανόν ότι η επίδραση του καταλοίπου 143 της VP1 στην εξασθένηση του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους σχετίζεται με γεγονότα που περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (Macadam et al. 1993). Τα ιϊκά στελέχη I6, I9, I10 και I11 δεν εμφάνισαν νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή. Αυτό σημαίνει ότι η κυκλοφορία αυτών των στελεχών είναι μικρής χρονικής διάρκειας καθώς η οροθεσία του 1% ποσοστού απόκλισης στην VP1 δείχνει ότι ένα ιϊκό στέλεχος κυκλοφορεί για τουλάχιστον 1 χρόνο (Dowdle et al. 2003). Ωστόσο, αυτό δεν σημαίνει ότι τα ιϊκά στελέχη που εμφανίζουν < 1% ποσοστό

απόκλισης δεν είναι ικανά να μεταδίδονται από άτομο σε άτομο σε πληθυσμούς με περιορισμένη ανοσολογική κάλυψη, καθώς οι μεταλλάξεις που συσχετίζονται με τον εξασθενημένο φαινότυπο των Sabin εμβολιακών στελεχών υφίστανται αναστροφή προς τον γενότυπο αγρίου-τύπου προτού οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις να φτάσουν στο επίπεδο του 1%. Για παράδειγμα, τα Sabin 2 ιικά στελέχη I3, I12, I5, I8 και I7 παρά τα χαμηλά ποσοστά απόκλισης στην VP1 περιοχή (0.11%, 0.11%, 0.22%, 0.22% και 0.33%, αντίστοιχα), εμφάνισαν μεταλλάξεις σε κύριους καθοριστές της εξασθένησης στις 5'-NCR και VP1 γενωμικές περιοχές (νουκλεοτιδίο 481 της 5'-NCR και κατάλοιπο 143 της VP1). Επίσης, τα στελέχη I9, I10 και I11 με 0% ποσοστά απόκλισης στην VP1 περιοχή εμφάνισαν μετάλλαξη στη θέση 481 της 5'-NCR περιοχής η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένησης του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους. Επιπλέον, το στέλεχος I1 (0.22% ποσοστό απόκλισης στην VP1) εμφάνισε μεταλλάξεις στο κατάλοιπο 90 της VP1 και στο νουκλεοτιδίο 525 της 5'-NCR περιοχής οι οποίες επηρεάζουν έμμεσα την νευρομολυσματικότητα των Sabin 1 ιικών στελεχών.

Η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 γενωμικών περιοχών δεν εντόπισε ανασυνδυασμό στα στελέχη γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς ο ανασυνδυασμός είναι σπάνιο φαινόμενο σε αυτές τις περιοχές (Blomqvist et al. 2003; Martin et al. 2002; Dedepsidis et al. 2008).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 περιοχών είναι σημαντική για την μοριακή διάγνωση των πολιοϊών. Η ανάλυση αυτών των περιοχών δείχνει ότι εμβολιοσυνδεδεμένοι πολιοϊοί είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε μεταδόσιμα και μολυσματικά παθογόνα μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων τόσο σε δομικά στοιχεία της VP1 (αντιγονικές θέσεις, περιοχή πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα) όσο και σε καθοριστές της εξασθένησης των Sabin εμβολιακών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι δεν είναι σημαντικό μόνο το ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή αλλά κυρίως οι θέσεις όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις. Ο χαρακτηρισμός εμβολιοσυνδεδεμένων πολιοϊών που βασίζεται στις 5'-NCR και VP1 αλληλουχίες θα μπορούσε να δώσει επιπλέον πληροφορίες όσον αφορά την εξέλιξη των στελεχών αυτών.

Ένα άλλο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η συσχέτιση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών με την κινητική ανάπτυξης

εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 14 ιικά στελέχη εκ των οποίων 6 ιικά στελέχη έφεραν απλούς ανασυνδυασμούς, 6 ιικά στελέχη έφεραν διπλούς ανασυνδυασμούς και δύο ιικά στελέχη τα οποία δεν έφεραν ανασυνδυασμό. Προσδιορίστηκαν οι φαινοτυπικές ιδιότητες κάθε ιικού στελέχους όπως η θερμοευαισθησία και η κινητική ανάπτυξης και συσχετίστηκαν με γενωμικές τροποποιήσεις όπως οι ανασυνδυασμοί και οι μεταλλάξεις.

Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) διαφέρουν από τα προγονικά τους στελέχη σε βιολογικές ιδιότητες εκτός της νευρομολυσματικότητας, κάποιες από τις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως *in vitro* μάρτυρες προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα νέων παρτίδων εμβολίων πριν γίνουν τεστ νευρομολυσματικότητας σε πιθήκους. Το RCT τεστ και η καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου έχουν χρησιμοποιηθεί ως *in vitro* φαινοτυπικοί μάρτυρες για την ταυτοποίηση εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με αυξημένη νευρομολυσματικότητα (Christodoulou et al. 1990; Macadam et al. 1989; Macadam et al. 1991; Bouchard et al. 1995; Georgescu et al. 1995; Tardy-Panit et al. 1993; Gutiérrez et al. 1997; Georgescu et al. 1997; McGoldrick et al. 1995; Georgescu et al. 1994; Martín et al. 2004; Cello et al. 2008; Malnou et al. 2004; De Jesus et al. 2005).

Ο φαινότυπος ανάπτυξης 8 εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών (Πίνακας 2.2), εκ των οποίων 6 φέρουν απλούς ανασυνδυασμούς και 2 είναι μη-ανασυνδυασμένα, καθώς και των Sabin εμβολιακών στελεχών προσδιορίστηκε σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 40°C) χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές μεθόδους (RCT τεστ και καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου).

Στο μη-ανασυνδυασμένο Sabin 1 στέλεχος (II), η παρουσία μεταλλάξεων σε γνωστούς καθοριστές της εξασθένισης και της θερμοευαισθησίας (νουκλεοτίδιο 525 της 5'-NCR περιοχής και αμινοξικό κατάλοιπο 106 της VP1) ή σε άλλες θέσεις της 5'-NCR περιοχής (νουκλεοτίδιο 583) και της VP1 περιοχής (κατάλοιπα 96, 99, 168, 220) που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, δεν επηρεάζουν την κινητική ανάπτυξης τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C καθώς το στέλεχος αυτό αντιγράφεται παρόμοια με το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος. Ωστόσο, το στέλεχος αυτό εμφάνισε μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο όπως προκύπτει από το RCT τεστ (RCT τιμή 2.0 μονάδες). Η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων πιθανόν

σχετίζεται με το γεγονός ότι αυτές παρουσιάζουν την ιϊκή αντιγραφή για διαφορετικές χρονικές περιόδους. Το RCT τεστ δείχνει την ιϊκή ανάπτυξη μετά από 5 μέρες επώασης ενώ η καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου παρουσιάζει την ιϊκή ανάπτυξη κατά την διάρκεια των πρώτων 12 ωρών μετά την μόλυνση των κυττάρων. Γενικά η παρουσία πολλών άλλων καθοριστών της θερμοευαισθησίας (νουκλεοτίδια 935, 1944, 2438 και 2741) στο 5' άκρο του γενώματος του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους κάνει δύσκολη την αναστροφή των Sabin 1 ιϊκών στελεχών σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο (Bouchard et al. 1995).

Δυο από τα ανασυνδυασμένα Sabin 2 ιϊκά στελέχη (EP9 και EP12) (S2/S1) εμφάνισαν έναν επιταχυνόμενο μολυσματικό κύκλο σε σύγκριση με το Sabin 2 πρότυπο εμβολιακό στέλεχος. Ωστόσο, τα ανασυνδυασμένα Sabin 2 ιϊκά στελέχη IF (S2/S1) και ID (S2/S1) εμφάνισαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης με το Sabin 2 πρότυπο εμβολιακό στέλεχος. Σε όλα τα Sabin 2 ιϊκά στελέχη ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη στη θέση 481 της 5'-NCR περιοχής και σε δυο από αυτά (EP9 και EP12) ταυτοποιήθηκε επιπλέον η μετάλλαξη στο αμινοξύ 143 της VP1, θέσεις που αποτελούν κύριους καθοριστές της εξασθένισης του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους. Κατά συνέπεια, ο επιταχυνόμενος φαινότυπος ανάπτυξης των στελεχών EP9 και EP12 σχετίζεται με την παρουσία της μετάλλαξης στο αμινοξύ 143 της VP1. Αν και τα στελέχη IF και ID εμφάνισαν παρόμοια κινητική με το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος, το ID έδειξε υψηλότερο ιϊκό φορτίο από το Sabin 2 εμβολιακό στέλεχος σε κάθε χρονική στιγμή μετά την μόλυνση. Επιπλέον, το στέλεχος EP9 εμφάνισε υψηλότερο ιϊκό φορτίο από το στέλεχος EP12 στις 6 και 8 ώρες μετά την μόλυνση. Έτσι, η μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 6203 της 3D^{pol} στα στελέχη EP9 και ID πιθανόν έχει μια συνεισφορά στο φαινότυπο ανάπτυξης. Επιπλέον, η μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 4473 της 2C περιοχής στο στέλεχος EP9 θα μπορούσε να έχει κάποια συνεισφορά στον φαινότυπο ανάπτυξης. Στο RCT τεστ, τρία στελέχη (EP9, IF, ID) και ένα στέλεχος (EP12) Sabin 2 γενότυπου εμφάνισαν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο και μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο αντίστοιχα, οι οποίοι έρχονται σε αντίθεση με τους φαινότυπους στους 40°C στις καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου. Συγκεκριμένα, στους 40°C η ανάπτυξη όλων των Sabin 2 ιϊκών στελεχών παρεμποδίστηκε όπως και του Sabin 2 πρότυπου εμβολιακού στελέχους.

Το μη-ανασυνδυσασμένο Sabin 3 στέλεχος (729) εμφάνισε τον ίδιο φαινότυπο ανάπτυξης και την ίδια RCT τιμή με το Sabin 3 πρότυπο εμβολιακό στέλεχος παρά την παρουσία μεταλλάξεων σε σημαντικούς καθοριστές της εξασθένησης και της θερμοευαισθησίας (νουκλεοτίδιο 472 της 5'-NCR περιοχής και κατάλοιπο 6 της VP1 περιοχής). Τα ανασυνδυσασμένα Sabin 3 στελέχη EP16 (S3/S2) και EP23 (S3/S1), εμφάνισαν παρόμοια κινητική ανάπτυξης στους 37°C με το μη-ανασυνδυσασμένο στέλεχος 729 και με το Sabin 3 πρότυπο εμβολιακό στέλεχος αλλά υψηλότερο ιϊκό τίτλο ($1,0-2,5 \log_{10}$ units) στα αρχικά στάδια της μόλυνσης. Επιπλέον, τα στελέχη EP16 και EP23 εμφάνισαν μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο ενώ το στέλεχος 729 εμφάνισε θερμοευαίσθητο φαινότυπο όπως προκύπτει από το RCT τεστ. Τα στελέχη EP16 και EP23 εμφάνισαν μεταλλάξεις στους ίδιους καθοριστές της εξασθένησης και της θερμοευαισθησίας με το μη-ανασυνδυσασμένο στέλεχος 729. Κατά συνέπεια οι διαφορετικοί φαινότυποι των ανασυνδυσασμένων στελεχών EP16 και EP23 σε σύγκριση με εκείνον του στελέχους 729 πιθανόν σχετίζονται με την παρουσία του ανασυνδυσασμού. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μιας προηγούμενης μελέτης (Macadam et al. 1989) η οποία έδειξε ότι παρόμοια Sabin 3 ανασυνδυσασμένα στελέχη ήταν ελαφρώς πιο θερμοευαίσθητα από άλλα Sabin 3 μη-ανασυνδυσασμένα στελέχη που περιείχαν τις ίδιες ακριβώς μεταλλάξεις. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η μερική αναστροφή των στελεχών EP16 και EP23 σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο στο RCT τεστ έρχεται σε αντίθεση με τους φαινότυπους στους 40°C στις καμπύλες ανάπτυξης ενός σταδίου όπου η ανάπτυξη και των δυο στελεχών παρεμποδίστηκε όπως και του Sabin 3 πρότυπου εμβολιακού στελέχους.

Συμπερασματικά, στα Sabin 2 ιϊκά στελέχη με απλό ανασυνδυσασμό τύπου S2/S1 η μετάλλαξη στο κατάλοιπο 143 της VP1 πρωτεΐνης ευνοεί σημαντικά την ιϊκή ανάπτυξη και πιθανόν την αναστροφή προς την νευρομολυσματικότητα. Η μετάλλαξη αυτή έχει συχνά παρατηρηθεί σε Sabin 2 ιϊκά στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP (Macadam et al. 1991; Georgescu et al. 1995; Muzychenko et al. 1991; Macadam et al. 1993; Georgescu et al. 1994; Equestre et al. 1991). Στα Sabin 3 ιϊκά στελέχη, ο ανασυνδυσασμός του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους με τα στελέχη Sabin 1 ή Sabin 2 και η απόκτηση γενωμικής δομής S3/S1 ή S3/S2 ευνοεί την ιϊκή ανάπτυξη και πιθανόν την

αναστροφή προς την νευρομολυσματικότητα. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι S3/SX ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν συχνά απομονωθεί από άτομα με VAPP (Karakasiliotis et al. 2004; Paximadi et al. 2006; Cuervo et al. 2001; Martín et al. 2002; Paximadi et al. 2007).

Ο φαινότυπος ανάπτυξης 8 εμβολιοσυνδεόμενων πολιτών (Πίνακας 2.3), εκ των οποίων 6 φέρουν διπλούς ανασυνδυασμούς και 2 είναι μη-ανασυνδυασμένα, καθώς και των Sabin εμβολιακών στελεχών προσδιορίστηκε σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 40°C) χρησιμοποιώντας το RCT τεστ και την καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου.

Ο φαινότυπος ανάπτυξης του μη-ανασυνδυασμένου Sabin 1 στελέχους (II) συζητήθηκε προηγουμένως. Το ανασυνδυασμένο Sabin 1 στέλεχος (742: S1/S3/S2) εμφάνισε τον ίδιο φαινότυπο ανάπτυξης με το στέλεχος II. Συγκεκριμένα, η παρουσία μεταλλάξεων σε γνωστούς καθοριστές της εξασθένισης και της θερμοευαισθησίας (νουκλεοτίδιο 480 της 5'-NCR περιοχής) ή σε άλλες θέσεις της 5'-NCR περιοχής (νουκλεοτίδιο 583) και της VP1 περιοχής (κατάλοιπα 99, 142) που εμπλέκονται στην ιϊκή αντιγραφή, δεν επηρεάζουν την κινητική ανάπτυξης τόσο στους 37°C όσο και στους 40°C καθώς το στέλεχος αυτό αντιγράφεται παρόμοια με το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος. Ωστόσο, το στέλεχος αυτό εμφάνισε μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο όπως προκύπτει από το RCT τεστ (RCT τιμή 2.0 μονάδες).

Η παρουσία S1/SX (SX: S2 ή S3) ανασυνδυασμένων στελεχών είναι πολύ σπάνια. Επιπλέον, αλληλουχίες του Sabin 1 στελέχους συνήθως εντοπίζονται σε SX/S1 ανασυνδυασμένα στελέχη (Macadam et al. 1989; Georgescu et al. 1994; Cuervo et al. 2001; Driesel et al. 1995; Gavrilin et al. 2000; Savolainen-Kopra et al. 2009). Το γεγονός αυτό πιθανόν σχετίζεται με την αυξημένη αρμοστικότητα των SX/S1 ανασυνδυασμένων στελεχών έναντι των S1/SX στελεχών. Οι καθοριστές της εξασθένισης και της θερμοευαισθησίας του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους κατανέμονται σε όλο το γένωμα αλλά οι περισσότεροι εντοπίζονται στην 5'-NCR περιοχή και στην περιοχή του καψιδίου (Bouchard et al. 1995). Το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος πιθανόν ανταλλάσει το 5' άκρο του γενώματός του με εκείνο του Sabin 2 ή Sabin 3 εμβολιακού στελέχους ώστε να απαλλαγεί από αυτές τις μεταλλάξεις που μειώνουν την αρμοστικότητά του. Η Sabin 1 εμβολιακή προέλευση του 5' άκρου του στελέχους 742 (S1/S3/S2) οδηγεί στην απόκτηση πολλών καθοριστών εξασθένισης και θερμοευαισθησίας. Κατά

συνέπεια, το στέλεχος 742 αντιγράφεται παρόμοια με το Sabin 1 πρότυπο εμβολιακό στέλεχος παρά την παρουσία μετάλλαξης σε έναν κύριο καθοριστή εξασθένισης και θερμοευαισθησίας της 5'-NCR περιοχής (νουκλεοτιδίο 480). Επιπλέον, η παρουσία ανασυνδυασμού στο στέλεχος 742 δεν επηρεάζει τον φαινότυπό του καθώς αυτό εμφανίζει μερική αναστροφή σε έναν μη-θερμοευαίσθητο φαινότυπο στο RCT τεστ όπως και το μη-ανασυνδυασμένο Sabin 1 στέλεχος (II).

Όλα τα Sabin 3 ιικά στελέχη εμφάνισαν μεταλλάξεις στους ίδιους καθοριστές εξασθένισης και θερμοευαισθησίας που εντοπίζονται στις 5'-NCR και VP1 περιοχές. Κατά συνέπεια, οι διαφορετικοί φαινότυποι των στελεχών LK3, LK6 και LK10 με ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S1 σε σύγκριση με εκείνους των στελεχών EPA, EPB με ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S3 και του μη-ανασυνδυασμένου στελέχους 729 πιθανόν σχετίζονται με την παρουσία άλλων μεταλλάξεων στο γένωμα και με τον τύπο του ανασυνδυασμού. Τέτοιες θέσεις είναι η αμινοξική υποκατάσταση His-73-Tyr της 3D πολυμεράσης η οποία είναι ένας γνωστός καθοριστής εξασθένισης και θερμοευαισθησίας του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους καθώς και μεταλλάξεις στις 5'-NCR, VP1, 3A, 3C και 3D περιοχές των στελεχών LK3, LK6 και LK10. Ο λειτουργικός ρόλος αυτών των μεταλλάξεων δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα αλλά η παρουσία τους στα στελέχη LK3, LK6 και LK10 δείχνει ότι παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα και υποστηρίζουν την αναστροφή των εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών προς νευρομολυσματικά. Επίσης, ο τύπος ανασυνδυασμού S3/S2/S1 των στελεχών LK3, LK6 και LK10 οδηγεί στην εξάλειψη των κύριων καθοριστών εξασθένισης και θερμοευαισθησίας που εντοπίζονται στο 5' άκρο του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους σε αντίθεση με το στέλεχος 742 (S1/S3/S2).

Συμπερασματικά, η παρουσία του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους στο 3' άκρο ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών ευνοεί την αναστροφή τους προς νευρομολυσματικά. Αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι Sabin 2 και Sabin 3 ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν απομονωθεί συχνά από άτομα με VAPP ενώ κανένα από τα Sabin 1 στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP δεν βρέθηκαν ανασυνδυασμένα (Macadam et al. 1989; Furione et al. 1993; Georgescu et al. 1994; Otelea et al. 1993). Επιπλέον, Sabin 2 και Sabin 3 ανασυνδυασμένα στελέχη με το Sabin 1 στέλεχος στο 3' άκρο έχουν απομονωθεί πιο συχνά από άτομα με VAPP σε σύγκριση με εκείνα τα οποία

φέρουν το Sabin 2 ή Sabin 3 στέλεχος στο 3' άκρο. Σε μια προηγούμενη μελέτη, όλα τα Sabin 3 ανασυνδυασμένα στελέχη με το Sabin 1 στέλεχος στο 3' άκρο (δύο με ανασυνδυασμό τύπου S3/S2/S1 και ένα με ανασυνδυασμό τύπου S3/S1) είχαν απομονωθεί από άτομα με VAPP ενώ τρία από τα τέσσερα Sabin 3 ανασυνδυασμένα στελέχη με το Sabin 3 στέλεχος στο 3' άκρο (S3/S2/S3) είχαν απομονωθεί από υγιή εμβολιασμένα άτομα (Macadam et al. 1989). Στην παρούσα μελέτη, και τα δυο S3/S2/S3 ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν επίσης απομονωθεί από υγιή εμβολιασμένα άτομα. Επιπλέον, η παρουσία στελεχών με αυξημένη νευρομολυσματικότητα στο περιβάλλον όπως τα τρία S3/S2/S1 ανασυνδυασμένα στελέχη (LK3, LK6 και LK10), τονίζει την αναγκαιότητα για περιβαλλοντικό έλεγχο.

Ο έλεγχος της θερμοευαισθησίας και η κινητική μελέτη των εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών (με απλούς και με διπλούς ανασυνδυασμούς) έδειξε ότι τόσο οι μεταλλάξεις όσο και ο ανασυνδυασμός μπορούν να επηρεάσουν τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες και να οδηγήσουν στην αναστροφή προς νευρομολυσματικά στελέχη. Επιπλέον, ο ανασυνδυασμός επιτρέπει είτε την συσσώρευση αναστροφών σε θέσεις καθοριστές της εξασθένισης και της θερμοευαισθησίας σε ένα ιϊκό γένωμα είτε την εξάλειψη κάποιων καθοριστών εξασθένισης και θερμοευαισθησίας από ένα ιϊκό γένωμα. Ωστόσο, το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος είναι γενετικώς πιο σταθερό από ότι τα Sabin 2 και Sabin 3 εμβολιακά στελέχη λόγω των περισσότερων καθοριστών εξασθένισης και θερμοευαισθησίας στο γένωμά του. Αυτό πιθανόν ερμηνεύει τον λόγο για τον οποίο τα Sabin 2 και Sabin 3 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη απομονώνονται πιο συχνά από άτομα με VAPP σε σύγκριση με τα Sabin 1 στελέχη (περίπου το 12 % μόνο των περιπτώσεων) (Strebel et al. 1992; Strebel et al. 1994).

Από το 1960, οι πολιοϊοί ελέγχονται αποτελεσματικά με τη χρήση δυο εμβολίων: του απενεργοποιημένου IPV και του ζωντανού OPV (Kew et al. 2005). Από το 1964, το OPV έγινε το εμβόλιο επιλογής στις περισσότερες χώρες του κόσμου και οδήγησε σε σημαντική μείωση των περιστατικών πολιομυελίτιδας οφειλόμενων σε μολύνσεις με πολιοϊούς αγριου-τύπου (από 350.000 περιστατικά σε 125 ενδημικές χώρες το 1988 σε 1.310 περιστατικά σε 4 χώρες το 2007) (CDC 2008). Ωστόσο, την δεκαετία του 1990 αναγνωρίστηκε ότι επιδημίες πολιομυελίτιδας μπορούν να προκαλέσουν και εμβολιοσυνδεόμενα

στελέχη πολιοϊών τα οποία μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών έχουν γίνει νευρομολυσματικά. Μέχρι το 2005, έξι επιδημίες οφειλόμενες σε κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (cVDPVs), είχαν αναφερθεί. Επιπλέον, σε σπάνιες περιπτώσεις (1 περίπτωση ανα 750.000 εμβολιασμούς) τα στελέχη του OPV εμβολίου έχουν οδηγήσει σε VAPP (εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα) (Kew et al. 2002; Shimizu et al. 2004; Rousset et al. 2003; CDC 2004). Η εμφάνιση περιπτώσεων VAPP και η απομόνωση VDPV στελεχών οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να προτείνει την διακοπή της χορήγησης του OPV εμβολίου όσο το δυνατόν συντομότερο μετά την εξάλειψη των πολιοϊών αγρίου-τύπου και την συνέχιση του εμβολιασμού με το IPV (Heymann et al. 2006). Σε μια εποχή εκρίζωσης των πολιοϊών αγρίου-τύπου, η κύρια πηγή μόλυνσης από πολιοϊούς παγκοσμίως είναι τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη. Καθώς η πλειοψηφία των χωρών έχει αντικαταστήσει το εμβόλιο OPV με το IPV και λαμβάνοντας υπόψη ότι το IPV δεν επάγει τα ίδια επίπεδα ανοσίας με το OPV, η εισαγωγή ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με αυξημένη νευρομολυσματικότητα θα είχε σοβαρές επιπτώσεις στην δημόσια υγεία.

Το OPV άρχισε να χρησιμοποιείται στην Ελλάδα από το 1964 με ένα πρόγραμμα εμβολιασμού το οποίο περιλάμβανε 4 δόσεις στην ηλικία των 2, 4, 6, 18 μηνών και μια ενισχυτική δόση στην ηλικία των 4-6 ετών. Το εμβόλιο OPV περιέχει και τους τρεις οροτύπους των πολιοϊών Sabin 1 (πολιοϊός τύπου 1), Sabin 2 (πολιοϊός τύπου 2), Sabin 3 (πολιοϊός τύπου 3) σε μια αναλογία 10:1:3 αντίστοιχα. Αυτό το πρόγραμμα εμβολιασμού οδήγησε στην εξάλειψη των ενδογενών περιπτώσεων πολιομυελίτιδας από το 1982 (Frantziidou-Adamopoulou 1992). Ωστόσο, η Ελλάδα έχει περάσει στην αποκλειστική χρήση του εμβολίου IPV από το 2005 όπως συμβαίνει πλέον και στις περισσότερες χώρες στις οποίες έχουν εξαλειφθεί οι πολιοϊοί αγρίου-τύπου. Κατά συνέπεια ο έλεγχος του επιπέδου ανοσίας του ανθρώπινου πληθυσμού έναντι των πολιοϊών κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικός σε μια μεταβατική περίοδο από το OPV εμβόλιο στο IPV.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε έλεγχος του επιπέδου ανοσίας ατόμων ηλικίας 1-40 ετών έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) και μιας συλλογής 15 ανασυνδυασμένων και 4 μη-ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με τη μέθοδο της

οροεξουδετέρωσης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους τίτλους των αντισωμάτων της ηλικιακής ομάδας 1-40 έναντι των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών σε σύγκριση με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Εξαιρέση αποτέλεσαν δυο Sabin 1 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη, 742 και 522, με το πρώτο να φέρει ανασυνδυασμό τύπου S1/S3/S2 και το δεύτερο να είναι μη-ανασυνδυασμένο.

Και στους τρεις οροτύπους πολιοϊών, οι υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων παρατηρήθηκαν στην ηλικιακή ομάδα 1-10 ενώ ο χαμηλότερος τίτλος αντισωμάτων παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών οροτύπου 3. Γενικά η ορολογική κατάσταση του πληθυσμού είναι καλύτερη για τους πολιοϊούς τύπων 1 και 2 από ότι για τους πολιοϊούς τύπου 3. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα προηγούμενων μελετών (Frantzidou et al., 2005; Mastroeni et al., 1997; White and Green, 1986). Η παρουσία του χαμηλότερου τίτλου αντισωμάτων στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών τύπου 3 δείχνει την αναγκαιότητα για μια ενισχυτική δόση με το μονοθενές Sabin 3 εμβολιακό στέλεχος ώστε να διασφαλιστεί η ατομική και η συλλογική ανοσία.

Σε μια εποχή μετά την αντικατάσταση του εμβολίου OPV από το IPV στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες και λαμβάνοντας υπόψη την ασθενέστερη ανοσοποίηση που επάγει το IPV, ο έλεγχος του επιπέδου ανοσίας του πληθυσμού σε τακτά χρονικά διαστήματα κρίνεται αναγκαίος. Η παρουσία πληθυσμών με κενά στην ανοσολογική κάλυψη θα μπορούσε να οδηγήσει στην εμφάνιση επιδημιών πολιομυελίτιδας οφειλόμενες είτε σε cVDPV είτε σε εισαγόμενα στελέχη πολιοϊών αγρίου-τύπου από ενδημικές χώρες.

Εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών με μία ή πολλαπλές θέσεις ανασυνδυασμού έχουν απομονωθεί από υγιή εμβολιασμένα άτομα και άτομα με VAPP σε προηγούμενες μελέτες (Kew et al. 2002; Cuervo et al. 2001; Georgopoulou and Markoulatos, 2001; Karakasiliotis et al. 2004; Blomqvist et al. 2003; Georgescu et al. 1995; Karakasiliotis et al. 2005; Paximadi et al. 2006; Boot et al. 2004; Liu et al. 2003). Διάφοροι παράγοντες ευνοούν την συσσώρευση διατυπικών ανασυνδυασμών στα εξασθενημένα στελέχη του OPV εμβολίου. Όπως προαναφέρθηκε, ο ανασυνδυασμός βοηθάει στην εξάλειψη των μεταλλάξεων που ευθύνονται για τον εξασθενημένο και θερμοευαίσθητο φαινότυπο των Sabin εμβολιακών στελεχών. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι θέσεις ανασυνδυασμού εντοπίζονται συνήθως στο ενδιάμεσο ή στο

3' άκρο της 2C περιοχής για τους ανασυνδυασμούς τύπου S3/Sx και στο ενδιάμεσο ή στο 3' άκρο της 3D περιοχής για τους ανασυνδυασμούς τύπου S2/Sx (Kew et al. 2002; Cuervo et al. 2001; Georgopoulou and Markoulatos, 2001; Karakasiliotis et al. 2004; Blomqvist et al. 2003; Georgescu et al. 1995; Karakasiliotis et al. 2005; Paximadi et al. 2006; Boot et al. 2004; Liu et al. 2003).

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μια νέα multiplex RT-PCR μέθοδος για την ταυτοποίηση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D μη-δομικές περιοχές του γονιδιώματος εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 μέσω μιας multiplex PCR αντίδρασης επιτρέπουν την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμών τύπων S3/S1 και S3/S2 στην 2C περιοχή δίνοντας PCR προϊόντα 1280 και 1227 bp, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα παραπάνω εκκινητικά μόρια ενισχύουν ολόκληρη τη 2C περιοχή (νουκλεοτίδια 4088-5368 για τον S3/S1 τύπο ανασυνδυασμού ή 4088-5315 για τον S3/S2 τύπο ανασυνδυασμού) επιτρέποντας την ταυτοποίηση όλων των S3/S1 και S3/S2 ανασυνδυασμών στην 2C περιοχή. Τα εκκινητικά μόρια S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 μέσω μιας δεύτερης multiplex PCR αντίδρασης επιτρέπουν την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμών τύπων S2/S1 και S2/S3 στην 3D περιοχή δίνοντας PCR προϊόντα 733 και 803 bp, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, αυτά τα εκκινητικά μόρια ενισχύουν μια περιοχή στο 3' άκρο της 3D περιοχής (νουκλεοτίδια 6430-7163 για τον S2/S1 τύπο ανασυνδυασμού ή 6430-7233 για τον S2/S3 τύπο ανασυνδυασμού) επιτρέποντας την ταυτοποίηση των S2/S1 και S2/S3 ανασυνδυασμών που εντοπίζονται στο 3' άκρο της 3D περιοχής.

Έντεκα ανασυνδυασμένα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την αξιολόγηση της multiplex RT-PCR μεθόδου. Έξι από αυτά τα στελέχη (EPA, EPB, EPC, LK3, LK6, LK10) είχαν ταυτοποιηθεί μέσω αλληλούχισης ως διπλά ανασυνδυασμένα με τις θέσεις ανασυνδυασμού να εντοπίζονται στις 2C ή/και 3D περιοχές ενώ πέντε από αυτά (EP16, EP23, ENP5, ENP7, ENP8) έφεραν μια θέση ανασυνδυασμού στην 2C ή 3D περιοχή. Όλοι οι ανασυνδυασμοί τύπων S3/S1 ή S3/S2 στην 2C περιοχή των θετικών μαρτύρων επιβεβαιώθηκαν μέσω της multiplex PCR αντίδρασης εκτός του S2/S1 ανασυνδυασμού που εντοπίζεται στο 3' άκρο της 2C περιοχής των στελεχών LK3, LK6 και LK10. Τα στελέχη LK3, LK6 και LK10 ταυτοποιήθηκαν ως διπλά ανασυνδυασμένα (S3/S2/S1) στην 2C περιοχή, με

τη θέση του πρώτου ανασυνδυασμού S3/S2 να εντοπίζεται στο 5' άκρο της και τη θέση του δεύτερου ανασυνδυασμού S2/S1 στο 3' άκρο της. Ανασυνδυασμοί οι οποίοι οδηγούν σε μια τριμερή 2C πρωτεΐνη είναι σπάνιοι. Στα ανασυνδυασμένα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη S3/S2/S1, οι θέσεις των ανασυνδυασμών εντοπίζονται συνήθως στις 2C και 3D περιοχές (Cuervo et al. 2001; Martín et al. 2002). Επιπλέον, όλοι οι ανασυνδυασμοί τύπων S2/S1 ή S2/S3 στην 3D περιοχή των θετικών μαρτύρων επιβεβαιώθηκαν μέσω της δεύτερης multiplex PCR αντίδρασης.

Το επίπεδο ευαισθησίας και των δυο multiplex PCR αντιδράσεων έφτασε στο επίπεδο του 1 TCID₅₀/0.1 ml. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε δείγματα που δεν περιέχουν μίγματα πολιοϊών καθώς τα πρότυπα ενίσχυσης που θα προέκυπταν από μίγματα ιικών στελεχών δεν θα μπορούσαν να ερμηνευθούν.

Οι multiplex PCR αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμών στις 2C ή/και 3D περιοχές τριών εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών (584, 738, 742) που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη από το περιβάλλον. Δυο από τα στελέχη (742, 584) έδωσαν ένα PCR προϊόν 1227 bp στην multiplex PCR αντίδραση με τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 το οποίο αντιστοιχεί σε ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 στην 2C περιοχή. Επιπλέον ένα από τα περιβαλλοντικά στελέχη (738) έδωσε ένα PCR προϊόν 733 bp στην multiplex PCR αντίδραση με τα εκκινητικά μόρια S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 το οποίο αντιστοιχεί σε ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 στην 3D περιοχή. Και τα τρία περιβαλλοντικά στελέχη αλληλουχίστηκαν από την 2A έως την 3'-NCR περιοχή προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τις ακριβείς θέσεις ανασυνδυασμού. Η αλληλούχιση επιβεβαίωσε τον ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 στην 2C περιοχή των στελεχών 742 και 584. Συγκεκριμένα, οι θέσεις ανασυνδυασμού εντοπίστηκαν στο ενδιάμεσο της 2C περιοχής, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4449-4464 για το στέλεχος 584 και μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4511-4527 για το στέλεχος 742. Επιπλέον, η αλληλούχιση επιβεβαίωσε τον ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 στην 3D περιοχή του στελεχούς 738. Η θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε στο 3' άκρο της 3D περιοχής μεταξύ των νουκλεοτιδίων 6901-6909.

Η αλληλούχιση έδειξε την παρουσία ενός επιπλέον ανασυνδυασμού σε κάθε ένα από τα τρία περιβαλλοντικά στελέχη. Στο στέλεχος 742 ένας σπάνιος

ανασυνδυασμός τύπου S1/S3 ταυτοποιήθηκε στο 5' άκρο της 2A περιοχής με τη θέση ανασυνδυασμού να εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3461-3465. Οι ανασυνδυασμοί οι οποίοι φέρουν το Sabin 1 εμβολιακό στέλεχος στο 5' άκρο τους και είναι τύπου S1/S3 είναι ιδιαίτερα σπάνιοι. Επιπλέον, οι ανασυνδυασμοί τύπου S1/SX εντοπίζονται συνήθως στο 5' άκρο της 3D περιοχής (Cuervo et al. 2001; Paximadi et al. 2007; Georgescu et al. 1994; Driesel et al. 1995). Ένας σπάνιος ανασυνδυασμός τύπου S3/S2 εντοπίστηκε στο 3' άκρο της 3C περιοχής του στελέχους 738 με την θέση ανασυνδυασμού να βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 5804-5814. Στο στέλεχος 584, ένας ανασυνδυασμός τύπου S2/S1 ταυτοποιήθηκε στο 3' άκρο της 3D περιοχής με την θέση ανασυνδυασμού να εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 7150-7172. Ο ανασυνδυασμός S2/S1 του στελέχους 584 δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί μέσω της multiplex PCR αντίδρασης καθώς η θέση ανασυνδυασμού εντοπίζεται downstream της θέσης υβριδισμού (νουκλεοτιδία 7141-7163) του antisense εκκινητή S1a3dmp.

Συμπερασματικά, η multiplex RT-PCR μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την γρήγορη ταυτοποίηση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Η ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών κρίνεται σημαντική σε μια εποχή εκρίζωσης των πολιοϊών αγρίου τύπου και αντικατάστασης του OPV από το IPV εμβόλιο.

Ένα τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ανίχνευση και η φυλογενετική ανάλυση νοροϊών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Οι νοροϊοί είναι υπεύθυνοι για >90% των επιδημιών γαστρεντερίτιδας μη-βακτηριακής προέλευσης σε μικρά παιδιά, ενήλικες και ηλικιωμένους και παρατηρούνται συνήθως σε νοσοκομεία, κλινικές, σχολεία, στρατιωτικές μονάδες, εστιατόρια και ξενοδοχεία όπου η μετάδοση του ιού είτε από άτομο σε άτομο είτε από μια μολυσμένη πηγή, όπως μολυσμένη τροφή ή πόσιμο νερό, διευκολύνεται (Dedman et al. 1998). Οι νοροϊοί διαφέρουν από τους υπόλοιπους εντερικούς ιούς στο ότι επάγουν μια σχετικά βραχυπρόθεσμη ανοσία και έτσι τα άτομα παραμένουν ευαίσθητα σε μόλυνση σε όλη τη διάρκεια ζωής τους. Οι νοροϊοί έχουν μελετηθεί εντατικά λόγω της οξείας φύσης της ασθένειας που προκαλούν και της αποτελεσματικότητας μετάδοσης του ιού αλλά η ανίχνευσή τους βασιζόνταν μέχρι πρόσφατα κυρίως στην

ηλεκτρονική μικροσκοπία καθώς δεν αναπτύσσονται σε κανένα γνωστό σύστημα κυτταροκαλλιέργειας. Η ανίχνευσή τους ήταν επίσης δύσκολη λόγω της ακαθόριστης μορφολογίας του ιοσωματίου. Μετά την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος του πρότυπου στελέχους Norwalk (Jiang et al. 1993; Lambden et al. 1993), πολλά εργαστήρια έχουν σχεδιάσει τεχνικές που βασίζονται στην RT-PCR μέθοδο για την ανίχνευση των νοροϊών. Ωστόσο, η γενετική ετερογένεια των νοροϊών δεν επιτρέπει τον σχεδιασμό μιας RT-PCR τεχνικής ικανής να ανιχνεύει όλα τα ιϊκά στελέχη. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η ομοιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των ιών της GI και GII ομάδας είναι <60%, ενώ μεταξύ κάθε γενότυπου είναι περίπου 75% (Green et al., 1993). Η περιοχή που κωδικοποιεί για την ιϊκή πολυμεράση θεωρείται η πιο συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματος των νοροϊών και μια ποικιλία εκκινητικών μορίων έχουν σχεδιαστεί για την ενίσχυση αυτής της περιοχής (Ando et al. 1995; Green et al. 1995a, b; Jiang et al. 1999; Le Guyader et al. 1996; Vinje and Koopmans, 1996). Επιπλέον, εκκινητικά μόρια που στοχεύουν σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος των νοροϊών έχουν σχεδιαστεί όπως για τις σχετικά συντηρημένες περιοχές στο 3' άκρο του ORF1 (Fankhauser et al. 2002), στο 5' άκρο του ORF2 (Green et al. 1995b; Noel et al. 1997; Vinje et al. 2000; Kojima et al. 2002) και στο 3' άκρο του ORF2 (Vinje et al. 2004).

Οι νοροϊοί απεκκρίνονται στα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων και μέσω των συστημάτων αποχέτευσης μπορούν να φτάσουν σε πηγές νερών. Επίσης είναι ανθεκτικοί στις τεχνικές επεξεργασίας των λυμάτων ή του πόσιμου νερού με αποτέλεσμα να επιβιώνουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτελώντας κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Επιδημίες οφειλόμενες στην κατανάλωση πόσιμου νερού επιμολυσμένου με απόβλητα που περιέχουν νοροϊό έχουν συχνά αναφερθεί (Lawson et al. 1991; Kukkula et al. 1997) καθώς επίσης και μολύνσεις οφειλόμενες στην κατανάλωση οστρακοειδών που είναι επιμολυσμένα με νοροϊό (Lees et al. 1995; Sugieda et al. 1996; Green et al. 1998). Η ανίχνευση, επομένως, των νοροϊών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα είναι ένα σημαντικό μέσο για την πρόληψη μιας επιδημίας.

Ωστόσο, η ανίχνευση των νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα μέσω της RT-PCR τεχνικής έρχεται αντιμέτωπη με το πρόβλημα της παραγωγής πολλών μη-ειδικών PCR προϊόντων εμποδίζοντας την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Ando et al. 1995; Atmar et al. 1995; Schwab et al. 1998). Η αλληλούχιση

επιτρέπει την ανίχνευση των ειδικών PCR προϊόντων αλλά είναι απαραίτητος ο καθαρισμός των PCR προϊόντων (ελεύθερα από μη-ειδικά προϊόντα) και η μοριακή κλωνοποίησή τους για την αποφυγή μιγμάτων ιικών στελεχών. Επιπλέον, η παρουσία πολύ λίγων ισοωματιών στα περιβαλλοντικά δείγματα συνήθως απαιτεί την εφαρμογή *autonested*, *nested* ή *seminested* PCR για την ανίχνευση των νοροϊών γεγονός το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο επιμολύνσεων των δειγμάτων. Ένα άλλο πρόβλημα που σχετίζεται με την ανίχνευση των νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι η παρουσία αναστολέων της RT-PCR τεχνικής. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την αποφυγή αυτού του προβλήματος όπως για παράδειγμα η χρησιμοποίηση εσωτερικών πρότυπων RNA μαρτύρων (Abbaszadegan et al. 1993; Boom et al. 1999; Boom et al. 1990; Schwab et al. 1995; Schwab et al. 1996).

Στην παρούσα διατριβή, η αρχική ανίχνευση νοροϊών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα έγινε με την RT-PCR τεχνική με ήδη υπάρχοντα στην βιβλιογραφία εκκινητικά μόρια. Εφαρμόστηκαν *autonested*, *nested* ή *seminested* PCR ενώ η παρουσία αναστολέων της RT-PCR τόσο στα κλινικά όσο και στα περιβαλλοντικά δείγματα προσδιορίστηκε με την εφαρμογή μιας PCR με το ζεύγος εκκινητικών μορίων P11P/P13P το οποίο στοχεύει στο βακτηριακό 16S rRNA. Η ανίχνευση θετικών για νοροϊούς κλινικών δειγμάτων (δύο από τα 8 συνολικά δείγματα) επέτρεψε την αλληλούχιση περιοχών του γονιδιώματος τους και την μετέπειτα χρήση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης για τον σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τελικά επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας περιοχής η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του ORF1 (νουκλεοτιδία 4387-5098), ολόκληρο το ORF2 (νουκλεοτιδία 5099-6723) και το 5' άκρο του ORF3 (νουκλεοτιδία 6722-7456) ενός στελέχους (A6) το οποίο απομονώθηκε από τα κόπρανα ατόμου με γαστρεντερίτιδα. Επιπλέον, από τα 8 περιβαλλοντικά δείγματα που αναλύθηκαν, τρία προέκυψαν θετικά για την παρουσία νοροϊών με προέλευση τους βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων. Χρησιμοποιήθηκαν δυο τεχνικές για την συγκέντρωση των περιβαλλοντικών δειγμάτων: μέθοδος διαχωρισμού δυο φάσεων και μέθοδος των φίλτρων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκέντρωση και των τριών θετικών περιβαλλοντικών δειγμάτων είχε πραγματοποιηθεί με τη τεχνική των φίλτρων. Επιπλέον, παρά την εφαρμογή όλων των εκκινητικών

μορίων (νέων και ήδη υπαρχόντων από την βιβλιογραφία) τελικά επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας μόνο μικρής γενωμικής περιοχής (280-700 bp) σε κάθε ένα από τα τρία περιβαλλοντικά δείγματα και στο δεύτερο θετικό κλινικό δείγμα (Δ1).

Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση του κλινικού στελέχους Α6. Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, ένα για κάθε αναγνωστικό πλαίσιο (ORF1, ORF2, ORF3) του γενώματος. Και στα τρία φυλογενετικά δέντρα το στέλεχος Α6 ομαδοποιείται με στελέχη από την GeneBank τα οποία ανήκουν στην γενετική ομάδα GII μεταξύ των οποίων και τα πρότυπα στελέχη Lordsdale, Snow Mountain και Hawaii. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το στέλεχος Α6 σχηματίζει υποομάδα με διαφορετικά στελέχη στα φυλογενετικά των ORF1 και ORF2. Συγκεκριμένα, στο δέντρο του ORF1 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος (GU131223) που απομονώθηκε από την περιοχή της δυτικής Σουηδίας ενώ στο δέντρο του ORF2 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος (EF547401) από την περιοχή Ιαπωνίας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ανασυνδυασμού στην περιοχή ένωσης μεταξύ των ORF1 και ORF2 γεγονός που συμφωνεί με την απομόνωση στελεχών νοροϊών ανασυνδυασμένων σε αυτή την περιοχή (Han et al., 2004; Hardy et al., 1997; Katayama et al., 2002). Η παρουσία μιας δευτεροταγούς δομής μίσχου-θηλιάς στην περιοχή επικάλυψης μεταξύ των ORF1 και ORF2 ευνοεί τον ανασυνδυασμό σε αυτή την περιοχή (Bull et al. 2005). Στο δέντρο του ORF3 το στέλεχος Α6 εμφανίζει μονοφυλετική σχέση με τα άλλα στελέχη γεγονός το οποίο πιθανόν οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό κατατεθειμένων στην GeneBank αλληλουχιών του ORF3. Ωστόσο, τα κοντινότερα φυλογενετικά στελέχη με αυτό είναι εκείνα με αριθμούς καταχώρησης στην GenBank AB084071, AB039776, AF414407 και AF414408 τα οποία απομονώθηκαν από την περιοχή της Ιαπωνίας τα δυο πρώτα και από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής τα δυο τελευταία.

Για τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα τρία περιβαλλοντικά δείγματα GN1, TR3 και LR6 καθώς και για το στέλεχος που απομονώθηκε από το δεύτερο θετικό κλινικό δείγμα Δ1 δεν κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα καθώς αυτά αλληλουχήθηκαν σε μία μόνο μικρή περιοχή του γονιδιώματος. Ωστόσο, η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών στην GenBank έδειξε ότι τα στελέχη Δ1 και GN1 εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην

γενετική ομάδα GI γεγονός το οποίο συμφωνεί με την ενίσχυση των αντίστοιχων PCR προϊόντων με τα ειδικά για την γενετική ομάδα GI εκκινητικά μόρια P78/P80 που στοχεύουν στην περιοχή της ΝΤΡάσης του ORF1. Αντίθετα τα στελέχη TR3 και LR6 εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα GII γεγονός που επίσης συμφωνεί με την ενίσχυση των αντίστοιχων PCR προϊόντων με τα ειδικά για την γενετική ομάδα GII εκκινητικά μόρια mon381/mon383 και NLVORF 1290/NLVORF 1974, αντίστοιχα, που στοχεύουν στο ORF2.

Συμπερασματικά, είναι αναγκαία η αλληλούχιση όσο το δυνατόν περισσότερων γενωμικών περιοχών στελεχών νοροϊών προκειμένου να είναι εφικτές οι φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες και η μελέτη επιπλέον μοριακών χαρακτηριστικών των νοροϊών.

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION OF NOROVIRUSES-POLIOVIRUSES IN THE ENVIRONMENT. IDENTIFICATION OF GENETIC RECOMBINATIONS AND CORRELATION WITH THE REPLICATION EFFICIENCY OF VIRAL STRAINS.

Vaia D. Pliaka

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Polioviruses are members of the enterovirus genus, belonging to the Picornaviridae family. They are the causative agents of poliomyelitis, a paralytic and sometimes fatal disease in humans. The number of poliomyelitis cases caused by wild poliovirus infections has been drastically reduced by the extensive use of two available vaccines: the inactivated poliovirus vaccine (IPV) and the oral poliovirus vaccine (OPV). Despite the importance of OPV in the reduction of poliomyelitis cases, one of the disadvantages associated with this vaccine is the rare occurrence of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) in vaccinees or their healthy contacts through the accumulation of mutations and/or recombination in Sabin strains genome.

Thirteen clinical isolates originating from healthy vaccinees and VAPP cases were initially investigated in order to identify genomic modifications in 5' non-coding region (5'-NCR) and VP1 genomic regions. The analysis of samples was conducted by RT PCR, RFLP, sequencing and bioinformatics analysis. All clinical isolates were characterized as OPV-like viruses. Our results showed that analysis of 5'-NCR and VP1 regions of Poliovirus Sabin strains is important in order to identify mutations that increase neurovirulence and may eventually lead to the emergence of VAPP cases.

Mutations at specific sites of the genome and recombination between Sabin strains may result in the loss of the attenuated phenotype of OPV strains and the acquisition of traits characteristic of wild polioviruses, such as increased neurovirulence and loss of temperature sensitivity. In this view, we determined the phenotypic traits such as temperature sensitivity and growth kinetics of fourteen OPV isolates (recombinant and non-recombinant). The growth

phenotype of each isolate as well as of Sabin vaccine strains in Hep2 cell line at two different temperatures (37°C and 40°C) was evaluated using two different assays, RCT test (Reproductive Capacity at different Temperatures) and one-step growth curve analysis. Moreover, the nucleotide and amino acid positions in the genomes of the isolates that have been identified as being involved in the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin vaccine strains were investigated. Mutations that result in loss of the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin vaccine strains were identified in 5'-NCR, VP1 and 2C-3'-NCR genomic regions of all isolates. Both mutations and recombination events correlated well with the reverted phenotypic traits of OPV-derivatives. The results showed that in Sabin-2 isolates with recombination type S2/S1, the mutation in residue 143 of VP1 capsid protein favours considerably the viral growth phenotype and may lead to the reversion towards neurovirulence. The substitution in residue 143 has been frequently observed in Sabin-2 strains isolated from VAPP cases. In isolates of Sabin 3 genotype, the recombination of Sabin 3 vaccine strain with Sabin 1 or Sabin 2 and the acquisition of genome structure S3/S1 or S3/S2 favour the growth phenotype and the reversion towards neurovirulence. This observation is in accordance with the fact that S3/SX recombinants have been frequently isolated from VAPP cases. Moreover, the presence of Sabin 1 vaccine strain as a 3' partner in bi-recombinants vaccine derived polioviruses (S3/S2/S1) favors the growth phenotype and may lead to the reversion towards neurovirulence. This is in accordance with the fact that recombinants Sabin-2 and Sabin-3 derivatives have been frequently isolated from VAPP cases while none of the Sabin-1 derivatives isolated from VAPP cases were found to be recombinants. The above may correlate with the increased fitness of SX/S1 recombinants than that of the S1/SX recombinants. In contrast, the bi-recombinants vaccine derived polioviruses S3/S2/S3 and S1/S3/S2 showed growth kinetics similar to that of Sabin vaccine strains. In the post-eradication era of wild polioviruses, the identification and the characterization (genomic and phenotypic) of vaccine-derived polioviruses become increasingly important in order to prevent cases or even outbreaks of paralytic poliomyelitis caused by neurovirulent strains.

Moreover, the serological status of southern Greek population of age groups 1-10, 11-20, 21-30 and 31-40 against Sabin vaccine strains and a collection of 15 recombinant and 4 non-recombinant Poliovirus vaccine strains was determined. No significant differences in NT titers of age group 1-40 were observed for the majority of OPV-derivatives in comparison with Sabin vaccine strains. However, significant lower NT titers were observed against two Sabin-1 derivatives, the first with recombination type S1/S3/S2 and the second non-recombinant, in comparison with Sabin 1 vaccine strain. For all three poliovirus types, the highest NT titers were observed in age group 1-10 while the lowest NT titer was observed in age group 21-30 against Poliovirus type 3. The serological status of the population of southern Greece against polioviruses is better for types 1 and 2 than type 3. The presence of the lowest NT titer in age group 21-30 against Poliovirus type 3 suggests the need for a booster dose of monovalent Sabin 3 vaccine to ensure personal and herd immunity. As the preponderance of countries certified to be polio-free has switched from OPV to IPV and taking into consideration that IPV does not induce the same immunity as OPV, the need for immunological studies in all age groups is urgent in order to avoid epidemics due to the circulation of highly-evolved OPV-derivatives and the importation of wild polioviruses from endemic countries.

A multiplex RT-PCR screening analysis for identifying the predominant recombination types in 2C and 3D non-structural regions of vaccine-derived poliovirus strains was also developed in this thesis. In particular, two multiplex PCR were used for the identification of the predominant recombination types S3/SX (SX: S2 or S1) and S2/SX (SX: S3 or S1) in 2C and 3D, respectively, genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains. To test the robustness of the proposed RT-PCR screening analysis, eleven recombinant vaccine-derived polioviruses that were characterized previously by sequencing by our group, in addition to three recently identified recombinant environmental isolates were assayed. Although the most definitive characterization of VDPVs is by genomic sequencing, in this study we describe a new, inexpensive and broadly applicable RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of VDPVs, that can be readily implemented in laboratories lacking sequencing facilities as a first approach for the early detection of VDPVs.

Finally, the detection of noroviruses which account for >90% of the reported outbreaks of non-bacterial gastroenteritis, was conducted in clinical and environmental samples. The detection of norovirus strains (in two out of eight clinical samples) was followed by sequencing of these genomic regions that allowed the designing of new primer pairs in order to sequence the whole genome. The sequencing of a genomic region, which includes the 3' end of ORF1, the whole ORF2 and the 5' end of ORF3 (nucleotides 4460-7421), of a viral strain (A6) isolated from stools of a patient with gastroenteritis was conducted. Moreover, norovirus strains were detected in three out of eight environmental samples originating from the sewage treatment plant of cities of Larissa, Trikala and Ioannina. Despite the use of a wide range of primer pairs (new and already used in previous studies), the sequencing of a small genomic region (280-700 bp) was achieved in each of the three environmental viral strains and in the second clinical viral strain. Finally phylogenetic analysis of the clinical strain A6 was conducted. Three phylogenetic trees for each of the three open reading frames (ORF1, ORF2 and ORF3) were constructed. In all three phylogenetic trees the strain A6 was clustered with viral strains (deposited in GeneBank) of genotype GII. It is noteworthy the fact that the strain A6 was clustered with strains originating from different geographic regions in the phylogenetic trees of ORF1 and ORF2. In particular, the strain A6 was clustered with strains isolated from the western Sweden and the Japan in the phylogenetic trees of ORF1 and ORF2, respectively. This fact indicates the presence of a recombination event in the junction between ORF1 and ORF2 genomic regions which is in accordance with the observation that the noroviruses usually recombine in this region. Phylogenetic trees were not constructed for the other norovirus strains isolated in this study due to the small genomic region sequenced. The sequencing analysis of noroviruses isolates is of importance in order to accomplish phylogenetic and epidemiological studies and define the precise position of recombination events.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP and Pepper IL. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* **59(5)**:1318-24.

Agol V. I. 1997. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* **8**:77-84.

Agol VI. 2002. Genomic instability in picornaviruses. *Mol Biol* **36(2)**:286-95.

Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, Northrup RS. 1973. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis :intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *An Intern Med* **79**:18-25.

Andino R., Rieckhof GE, Achacoso PL and Baltimore D. 1993. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5'-end of viral RNA. *The EMBO Journal* **12(9)**: 3587-3598.

Andino R, Rieckhof GE and Baltimore D. 1990. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell.* **63(2)**:369-80.

Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC and Glass RI. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol.* **33(1)**:64-71.

Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996. Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* **46**:1-68.

Arnold JJ, Gohara DW and Cameron CE. 2004. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mn²⁺. *Biochemistry.* **43(18)**:5138-48.

Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH and Estes MK. 2005. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102(29)**:10327-32.

Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., and Hinnebusch, A.G. 2000. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors eIF1, eIF2, eIF3, and eIF5 and initiator tRNAMet is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* **14**: 2534-2546.

Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG and Estes MK. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol.* **61(8)**:3014-8.

Balanant, J., S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 1991. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* **184**: 645-54.

- Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA and Estes MK.** 1999. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology*. **117(1)**:40-8.
- Banerjee R, Echeverri A and Dasgupta A.** 1997. Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol*. **71(12)**:9570-8.
- Banerjee R, Tsai W, Kim W and 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 and 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.
- Barton DJ, O'Donnell BJ and Flanagan JB.** 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J*. **20(6)**:1439-48.
- Bell YC, Semler BL and Ehrenfeld E.** 1999. Requirements for RNA replication of a poliovirus replicon by coxsackievirus B3 RNA polymerase. *J Virol*. **73(11)**:9413-21.
- Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M and Green KY.** 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol*. **77(20)**:10957-74.
- 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(2)**:178-84.
- Belnap, D. M., B. M. McDermott, D. J. Filman, N. Cheng, B. L. Trus, H. J. Zuccola, V. R. Racaniello, J. M. Hogle, and A. C. Steven.** 2000. Three dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:73-78.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM and Estes MK.** 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol*. **77(21)**:11603-15.
- Billgren M, Christenson B, Hedlund KO and Vinjé J.** 2002. Epidemiology of Norwalk-like human caliciviruses in hospital outbreaks of acute gastroenteritis in the Stockholm area in 1996. *J Infect*. **44(1)**:26-32.
- Blacklow N.R., Dolin R., Fedson D.S., et al.** 1972. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. A combined clinical staff conference at the Clinical Center of the National Institutes of Health. *Ann Intern Med*. **76**:993-1008.
- Blomqvist, S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi.** 2003. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccine and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* **84**: 573-580.

- Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin.** 1998. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* **4**:1-26.
- Boniotti B, Wirblich C, Sibilis M, Meyers G, Thiel HJ and Rossi C.** 1994. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol.* **68(10)**:6487-95.
- Boom R, Sol C, Beld M, Weel J, Goudsmit J and Wertheim-van Dillen P.** 1999. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. *J Clin Microbiol.* **37(3)**:615-9.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM and van der Noordaa J.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* **28(3)**:495-503.
- Boot HJ, Schepp RM, van Nunen FJ and Kimman TG.** 2004. Rapid RT-PCR amplification of full-length poliovirus genomes allows rapid discrimination between wild-type and recombinant vaccine-derived polioviruses. *J Virol Methods.* **116**:35-43.
- Bouchard MJ, Lam DH and Racaniello VR.** 1995. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J Virol* **69**:4972-8.
- Brown, B., M. S. Oberste, K. Maher, and M. A. Pallansch.** 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* **77**:8973–8984.
- Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD and White PA.** 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis.* **11(7)**:1079-85.
- Burroughs JN and Brown F.** 1978. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol.* **41(2)**:443-6.
- Caro, V., S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 2001. Molecular strategy of 'serotyping' of human enterovirus. *J. Gen. Virol.* **82**:79–91.
- Carter MJ, Milton ID, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM and Turner PC.** 1992. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology.* **190(1)**:443-8.
- Casas, I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator.** 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* **53**:25–36.
- Cello J, Toyoda H, Dejesus N, Dobrikova EY, Gromeier M and Wimmer E.** 2008. Growth phenotypes and biosafety profiles in poliovirus-receptor transgenic mice of recombinant oncolytic polio/human rhinoviruses. *J Med Virol* **80**:352-9.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2002. Global progress toward laboratory containment of wild polioviruses. *MMWR* **51**: 993-996.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2004. Acute flaccid paralysis surveillance for expansion to other diseases, 2003–2004. *MMWR* **53**:1113–1116.

Centers for Disease Control and Prevention. 2006. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* 9th edition. Edited by: Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S. Washington, D.C.: Public Health Foundation.

Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Progress toward interruption of wild poliovirus transmission-worldwide, January 2007-April 2008. *MMWR* **57**:489-494.

Chakravarty S., Hutson A.M., Estes M.K. and Venkataram Prasad V. 2005. Evolutionary Trace Residues in Noroviruses: Importance in Receptor Binding, Antigenicity, Virion Assembly, and Strain Diversity. *J Virol.* **79**: 554-568.

Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, Ivanova OE, Eremeeva TP, Chumakov KM and Agol VI. 2002. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol.* **76(13)**:6791-9.

Cherkasova EA, Yakovenko ML, Rezapkin GV, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP, Krasnoproshina LI, Romanenkova NI, Rozaeva NR, Sirota L, Agol VI and Chumakov KM. 2005. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol* **79**:1062-70.

Cho MW, Teterina N, Egger D, Bienz K and Ehrenfeld E. 1994. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology.* **202(1)**:129-45.

Choe S. S. and K. Kirkegaard. 2004. Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* **78(11)**: 5973-5982.

Chow, M., J.F. Newman, and D. Filman. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* **327**:482-486.

Christodoulou C, Colbere-Garapin F, Macadam A, Taffs LF, Marsden S, Minor P and Horaud F. 1990. Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J Virol.* **64(10)**:4922-9.

Chumakov KM, Powers LB, Noonan KE, Roninson IB and Levenbook IS. 1991. Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:199-203.

Clarke IN and Lambden PR. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol.* **78 (Pt 2)**:291-301.

Clarke I.N., Lambden P.R., Caul E.O. Human enteric RNAviruses: caliciviruses and astroviruses. In: Mahy BWJ, Collier L, eds. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections.* London: Arnold, 1998:511-35.

Clarke IN and Lambden PR. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis.* **181**:S309-16.

- Colston, E. M., and V. R. Racianello.** 1994. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* **13**:5855–5862.
- Coyne, K. P., Reed, F. C., Porter, C. J., Dawson, S., Gaskell, R. M. and Radford, A. D.** 2006. Recombination of Feline calicivirus within an endemically infected cat colony. *J Gen Virol* **87**: 921–926.
- Cuervo, N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, and R. Crainic.** 2001. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines. *J Virol* **75**: 5740–5751.
- Dahourou G, Guillot S, Le Gall O and Crainic R.** 2002. Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J Gen Virol.* **83(Pt 12)**:3103-10.
- Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW and Hardy ME.** 2003. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* **22(11)**:2852-9.
- Dedepisdid, E., I. Karakasiliotis, E. Paximadi, Z. Kyriakopoulou, D. Komiotis, and P. Markoulatos.** 2006. Detection of unusual mutation within the VP1 region of different re-isolates of poliovirus Sabin vaccine. *Virus Genes* **33**:183–191.
- Dedepisdid E, Kyriakopoulou Z, Pliaka V et al.** 2007. Retrospective Characterization of a Vaccine-Derived Poliovirus Type 1 Isolate from Sewage in Greece. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6697–6704.
- Dedepisdid, E., V. Pliaka, Z. Kyriakopoulou, C. Brakoulias, S. Levidiotou-Stefanou, A. Pratti, Z. Mamuris, and P. Markoulatos.** 2008. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin3/Sabin2 capsid recombinant. *FEMS* **52**:342-351.
- Dedman D, Laurichesse H, Caul EO and Wall PG.** 1998. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. *Epidemiol Infect.* **121(1)**:139-49.
- Deitz SB, Dodd DA, Cooper S, Parham P and Kirkegaard K.** 2000. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97(25)**:13790-5.
- De Jesus N, Franco D, Paul A, Wimmer E and Cello J.** 2005. Mutation of a single conserved nucleotide between the cloverleaf and internal ribosome entry site attenuates poliovirus neurovirulence. *J Virol* **79**:14235-43.
- Doedens JR and Kirkegaard K.** 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* **14(5)**:894-907.
- Doedens JR, Giddings TH Jr and Kirkegaard K.** 1997. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol.* **71(12)**:9054-64.
- Domingo E. and J. J. Holland.** 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **5**:151-178.

- Dowdle WR, De Gourville E, Kew OM, Pallansch MA and Wood DJ.** 2003. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol.* **13(5)**:277-91.
- Driesel G, Diedrich S, Kunkel U and Schreier E.** 1995. Vaccine-associated cases of poliomyelitis over a 30 year period in East Germany. *Eur J Epidemiol* **11**:647-654.
- Echeverri AC and Dasgupta A.** 1995. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology.* **208(2)**:540-53.
- Egger, D., and K. Bienz.** 2002. Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J. Virol.* **76**:10960-10971.
- Equestre M, Genovese D, Cavalieri F, Fiore L, Santoro R and Perez Bercoff R.** 1991. Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J Virol* **65**:2707-10.
- Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS and Graham DY.** 2000. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis.* **181 Suppl 2**:S367-73.
- Ettayebi K and Hardy ME.** 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol.* **77(21)**:11790-7.
- Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T and Glass RI.** 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* **186(1)**:1-7.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T and Glass RI.** 1998. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* **178(6)**:1571-8.
- Feachem R, Garelick H and Slade J.** 1981. Enteroviruses in the environment. *Trop Dis Bull.* **78(3)**:185-230.
- Fernandez-Vega V, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Mitra T, Gorbalenya A and Green KY.** 2004. Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol.* **78(9)**:4827-37.
- Ferguson, M., D.J. Wood, and P.D, Minor.** 1993. Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *J. Gen. Virol.* **74**:685-90.
- Figlerowicz M, Alejska M, Kurzyńska-Kokorniak A and Figlerowicz M.** 2003. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev.* **23(4)**:488-518.
- Filman, D. J., R. Syed, M. Chow, A. J. Macadam, and J. M. Hogle.** 1989. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* **8**: 1567-1579.

- Fogg M. H., N. L. Teterina, and E. Ehrenfeld.** 2003. Membrane requirements for uridylylation of the poliovirus VPg protein and viral RNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **77(21)**: 11408-11416.
- Frantidou-Adamopoulou F.** 1992. Poliomyelitis cases in Northern Greece 1976-1990. *Eur J Epidemiol* **8**:112-113.
- Frantidou F, Diza E, Halkia D, Antoniadis A.** 2005. A seroprevalence study of poliovirus antibody in the population of northern Greece. *Clin Microbiol Infect* **11**:68-71.
- Fricks CE and Hogle JM.** 1990. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* **64**:1934-45.
- Friedrich F.** 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virol* **40**:157-70.
- Friedrich F.** 2000. Molecular evolution of oral poliovirus vaccine strains during multiplication in humans and possible implications for global eradication of poliovirus. *Acta Virol.* **44(2)**:109-17.
- Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, Crainic R.** 1993. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* **196**:199-208.
- Gamarnik AV and 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 GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM and Agol VI.** 2000. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol* **74**:7381-90.
- Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, Crainic R and Delpeyroux F.** 1997. Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* **71**:7758-7768.
- Georgescu MM, Delpeyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combiescu M, Combiescu AA, 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 MM, Tardy-Panit M, Guillot S, Crainic R, Delpeyroux F.** 1995. Mapping of mutations contributing to the temperature sensitivity of the Sabin 1 vaccine strain of poliovirus. *J Virol* **69**:5278-5286.
- Georgopoulou A and Markoulatos P.** 2001. Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **20**:792-9.

- Georgopoulou, A., P. Markoulatos, N. Spyrou, and N.C. Vamvakopoulos.** 2000. Improved genotyping of vaccine and wild type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J Clin Microbiol* **141**:1047-54.
- Giachetti C and Semler BL.** 1991. Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J Virol.* **65(5)**:2647-54.
- Giachetti C, Hwang SS and Semler BL.** 1992. cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. *J Virol.* **66(10)**:6045-57.
- Gingras AC, Raught B and Sonenberg N.** 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* **68**:913-63.
- Glass PJ, et al.** The NV orf3 encodes a minor capsid protein. In: ASM 18th Annual Meeting, July 10-14, 1999, University of Mass., Amherst, MA.
- Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME and Estes MK.** 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol.* **74(14)**:6581-91.
- Gmyl, A.P., E.V. Belousov, S.V. Maslova, E.V. Khitrina, A.B. Chetverin, and V.I. Agol.** 1999. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* **73**: 8958-8965.
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Richardson A, Meredith J, Almond JW, Barclay W and Evans DJ.** 2000. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol.* **74(10)**:4590-600.
- Goodfellow IG, Kerrigan D and Evans DJ.** 2003. Structure and function analysis of the poliovirus cis-acting replication element (CRE). *RNA.* **9(1)**:124-37.
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J. et al.** 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* **181 (Suppl 2)**: S322-S330.
- Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D and Brown DW.** 1995a. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* **47(4)**:392-8.
- Green SM, Lambden PR, Deng Y, Lowes JA, Lineham S, Bushell J, Rogers J, Caul EO, Ashley CR and Clarke IN.** 1995b. Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. *J Med Virol.* **45(2)**:197-202.
- Green K.Y., Lew J.F., Jiang X., Kapikian A.Z., Estes M.K.** 1993. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J. Clin. Microbiol.* **31 (8)**: 2185-2191.

- Green KY, Mory A, Fogg MH, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, Mitra T, Ehrenfeld E, Cameron CE and Sosnovtsev SV.** 2002. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol.* **76(17)**:8582-95.
- Green J, Wright PA, Gallimore CI, Mitchell O, Morgan-Capner P and Brown DW.** 1998. The role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *J Hosp Infect.* **39(1)**:39-45.
- Guerrero RA, Ball JM, Krater SS, Pacheco SE, Clements JD and Estes MK.** 2001. Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *J Virol.* **75(20)**:9713-22.
- Guest S, Pilipenko E, Sharma K, Chumakov K and Roos RP.** 2004. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J Virol* **78**:11097-11107.
- Guillot, S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 2000. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* **74**:8434-8443.
- Guillot S, Otelea D, Delpeyroux F and Crainic R.** 1994. Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. *Vaccine* **12**:503-507.
- Gutiérrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM and Jiang X.** 2000. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol.* **74(18)**:8558-62.
- Gutiérrez AL, Denova-Ocampo M, Racaniello VR and del Angel RM.** 1997. Attenuating mutations in the poliovirus 5' untranslated region alter its interaction with polypyrimidine tract-binding protein. *J Virol.* **71(5)**:3826-33.
- Gutiérrez-Escolano AL, Vázquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J and Hernández-Acosta J.** 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **311(3)**:759-66.
- Häfliger D, Gilgen M, Lüthy J and Hübner P.** 1997. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int J Food Microbiol.* **37(1)**:27-36.
- Han MG, Smiley JR, Thomas C and Saif LJ.** 2004. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J Clin Microbiol.* **42(11)**:5214-24.
- Hansen JL, Long AM and Schultz SC.** 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure.* **5(8)**:1109-22.
- Harber J, Bernhardt G, Lu HH, Sgro JY and Wimmer E.** 1995. Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology.* **214(2)**:559-70.

- Hardy, M. E., Kramer, S. F., Treanor, J. J. and Estes, M. K.** 1997. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch Virol* **142**: 1469–1479.
- Hardy ME and Estes MK.** 1996. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes*. **12(3)**:287-90.
- Harris KS, Xiang W, Alexander L, Lane WS, Paul AV and Wimmer E.** 1994. Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem*. **269(43)**:27004-14.
- He, Y., V. D. Bowman, S. Mueller, C. M. Bator, J. Bella, X. Peng, T. S. Baker, E. Wimmer, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann.** 2000. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:79–84.
- Herbert TP, Brierley I and Brown TD.** 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol*. **78 (Pt 5)**:1033-40.
- Herold, J., and R. Andino.** 2001. Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein-Protein Bridge. *Mol. Cell* **7**: 581-591.
- Herremans T, Reimerink JH, Kimman TG, van Der Avoort HG and Koopmans MP.** 2000. Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with oral live attenuated or inactivated poliovirus vaccine and after natural exposure. *Clin Diagn Lab Immunol*. **7(1)**:40-4.
- Hershey, J.W.B. and Merrick, W.C.** 2000. The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. and Mathews, M.B. (eds), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 33-88.
- Heymann DL, Sutter RW and Aylward RB.** 2006. A vision of a world without polio: the OPV cessation strategy. *Biologicals* **34(2)**:75-9.
- Hirst GK.** 1962. Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **27**:303-9.
- Hogle, J. M.** 2002. Poliovirus cell entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways. *Annu Rev Microbiol*. **56**: 677-702.
- Holland, J.J., J.C. De La Torre, and D.A. Steinhauer.** 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol*. **176**:1–20.
- Hughes PJ and Stanway G.** 2000. The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation. *J Gen Virol*. **81(Pt 1)**:201-7.
- Jacobson MF and Baltimore D.** 1968. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J Mol Biol*. **33(2)**:369-78.

- Jacobson, S. J., D. A. Konings, and P. Sarnow.** 1993. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol.* **67**:2961-2971
- Jang,S.K., Pestova,T.V., Hellen,C.U., Witherell,G.W. and Wimmer,E.** 1990. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* **44**: 292-309.
- Jiang X, Wang M, Wang K and Estes MK.** 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* **195(1)**:51-61.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW and Matson DO.** 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods.* **83(1-2)**:145-54.
- Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK and Matson DO.** 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis.* **181 Suppl 2**:S349-59.
- Johansson, S., Niklasson, B., Maizel, J., Gorbalenya, A.E., and Lindberg, A.M.** 2002. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the picornaviridae with a cluster of two unrelated 2A proteins. *J Virol* **76**: 8920-8930.
- Johnson KL and Sarnow P.** 1991. Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J Virol.* **65(8)**:4341-9.
- Jurgens C. and J. B. Flanagan.** 2003. Initiation of poliovirus negative-strand RNA synthesis requires precursor forms of P2 proteins. *J. Virol.* **77(2)**: 1075-1083.
- Karakasiliotis I, Chaudhry Y, Roberts LO and Goodfellow IG.** 2006. Feline calicivirus replication: requirement for polypyrimidine tract-binding protein is temperature-dependent. *J Gen Virol.* **87(Pt 11)**:3339-47.
- Karakasiliotis I, Markoulatos P and 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.
- Karakasiliotis I, Paximadi E, Markoulatos P.** 2005. Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol* **86**:3137-3142.
- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J and Virgin HW 4th.** 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science.* **299(5612)**:1575-8.
- Katayama, K., Horikoshi-Shirato, H. and Takeda, N.** 2002. Phylogenetic analysis of 14 strains of Norwalk-like viruses: identification of the region in the genome for genotyping. *Nippon Rinsho* **60**: 1165-1174
- Kawamura N, Kohara M, Abe S, Komatsu T, Tago K, Arita M and Nomoto A.** 1989. Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J Virol.* **63(3)**:1302-9.

- Kew, O. M., V. M. Glasgow, M. Landaverde, C. Burns, J. Shaw, Z. Garib, J. Andre, E. Blackman, C. J. Freeman, J. Jorba, R. Sutter, G. Tambini, L. Venczel, C. Pedreira, F. Laender, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Mijamura, H. van der Avoort, M. S. Oberste, D. Kilpatrick, S. Cochi, M. Pallansch, and C. de Quadros.** 2002. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* **296**:356–359.
- Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L and Pallansch MA.** 1998. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol.* **36(10)**:2893-9.
- Kew, O. M., R. W. Sutter, E. M. de Gourville, W. R. Dowdle, and M. A. Pallansch.** 2005. Vaccine-derived poliovirus and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:587–635.
- Kim, M. J. and Kao, C.** 2001. Factors regulating template switch in vitro by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNARNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4972–4977.
- King AM.** 1988. Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: an analysis of 40 intertypic cross-over sequences. *Nucleic Acids Res.* **16(24)**:11705-23.
- King, A. M. Q., F. Brown, P. Christian, T. Hovi, T. Hyypia, N. J. Knowles, S. M. Lemon, P. D. Minor, A. C. Palmenberg, T. Skern, and G. Stanway.** 2000. Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, New York.
- Kirkegaard, K.** 1990. Mutations in VP1 of poliovirus specifically affect both encapsidation and release of viral RNA. *J Virol* **64**: 195-206.
- Kirkegaard, K. & Baltimore, D.** 1986. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**: 433-443.
- Knipe, D. M., and P. M. Howley.** 2007 *Fields Virology*, 5th Edition, Vol:1, Copyright: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N and Katayama K.** 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* **100(1-2)**:107-14.
- Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH and Jaatinen P.** 1997. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis.* **29(4)**:415-8.
- Kuyumcu-Martinez M, Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Green KY and Lloyd RE.** 2004. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol.* **78(15)**:8172-82.
- La Monica N, Almond JW and Racaniello VR.** 1987. A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuate the virus for humans. *J Virol* **61**:2917-20.

- La Monica N and Racaniello VR.** 1989. Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Virol* **63**:2357-60.
- Lambden PR, Caul EO, Ashley CR and Clarke IN.** 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*. **259(5094)**:516-9.
- Lawson HW, Braun MM, Glass RI, Stine SE, Monroe SS, Atrash HK, Lee LE and Engler SJ.** 1991. Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort: role of geological formations in contamination of well water. *Lancet*. **337(8751)**:1200-4.
- LeBaron CW, Furutan NP, Lew JF, Allen JR, Gouvea V, Moe C and Monroe SS.** 1990. *MMWR Recomm Rep*. **39(RR-5)**:1-24.
- Lees DN, Henshilwood K, Green J, Gallimore CI and Brown DW.** 1995. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. **61(12)**:4418-24.
- Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW and Atmar RL.** 1996. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol*. **141(11)**:2225-35.
- Leong LE, Walker PA and Porter AG.** 1993. Human rhinovirus-14 protease 3C (3Cpro) binds specifically to the 5'-noncoding region of the viral RNA. Evidence that 3Cpro has different domains for the RNA binding and proteolytic activities. *J Biol Chem*. **268(34)**:25735-9.
- Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK and Green KY.** 1994. Identification of Minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* **68**:3391-3396.
- Li X, Lu HH, Mueller S and Wimmer E.** 2001. The C-terminal residues of poliovirus proteinase 2A(pro) are critical for viral RNA replication but not for cis- or trans-proteolytic cleavage. *J Gen Virol*. **82(Pt 2)**:397-408.
- Li J, Zhang LB, Yoneyama T, Yoshida H, Shimizu H, Yoshii K, Hara M, Nomura T, Yoshikura H, Miyamura T and Hagiwara A.** 1996. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch Virol*. **141(6)**:1047-54.
- Liang, X., Y. Zhang, W. Xu, N. Wen, S. Zuo, L. A. Lee, and J. Yu.** 2006. An outbreak of poliomyelitis caused by type-1 vaccine-derived poliovirus in China. *J. Infect. Dis*. **194**:545-551.
- Lipskaya GY, Muzychenko AR, Kutitova OK, Maslova SV, Equestre M, Drozdov SG, Bercoff RP and Agol VI.** 1991. Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype 2 specificity from vaccine-associated polio cases. *J Med Virol*. **35(4)**:290-6.

- Liu H., Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Kew OM and Pallansch MA.** 2003. Serial recombination during circulation of type 1 wildvaccine recombinant polioviruses in China. *J. Virol.* **77**:10994–11005.
- Lobert PE, Escriou N, Ruelle J and Michiels T.** 1999. A coding RNA sequence acts as a replication signal in cardioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(20):11560-5.
- Lyle JM, Clewell A, Richmond K, Richards OC, Hope DA, Schultz SC and Kirkegaard K.** 2002. Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* **277**(18):16324-31.
- Lyle, J. M., E. Bullitt, K. Bienz, and K. Kirkegaard.** 2002. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**:2218–2222.
- Lyons T., K.E. Murray, A.W. Roberts, and D.J.Barton.** 2001. Poliovirus 5' -Terminal Cloverleaf RNA Is Required in cis for VPg Uridylylation and the Initiation of Negative- Strand RNA Synthesis. *J. Virol.* **75**:10696-10708
- Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, John A, Marsden S, Taffs F, Reeve P, Hamada N, Wareham K, Almond J, Cammack N and Minor PD.** 1989. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* **172**:408-414.
- Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Dunn G, Skuce R, Almond JW and Minor PD.** 1991. The 5' noncoding region of the type 2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. *Virology* **81**:451-8.
- Macadam, A. J., S. R. Pollard, G. Ferguson, R. Skuce, D. Wood, J. W. Almond, and P. D. Minor.** 1993. Genetic basis of attenuation of the sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology* **192**:18-26
- Malnou CE, Werner A, Borman AM, Westhof E and Kean KM.** 2004. Effects of vaccine strain mutations in domain V of the internal ribosome entry segment compared in the wild type poliovirus type 1 context. *J Biol Chem* **279**:10261-10269.
- Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M and Le Pendu J.** 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie.* **83**(7):565-73.
- Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG, Kelly H and Wright PJ.** 2003. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* **69**(4):568-78.
- Martin A, Benichou D, Couderc T, Hogle JM, Wychowski C, Van der Werf S and Girard M.** 1991. Use of type 1/type 2 chimeric polioviruses to study determinants of poliovirus type 1 neurovirulence in a mouse model. *Virology* **180**:648-658.
- Martín J and Minor PD.** 2002. Characterization of CHAT and Cox type 1 live-attenuated poliovirus vaccine strains. *J Virol.* **76**(11):5339-49.

- Martín J, Odoom K, Tuite G, Dunn G, Hopewell N, Cooper G, Fitzharris C, Butler K, Hall WW and Minor PD.** 2004. Long-term excretion of vaccine-derived poliovirus by a healthy child. *J Virol* **78**:13839-13847.
- Martin, J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor.** 2002. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* **76**: 10921–10928.
- Mastroeni I, Patii AM, Fabrizi A et al.** 1997. Immunity status against poliomyelitis in persons 13–14 years old living in Rome. *Vaccine* **15**:745–750.
- McGoldrick A, Macadam AJ, Dunn G, Rowe A, Burlison J, Minor PD, Meredith J, Evans DJ and Almond JW.** 1995. Role of mutations G-480 and C-6203 in the attenuation phenotype of Sabin type 1 poliovirus. *J Virol* **69**:7601-7605.
- McKnight KL and Lemon SM.** 1996. Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA. *J Virol.* **70(3)**:1941-52.
- Mento SJ, Weeks-Levy C, Tatem JM, Gorgacz EJ and Waterfield WF.** 1993. Significance of a newly identified attenuating mutation in Sabin 3 oral poliovirus vaccine. *Dev Biol Stand* **78**:93-100.
- Minor PD.** 1999. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Rev Mol Med.* **1999**:1-17.
- Minor PD, Dunn G, Evans DM, Magrath DI, John A, Howlett J, Phillips A, Westrop G, Wareham K, Almond JW and Hogle JM.** 1989. The temperature sensitivity of the Sabin type 3 vaccine strain of poliovirus: molecular and structural effects of a mutation in the capsid protein VP3. *J Gen Virol* **70**:1117-1123.
- Minor, P. D., M. Ferguson, D. M. A. Evans, J. W. Almond, and J. P. Icenogle.** 1986. Antigenic structures of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* **67**: 1283-1291
- Minor PD, Macadam AJ, Stone DM and Almond JW.** 1993. Genetic basis of attenuation of the Sabin oral poliovirus vaccines. *Biologicals.* **21(4)**:357-63.
- Mirzayan C and Wimmer E.** 1994. Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology.* **199(1)**:176-87.
- Molla A, Harris KS, Paul AV, Shin SH, Mugavero J and Wimmer E.** 1994. Stimulation of poliovirus proteinase 3C_{pro}-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J Biol Chem.* **269(43)**:27015-20.
- Morasco B. J., N. Sharma, J. Parilla, and J. B. Flanagan.** 2003. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VP_gUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **77(9)**: 5136-5144.
- Moss EG and Racaniello VR.** 1991. Host range determinants located on the interior of the poliovirus capsid. *EMBO J.* **10(5)**:1067-74.

- Mulders, M. N., G. Y. Lipskaya, H. G. van der Avoort, M. P. Koopmans, O. M. Kew, and A. M. van Loom.** 1995. Molecular epidemiology of wild poliovirus 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J. Infect. Dis.* **171**:1399-1405.
- Muller, H. J.** 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* **106**: 2-9.
- Murray K. E. and D. J. Barton.** 2003. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **77**(8): 4739-4750.
- Muzychenko AR, Lipskaya GYu, Maslova SV, Svitkin YV, Pilipenko EV, Nottay BK, Kew OM, Agol VI.** 1991. Coupled mutations in the 5'-untranslated region of the Sabin poliovirus strains during in vivo passages: structural and functional implications. *Virus Res.* **21**(2):111-22.
- Neill JD.** 2002. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res.* **87**(1):89-93.
- Ng KK, Pendás-Franco N, Rojo J, Boga JA, Machín A, Alonso JM and Parra F.** 2004. Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem.* **279**(16):16638-45.
- Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A and Svensson L.** 2003. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol.* **77**(24):13117-24.
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS and Glass RI.** 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol.* **53**(4):372-83.
- Oberste, M. S., K. Maher, M. R. Flemister, G. Marchetti, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch.** 2000. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* **38**:1170-4
- Ochs K., L. Saleh, G. Bassili, V. H. Sonntag, A. Zeller, and M. Niepmann.** 2002. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.* **76**(5): 2113-2122.
- Ochs K, Zeller A, Saleh L, Bassili G, Song Y, Sonntag A and Niepmann M.** 2003. Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J Virol.* **77**(1):115-22.
- Oliver, S.L., Asobayire, E., Dastjerdi, A.M. and Bridger, J.C.** 2006. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* **350**: 240-250.
- Otelea D, Guillot S, Furione M, Combiescu AA, Balanant J, Candrea A and Crainic R.** 1993. Genomic modifications in naturally occurring neurovirulent revertants of Sabin 1 polioviruses. *Dev Biol Stand.* **78**:33-8.

- Parsley TB, Towner JS, Blyn LB, Ehrenfeld E and Semler BL.** 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(10)**:1124-34.
- Paul AV, Cao X, Harris KS, Lama J and Wimmer E.** 1994. Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem*. **269(46)**:29173-81.
- Paul AV, Molla A and Wimmer E.** 1994. Studies of a putative amphipathic helix in the N-terminus of poliovirus protein 2C. *Virology*. **199(1)**:188-99.
- Paul AV, Rieder E, Kim DW, van Boom JH and Wimmer E.** 2000. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**:10359-10370.
- Paul AV, van Boom JH, Filippov D and Wimmer E.** 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*. **393(6682)**:280-4.
- Paul AV, J. Yin, J. Mugavero, E. Rieder, Y. Liu, and E. Wimmer.** 2003. A 'Slide-back' mechanism for the initiation of Protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Biol. Chem*. **278(45)**: 43951-43960.
- Paximadi E, Karakasiliotis I, Bolanaki E, Krikelis A and Markoulatos P.** 2007. Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* **35**:541-8.
- Paximadi E, Karakasiliotis I, Papaventsis D, Papageorgiou G, Markoulatos P.** 2008. Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and Cyprus. *J Appl Microbiol* **104**:1153-62.
- Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V and Markoulatos P.** 2006. Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* **32**:203-10.
- Periwal SB, Kourie KR, Ramachandaran N, Blakeney SJ, DeBruin S, Zhu D, Zamb TJ, Smith L, Udem S, Eldridge JH, Shroff KE and Reilly PA.** 2003. A modified cholera holotoxin CT-E29H enhances systemic and mucosal immune responses to recombinant Norwalk virus-virus like particle vaccine. *Vaccine*. **21(5-6)**:376-85.
- Pfister T, Egger D and Bienz K.** 1995. Poliovirus subviral particles associated with progeny RNA in the replication complex. *J Gen Virol*. **76 (Pt 1)**:63-71.
- Pfister T, Pasamontes L, Troxler M, Egger D and Bienz K.** 1992. Immunocytochemical localization of capsid-related particles in subcellular fractions of poliovirus-infected cells. *Virology*. **188(2)**:676-84.
- Pfister T and Wimmer E.** 2001. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol*. **75(4)**:1611-9.
- Pfister T., E. Wimmer, and C. Mirzayan.** 1999. *Molecular Biology of poliovirus*. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.

- Pfister T, Jones KW and 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.
- Pilipenco, E.V., A.P. Gmyl, and V.I. Agol.** 1995. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1870-1875.
- Pliaka V , Dedepsidis E, Kyriakopoulou Z, Papadopoulou I, Levidiotou S, Markoulatos P.** 2007. Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Mol Cell Probes* **21**:267-275.
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG and Estes MK.** 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* **286(5438)**:287-90.
- Prevot D., D. Decimo, C.H. Herbreteau, F. Roux, J. Garin, J. Luc Darlix, and T. Ohlmann.** 2003. Characterization of a novel RNA - binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Jour.* **22**: 1909-1921
- Racaniello VR.** 2006. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* **344(1)**:9-16.
- Ravn V and Dabelsteen E.** 2000. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS.* **108(1)**:1-28.
- Rezapkin GV, Chumakov KM, Lu Z, Ran Y, Dragunsky EM, Levenbook IS.** 1994. Microevolution of Sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine. *Virology.* **202(1)**:370-8.
- Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH and Wimmer E.** 2000. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* **74**:10371-10380.
- Rieder E, Xiang W, Paul A and Wimmer E.** 2003. Analysis of the cloverleaf element in a human rhinovirus type 14/poliovirus chimera: correlation of subdomain D structure, ternary protein complex formation and virus replication. *J Gen Virol.* **84(Pt 8)**:2203-16.
- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y and Koopmans M.** 2002. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* **35(3)**:246-53.
- Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenröder O, Mogel M, Poppe M, Henker J and Rethwilm A.** 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods.* **118(1)**:49-59.
- Rohayem J, Robel I, Jäger K, Scheffler U and Rudolph W.** 2006. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol.* **80(14)**:7060-9.

- Romanova L. I., V. M. Blinov, E. A. Tolskaya, E. G. Viktorova, M. S. Kolesnikova, E. A. Guseva, and V. I. Agol.** 1986. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* **155**: 202-213
- Rousset, D., M. R. Andrianarivelo, R. Razafindratsimandresy, B. Randriamanalina, S. Guillot, J. Balanant, P. Maucle`re, and F. Delpeyroux.** 2003. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:885–887.
- Sabin, A. B., M. Ramos-Alvarez, J. Alvarez-Amezquita, W. Pelon, and R.H. Michaels.** 1960. Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *JAMA* **173**:1521-26
- Sabin, A. B.** 1985. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use, and current strategies to eliminate poliomyelitis from the world. *J. Infect. Dis.* **151**:420-36
- Sadowy E, Milner M and Haenni AL.** 2001. Proteins attached to viral genomes are multifunctional. *Adv Virus Res.* **57**:185-262.
- Saito H, Saito S, Kamada K, Harata S, Sato H, Morita M and Miyajima Y.** 1998. Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbiol Immunol.* **42(6)**:439-46.
- Savolainen-Kopra C, Samoilovich E, Kahelin H, Hiekka AK, Hovi T and Roivainen M.** 2009. Comparison of poliovirus recombinants: accumulation of point mutations provides further advantages. *J Gen Virol.* **90(Pt 8)**:1859-68. Epub 2009 Apr 29.
- Schaub SA and Oshiro RK.** 2000. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. *J Infect Dis.* **181 Suppl 2**:S374-80.
- Scheffler U, Rudolph W, Gebhardt J and Rohayem J.** 2007. Differential cleavage of the norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease. *J Gen Virol.* **88(Pt 7)**:2013-8.
- Schein, C. H., N. Oezguen, D. E. Volk, R. Garimella, A. Paul, and W. Braun.** 2006. NMR structure of the viral peptide linked to the genome (VPg) of poliovirus. *Peptides.* **27**: 1676–1684.
- Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Cazaux G, Serceau R, Fleury HJ and Lafon ME.** 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol.* **151(8)**:693-701.

- Schwab KJ, De Leon R and Sobsey MD.** 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* **61(2)**:531-7.
- Schwab KJ, De Leon R and Sobsey MD.** 1996. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* **62(6)**:2086-94.
- Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, Metcalf TG and Atmar RL.** 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J Food Prot.* **61(12)**:1674-80.
- Seal BS, Neill JD and Ridpath JF.** 1994. Predicted stem-loop structures and variation in nucleotide sequence of 3' noncoding regions among animal calicivirus genomes. *Virus Genes.* **8(3)**:243-7.
- Shimizu, H., B. Thorley, F. J. Paladin, K. A. Brussen, V. Stambos, L. Yuen, A. Utama, Y. Tano, M. Arita, H. Yoshida, T. Yoneyama, A. Benegas, S. Roesel, M. Pallansch, O. Kew, and T. Miyamura.** 2004. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J. Virol.* **78**:13512-13521.
- Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG.** 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* **36(8)**:2530-46.
- Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinjé J and Saif LJ.** 2002. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol.* **76(20)**:10089-98.
- Smiley JR, Hoet AE, Trávén M, Tsunemitsu H and Saif LJ.** 2003. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol.* **41(7)**:3089-99.
- Solecki D., M. Gromeier, J. Harber, G. Bernhardt and E. Wimmer.** 1998. Poliovirus and its cellular receptor: a molecular genetic dissection of a virus/receptor affinity interaction. *J. Mol. Recogn.* **11**:2-9.
- Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV and Green KY.** 1999. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol.* **73(8)**:6626-33.

Sosnovtsev SV and Green KY. 2000. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*. **277(1)**:193-203.

Strauss, J.H., and Strauss, E.G. 1998. Evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol*. **42**: 657-683.

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

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

Sugieda M, Nakajima K and Nakajima S. 1996. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol Infect.* **116(3)**:339-46.

Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS and Estes MK. 2003. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol.* **108(3)**:241-7.

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

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

Teterina NL, Kean KM, Gorbalenya AE, Agol VI and Girard M. 1992. Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein. *J Gen Virol.* **73 (Pt 8)**:1977-86.

Thiel HJ and König M. 1999. Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol.* **69(1-2)**:55-62.

Towner JS, Ho TV and Semler BL. 1996. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem.* **271(43)**:26810-8.

Treanor JJ and Dolin R. Norwalk Virus and Other Caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, 5th Edition ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol. 2. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. 1949-1956.

- van Kuppeveld F.J., J.G. Hoenderop, R.L. Smeets, P.H. Willems, H.B. Dijkman, F.W. Studier, E. Wimmer.** 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.* **16 (12):** 3519-3532.
- Vennema H, de Bruin E and Koopmans M.** 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol.* **25(2):**233-5.
- Ventoso I, MacMillan SE, Hershey JW and Carrasco L.** 1998. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS Lett.* **435(1):**79-83.
- Victoria M, Colina R, Miagostovich MP, Leite JP and Cristina J.** 2009. Phylogenetic prediction of cis-acting elements: a cre-like sequence in Norovirus genome? *BMC Res Notes.* **2:**176.
- Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DW, Koopmans MP.** 2000. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol.* **145(2):**223-41.
- Vinje J, Hamidjaja RA and Sobsey MD.** 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods.* **116(2):**109-17.
- Vinje J and Koopmans MP.** 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis.* **174(3):**610-5.
- Waggoner S and Sarnow P.** 1998. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocation of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol.* **72(8):**6699-709.
- Walter BL, Parsley TB, Ehrenfeld E and Semler BL.** 2002. Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. *J Virol.* **76(23):**12008-22.
- Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY, et al.** 1994. Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol.* **68(9):**5982-90.
- Weeks-Levy C, Tatem JM, DiMichele SJ, Waterfield W, Georgiu AF, Mento SJ.** 1991. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. *Virology* **185:**934-7.

- Westrop GD, Wareham KA, Evans DM, Dunn G, Minor PD, Magrath DI, Taffs F, Marsden S, Skinner MA, Schild GC, et al.** 1989. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J Virol* **63**:1338-1344.
- White LJ, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N and Estes MK.** 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol.* **70(10)**:6589-97.
- White PM and Green J.** 1986. Prevalence of antibody to polioviruses in England and Wales 1984-6. *BMJ* **293**:1153-1155.
- Widjojatmodjo MN, Fluit AC and Verhoef J.** 1995. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* **33(10)**:2601-6.
- Wieggers K, Uhlig H and Dernick R.** 1989. N-AgIB of poliovirus type 1: a discontinuous epitope formed by two loops of VP1 comprising residues 96-104 and 141-152. *Virology.* **170(2)**:583-6.
- Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao.** 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* **27**:353-436.
- Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie **JM, Green KY and Virgin HW.** 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* **2(12)**:e432.
- Wood N and Thorley B.** 2003. Towards global poliomyelitis eradication: the successes and challenges for a developed country. *J Paediatr Child Health.* **39(9)**:647-50.
- World Health Organization.** 1998. Report of the meeting on the scientific basis for stopping polio immunisation, Geneva, 23-25 March 1998. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO/EPI/GEN/98.12).
- World Health Organization.** 2004. Polio laboratory manual, 4th edition, 2004. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO/IVB/04.10).
- World Health Organization.** 2003. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation Vaccines and Biologicals. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO/V&B/03.03).
- Xi JN, Graham DY, Wang KN and Estes MK.** 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* **250(4987)**:1580-3.

Xiang W, Harris KS, Alexander L and Wimmer E. 1995a. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol.* **69(6)**:3658-67.

Xiang W., A. Cuconati, A.V. Paul, X. Cao, E. Wimmer. 1995b. Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA- binding protein 3AB. *RNA* **1**: 892-904.

Yakovenko ML, Cherkasova EA, Rezapkin GV, Ivanova OE, Ivanov AP, Eremeeva TP, Baykova OY, Chumakov KM and Agol VI. 2006. Antigenic evolution of vaccine-derived polioviruses: changes in individual epitopes and relative stability of the overall immunological properties. *J Virol.* **80(6)**:2641-53.

Zaoutis T and Klein JD. 1998. Enterovirus infections. *Pediatr Rev.* **19(6)**:183-91.

Zell R, Sidigi K, Bucci E, Stelzner A and Görlach M. 2002. Determinants of the recognition of enteroviral cloverleaf RNA by coxsackievirus B3 proteinase 3C. *RNA.* **8(2)**:188-201.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI and Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* **346(2)**:312-23.

Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis

V. Pliaka^a, E. Dedepdis^a, Z. Kyriakopoulou^a, I. Papadopoulou^a,
S. Levidiotou^b, P. Markoulatos^{a,*}

^aMicrobiology-Virology Laboratory, Department of Biochemistry & Biotechnology, School of Health Sciences, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aioulou, 41221 Larissa, Greece

^bDepartment of Microbiology, Medical School, University of Ioannina, Greece

Received 3 October 2006; accepted 9 January 2007

Available online 25 January 2007

Abstract

Polioviruses are members of the *enterovirus* genus, belonging to the *Picornaviridae* family. They are the causative agents of poliomyelitis, a paralytic and sometimes fatal disease in humans. The number of poliomyelitis cases caused by wild poliovirus infections has been dramatically reduced by the extensive use of two available vaccines: the inactivated poliovirus vaccine (IPV) and the oral poliovirus vaccine (OPV). Despite the importance of OPV in the reduction of poliomyelitis cases, one of the disadvantages associated with this vaccine is the rare occurrence of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) in vaccinees or their healthy contacts through the accumulation of mutations and/or recombination in Sabin strains genome. Thirteen clinical isolates originating from healthy vaccinees and VAPP cases were investigated in order to identify genomic modifications in 5' non-coding region (5'-NCR) and VP1 genomic regions. The analysis of samples was conducted by RT-PCR, RFLP, sequencing and bioinformatics analysis. All clinical isolates were characterized as OPV-like viruses. Our results showed that analysis of 5'-NCR and VP1 regions of Poliovirus Sabin strains is important in order to identify mutations that increase the neurovirulence conducting to the eventuality of emergence of VAPP cases. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Polioviruses; Molecular diagnosis; VP1; 5'-NCR; Mutations; Sequencing

1. Introduction

Polioviruses are members of the *enterovirus* genus, belonging to the *Picornaviridae* family and consist of an icosahedral particle, composed of 60 copies of capsid proteins VP1–VP4, surrounding a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 7500 nt [1]. The outer surface of the capsid on which the antigenic sites of the virus (N-Ags) and the canyon (where CD155 cell receptor is attached) are situated, consists of VP1, VP2 and VP3 viral proteins. VP4 viral protein is located in the inner surface of the capsid [2,3]. VP1 plays a critical role in the function of poliovirus capsid. Specifically, N-AgI is composed of amino acids 89–100 of VP1 while N-AgIIa and N-AgIIIa sites are composed of VP1 amino acids

220–222 and 286–290, respectively [4]. Canyon is composed of specific amino acids (aa 109) and oligopeptide segments of VP1 (91–107, 166–169, 223–226, 228–235), of VP2 and of VP3 [5–8]. In the β -barrel core of VP1, at the base of the canyon, a sphingosine molecule is found which is believed to play a key role in the stability of the virion [9].

The viral RNA contains a 5' non-coding region (5'-NCR) of about 740 nt and terminates in a 3' non-coding region (3'-NCR) of about 70 nt followed by a poly(A)-sequence [1]. The first 100 nt of 5'-NCR form a cloverleaf structure involved in the initiation of positive-strand replication [10], and further downstream, secondary structures form the internal ribosomal entry site (IRES) which is necessary for the initiation of translation [11].

Detailed typing of polioviruses isolated from patients with poliomyelitis is essential to public health polio surveillance programs aiming to eradicate wild-type polioviruses. However, the number of poliomyelitis cases caused by wild

*Corresponding author. Tel.: +302410 565274; fax: +302410 565294.
E-mail address: Markoulatos@bio.uth.gr (P. Markoulatos).

poliovirus infections has been dramatically reduced by the extensive use of two available vaccines: the inactivated poliovirus vaccine (IPV) and the oral poliovirus vaccine (OPV). OPV consists of three live attenuated strains of the three serotypes of poliovirus (Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3). Genetic differences distinguish OPV viruses from their parent strains and characteristic mutations are associated with attenuation of neurovirulence of parental strains [12]. Mutations in positions 2795 (aa 106) and 2879 (aa 134) of VP1 have been shown to contribute in attenuation of Sabin 1 [13]. Furthermore mutations in positions 2908 (aa 143) and 2493 (aa 6) of VP1 are determinants of attenuation in Sabin 2 and Sabin 3 isolates, respectively [14,15]. Mutations in 5'-NCR at nucleotides 480, 481 and 472 are the major determinants of attenuation in Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3, respectively [12].

OPV strains can mutate or recombine during their replication in the human intestine and some genomic modifications may result in recovery of neurovirulence and lead to vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) [16]. VAPP is a rare event occurring in approximately one in every 2.5 million vaccine recipients [16]. While it is known that such genomic modifications are selected in vaccinees, the frequency of appearance and consequently their putative epidemiological impact are less well known.

A variety of OPV-derived viruses can be isolated from OPV recipients and their contacts, most commonly, in the absence of paralytic conditions. The extent of sequence divergence of the VP1 capsid gene from Sabin strains can be used as a “molecular clock” to estimate the duration of poliovirus replication [17]. Derivatives of Sabin OPV strains have been classified into two categories. (i) OPV-like viruses: the vast majority of vaccine related isolates are “OPV-like” and have close sequence relationships (>99% VP1 sequence identity) to the original OPV strains. (ii) Vaccine-derived polioviruses (VDPV): rare VDPV isolates show ≤99% VP1 sequence identity to the parental Sabin strains and the extent of their genetic changes is indicative of prolonged replication.

In the present study, 13 clinical isolates originating from healthy vaccinees and VAPP cases were investigated in order to identify genomic modifications in 5'-NCR and VP1 genomic regions. The analysis of samples was conducted by RT-PCR, RFLP, sequencing and bioinformatics. Our aim was to investigate the frequency of appearance of mutations in the major determinants of attenuation of Sabin strains and to emerge the importance of sequencing of 5'-NCR and VP1 genomic regions in molecular diagnosis of polioviruses.

2. Materials and methods

2.1. Samples and cell cultures

The 13 samples were taken from healthy vaccinees and VAPP cases during the time period 1978–2001 (Table 1). The reference strains Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3 were

provided by the World Health Organization (WHO). In order to avoid viral mixtures, serial ten-fold dilutions of samples were performed in MEM-D medium. Each dilution was inoculated in duplicates in microtiter plates containing Hep2 cells in MEM-D medium. The inoculated microtiter plates were incubated at 37 °C for a period of 1–5 days, until a complete cytopathic effect (CPE) was observed under an inverted light microscope. The last dilution, in which a complete CPE was observed, was inoculated in flasks containing Hep2 cells in MEM-D medium. When a complete CPE was observed, flasks were collected and stored at –20 °C. Uninfected Hep2 cells were used as a negative control. The serotype of the samples was determined by virus neutralization with rabbit polyclonal antibodies (National Institute for Public Health and Environment, RIVM, The Netherlands) as described in Polio laboratory manual 4th edition, 2004, World Health Organization.

2.2. Extraction of viral RNA

Two hundred microliter of frozen and thawed viral stocks were subjected to viral RNA extraction as has been previously described [18]. Finally, the pellet was dried and dissolved in 200 µl of sterile double-distilled water, DNase, RNase free (Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, USA).

2.3. PCR primers

The primer pairs used were, UG1/222 [19,20] for the amplification of the first half of VP1 in isolates of Sabin 1 and Sabin 2 vaccine origin. Primer pairs S₁37/S₁688, S₂30/S₂688 were designed according to Sabin 1 (GenBank accession no. AY184219) and Sabin 2 (GenBank accession no. AY184220) using Primer 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>), and were used for the amplification of the second half of VP1 in isolates of Sabin 1 and Sabin 2 vaccine origin, respectively. The primer pair used for the amplification of the 5'-NCR was UG52/UC53 [21]. The concentration of all the primer pairs used in PCR reactions was adjusted to 50 pmol/µl (Table 2).

2.4. RT-PCR

Reverse transcription was performed at an Eppendorf Mastercycler. For each sample a reaction mixture consisting of: 1 µl of random d(N₆) primers (50 nmol) (NEW ENGLAND Biolabs, USA), 1 µl dNTPs (10 mM) and 5 µl Rnase-free distilled water was prepared. Seven microliter of the reaction mixture with 5 µl of the extracted viral RNA were incubated for 5 min at 65 °C. Afterwards, a second reaction mixture (for each sample) consisting of: 4 µl of 5 × M-MLV reaction buffer, 2 µl DTT (0,1 M) and 1 µl ribonuclease inhibitor (40 U/µl) was prepared. Then 7 µl of the second reaction mixture was added to each sample and incubated for 2 min at 37 °C. Finally, 1 µl (200 units) of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen,

Table 1
Available data for the clinical isolates

No. of isolate/year	Age of child	Clinical condition	Serotype	5'-NCR genotype	Sequence divergence (%) in VP1	Mutations and AA changes in VP1	Mutations in 5'-NCR
I1/1978	1 year	Healthy vaccinee	Polio1	Sabin1	0.22	A2623G –A2749G–Ile90-Met	T525C C583G
I2/1979	6 years	Healthy vaccinee	Polio1	Sabin1	0.11	A3022G	C583G
I3/1980	7 months	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0.11	–A2908G–Ile143-Val	G302A A481G C584G
I4/1980	1 year	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0.11	A2906T	A481G T575A C584G
I5/1981	1 year	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0.22	–T2909A–Ile143-Asn C3252T	T398C T437C A481G C576T C584G
I6/1982	2 years	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0	—	C584G
I7/1983	2 years	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0.33	A2859G –T2888G–Phe136-Cys –T2909C–Ile143-Thr	A481G C584G T597A
I8/1984	7 months	VAPP	Polio2	Sabin2	0.22	–A2908G–Ile143-Val T3330C	A481G C584G
I9/1985	7 years	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0	—	A481G C584G
I10/1985	6 months	VAPP	Polio2	Sabin2	0	—	A481G T567A
I11/1985	5 years	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0	—	T398C A481G C584G
I12/1999	3 months	VAPP	Polio2	Sabin2	0.11	–T2909C–Ile143-Thr	T398C A481G C584G
I13/2001	5 months	Healthy vaccinee	Polio2	Sabin2	0.22	T2736C –T2909C–Ile143-Thr	T398C A481G C584G

VP1 sequence divergence (%) in Sabin 1 and Sabin 2 isolates.

Nucleotide mutations and amino-acid substitutions in 5'-NCR and VP1 regions of Sabin 1 and Sabin 2 isolates.

Numbering according to reference strains [AY184219](#) and [AY184220](#) for isolates of Sabin 1 and Sabin 2 vaccine origin respectively.

The reported nucleotide VP1 and 5'-NCR sequences are available in the GenBank nucleotide sequence database under the accession numbers DQ787783–DQ787796 and DQ792910–DQ792923 respectively.

Life Technologies Paisley, UK) was added to each sample and sequentially incubated: for 10 min at 25 °C, for 50 min at 37 °C and for 15 min at 70 °C.

PCR for 5'-NCR and VP1 genomic regions was performed, using the primers described above (Table 2), at a MJ Research Minicycler. PCR reaction mixture, for each sample, consisted of: 3 µl cDNA, 2 µl of each primer pair (50 pmol/µl), 5 µl 10 × Taq reaction buffer, 2 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl dNTPs (10 mM), 0.4 µl (5 U/µl) Taq DNA Polymerase (Biotaq, Moscow, Russia) and ddH₂O up to a final volume of 50 µl. All reactions were performed for 40

cycles. Each cycle consisted of 20 s of denaturation at 95 °C, 20 s of annealing at 45 °C (for UG1/222 and UG52/UC53) or at 55 °C for (S₁37/S₁688, S₂30/S₂688) and 20 s of extension at 74 °C. The completion of extension was carried out at 78 °C for 15 min.

Analysis of PCR products was performed through agarose gel electrophoresis (2% agarose, 1 µg/ml ethidium bromide in Tris–Boric acid–EDTA buffer). The ladder used was HaeIII ΦX174 (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) and gels were visualized in a UV Foto/Phoresis I system (Fotodyne, Hartland, WI, USA).

Table 2
Primer pairs used in the present study

Primers	Polarity	Sequence 5' → 3'	Vaccine origin	Position
UG1	Sense	TTTGTGTCAGCGTGTAAATG	Sabin 1 Sabin 2	2402–2421 2404–2423
222	Antisense	CICCIGGIGGIAYRWACAT	Sabin 1 Sabin 2	2951–2969 2953–2971
S ₁ 37	Sense	AGGAAATTGGAGTTCTTCACC	Sabin 1	2837–2857
S ₁ 688	Antisense	ACATGACGTTCACTGCGTTTT	Sabin 1	3468–3488
S ₂ 30	Sense	CAACTGAGACGCAAACCTGGA	Sabin 2	2830–2849
S ₂ 688	Antisense	CACATGACACTCACGGCATT	Sabin 2	3469–3488
UG52	Sense	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sabin 1 Sabin 2	162–182 162–182
UC53	Antisense	TTGTCACCATAACCAGCCA	Sabin 1 Sabin 2	577–595 578–596

Primers used for the 5'-NCR (UG52/UC53) and VP1 genomic regions analysis. Primer position according to AY184219 and AY184220 for isolates of Sabin 1 and Sabin 2 vaccine origin respectively.

R: A or G, W: A or T, Y: C or T, I: hydroxyinosine (according to IUPAC ambiguity codes).

2.5. RFLP analysis

RFLP analysis was conducted on UC53/UG52 produced RT-PCR amplicons of the clinical isolates [21]. Six microliters of each amplicon were digested with 20 Units of: HpaII (Promega Corporation), HaeIII (Takara Biotechnology) and NcoI (Takara Biotechnology). The restriction enzymes, the appropriate buffer and double distilled DNase–Rnase free sterile water (Sigma Aldrich) were added to each sample to a final volume of 20 µl. The samples were then incubated at 37 °C for 2 h and the products were subjected to electrophoresis in 3% agarose gels (high-resolution agarose, Metaphor FMC Bioproducts, Rockland ME), containing 1 µg/ml ethidium bromide. The ladder used was HaeIII ΦX174 (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) and gels were visualized in a UV Foto/Phoresis I system (Fotodyne, Hartland, WI, USA).

2.6. Sequencing

PCR products of 5'-NCR and VP1 regions, from all 13 isolates, were sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). In particular, overlapping amplicons in VP1 region were obtained and sequenced. The total VP1 region sequenced (without primers) was 1047 nt for Sabin 1 and 1046 nt for Sabin 2 clinical isolates.

2.7. Computational analysis/computer graphics

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) was used in order to perform the alignment of 5'-NCR and VP1 nucleotide sequences of clinical isolates to the 5'-NCR and VP1 nucleotide sequences of the reference Sabin 1 and 2 strains (AY184219, AY184220). The length of VP1

aligned was 906 nt for Sabin 1 and 903 nt for Sabin 2 clinical isolates. ClustalW was also used for the alignment of VP1 amino-acid sequences of clinical isolates with VP1 amino-acid sequences of the reference strains, while Gene-Runner V 3.05 was used in order to obtain amino-acid sequences of VP1 from the VP1 nucleotide sequences of isolates. Rasmol V. 2.7.1.1 (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol>) was used for the depiction of the amino-acid substitutions, which were identified among the 13 isolates. For the visualization of the observed amino-acid substitutions in Sabin 1 and 2 isolates, the structure of Poliovirus type 1 Mahoney strain (1ASJ.pdb) [22] was used.

3. Results

3.1. RFLP analysis for the genotyping of isolates

Isolates I1, I2 and isolates I3–I13 that had previously been serotyped as poliovirus type 1 and type 2, respectively, were also genotyped as Sabin poliovirus type 1 and 2 vaccine strains (Table 1).

3.2. Sequencing analysis of the isolates

For the identification of mutations in 5'-NCR and VP1 regions, the obtained 5'-NCR and VP1 sequences of the 13 clinical isolates were aligned with 5'-NCR and VP1 sequences of the respective reference strains. For the identification of amino-acid substitutions, VP1 amino acid sequences of clinical isolates were aligned with VP1 amino acid sequences of the respective reference strains. Results for serotypes 1 and 2 are presented in Table 1.

3.3. Characterization of Sabin isolates based on full VP1 sequence

All clinical isolates presented <1% percentage divergence in VP1 region in comparison with the respective vaccinal Sabin strains and were characterized as OPV-like viruses. In particular, among the 13 isolates, four isolates each, presented, respectively, 0.22%, 0.11% and 0% percentage divergence and one isolate presented 0.33% percentage divergence in VP1 region (Table 1).

3.4. Mutational pattern in VP1 region and location of amino-acid changes in the capsid structure

Amino-acid substitutions, which emerged from non-synonymous mutations, were depicted in three-dimensional atomic structure (1 ASJ.pdb) in order to find out their exact location and to deduce their possible role in virus fitness (Fig. 1).

3.4.1. Sabin 1 isolates

The percentage of synonymous mutations in VP1 region of Sabin 1 isolates was 67% which is consistent with the general mutational pattern of *Polioviruses* [23,24]. Moreover, the percentage of transitions was 100% which is also consistent with the tendency of 3D^{Pol} to introduce mainly transitions during the viral replication [25].

In Sabin 1 clinical isolates, only one amino-acid substitution was identified which is likely due to the small number of Sabin 1 clinical isolates (only two). In particular, in I1 isolate the amino-acid substitution Ile90Met was identified while in isolate I2 no amino-acid substitution was identified. The amino-acid substitution Ile90Met is situated in the exterior of the capsid, in N-AgI site (data not shown).

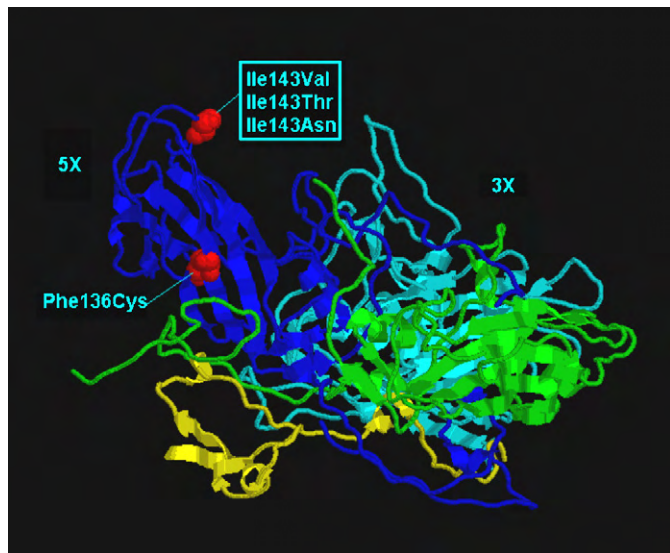


Fig. 1. Location of all Sabin 2 isolates amino-acid substitutions, in the viral protomer. 1ASJ.pdb structure was used. 5 × and 3 × symmetry axes are shown. Numbering of VP1 according to AY184221.

3.4.2. Sabin 2 isolates

The percentage of synonymous mutations in VP1 region of Sabin 2 clinical isolates was 42%. Consequently, these isolates are showing a preference to non-synonymous mutations with a direct impact to their fitness, than to synonymous mutations, which alter their nucleotide sequence without changing their fitness (without phenotypic impact). On the other hand, the percentage of transitions was 75% which is consistent with previous studies [23].

Six of Sabin type 2 isolates presented mutation in residue 143 (Ile) which was substituted by Val, Asn or Thr. The residue 143 of VP1 is exposed on the external surface of the virion in the loop connecting β-strands D and E (DE loop) of VP1 (Fig. 1). Isolate I7 shows also the mutation Phe136Cys. The residue 136 of VP1 is situated in the hydrocarbon-binding pocket of VP1 where the aromatic side chain of Phe interacts with the sphingosine molecule (Fig. 1). Sabin 2 isolates I6, I9, I10, I11 show no nucleotide substitutions in VP1 region.

3.5. Mutational pattern in 5'-NCR region and location of nucleotide changes in the IRES secondary structure

In order to find out the exact location of mutations and to deduce their possible role in virus fitness we depicted them in the IRES secondary structure of the respective reference strains (Fig. 2).

3.5.1. Sabin 1 isolates

The percentage of transitions in 5'-NCR was 33% which is likely due to small number of Sabin 1 clinical isolates.

In both Sabin 1 isolates, the mutation C583G was identified which is situated in domain VI of IRES cis-acting element (Fig. 2). Additionally, the mutation U525C was identified in isolate I1. This substitution is situated in domain V of IRES cis-acting element (Fig. 2).

3.5.2. Sabin 2 isolates

The percentage of transitions in 5'-NCR was 57% which is consistent with previous studies [23].

In almost all Sabin type 2 isolates, the mutation A481G was identified except for the isolate I6. This substitution is situated in domain V of IRES cis-acting element (data not shown). Additionally, the mutation T398C was identified in four Sabin 2 isolates. The mutation T398C and the mutation T437C which was identified in isolate I5 are situated in a double stranded region of IV IRES (data not shown). It is noteworthy the presence of C584G mutation in ten Sabin 2 isolates. The mutation C584G and the mutation T597A in isolate I7 are situated in double stranded region of IRES cis-acting element and in particular in the stem of VI region (data not shown). Finally, the mutations T567A in isolate I10, T575A in isolate I4 and C576T in isolate I5 are situated in single stranded region of IRES cis-acting element and in

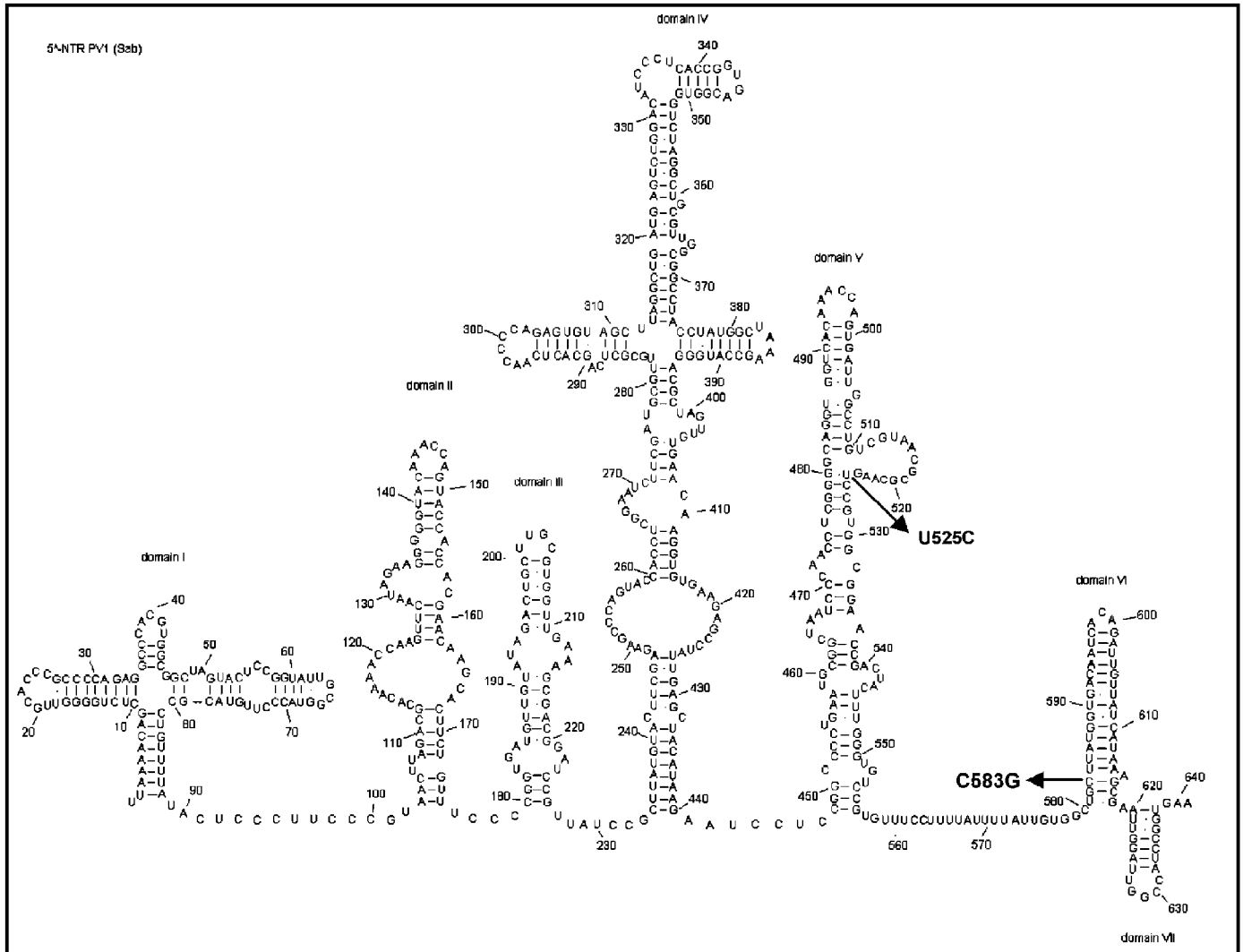


Fig. 2. Location of all Sabin 1 isolates nucleotide substitutions in the secondary structure of 5'-NCR PV1 (Sabin).

particular in the variable region (X_m) of the conserved motif Y_n-X_m-AUG (data not shown).

4. Discussion and conclusions

In the present study, 13 samples which were taken from healthy vaccinees and VAPP cases during the time period 1978–2001, were investigated. From the 13 clinical isolates, two were genotyped as Sabin type 1 and 11 were genotyped as Sabin type 2 vaccinal strains by RFLP in 5'-NCR. The sequencing of full VP1 genomic region showed that all clinical isolates were characterized as OPV-like viruses with percentage divergence less than 1% in VP1 region.

Moreover, the isolated Poliovirus Sabin strains were investigated for mutations in partial 5'-NCR and the full VP1 genomic regions. Amino-acid substitutions in VP1, which emerged from non-synonymous mutations, were depicted in three-dimensional atomic structure (1 ASJ.pdb) while nucleotide changes in 5'-NCR were depicted in the

IRES secondary structure of the respective reference strains.

Both Sabin type 1 viruses were isolated from healthy vaccinees. In both Sabin type 1 isolates the mutation C583G was identified in 5'-NCR region. This mutation is situated in double stranded region of IRES cis-acting element and in particular in the stem of VI region which is the site of binding of cellular peptide p52, an essential factor for translation of poliovirus genome [26]. The adverse effect of this mutation is possibly avoided by the phenomenon of covariance. Additionally, the mutation U525C was identified in isolate II. This substitution in domain V of the 5'-NCR most likely conferred a selective advantage. It restored the stability of a base pair between nt 480 and 525 (AU in Mahoney, GU in Sabin-1, and GC in isolate II). The destabilization of this base pair in the Sabin 1 RNA appears to be associated with a decrease in neurovirulence [27,28].

In VP1 genomic region, in Sabin 1 isolates, the mutation Ile90Met is reversion to the parental Mahoney strain [23]

and include residue that is situated in β -strand B of VP1. The residue Ile-90 participates in hydrophobic interactions with residue Thr-106 in β -strand C which contributes to the characteristic eight-stranded anti-parallel beta-barrel structure of VP1. In addition, according to Bouchard et al. [13] residue 106 is one of the major determinants of attenuation in isolates of Sabin 1 vaccine origin and substitution in this site has been associated with an increase in neurovirulence. Consequently, the mutation Ile90Met can indirectly influence the neurovirulence. The residue 90 also takes part in the formation of N-AgI, which is composed of residues 90–105 of VP1 [29]. Generally, the accumulation of mutations in N-Ags is a common phenomenon because these sites are the most exposed in the exterior of the capsid and as a result they undergo high antigenic pressure. Moreover, the location of substitutions in these sites may be part of a virus strategy, which is focused to the escape from the host's immune response.

Eight of Sabin type 2 strains were isolated from healthy vaccinees while three were isolated from VAPP cases.

All of Sabin type 2 strains which were isolated from VAPP cases and seven of Sabin type 2 viruses which were isolated from healthy vaccinees presented the mutation A481G in 5'-NCR. This substitution is situated in domain V of the 5'-NCR and the presence of A at nt 481 is the major determinant of neurovirulence attenuation in isolates of Sabin type 2 vaccine origin [12]. This phenotypic impact is due to the impaired binding of eIF4G with the IRES domain V [30]. It has been proposed that in vaccinees, the A at nt 481 that is found in the type 2 vaccine strains revert rapidly to the base pair that is found in the wild-type strain. On the other hand, in the type 1 vaccine strain, only 50% of vaccinees excrete reverted virus [31]. This observation is consistent with the results of our study as in almost all Sabin 2 clinical isolates the mutation A481G was identified while no one Sabin type 1 isolate showed the corresponding mutation A480G. Additionally, the mutation T398C was identified in three Sabin type 2 viruses isolated from healthy vaccinees and in one Sabin type 2 strain isolated from VAPP case. It has been proposed that mutation T398C and mutation T437C which was identified in isolate I5 could also have some effect in attenuation and reversion of the P2/Sabin strain towards neurovirulence, even though minor [12]. Moreover, an U→C mutation at nt 398 of 5'-NCR was also frequently observed in P2/Sabin-derived isolates from VAPP cases [32,33]. Both of these mutations are situated in a double stranded region of IV IRES and in particular they convert the base pair GU into GC. It is worth mentioning the presence of C584G mutation in all of Sabin type 2 isolates except for the isolate I10. This mutation is situated in double stranded region of IRES cis-acting element and in particular in the stem of VI region. However, the adverse effect of this mutation is possibly avoided by the phenomenon of covariance. The mutation T597A in I7 isolate acts in the same way as the mutation C584G. Finally, the mutations T567A in isolate I10, T575A in

isolate I4 and C576T in isolate I5 are situated in single stranded regions of IRES cis-acting element and in particular in the variable region (X_m) of the conserved motif Y_n-X_m-AUG which is essential for translation of viral RNA. Consequently, these mutations are unlikely to affect the secondary structure of IRES and the efficiency of translation.

Sabin 2 isolates are characterized by an unusually high rate of non-synonymous mutations in VP1 region. The VP1 mutational pattern of these isolates comes in contradiction with mutational patterns observed in previous studies where synonymous mutations outnumbered the non-synonymous ones in VP1 region [23,34–36]. A hypothesis about this mutational pattern could be the necessity of accumulation of non-synonymous mutations in order to repress the mutations responsible for attenuation that are situated in other genomic regions of Sabin 2 vaccine strains.

Six of Sabin type 2 isolates presented mutation in residue 143 of VP1 which was substituted by Val, Asn or Thr. Four of them were isolated from healthy vaccinees and two from VAPP cases. In particular, the mutation Ile143Thr is reversion to the parental wild strain. Moreover, the residue 143 of VP1 is one of the major determinants of attenuation in isolates of Sabin type 2 vaccine origin and substitution in this site has been associated with an increase in neurovirulence [12]. The residue 143 of VP1 is situated in DE loop of VP1. The DE loop interacts closely with the BC loop of VP1 to make up the discontinuous antigenic neutralization site 1 [37] and on the other hand the BC loop is believed to influence poliovirus host range through receptor-mediated events early in infection [38]. Thus, it is possible that the attenuating effect of the residue VP1–143 affects early receptor-mediated events [14].

Sabin 2 isolates I6, I9, I10, I11 show no nucleotide substitutions in VP1 region. This means that the circulation of these strains is of short duration as the demarcation of 1% VP1 divergence implies that replication of vaccine virus had occurred for approximately for 1 year [39]. However, it does not imply that isolates having <1% divergence would lack the capacity for person-to-person transmission in poorly immunized populations, as it is likely that the critical attenuating mutations of the Sabin strains generally revert well before nucleotide substitutions accumulate to the level of 1%. For example, Sabin 2 isolates I3, I12, I5, I8, I7 despite the low percentage of divergence in VP1 region (0.11%, 0.11%, 0.22%, 0.22% and 0.33%, respectively), show mutations in the major determinants of attenuation in both of 5'-NCR and VP1 genomic regions (nt 481 of 5'-NCR and aa 143 of VP1). Also, isolates I9, I10, I11 with 0% percentage divergence in VP1 show mutation at nucleotide 481 of 5'-NCR which is the major determinant of attenuation of Sabin 2 vaccine strains. In addition, isolate I1 (0.22% percentage divergence in VP1) show mutations at residue 90 of VP1 and at nucleotide 525 of 5'-NCR which indirectly affect the neurovirulence of Sabin 1 vaccine strains.

The sequencing of these two genomic regions (5'-NCR and VP1) did not detect any recombination event, fact which was expected as the recombination is a rare phenomenon in these regions [40,41].

In conclusion, the present study implies that sequencing of 5'-NCR and VP1 is critical for molecular diagnosis of Polioviruses. The analysis of the partial 5'-NCR and the full VP1 sequences suggest that vaccine-derived polioviruses may evolve into transmissible and infectious pathogens through the accumulation of mutations both in structural elements of VP1 (N-Ags, canyon) and in the determinants of attenuation of Sabin vaccine strains in 5'-NCR. It is concluded that, it is not only important the percentage divergence in VP1 region but namely the precise sites at which these mutations are situated. Prospective and retrospective characterization of Sabin vaccine-derived polioviruses based on 5'-NCR and VP1 sequence may shed additional light on this important topic and provide valuable information for making a rational decision on vaccination policies. Finally, this study emphasizes the critical importance of permanently increased poliovirus laboratory surveillance even in adequately immunized communities that must continue in the foreseeable future regardless of the immunization policies.

Acknowledgments

The present work was co funded by the European Union (75%) and the Greek Ministry of Education (25%) under the framework of the Education and Initial Vocational Training Program "Pythagoras II". Research project: "Molecular detection of Enteroviruses in clinical samples and the environment. Implications for the public health. Code 52213.11".

References

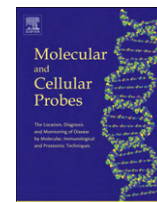
- [1] Wimmer E, Hellen CU, Cao X. Genetics of poliovirus. *Ann Rev Genet* 1993;27:353–436.
- [2] Emini EA, Jameson BA, Lewis AJ, Larsen GR, Wimmer E. Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* 1982;43:997–1005.
- [3] Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 1985;229(4720):1358–65.
- [4] Minor PD, Ferguson M, Evans DMA, Almond JW, Icenogle JP. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* 1986;67(pt 7):1283–91.
- [5] Bernhardt G, Harber J, Zibert A, deCrombrugge M, Wimmer E. The poliovirus receptor: identification of domains and amino acid residues critical for virus binding. *Virology* 1994;203(2):344–56.
- [6] Colston E, Racaniello VR. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J* 1994;13(24):5855–62.
- [7] Harber J, Bernhardt G, Lu HH, Sgro JY, Wimmer E. Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* 1995;214(2):559–70.
- [8] Liao S, Racaniello VR. Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* 1997;71(12):9770–7.
- [9] Filman DJ, Syed R, Chow M, Macadam AJ, Hogle JM. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* 1989;8(5):1567–79.
- [10] Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell* 1990;63:369–80.
- [11] Rohlf JB, Percy N, Ley R, Evans DJ, Almond JW, Barclay WS. The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol* 1994;68:4384–91.
- [12] Friedrich F. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinee. *Acta Virol* 1996;40:157–70.
- [13] Bouchard MJ, Lam DH, Racaniello VR. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J Virol* 1995;69(8):4972–8.
- [14] Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Skuce R, Wood D, Almond JW. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology* 1993;192:18–26.
- [15] Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, John A, Marsden S, Taffs F, et al. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccines. *Virology* 1989;172:408–14.
- [16] Friedrich F. Neurologic complications associated with oral poliovirus vaccine and genomic variability of the vaccine strains after multiplication in humans. *Acta Virol* 1998;42:187–94.
- [17] World Health Organization. Manual for the virological investigation of poliomyelitis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
- [18] Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Meth* 1995;53:25–36.
- [19] Balanant J, Guillot S, Candrea A, Delpeyroux F, Crainic R. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* 1991;184:645–54.
- [20] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. *J Clin Microbiol* 2000;38:1170–4.
- [21] Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Vamvakopoulos NC. Improved genotype vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J Clin Microbiol* 2000;38:4337–42.
- [22] Wien MW, Curry S, Filman DJ, Hogle JM. Structural studies of poliovirus mutants that overcome receptor defects. *Nat Struct Biol* 1997;4:666–74.
- [23] Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, Ivanova OE, Eremeeva TP, Cumakov KM, et al. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol* 2002;76:6791–9.
- [24] Figlerowicz M, Alejska M, Kurzynska-Kokorniak A, Figlerowicz M. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev* 2003;23:488–518.
- [25] Agol VI. Genome instability in picornaviruses. *Mol Biol* 2002;36:216–22.
- [26] Equestre M, Genovese D, Cavalieri F, Fiore L, Santoro R, Bercoff RP. Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J Virol* 1991;65:2707–10.
- [27] Christodoulou C, Colbere-Garapin F, Macadam A, Taffs LF, Marsden S, Minor P, et al. Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J Virol* 1990;64:4922–9.
- [28] Kawamura N, Kohara M, Abe S, Komatsu T, Tago K, Arita M, et al. Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J Virol* 1989;63:1302–9.
- [29] Herremans T, Reimerink JH, Kimman TG, van der Avoort HG, Koopmans MP. Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with oral live attenuated or

- inactivated poliovirus vaccine and after natural exposure. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:40–4.
- [30] Ochs K, Zeller A, Saleh L, Bassili G, Song Y, Sonntag A, et al. Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J Virol* 2003;77:115–22.
- [31] Minor PD. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert reviews in molecular medicine*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- [32] Muzychenko AR, Lipskaya G, Maslova SV, Svitkin YV, Pilipenko EV, Nottay BK, et al. Coupled mutations in the 5′-untranslated region of the Sabin poliovirus strains during in vivo passages: structural and functional implications. *Virus Res* 1991;21:111–22.
- [33] Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Dunn G, Skuce R, Almond JW, et al. The 5′ noncoding region of the type 2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. *Virology* 1991;181:451–8.
- [34] Bellmunt A, May G, Zell R, Pring-Akerblom P, Verhagen W, Heim A. Evolution of poliovirus type I during 5.5 years of prolonged enteric replication in an immunodeficient patient. *Virology* 1999;265:178–84.
- [35] Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, et al. Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 1997;71:7758–68.
- [36] Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L, et al. Prolonged replication of a Type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* 1998;36:2893–9.
- [37] Wiegers K, Uhlig H, Dernick R. Nag1B of poliovirus type 1: a discontinuous epitope formed by two loops of VP1 comprising residues 96–104 and 141–152. *Virology* 1989;170:583–6.
- [38] Moss EG, Racaniello VR. Host range determinants located on the interior of the poliovirus capsid. *EMBO J* 1991;10:1067–74.
- [39] Dowdle WR, De Gourville E, Kew OM, Pallansch MA, Wood DJ. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol* 2003;13:277–91.
- [40] Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* 2003;84:573–80.
- [41] Martin J, Samoilovich E, Dunn G, Lackenby A, Feldman E, Heath A, et al. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 2002;76:1092–10928.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Probes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcpr

A new RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains

V. Pliaka^a, E. Dedepsidis^a, Z. Kyriakopoulou^a, K. Mpirli^a, D. Tsakogiannis^a, A. Pratti^a, S. Levidiotou-Stefanou^b, P. Markoulatos^{a,*}

^a University of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology, Ploutonos 26 & Aiolou, 41221 Larissa, Greece

^b University of Ioannina, Medical School, Department of Microbiology, Ioannina, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2009

Accepted 16 November 2009

Available online xxx

Keywords:

Vaccine-derived poliovirus

Recombination

RT-PCR screening analysis

ABSTRACT

In the post-eradication era of wild polioviruses, the only remaining sources of poliovirus infection worldwide would be the vaccine-derived polioviruses (VDPVs). As the preponderance of countries certified to be polio-free has switched from OPV (oral poliovirus vaccine) to IPV (inactivated poliovirus vaccine), importation of recombinant evolved derivatives of vaccinal strains would have serious implication for public health. To test the robustness of the proposed RT-PCR screening analysis, eleven recombinant vaccine-derived polioviruses that were characterized previously by sequencing by our group, in addition to three recently identified recombinant environmental isolates were assayed. Although the most definitive characterization of VDPVs is by genomic sequencing, in this study we describe a new, inexpensive and broadly applicable RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types S3/Sx in 2C and S2/Sx in 3D genomic regions respectively of VDPVs, that can be readily implemented in laboratories lacking sequencing facilities as a first approach for the early detection of vaccine-derived poliovirus (VDPVs).

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Poliovirus, the causal agent of poliomyelitis, is a member of the enterovirus genus of the Picornaviridae family and exists as three immunologically defined serotypes (P1, P2 and P3). The poliovirus is a nonenveloped virus composed of a 7.5-Kb positive sense single-stranded polyadenylated RNA genome surrounded by an icosahedral capsid. Structural (VP4, VP2, VP3 and VP1) and nonstructural (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D) viral proteins are coded by a single polypeptide precursor which is cleaved by viral proteases [1].

All individuals infected with poliovirus, whether suffering from paralysis or asymptomatic, excrete the virus into the stools for several weeks. The excreted virus enters the environment and remains detectable, for a finite time, ranging from days to months depending on the conditions. AFP (acute flaccid paralysis) surveillance remains the gold standard of poliovirus surveillance. However, environmental surveillance is a powerful and highly sensitive tool for detection of poliovirus circulation even in

absence of clinical cases in populations with high immunization coverage [2].

Since the 1960s, poliomyelitis has been effectively controlled by the use of inactivated poliovirus vaccine (IPV) or live-attenuated oral poliovirus vaccine (OPV). The OPV is constituted of attenuated strains of each of the three serotypes (Sabin 1, 2, and 3) [3]. By 1964, OPV was the vaccine adopted throughout most of the world and led in drastic reductions in the number of poliomyelitis cases due to infections with wild-type polioviruses from an estimated 350,000 cases in over 125 endemic countries in 1988 to just 1310 cases in four countries in 2007 [4].

In the late 1990s it was recognized that polio outbreaks can be caused by circulating live-attenuated vaccine viruses (Sabin strain) that have reverted and re-acquired neurovirulence. By late-2005, six outbreaks caused by such circulating vaccine-derived polioviruses (cVDPVs), had been documented [5–8]. Moreover, in rare cases (1 case per 750,000 primary vaccinees), OPV strains have been implicated in vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) [9]. The underlying cause of VAPP is the genetic instability of OPV strains. During multiplication in the human intestine, mutations at specific sites of the genome which are associated with the attenuated and temperature sensitive phenotype of Sabin strains as well as recombination between Sabin strains of the

* Corresponding author. Tel.: +30 2410 565274; fax: +30 2410 565294.

E-mail address: markoulatos@bio.uth.gr (P. Markoulatos).

trivalent OPV may result in the loss of the attenuated phenotype of OPV strains and the acquisition of traits characteristic of wild polioviruses, such as increased neurovirulence and loss of temperature sensitivity [10–12].

Administration of trivalent OPV provides optimal conditions for multiple infections of human intestinal target cells, thus favoring the possibility of intermolecular recombination between heterotypic viral genomes. Moreover, the mixed replication complexes located at few preferential sites in the perinuclear region of the target cells promote intertypic recombination [13]. Up to 79% of PV strains isolated from stools following vaccination were found to be recombinant [14]. Among VAPP cases, up to 50% of type 2 and 67% of type 3 Sabin poliovirus strains have been characterized as recombinant [10]. The presence of Sabin type 1 recombinants is extremely rare as S1/Sx (S1/S2 or S1/S3). A possible hypothesis for polio recombination partners is their secretion time period in the carriers gut, where first polio type 1 is secreted followed by type 2 and last by type 3 poliovirus [14]. Intertypic recombination usually occurs in the nonstructural protein genome region [5,15,16] while only three reports indicated recombination in the 3' end of VP1 genomic region [17–19] leading to a chimeric S3/S2 VP1 capsid protein. Recombination also occurs between Sabin and wild PV strains [20,21] or even between polio and non-polio EVs [5,22]. All cVDPVs described so far, appear to be recombinants with Enteroviruses of group C which are closely related to polioviruses in the non-structural coding region [5–7,22].

The primary identification of recombination events in non-structural genomic region usually included the amplification of 2C and 3D coding regions following RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis [16,23–27]. However, these assays usually need additional RFLP mapping and/or sequence analysis in order to allow the identification of recombinant poliovirus strains.

A multiplex PCR assay has also been described for identification of recombinant poliovirus strains [28]. This assay targets an interval at the 5' half of the 2C region and variable sequences near the middle of the 3D region of all three Sabin vaccine strains but could lead to the underestimation of the number of recombinant vaccine strains as the primers used sample only a small part of the non-structural sequences [28].

In the present study, eleven recombinant vaccine-derived polioviruses that were characterized previously by sequencing by our group, in addition to three recently identified recombinant environmental isolates were screened for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions using a new RT-PCR assay.

2. Materials and methods

2.1. Environmental sampling

Environmental samples were collected from the sewage treatment plant of Athens from April to October 1997. Ten 1-liter samples were collected and stored at -80°C . Samples were recently transported in dry ice to the Biochemistry & Biotechnology Department in Larissa, Greece, where processing of the samples took place.

2.2. Processing of samples: virus isolation

Processing of the environmental samples was carried out using the method proposed by WHO [29]. A concentrate of every environmental sample was added to 10X minimal essential medium (MEM) (9 ml of concentrate and 1 ml of 10X MEM) and inoculated into 96-well plates (fifty microliters of the concentrate/well) containing confluent HEp-2 cells in 100 μl of Eagle MEM supplemented

with 3% fetal calf serum (FCS). Following absorption of the virus for 2 h at 37°C , the medium from each well was aspirated and replaced by 200 μl of Eagle MEM supplemented with 1% FCS and the 96-well plates were incubated at 37°C for 4–5 days. The plates were then frozen and thawed three times before a second passage in 96-well plates as above was performed. The second passage lasted for approximately 5–6 days. The wells in which cytopathic effect (CPE) was observed were marked and their contents were inoculated into 25-cm² flasks containing HEp-2 cells in 3 ml of Eagle MEM and 2% FCS in order to confirm CPE. RNA extraction [30], reverse transcription and PCR with primer pair UG52/UC53 [31] were performed in the content of each flask in which CPE was observed in order to confirm the enterovirus CPE. Following confirmation of enterovirus CPE, serial 10-fold dilutions were prepared in order to avoid viral mixtures. The last dilution in which CPE was observed was inoculated into a 25-cm² flask containing HEp-2 cells and the presence of enterovirus was retested as described above.

2.3. Extraction of viral RNA

Two hundred microliters of frozen and thawed viral stocks were subjected to viral RNA extraction as has been previously described [30]. Finally, the pellet was dried and dissolved in 200 μl of sterile double-distilled water, DNase RNase-free (Sigma–Aldrich, Inc., St Louis, USA).

2.4. cDNA synthesis

Reverse transcription was performed at an Eppendorf thermal cycler. The final volume of the reaction was 20 μl . In brief, a first reaction mixture consisting of: random d(N6) primers (5 pmol) (NEW ENGLAND Biolabs, USA), dNTPs (2 mM) and Rnase-free distilled water up to a volume of 7 μl was prepared. Seven microliter of the first reaction mixture with 5 μl of the extracted viral RNA were incubated for 5 min at 65°C . Afterwards, a second reaction mixture consisting of: M-MLV reaction buffer (1X), DTT (0.01 M), ribonuclease inhibitor (10 U), M-MLV Reverse Transcriptase (100 U) (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) and Rnase-free distilled water up to a volume of 8 μl was prepared. Then 8 μl of the second reaction mixture was added to each sample and sequentially incubated: for 10 min at 25°C , for 50 min at 37°C and for 15 min at 70°C .

2.5. Preliminary characterization of the isolates

Primer pair UG52/UC53 was used for the identification of the vaccine origin and for the genotyping of the environmental isolates in the 5'-UTR genomic region [31]. Moreover, sequencing of VP1 capsid protein of poliovirus isolates was conducted. The primer pairs used for complete VP1 gene sequencing were UG1/222 [32,33] for the first half of the VP1 gene and serotype-specific primer pairs S₁37/S₁688 and S₃26/S₃651 for Sabin 1 and Sabin 3 isolates, respectively, for the second half of the VP1 gene [34].

2.6. PCR screening analysis for the identification of recombination sites in 2C and 3D genomic regions

Primers S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2, S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 were designed using the reference Sabin strains (AY184219, AY184220, AY184221) (Table 1). Primers S3sC2b, Sa13C2 and Sa23C2 were used in each reaction tube for the identification of predominant recombination types S3/S1 and S3/S2 in the 2C genomic region (Fig. 1) yielding amplification products of 1280 and 1227 bp, respectively.

Table 1

Primers for identification of predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived polioviruses.

Primers	Polarity	Sequence (5' → 3')	Product length (bp)	Detectable recombination type in	
				2C	3D
S3sC2b	Sense	4088-TTGGAGATTCCTATGTTATTAG-4110 ^c			
Sa13C2	Antisense	5350-GTGTCCAGCAAACAGTTTA-5368 ^a	1280	S3/S1	
Sa23C2	Antisense	5295-AAAGTAGTTACTGCTTAGG-5315 ^b	1227	S3/S2	
S2s3dmp	Sense	6430-GGAATTAACCTACCGCTTGTGA-6450 ^b			
S1a3dmp	Antisense	7141-GCATTACTGGATGAATAAGAAAT-7163 ^a	733		S2/S1
S31aD3	Antisense	7213-GACACAAGGAGCGTACATGG-7232 ^c	803		S2/S3

^a Primer positions based: on those of the Sabin 1 reference strain (AY184219).^b Primer positions based: on those of the Sabin 2 reference strain (AY184220).^c Primer positions based: on those of the Sabin 3 reference strain (AY184221).

Primers S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 were used in a separate reaction tube for the identification of predominant recombination types S2/S1 and S2/S3 in the 3D genomic region (Fig. 1) yielding amplification products of 733 and 803 bp, respectively.

The PCR mixture for each tube consisted of: 3 µl of cDNA, sense primer (2 pmol), antisense primers (1 pmol each), Taq reaction buffer (1X), dNTPs (1 mM), Taq DNA polymerase (2.5 U) (Paq5000 Strategene) and double-distilled H₂O up to a final volume of 50 µl. Both PCR reactions were performed in an Eppendorf thermal cycler for 40 cycles. PCR conditions for each cycle were: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min. The final extension was carried out at 72 °C for 5 min. Analysis of PCR products was performed through agarose gel electrophoresis (2% agarose, 1 µg mL⁻¹ ethidium bromide in Tris–boric acid–EDTA buffer) using as a molecular weight marker the 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK).

2.7. Positive and negative controls in RT-PCR screening analysis for the identification of recombination sites in 2C and 3D genomic regions

The strains used as positive controls in the RT-PCR screening analysis are presented in Table 2. Recombinant clinical strains EPA, EPB, EPC, EP16, EP23 and environmental strains ENP5, ENP7, ENP8, LK3, LK6, LK10 that were characterized in previous studies of our group were used as positive controls.

Vaccine strains (Sabin types 1, 2, 3) which were used as negative controls in RT-PCR screening analysis were provided by the World Health Organization (WHO). Seven strains of Enterovirus group C (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17, CAV18, CAV21) kindly provided

by RIVM (National Institute for Public Health and the Environment, the Netherlands), were also used as negative controls in RT-PCR screening analysis.

2.8. Sensitivity assay of RT-PCR screening analysis

Serial dilutions (10^{5.5}–1 TCID₅₀/0.1 ml) of strain EPA were prepared in Eagle MEM. After RNA extraction and cDNA synthesis, two PCR reactions with primers S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2 and S2s3dmp, S1a3dmp, S31aD3 in 2C and 3D genomic region respectively were performed in order to assay the detection limit of RT-PCR screening analysis of recombinant strains.

2.9. Sequencing

Following RT-PCR screening analysis with primers S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2 and S2s3dmp, S1a3dmp, S31aD3, the sequences encompassing the recombination sites of three recently identified environmental isolates (584, 738 and 742) were determined by sequencing of the respective regions using overlapping primer pairs, in order to cover the recombination sites. Sequencing was performed by Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Primer pairs used for 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D gene sequencing analysis are shown in Table 3. For all primer pairs, PCR conditions were as described in the original publications (see Table 3).

2.10. Computational analysis

Primer 3 software (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) was used for design of primers S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2 and S2s3dmp,

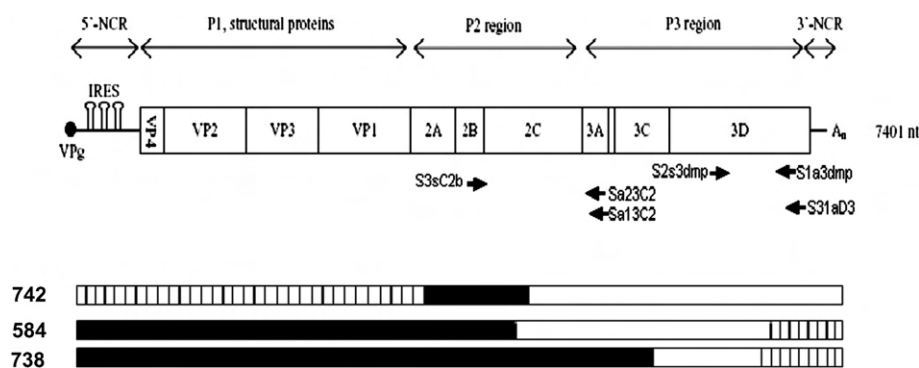


Fig. 1. Schematic representation of the poliovirus genome. Several genetic elements like the viral protein genome-linked (VPg), internal ribosome entry site (IRES), open reading frame (boxes), and poly-A-tail (An) are indicated. The position and direction of the used primers are indicated with bold arrows. The location of crossover sites of the three recently isolated environmental strains is also indicated below the genome. The bars symbolize the derivation of sequences of isolates 742, 584 and 738. Lined bars, Sabin 1-derived sequences; white bars, Sabin 2-derived sequences; black bars, Sabin 3-derived sequences.

Table 2

Location of recombination sites of the clinical and environmental isolates from previous studies. Type of recombination and accession numbers of sequences deposited in GenBank.

Isolate	Recombination Nucleotide position	Recombination type	Accession numbers	Reference
EPA	1st 4643–4656/S3 2nd 6598–6605/S2	S3/S2/S3	AY738635	[25]
EPB	1st 4643–4656/S3 2nd 6598–6605/S2	S3/S2/S3	AY738636	[25]
EPC	1st 4643–4656/S3 2nd 6535–6563/S2	S3/S2/S3	AY738637	[25]
EP16	4892–4914/S3	S3/S2	AY736180	[26]
EP23	4880–4887/S3	S3/S1	AY736181	[26]
ENP5	6679–6692/S2	S2/S1	AY820970	[23]
ENP7	6549–6553/S2	S2/S3	AY820972	[23]
ENP8	6790–6794/S2	S2/S1	AY820973	[23]
LK3	1st 4766–4791/S3 2nd 4942–4958/S2	S3/S2/S1	DQ150697	[23]
LK6	1st 4766–4791/S3 2nd 4942–4958/S2	S3/S2/S1	DQ150698	[23]
LK10	1st 4766–4791/S3 2nd 4942–4958/S2	S3/S2/S1	DQ150699	[23]

S1a3dmp, S31aD3. The online alignment software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) was used for the analysis of the sequences combined with the reference strains cited in GenBank (Sabin type 1: AY184219, Sabin type 2: AY184220 and Sabin type 3: AY184221). SimPlot software (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>) (version 3.5.1) was used for depiction of the recombination events.

3. Results

3.1. Preliminary characterization of the three recently identified environmental strains (584, 738 and 742)

From the environmental samples three poliovirus strains (584, 738 and 742) were isolated, of which two were of Sabin 3 vaccine origin and one was of Sabin 1 vaccine origin (Table 4).

3.2. PCR screening analysis for the identification of recombination sites in 2C and 3D genomic regions

To test the robustness of RT-PCR screening analysis, eleven recombinant vaccine-derived polioviruses were selected from

Table 3

Primers used for complete amplification of the genomic region from 2A to 3'-UTR.

Primer	Polarity	Sequence (5' → 3') ^a	Reference
71,935	Sense	3206-GTCAATGATCACACCC-3222	[44]
EUC2	Antisense	4454-TTTGCACTTGAACCTGTATGTA-4474	[45]
UG23	Sense	4169-AAGGATTGGAGTGGGTGTC-4188	[46]
UC15	Antisense	4948-CATCTCTTGAAGTTTGTCT-4965	[46]
S ₂ 97*	Sense	4717-TTAGCCTCCACCCTCCAG-4737	[26]
S ₂ 598*	Antisense	5195-TGATGTTCTCTCTTTGAACC-5218	[26]
S ₂ 48*	Sense	4968-TCCTTTAGTGTGGCAAGG-4988	[26]
S ₂ 911*	Antisense	5812-GTTTGTCTCCACCGAGAIT-5832	[26]
S ₁ 42	Sense	4962-GATGCTGTCTTTAGTGTGTGG-4984	[26]
S ₁ 952	Antisense	5853-GATGCTGTCTTTAGTGTGTGG-5873	[26]
UG16	Sense	GTTGGTGGAAACGGTTCACA	[46]
UC12	Antisense	TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG	[46]
S ₃ 64	Sense	5772-GTATGTTCTGTCCGGTGTCTGT-5792	[26]
S ₂ 380*	Antisense	6800-TGGGAATGGTTGAGGTAATC-6780	[26]
S ₂ 107*	Sense	6647-TCCACAGTCTAATGGAAGAGA-6668	[26]
S ₂ 872*	Antisense	7393-ACAACAGCATGCCCAATCC-7413	[26]

^a Positions of primers are according to reference strain Sabin 1 (AY184219) except for those with an asterisk, for which positions refer to reference strain Sabin 2 (AY184220).

Table 4

Location of recombination sites of the three recently isolated environmental strains. Type of recombination and accession numbers of 2A–3'-UTR sequences deposited in GenBank. The genotype in 5'-UTR and VP1 regions is also shown.

Isolate	Recombination Nucleotide position	Recombination type	Accession numbers	5'-UTR genotype	VP1 genotype
584	1st 4449–4464/S3 2nd 7150 7172/S2	S3/S2/S1	EU598486	Sabin 3	Sabin 3
738	1st 5804–5814/S3 2nd 6901–6909/S2	S3/S2/S1	EU598487	Sabin 3	Sabin 3
742	1st 3461–3465/S1 2nd 4511–4527/S3	S1/S3/S2	EU598488	Sabin 1	Sabin 1

previous studies. Six of them (EPA, EPB, EPC, LK3, LK6, LK10) were found to be bi-recombinant while five of them (EP16, EP23, ENP5, ENP7, ENP8) were found to have one recombination site (Table 2). EPA, EPB and EPC were identified as S3/S2/S3 recombinant with the first recombination site located in the 5' end of 2C region and the second recombination site located in the middle of 3D region. LK3, LK6 and LK10 were found to be S3/S2/S1 recombinant with the first recombination site located in the 5' end of 2C region and the second recombination site located in the 3' end of the same region.

EP16 and EP23 were identified as S3/S2 and S3/S1 recombinant respectively in the 3' end of 2C region while ENP5, ENP8 and ENP7 were identified as S2/S1 and S2/S3 recombinant respectively in the middle of 3D region. The RT-PCR screening analysis with primers S3c2b, Sa13C2 and Sa23C2 confirmed the recombination events S3/S1 or S3/S2 of all vaccine-derived polioviruses in 2C region yielding amplification products of 1280 and 1227 bp, respectively (Fig. 2).

For strains LK3, LK6 and LK10, only the first of the two recombination events (S3/S2/S1) in the 2C genomic region was confirmed yielding an amplification product of 1280 bp. The second recombination event S2/S1 in the 2C region is a rare one and could be detected by designing an additional primer pair.

RT-PCR screening analysis with primers S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 confirmed the recombination events S2/S1 and S2/S3 of all vaccine-derived polioviruses in the 3D genomic region yielding amplification products of 733 and 803 bp, respectively (Fig. 3).

Two of the recently identified environmental isolates (742, 584) yielded an amplicon of 1227 bp in RT-PCR screening analysis with primers S3c2b, Sa13C2 and Sa23C2 which corresponds to a S3/S2 recombination event in the 2C region (Fig. 2). Moreover, one of the environmental isolates (738) yielded an amplicon of 733 bp in RT-PCR screening analysis with primers S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 which corresponds to a S2/S1 recombination event in the 3D region (Fig. 3).

The reference vaccine strains (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) did not yield any PCR product in both 2C and 3D genomic regions (Figs. 2 and 3) as well as the seven strains of Enterovirus group C (data not shown).

3.3. Sensitivity assay of RT-PCR screening analysis

To assess the sensitivity of RT-PCR screening analysis of recombinant vaccine-derived polioviruses in 2C and 3D genomic regions, the bi-recombinant strain EPA was selected. The sensitivity reached the level of 1 TCID₅₀/0.1 ml in both 2C (Fig. 4) and 3D (data not shown) genomic regions.

A titer of 10^{5.5} TCID₅₀/0.1 ml of each Sabin vaccine strain (Fig. 4) and each of seven strains of Enterovirus group C (data not shown) were also included in the sensitivity assay of RT-PCR screening

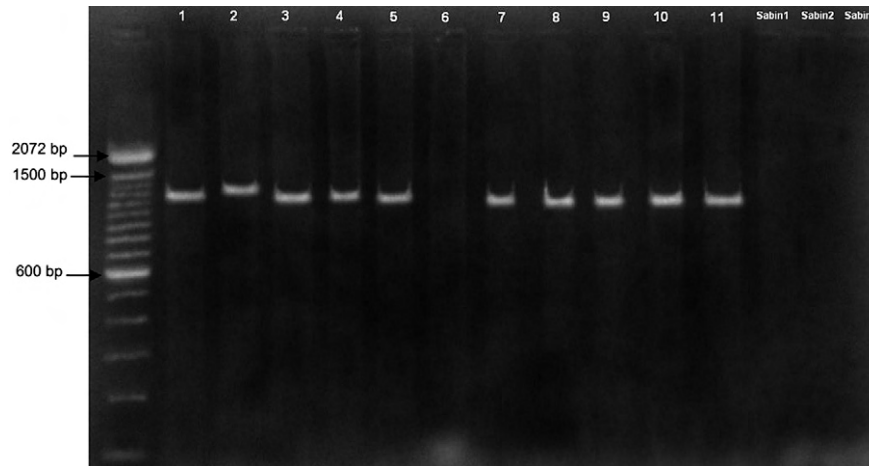


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the amplicons of the 2C RT-PCR screening analysis of eight recombinant poliovirus strains from previous studies and three recently isolated poliovirus strains (738, 742, 584). The lane numbers 1–11 correspond to amplification products of isolates EP16, EP23, EPA, EPB, EPC, 738, 742, 584, LK3, LK6 and LK10, respectively. The predominant recombination types S3/S1 and S3/S2 in the 2C genomic region were identified yielding amplification products of 1280 and 1227 bp, respectively. The reference vaccine strains (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) were used as negative controls in RT-PCR screening analysis. The position of some of the marker DNA bands is also indicated.

analysis in both genomic regions 2C and 3D without yielding any PCR product.

3.4. Genomic sequencing

The three recently identified environmental isolates (742, 584, 738) were sequenced from 2A to 3'-UTR genomic region in order to identify the recombination junctions. The resulting sequences (deposited in GenBank under accession numbers 584-EU598486, 738-EU598487, 742-EU598488) were aligned with both Sabin strain sequences participating in the putative recombinant site. The two alignments were combined so as to determine the minimum common sequence flanked by two heterotypic nucleotides. This sequence represents the site of recombination between the two genomes. The determination of the minimum common flanking sequence between two heterotypic nucleotides revealed the

recombination site of the two genomes. Such sites were found for all three investigated strains.

All three isolates were found to be recombinant in two sites (Figs. 1 and 5a, Table 4). The first recombination site was located in the 2C region for isolate 584 from nucleotide 4449 to 4464, in the 2A region for isolate 742 from nucleotide 3461 to 3465 and in the 3C region for isolate 738 from nucleotide 5804 to 5814. The second recombination site was located in the 2C region for isolate 742 from nucleotide 4511 to 4527 and in the 3D region for isolates 584 and 738 from nucleotide 7150 to 7172 and from nucleotide 6901 to 6909, respectively. For isolates 584 and 738, the 5' part of the genome was a Sabin type 3, the middle part a Sabin type 2 and the 3' part a Sabin type 1 strain (S3/S2/S1). For isolate 742, the 5' part of the genome was a Sabin type 1, the middle part a Sabin type 3 and the 3' part a Sabin type 2 strain (S1/S3/S2). The accession numbers and recombination sites are summarized in Table 4.

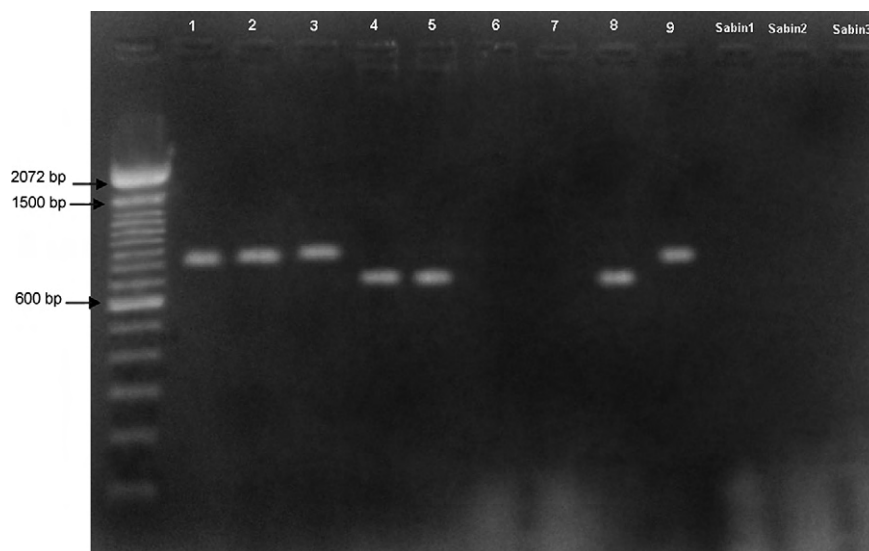


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the amplicons of the 3D RT-PCR screening analysis of six poliovirus strains from previous studies and three recently isolated poliovirus strains (738, 742, 584). The lane numbers 1–9 correspond to amplification products of isolates EPA, EPB, EPC, ENP5, 738, 584, 742, ENP8 and ENP7, respectively. The predominant recombination types S2/S1 and S2/S3 in the 3D genomic region were identified (except for isolate 584) yielding amplification products of 733 and 803 bp, respectively. The reference vaccine strains (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3) were used as negative controls in RT-PCR screening analysis. The positions of some of the marker DNA bands are indicated.

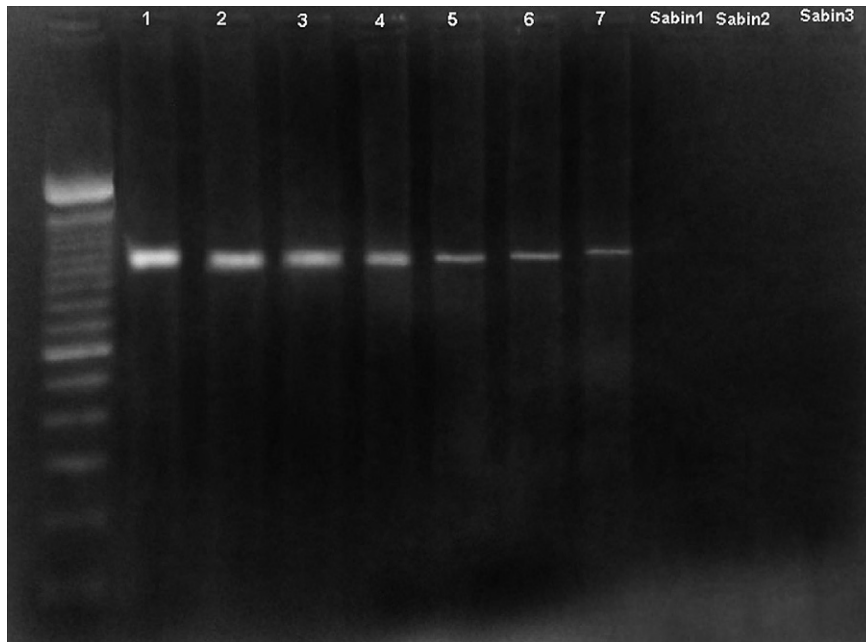


Fig. 4. Sensitivity test of RT-PCR screening analysis in the 2C region. Serial dilutions of recombinant strain EPA (S3/S2) were used yielding amplification product of 1227 bp towards the level of 1 TCID₅₀/0.1 ml. The lane numbers 1–7 correspond to serial dilutions 10^{5.5}, 10^{4.5}, 10^{3.5}, 10^{3.0}, 10^{2.0}, 10 and 1 TCID₅₀/0.1 ml respectively. A titer of 10^{5.5} TCID₅₀/0.1 ml of each Sabin vaccine strain was also included as a negative control.

SimPlot (similarity plotting) analysis was also performed in order to visualize the exact position of recombination sites, calculating the similarity percentage between the nucleotide sequences of the recombinant environmental isolate and the two reference Sabin type strains involved in recombination (Fig. 5b,c,d).

4. Discussion

Environmental surveillance is a suitable approach for supplementary surveillance which can be targeted on selected populations where AFP surveillance is not considered to be sufficiently sensitive. Moreover, several sporadic isolations of highly divergent VDPVs in the environment have been described even in the absence of suspected poliomyelitis cases [35–37]. As a consequence, sustained and sensitive environmental surveillance for polioviruses, particularly during the post-OPV cessation period when the risk of cVDPV emergence will be greatest, is mandatory.

The Program of Polio Eradication has led to a drastic decrease in the circulation of wild polioviruses, which is now restricted to only a few countries [4]. However, the occurrence of recent outbreaks of highly evolved vaccine-derived polioviruses in Egypt, Hispaniola, the Philippines and Madagascar [5–7,38] shows the importance of maintaining sensitive poliovirus surveillance in order to prevent cases or even outbreaks of paralytic poliomyelitis in populations with gaps in immunity.

Genetic instability is an inherent property of poliovirus as well as most, if not all, of other RNA-containing viruses. There are two major reasons for this instability: the nucleotide substitutions resulting from a high error frequency during viral RNA replication and the recombination [39,40].

Recombinant vaccine strains have been isolated from healthy vaccinees and VAPP cases in previous studies having a single site or multiple sites of recombination [5,14–17,20,24,26,27,41]. Several factors may favour the accumulation of intertypic recombinants in recipients of OPV. Attenuating mutations are known to be distributed over the entire genome of the Sabin strains. Therefore, intertypic recombination may again help eliminate these fitness-

decreasing mutations. According to previous studies, recombination hotspots are located in the middle or 3' half of 2C genomic region for recombination junctions of type S3/Sx and in the middle or 3' half of 3D genomic region for recombination junctions of type S2/Sx [5,14–17,20,24,26,27,41].

However, as VDPV strains have frequently undergone recombination in the non-structural protein-encoding region, a rapid and broad-range analysis method that yields nucleotide sequence information is urgently needed.

In this study, we describe a rapid RT-PCR screening analysis for identifying the predominant recombination types in 2C and 3D non-structural regions of vaccine-derived poliovirus strains. The primers S3sC2b, Sa13C2 and Sa23C2 allow the identification of predominant recombination types S3/S1 and S3/S2 in 2C genomic region yielding amplification products of 1280 and 1227 bp, respectively. More precisely, the above primers amplified the whole 2C coding region (nt 4088 to 5368 for S3/S1 recombination type or nt 4088 to 5315 for S3/S2 recombination type) making possible the detection of all S3/S1 and S3/S2 recombination events in the 2C region. The primers S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 allow the identification of predominant recombination types S2/S1 and S2/S3 in 3D genomic region yielding amplification products of 733 and 803 bp, respectively. The primers S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 amplified an interval at the 3' half of the 3D region (nt 6430 to 7163 for S2/S1 recombination type or nt 6430 to 7233 for S2/S3 recombination type) making possible the detection of S2/S1 and S2/S3 recombination events in the 3' half of 3D coding region.

Eleven recombinant vaccine-derived polioviruses that were previously characterized by sequencing by our group were selected in order to assay the robustness of the proposed RT-PCR screening analysis. Six of them (EPA, EPB, EPC, LK3, LK6, LK10) were identified as bi-recombinants with the recombination sites located in the 2C and/or 3D regions while five of them (EP16, EP23, ENP5, ENP7, ENP8) were found to have one recombination site located in 2C or in 3D region. All the recombination events of types S3/S1 or S3/S2 located in the 2C region were confirmed by RT-PCR screening analysis except the recombination type S2/S1 located in the 3' end

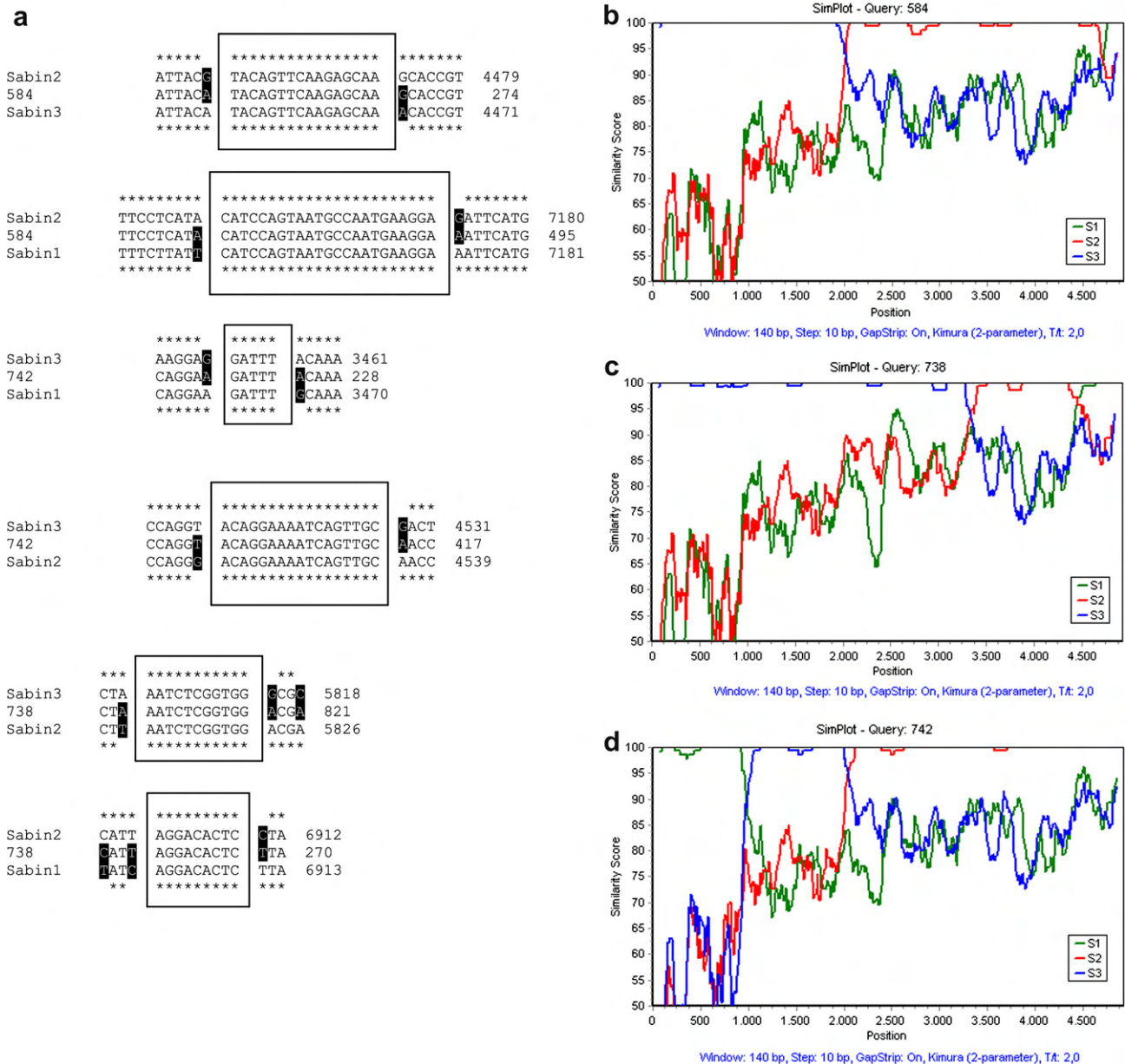


Fig. 5. (a) Positions of recombination sites for isolates 584, 738 (S3/S2/S1) and 742 (S1/S3/S2). At the left of each alignment is presented the Sabin origin of the sequence. The bold nucleotides are the ones that differentiate the three sequences. The framed nucleotides represent the site of recombination. SimPlot analysis of the partial VP1-3D genomic region of isolates 584 (b), 738 (c) and 742 (d) compared with the respective regions of Sabin vaccine strains (Sabin 1: AY184219, Sabin 2: AY184220 and Sabin 3: AY184221) is also indicated.

of the 2C region of strains LK3, LK6 and LK10. Strains LK3, LK6 and LK10 were found to be bi-recombinants S3/S2/S1 in the 2C genomic region, with the first recombination site S3/S2 towards the 5' end of 2C and the second recombination site S2/S1 towards the 3' end of 2C. Such recombination that leads to a tripartite hybrid 2C protein is a rare event. Tripartite (S3/S2/S1) Sabin strains are usually found recombinant in 2C and 3D regions [14,18].

All the recombination events of types S2/S1 or S2/S3 located in the 3D region were also confirmed by RT-PCR screening analysis.

The sensitivity limit of RT-PCR screening analysis was up to 1 TCID₅₀/0.1 ml in both 2C and 3D genomic regions. However, the present assay should be used only with isolates that do not contain poliovirus mixtures, as the amplification patterns obtained from vaccine virus mixtures cannot be unambiguously interpreted.

The RT-PCR screening analysis was used for identifying recombination events located in the 2C and/or 3D genomic region of three strains (584, 738, 742) isolated from environmental samples. Two of the environmental isolates (742, 584) yielded an amplicon of 1227 bp in RT-PCR screening analysis with primers S3sC2b, Sa13C2 and Sa23C2 which corresponds to a S3/S2 recombination event in the 2C region. Moreover, one of the environmental isolates (738) yielded an amplicon of 733 bp in RT-PCR screening analysis with primers S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 which corresponds to a S2/S1 recombination event in the 3D region. All the three isolates were sequenced from 2A to the 3'-UTR genomic region in order to identify the recombination junctions. The sequencing analysis confirmed the S3/S2 recombination event of isolates 742 and 584 located in the middle of the 2C region. Specifically, the recombination sites were identified in the middle of the 2C region from nt 4449 to 4464 for

isolate 584 and from nt 4511 to 4527 for isolate 742. Moreover, the sequencing confirmed the recombination event S2/S1 of isolate 738 located in the 3D region. The recombination site was identified in the 3' end of the 3D region from nt 6901 to 6909.

Moreover, the sequencing revealed an additional recombination event in all three isolates. In isolate 742 an extremely rare recombination event of type S1/S3 was identified in the 5' half of the 2A genomic region with the recombination site located from nt 3461 to 3465. The very few recombinations that implicate Sabin type 1 as first partner are mainly of the S1/S3 type. Moreover, such recombinations (S1/Sx) have been reported to occur mainly in the 5' end of the 3D region [14,25,42,43]. Also, a rare recombination event of type S3/S2 was identified in the 3' half of the 3C region of isolate 738 with the recombination site situated from nt 5804 to 5814. In isolate 584 a recombination event of type S2/S1 was identified in the 3' end of the 3D region with the recombination site (nt 7150–7172) located downstream the annealing site (nt 7141–7163) of antisense primer S1a3dmp.

The existence of cVDPVs, their ability to produce outbreaks and the fact that they exhibit pathogenicity similar to wild-type strains significantly changed the risk-benefit analysis associated with the endgame of the polio eradication campaign. It became obvious that the emergence of populations of unvaccinated individuals following OPV cessation could risk re-starting a polio pandemic caused by either cVDPV or wild-type polioviruses. This fact makes increasingly important the early detection and characterization of recombinant evolved derivatives of vaccine strains. Our RT-PCR assay offers a new approach for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D regions of vaccine-derived poliovirus strains.

Acknowledgements

The work was supported by research grants of the Postgraduate Program “Applications of Molecular Biology-Genetics. Diagnostic Biomarkers”, code 3817, of the University of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology.

References

- [1] Wimmer E, Hellen CU, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* 1993;27:353–436. Review.
- [2] Hovi T. Surveillance for polioviruses. *Biologicals* 2006;34:123–6.
- [3] Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 2005;59:587–635. Review.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Progress toward interruption of wild poliovirus transmission-worldwide, January 2007–April 2008. *MMWR* 2008;57:489–94.
- [5] Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002;296(5566):356–9.
- [6] Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, et al. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 2004;78:13512–21.
- [7] Rousset D, Rakato-Andrianarivo M, Razafindratsimandresy R, et al. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2003;9:885–7.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention. Acute flaccid paralysis surveillance for expansion to other diseases, 2003–2004. *MMWR* 2004;53:1113–6.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. Recommendations of the advisory committee on Immunization practices (ACIP). *MMWR* 1997;46:1–25.
- [10] Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, Crainic R. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* 1993;196:199–208.
- [11] Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, et al. Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 1997;71:7758–68.
- [12] Cherkasova EA, Yakovenko ML, Rezapkin GV, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP, et al. 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* 2005;79:1062–70.
- [13] Egger D, Bienz K. Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J Virol* 2002;76:10960–71.
- [14] Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, et al. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol* 2001;75:5740–51.
- [15] Georgopoulou A, Markoulatos P. Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:792–9.
- [16] Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorchis T. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes* 2004;18:103–9.
- [17] Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* 2003;84:573–80.
- [18] Martin J, Samoilovich E, Dunn G, Lackenby A, Feldman E, Heath A, et al. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 2002;76:10921–8.
- [19] Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulis C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:343–51.
- [20] Georgescu MM, Delpeyroux F, Crainic R. Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J Gen Virol* 1995;76:2343–8.
- [21] Dahourou G, Guillot S, Le Gall O, Crainic R. Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J Gen Virol* 2002;83:3103–10.
- [22] Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol* 2003;77:8973–84.
- [23] Paximadi E, Karakasiliotis I, Papaventsis D, Papageorgiou G, Markoulatos P. Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and Cyprus. *J Appl Microbiol* 2008;104:1153–62.
- [24] Karakasiliotis I, Paximadi E, Markoulatos P. Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol* 2005;86(Pt 11):3137–42.
- [25] Paximadi E, Karakasiliotis I, Bolanaki E, Krikelis A, Markoulatos P. Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* 2007;35:541–8.
- [26] Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P. Genomic analysis of recombinant Sabin clinical isolates. *Virus Genes* 2006;32:203–10.
- [27] Boot HJ, Schepp RM, van Nunen FJ, Kimman TG. Rapid RT-PCR amplification of full-length poliovirus genomes allows rapid discrimination between wild-type and recombinant vaccine-derived polioviruses. *J Virol Methods* 2004;116:35–43.
- [28] Kilpatrick DR, Ching K, Iber J, Campagnoli R, Freeman CJ, Mishrik N, et al. Multiplex PCR method for identifying recombinant vaccine-related polioviruses. *J Clin Microbiol* 2004;42:4313–5.
- [29] WHO. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Geneva, Switzerland: World Health Organisation; 3 March 2003. posting date.
- [30] Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995;53:25–36.
- [31] Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Vamvakopoulos NC. Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J Clin Microbiol* 2000;38:4337–42.
- [32] Balanant J, Guillot S, Candrea A, Delpeyroux F, Crainic R. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* 1991;184:645–54.
- [33] Mulders MN, Reimerink JHJ, Stevnik M, Alaeddinoglou I, M. van der Avoort HGA, Hovi T, et al. A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J Gen Virol* 1999;80:907–16.
- [34] Dedepsidis E, Karakasiliotis I, Paximadi E, Kyriakopoulou Z, Komiotis D, Markoulatos P. Detection of unusual mutation within the VP1 region of different re-isolates of poliovirus Sabin vaccine. *Virus Genes* 2006;33(2):183–91.
- [35] Manor Y, Handsher R, Halmut T, Neuman M, Bobrov A, Rudich H, et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *J Clin Microbiol* 1999;37:1670–5.
- [36] Shulman LM, Manor Y, Handsher R, Delpeyroux F, McDonough MJ, Halmut T, et al. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 oral-polio vaccine strain isolated from sewage in Israel. *J Clin Microbiol* 2000;38:3729–34.
- [37] Blomqvist S, Savolainen CP, Laine P, Hirttio E, Lamminsalo E, Penttila S, et al. Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. *J Virol* 2004;78:4876–83.
- [38] Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, et al. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 2003;77:8366–77.

- [39] Agol VI. Picornavirus genetics: an overview. In: Semler BL, Wimmer E, editors. *Molecular biology of picornaviruses*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2002. p. 269–84.
- [40] Agol VI. Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;299:211–59.
- [41] Liu H, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA. Serial recombination during circulation of type 1 wildvaccine recombinant polioviruses in China. *J Virol* 2003;77:10994–1005.
- [42] Georgescu MM, Delpeyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combiescu M, Combiescu AA, et al. High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 1994;68:8089–101.
- [43] Driesel G, Diedrich S, Kunkel U, Schreier E. Vaccine-associated cases of poliomyelitis over a 30 year period in East Germany. *Eur J Epidemiol* 1995;11: 647–54.
- [44] Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, Koopmans MP, Kew OM, van Loom AM. Molecular epidemiology of wild poliovirus 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis* 1995;171: 1399–405.
- [45] Caro V, Guillot S, Candrea A, Delpeyroux F, Crainic R. Molecular strategy of 'serotyping' of human enterovirus. *J Gen Virol* 2001;82:79–91.
- [46] Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, et al. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol* 2000;74:8434–43.

Growth kinetic analysis of bi-recombinant poliovirus vaccine strains

Vaia Pliaka · Evaggelos Dedepsidis · Zaharoula Kyriakopoulou · Georgia Papadi · Dimitris Tsakogiannis · Anastassia Pratti · Stamatina Levidiotou-Stefanou · Panayotis Markoulatos

Received: 15 September 2009 / Accepted: 8 January 2010 / Published online: 21 January 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Attenuated strains of Sabin poliovirus vaccine replicate in the human gut and in rare cases may cause vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP). Mutations at specific sites of the genome and recombination between Sabin strains may result in the loss of the attenuated phenotype of OPV (Oral Poliovirus Vaccine) strains and the acquisition of traits characteristic of wild polioviruses, such as increased neurovirulence and loss of temperature sensitivity. In this study, we determined the phenotypic traits such as temperature sensitivity and growth kinetics of eight OPV isolates (six bi-recombinant and two non-recombinant). The growth phenotype of each isolate as well as of Sabin vaccine strains in Hep2 cell line at two different temperatures (37 and 40°C) was evaluated using two different assays, RCT test (Reproductive Capacity at different Temperatures) and one-step growth curve analysis. Moreover, the nucleotide and amino acid positions in the genomes of the isolates that have been identified as being involved in the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin vaccine strains were investigated. Mutations that result in loss of the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin vaccine strains were identified in the genomes of all isolates. Both mutations and recombination events correlated well with the reverted

phenotypic traits of OPV-derivatives. In the post-eradication era of wild polioviruses, the identification and the characterization (genomic and phenotypic) of vaccine-derived polioviruses become increasingly important in order to prevent cases or even outbreaks of paralytic poliomyelitis caused by neurovirulent strains.

Keywords OPV-derivatives · RCT test · One-step growth curve experiment

Introduction

Polioviruses, the causal agent of acute paralytic poliomyelitis, belong to the genus *Enterovirus* in the family *Picornaviridae* and are classified into three serotypes (PV1, PV2, and PV3). The polio virion is a non-enveloped virus composed of a 7.5 kb positive-sense single-stranded polyadenylated RNA genome surrounded by an icosahedral capsid. The viral RNA contains a long open reading frame flanked by 5' and 3' non-coding regions (5'-NCR and 3'-NCR, respectively) involved in viral replication and translation. The structural (VP4, VP2, VP3, and VP1) and non-structural (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D) viral proteins are produced by translation of the coding region and proteolytic cleavage of the polyprotein [1].

Since the 1960s, poliomyelitis has been effectively controlled by the use of inactivated or live attenuated vaccines. The Sabin live oral poliovirus vaccine (OPV) is constituted of attenuated strains of each of the three serotypes (Sabin 1, 2, and 3-trivalent OPV) which have been selected by numerous passages of wild-type strains in monkey tissues in vivo and in vitro [2]. The Sabin strains are temperature sensitive (ts) and the ts phenotype correlates with the attenuated phenotype [3–5]. The molecular determinants of

V. Pliaka · E. Dedepsidis · Z. Kyriakopoulou · G. Papadi · D. Tsakogiannis · A. Pratti · P. Markoulatos (✉)
Department of Biochemistry & Biotechnology, Microbiology-Virology Laboratory, School of Health Sciences, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aioulou, 41221 Larissa, Greece
e-mail: markoulatos@bio.uth.gr

V. Pliaka
e-mail: bpliaka@yahoo.com

S. Levidiotou-Stefanou
Department of Microbiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece

attenuation and temperature sensitivity have been intensively studied to elucidate the mechanisms involved and to improve the safety of Sabin vaccine strains [4–14].

Undoubtedly, the use of OPV in mass vaccinations has resulted in drastic reductions in the number of cases of poliomyelitis due to infections with wild-type polioviruses from an estimated 350,000 cases in over 125 endemic countries in 1988 to just 1,310 cases in four countries in 2007. However, in rare cases (1 case per 750,000 primary vaccinees), OPV strains have been implicated in vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) [15]. The underlying cause of VAPP is the genetic instability of OPV strains. During multiplication in the human intestine, mutations at specific sites of the genome which are associated with the attenuated and temperature sensitive phenotype of Sabin strains as well as recombination between Sabin strains of the trivalent OPV may result in the loss of the attenuated phenotype of OPV strains and the acquisition of traits characteristic of wild polioviruses, such as increased neurovirulence and loss of temperature sensitivity [16–18].

In this study, eight OPV isolates (two non-recombinant and six bi-recombinant) were tested in order to correlate the reverted phenotypic traits such as temperature sensitivity and growth kinetics with mutations and recombination events of the viral genome.

Materials and methods

Virus isolation

Virus isolation was performed from fecal samples during the time period 1978–1985 from healthy vaccinees or from environmental samples collected from the sewage treatment plant of Nicosia in Cyprus from April to October 1997 (Table 1).

Initial isolation at that time occurred at the Hellenic Pasteur Institute and identification/serotyping was done by sero-neutralization with rabbit polyclonal antibodies (National Institute for Public Health and Environment, RIVM, The Netherlands), according to the enclosed instructions. To avoid viral mixtures serial tenfold dilutions were performed; the last dilution presenting a complete cytopathic effect (CPE) was passaged once again in Hep-2 cells, and the serotype was retested as described above. Vaccine strains (Sabin types 1, 2, and 3) used in this study were provided by the World Health Organization (WHO).

Genotyping and identification of recombinant OPV-derivatives

Primer pair UG52/UC53 was used for the identification of the vaccine origin and for the genotyping of the

OPV-derivatives in the 5'-NCR genomic region [19] (Table 2). Moreover, the genotype of OPV-derivatives in VP1 capsid protein was determined. The primer pairs used for complete VP1 gene sequencing were UG1/222 for the first half of the VP1 gene [20, 21] and serotype-specific primer pairs S₁37/S₁688 and S₃26/S₃651 for Sabin 1 and Sabin 3 isolates, respectively, for the second half of the VP1 gene [22] (Table 2).

The primer pairs used for sequencing of isolate 742 from 2C to 3D region were also from previous studies [23–26] (Table 2). The identification of recombination sites of isolate 742 was performed as previously described [26–30]. The recombination sites and the sequences from 2C-3D regions of isolates EPA, EPB, LK3, LK6, and LK10 have been previously determined by our group [26, 28–30].

RCT marker test

Reproductive capacities at different temperatures (RCT marker) were evaluated by an RCT test. The RCT value is defined as the difference between the log₁₀ virus titer of a viral stock measured at the optimal temperature (37°C) and that of the supraoptimal temperature (40°C). Briefly, each virus stock was decimally diluted through 10⁻⁷. A 0.1-ml of medium containing 4 × 10⁴ Hep-2 cells was added into each well of two 96-well cell culture plates. A 0.1-ml volume of each virus dilution was inoculated into four wells of each of the two plates. One plate was incubated at 37°C and the other at 40°C. After 5 days of incubation at the appropriate temperatures, the titers were determined by an endpoint micromethod [31] and were expressed in log₁₀ 50% tissue culture infective dose units (TCID₅₀) per ml. Viruses were considered thermosensitive (ts) if the RCT value (between 37 and 40°C) was greater or equal to 2.00 and thermo resistant (non-ts) when the RCT value was inferior to 2.00.

One-step growth curve experiment

One-step growth curve experiments were performed in Hep-2 cells at 37 and 40°C, with a multiplicity of infection of 10 as determined by titration of virus stocks on Hep-2 cells, as has been previously described [32]. Briefly, 100 μl of Hep-2 cells (9 × 10³ cells/100 μl) were added into each well of fourteen 96-well plastic plates. After the cells were attached to the plates, the isolates and the reference Sabin vaccine strains (Sabin 1 and Sabin 3) were inoculated each into five replica wells of 96-well cell culture plates. The plates were rocked for 2 h at 37°C, then the cells were thoroughly washed two times each with 300 μl of Eagle MEM to remove unbound virus. Then, 100 μl of Eagle MEM was added into each well and the plates were incubated at 37 or 40°C for 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h. The

Table 1 Data for the OPV isolates

Isolate	5'-NTR and VP1 genotype	Source	Recombination type	Crossover point ^a	Reference
742	S1	Environment	S1/S3/S2	1st 3461-3465/S1 2nd 4511-4527/S3	This study
II	S1	Cord tumor	Non-recombinant	–	[27]
EPA	S3	Healthy vaccine	S3/S2/S3	1st 4643-4656/S3 2nd 6598-6605/S2	[30]
EPB	S3	Healthy vaccine	S3/S2/S3	1st 4643-4656/S3 2nd 6598-6605/S2	[30]
LK3	S3	Environment	S3/S2/S1	1st 4766-4791/S3 2nd 4942-4958/S2	[29]
LK6	S3	Environment	S3/S2/S1	1st 4766-4791/S3 2nd 4942-4958/S2	[29]
LK10	S3	Environment	S3/S2/S1	1st 4766-4791/S3 2nd 4942-4958/S2	[29]
729	S3	Healthy vaccine	Non-recombinant	–	This study

The recombination type and the crossover points of isolates EPA, EPB, LK3, LK6, and LK10 were previously identified by our group

^a Numbering according to Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220), or Sabin 3 (AY184221) vaccinal strains

Table 2 Primers used for amplification of 5'-NCR and VP1 regions of all isolates and of the genomic region from 2A to 3'-NCR of isolate 742

Primer	Polarity	Sequence (5' → 3') ^a	Reference
UG52	Sense	162-CAAGCACTTCTGTTTCCCGG-182	[19]
UC53	Antisense	577-ACCGACCAATACCACTGTT-595	[19]
UG1	Sense	2402-TTTGTGTGCAGCGTGTAAATG-2421	[20]
222	Antisense	2982-CICGIGGIGGIAYRWACA-3000	[21]
S ₁ 37	Sense	2837-AGGAAATTGGAGTTCCTCACC-2857	[22]
S ₁ 688	Antisense	3488-ACATGACGTTCACTGCGTTTT-3468	[22]
S ₃ 26*	Sense	2826-GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC-2847	[22]
S ₃ 651*	Antisense	3451-CTCCTTAGTGGCGAGATGGTAG-3430	[22]
71935	Sense	3206-GTCAATGATCACAACCC-3222	[23]
EUC2	Antisense	4454-TTTGCACTTGAAGTGTATGTA-4474	[24]
UG23	Sense	4169-AAGGGATTGGAGTGGGTGTC-4188	[25]
UC15	Antisense	4948-CATCTCTTGAAGTTTGCT-4965	[25]
S ₂ 97*	Sense	4717-TTAGCCTCCACCACCTCCAG-4737	[26]
S ₂ 598*	Antisense	5195-TGATGTTCTCTCTGTTTGAACC-5218	[26]
S ₂ 48*	Sense	4968-TCCTTTAGTGTGTGGCAAGG-4988	[26]
S ₂ 911*	Antisense	5812-GTTTGTGTCGCCACCGAGATT-5832	[26]
S ₁ 42	Sense	4962-GATGCTGTCTTTAGTGTGTGG-4984	[26]
S ₁ 952	Antisense	5853-GATGCTGTCTTTAGTGTGTGG-5873	[26]
UG16	Sense	5921-GTTGGTGGGAACGGTTCACA-5940	[25]
UC12	Antisense	6494-TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG-6516	[25]
S ₃ 64*	Sense	5763-GTATGTTCTGTGCGGTGCTGT-5784	[26]
S ₂ 380*	Antisense	6800-TGGGAATGGTTGAGGTAATC-6780	[26]
S ₂ 107*	Sense	6647-TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA-6668	[26]
S ₂ 872*	Antisense	7393-ACAACAGCATGACCCAATCC-7413	[26]

^a Positions of primers are according to reference strain Sabin 1 (AY184219) except for those with an asterisk, for which positions refer to reference strains Sabin 2 (AY184220) or Sabin 3 (AY184221)

plates were subjected to three consecutive freeze–thaw cycles and the viral titers of the supernatants were determined by the TCID₅₀ assay on Hep-2 cells at 37°C for each of the above-mentioned hours post-infection. The titration was repeated five times for each of the post-infection hours.

It must be mentioned that the growth of isolates II and 729 was determined in another experiment in which the reference Sabin vaccine strains (Sabin 1 and Sabin 3) were also included. The same process as above was followed with only difference the number of Hep-2 cells added into the wells of the 96-well cell culture plates (17.687 cells/well).

Computational analysis

ClustalW was used for alignment of the sequences (nucleotide and amino acid) of 5'-NCR, VP1, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D genomic regions of all virus isolates with those of the reference strains cited in GenBank (Sabin type 1: AY184219, Sabin type 2: AY184220, and Sabin type 3: AY184221). Amino acid sequences of VP1, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D genomic regions of all virus isolates were obtained by using Gene-Runner V 3.05.

Results

Genotypes and recombination types of OPV-derivatives

The 5'-NCR and VP1 genotypes of isolates were identified. Two strains were genotyped as Sabin 1 and six strains as Sabin 3 (Table 1). Among the eight isolates, two (II and 729) were identified as non-recombinant and six were identified as recombinant in two sites (Table 1). Isolate 742 was identified as S1/S3/S2 recombinant with the first recombination site located in the 2A region from 3461 to 3465 nucleotide position and the second in the 2C region from 4511 to 4527 nucleotide position. The recombination sites of isolates EPA, EPB, LK3, LK6, and LK10, have been previously identified by our group and are presented in Table 1. Isolates EPA and EPB were identified as S3/S2/S3 recombinants and isolates LK3, LK6, LK10 were identified as S3/S2/S1 recombinants.

Temperature sensitivity of OPV-derivatives

The RCT marker assay is based on a comparison of the temperature-sensitive multiplication of poliovirus Sabin strains and the non-temperature-sensitive multiplication of virulent strains.

Both of Sabin-1 isolates (742: S1/S3/S2 and II: non-recombinant) displayed partial reversion to non-ts phenotype with RCT values of 2.0 units. Two of the recombinant

Table 3 Reproductive capacity of OPV isolates and Sabin vaccine strains at different temperatures (RCT marker)

Isolate	Titer (log TCID ₅₀ /0.1 ml)		RCT (Δ log TCID ₅₀ /0.1 ml)
	37°C	40°C	
742	4.75	2.75	2.0
II	3.5	1.5	2.0
EPA	7.0	3.5	3.5
EPB	6.75	3.25	3.5
LK3	6.25	6.25	0
LK6	6.25	6.25	0
LK10	4.75	4.0	0.75
729	5.0	1.5	3.5
Sabin 1	6.0	2.5	3.5
Sabin 3	6.0	2.5	3.5

Sabin-3 isolates (EPA and EPB: S3/S2/S3) and the non-recombinant 729 displayed a ts phenotype with RCT values of 3.5 units. Three of the recombinant Sabin-3 isolates (LK3, LK6, LK10:S3/S2/S1) displayed a non-ts phenotype with RCT values ranging from 0.0 to 0.75 units (Table 3). The Sabin vaccine strains (Sabin 1 and Sabin 3) exhibited, as expected, RCT values greater than 2.00 units.

The different titers of viral strains at 37°C are due to the different number of serial passages of viral stocks performed in Hep-2 cells. Consequently, the different titers of viral strains at 37°C have none importance.

One-step growth curve experiment

To determine whether the ts phenotype, as determined by RCT assay, was indicative of growth defects, one-step growth curve experiments were carried out for each isolate. We compared the growth rates and virus yields at 37 and 40°C of each isolate with that of the corresponding genotype of Sabin vaccine strain (Sabin 1 or Sabin 3) in one-step growth experiments in Hep-2 cells.

Both of Sabin-1 derivatives replicated with kinetics similar to that of their progenitor Sabin 1 vaccine strain showing that the virus yield rise after 4 h post-infection at 37°C (Fig. 1) while at 40°C their growth was blocked as was also for Sabin 1 vaccine strain.

Two of the recombinant Sabin-3 isolates (EPA: S3/S2/S3 and EPB: S3/S2/S3) (Fig. 2) and the non-recombinant 729 (data not shown) displayed similar growth kinetics to their progenitor Sabin 3 vaccine strain at both 37 and 40°C. Three of the recombinant Sabin-3 isolates (LK3, LK6, LK10: S3/S2/S1) (Fig. 3, LK10 data not shown) showed different growth kinetics from that of Sabin 3 vaccine strain. More specifically, they showed 1.0–3.0 log₁₀ units and 1.0–2.0 log₁₀ units higher viral yield than the Sabin 3

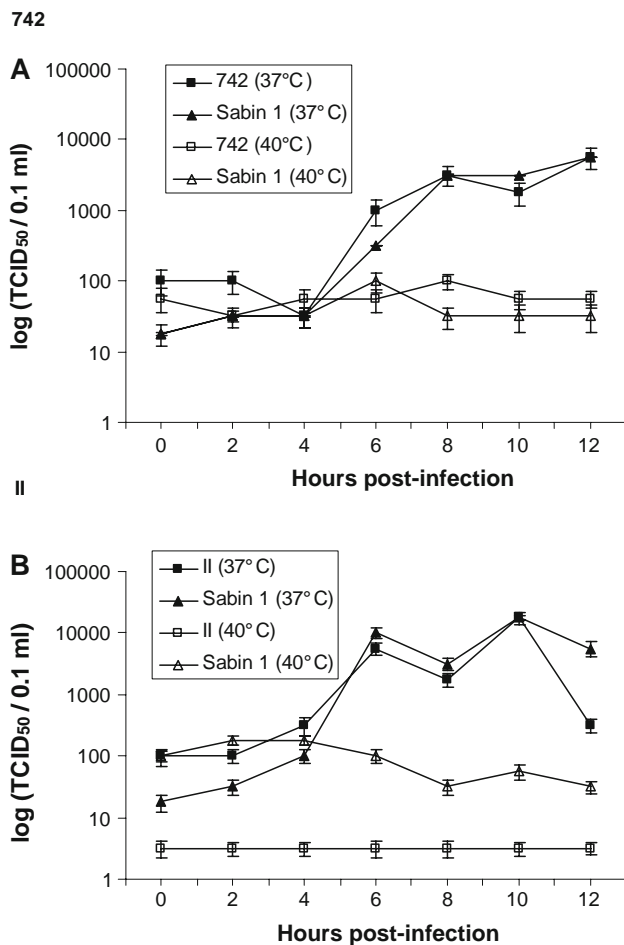


Fig. 1 One-step growth curve analysis of Sabin-1 isolates 742 (a) and II (b) in comparison with Sabin 1 vaccine strain in Hep2 cells. Cells were infected at an MOI of 10 and incubated at 37 or 40°C. Total virus production at different times (0–12 h) post-infection was determined by TCID₅₀ assay on Hep2 cells. Each point represents the mean (\pm standard deviation) of virus titers from five different experiments

vaccine strain at each time post-infection at 37 and 40°C, respectively.

Nucleotide and amino acid sequence analysis

In an attempt to correlate the phenotypic markers of the isolates with some molecular markers, we investigated the nucleotide and amino acid positions in the genomes of the isolates that have been described as being involved in the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin vaccine strains.

The nucleotide sequences of 5'-NCR, VP1, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D genomic regions were investigated and mutations that result in loss of the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin vaccine strains have been identified in the genomes of all isolates.

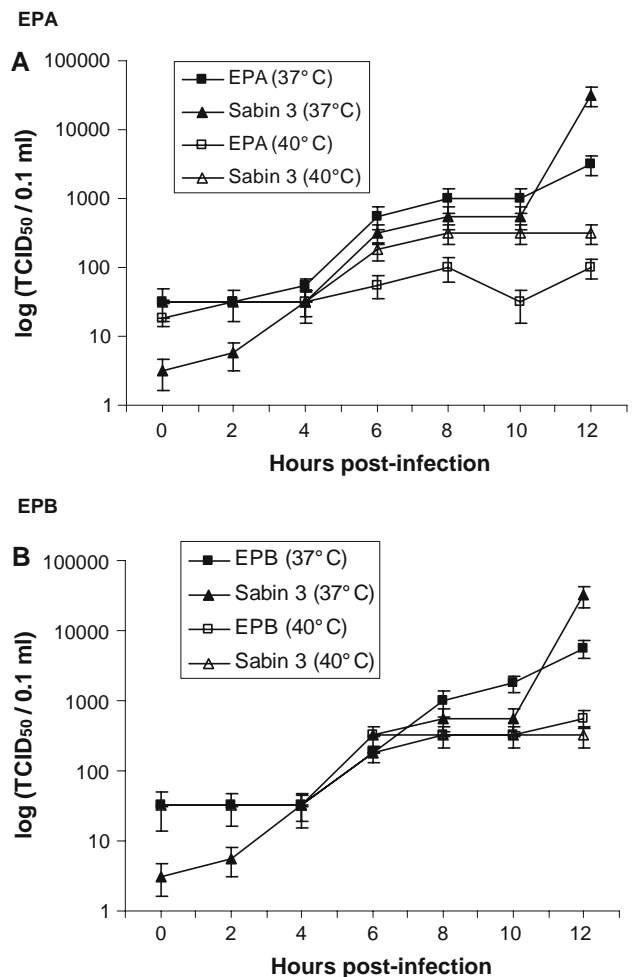


Fig. 2 One-step growth curve analysis of Sabin-3 isolates EPA (a) and EPB (b) in comparison with Sabin 3 vaccine strain in Hep2 cells. Cells were infected at an MOI of 10 and incubated at 37 or 40°C. Total virus production at different times (0–12 h) post-infection was determined by TCID₅₀ assay on Hep2 cells. Each point represents the mean (\pm standard deviation) of virus titers from five different experiments

In Sabin-1 isolates, the mutations G480A and U525C were identified in the 5'-NCR of isolates 742 and II, respectively (Table 4). Both of these mutations restore the stability of a base pair between nt 480 and 525 (AU in Mahoney, GU in Sabin 1, AU in isolate V1, GC in isolate V2) in domain V of 5'-NCR and have been correlated with reversion to neurovirulence and thermoresistance [3, 6, 7, 33, 34]. Both of Sabin-1 isolates displayed the mutation C583G which is situated in a double stranded region of domain VI of IRES and leads to a G–G mismatch (data not shown). In VP1 coding region, the reversion A2795G \rightarrow [Thr-106-Ala], a well-known determinant of attenuation [3, 6] was identified in isolate II (Table 4). Residue 106 is located at the exterior of the capsid, specifically in VP1 BC loop, and is involved in hydrophobic interactions with residue in position 90 [35]. Substitutions Ala-96-Thr

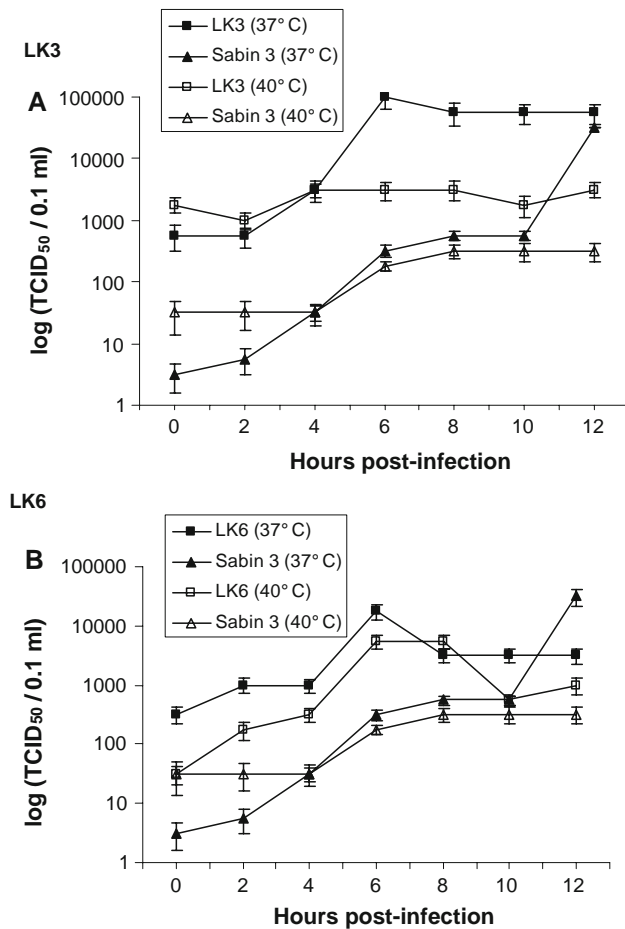


Fig. 3 One-step growth curve analysis of Sabin-3 isolates LK3 (a) and LK6 (b) in comparison with Sabin 3 vaccine strain in Hep2 cells. Cells were infected at an MOI of 10 and incubated at 37 or 40°C. Total virus production at different times (0–12 h) post-infection was determined by TCID₅₀ assay on Hep2 cells. Each point represents the mean (\pm standard deviation) of virus titers from five different experiments

(in isolate II) and Lys-99-Asn (in isolates 742 and II), which are highly exposed in the exterior of the capsid, are located in N-AgI site as well as in VP1 BC loop, which is participating in the formation of the north rim of the canyon and is involved in the binding of receptor CD155 to the virus [36–38]. Amino acid substitution Glu-168-Gly (in isolate II) is exposed at the outer surface of the virion and is located in EF loop which is implicated in hydrophobic interactions with receptor CD155 [37, 38]. Amino acid substitution Gln-220-Arg (in isolate II) is situated in the exterior of the virion, in N-AgIIa site [36].

All Sabin-3 isolates displayed the mutation U472C in 5'-NCR (Table 4). This substitution is a reversion to the wild-type genotype and has been associated with increased neurovirulence and thermoresistance [4, 12, 39–41]. The presence of mutation C586G in all six Sabin-3 isolates is particularly significant. This substitution is situated in a

double stranded region of domain VI of IRES and leads to a G–G mismatch as the mutation C583G in Sabin-1 derivatives. Both C583G and C584G may confer a selective advantage in Sabin derivatives as they have been also observed in isolates of a previous study [42]. Moreover, the mutations C438U and A439G were identified in three Sabin-3 isolates (LK3, LK6, and LK10). Both C438U and A439G are situated in a double stranded region of domain IV of IRES and convert the base pairs GC and UA to GU and UG, respectively. In VP1 coding region, all Sabin-3 isolates displayed the reversion C2493U \rightarrow [Thr-6-Ile] which is a determinant of attenuation [43–45]. Residue 6 is situated at the N-terminus of VP1 in the interior of the capsid (data not shown) and the substitution of the attenuating Thr by Ile probably strengthens the hydrophobic interactions between the VP1 amino terminus and endosomal cell membranes during virus cell entry [44, 46]. The substitutions C2637U \rightarrow [Ala-54-Val] and U2790C \rightarrow [Met-105-Thr] were identified in three Sabin-3 isolates (LK3, LK6, and LK10). Residue 54 is located in the inner surface of the capsid and is believed to participate in hydrophobic interactions between VP1 and VP3 protein [35]. Residue 105 is located at the exterior of the virion, near the N-AgI site as well as in VP1 BC loop, which is participating in the formation of the north rim of the canyon and is involved in the binding of receptor CD155 to the virus [36–38]. Moreover, the mutations C2855A and U2857A were identified in three Sabin-3 isolates (LK3, LK6, and LK10). Mutations at 2855 and 2857 positions of the genome did not result in amino-acid substitutions but they may confer a selective advantage for a secondary RNA structure in this region which may act as a *cis*-acting replicative signal. This hypothesis is reinforced by previous studies on *cis*-acting replicative elements identified in picornaviral genomes [47, 48].

In the 2C-3D non-structural region of the isolates' genome, nucleotide and amino acid substitutions were also identified (Table 5). The reversion C6203U \rightarrow [His-73-Tyr] of 3D polymerase coding region which has been correlated with the attenuated and thermo sensitive phenotype of Sabin 1 vaccine strain [3, 7, 10, 17, 34, 49], was identified in three recombinant Sabin-3 isolates (LK3, LK6, and LK10: S3/S2/S1) in the Sabin 1 genomic background. The presence of some mutations with unknown functional role in more than one isolates is considerable as they may confer a selective advantage. More specifically, in 2C region the mutation A4171G was identified in two isolates (EPB and LK3) in a Sabin 3 genomic background. In 3A region, the mutation U5214C was identified in two isolates (EPA and EPB) in a Sabin 2 genomic background and the mutation A5269G also in two isolates (LK3 and LK10) in a Sabin 1 genomic background. In 3C region, the mutations C5641U and A5769U \rightarrow [Asn-111-Ile] were

Table 4 Location of mutations in 5'-NCR and VP1 sequences of OPV isolates and comparison with the corresponding nucleotide and amino acid positions in Sabin vaccine strains

Origin	Region	Isolate	Nucleotide position	Sabin	Isolate	Amino acid position	Sabin	Isolate	Accession numbers		
Sabin 1	5'-NCR	742	480	G	A				EU598472		
			<u>583</u>	C	G						
		II	525	525	U	C				EU598476	
				<u>583</u>	C	G					
		Sabin 3	EPA	472	472	U	C				EU598469
					<u>586</u>	C	G				
			EPB	472	472	U	C				EU598470
					<u>586</u>	C	G				
			LK3	438	438	C	U				FJ609747
					<u>439</u>	A	G				
<u>472</u>	U				C						
<u>586</u>	C				G						
LK6	438				438	C	U				FJ609748
					<u>439</u>	A	G				
LK10	438	472	U	C							
		<u>586</u>	C	G							
		<u>438</u>	C	U							
		<u>439</u>	A	G							
		<u>472</u>	U	C							
		<u>586</u>	C	G							
729	248	248	G	A				EU598477			
		<u>472</u>	U	C							
Sabin 1	VP1	742	2502	G	A	8	Ser	Asn	FJ609767		
			<u>2776</u>	G	U	99	Lys	Asn			
Sabin 1	VP1	II	2833	A	G	–					
			2904	U	G	142	Phe	Cys			
			2605	G	A	–			FJ609769		
			2765	G	A	96	Ala	Thr			
			<u>2776</u>	G	U	99	Lys	Asn			
			2795	A	G	106	Thr	Ala			
			2917	C	U	–					
			2982	A	G	168	Glu	Gly			
			3138	A	G	220	Gln	Arg			
			Sabin 3	VP1	EPA	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile
<u>2493</u>	C	U				6	Thr	Ile	EU598482		
LK3	<u>2493</u>	C			U	6	Thr	Ile	FJ609761		
	<u>2637</u>	C			U	54	Ala	Val			
LK6	<u>2790</u>	U			C	105	Met	Thr			
	<u>2855</u>	C			A	–					
	<u>2857</u>	U			A	–					
	<u>2493</u>	C			U	6	Thr	Ile	FJ609762		
	<u>2637</u>	C			U	54	Ala	Val			
	<u>2790</u>	U			C	105	Met	Thr			
Sabin 3	VP1	LK6	<u>2855</u>	C	A	–					
			<u>2857</u>	U	A	–					

Table 4 continued

Origin	Region	Isolate	Nucleotide position	Sabin	Isolate	Amino acid position	Sabin	Isolate	Accession numbers
		LK10	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609763
			<u>2637</u>	C	U	54	Ala	Val	
			<u>2790</u>	U	C	105	Met	Thr	
			<u>2855</u>	C	A	–			
			<u>2857</u>	U	A	–			
		729	<u>2493</u>	C	U	6	Thr	Ile	FJ609778
			2659	G	A	–			
			2716	A	G	–			

Numbering according to vaccine strains, Sabin 1 (AY184219) and Sabin 3 (AY184221). Mutations identified in more than one isolates are underlined

identified in three (LK3, LK6, and LK10) and two isolates (LK3 and LK6), respectively, in Sabin 1 genomic background. In 3D region, the mutations A6019G and G6151A were identified in three isolates (LK3, LK6, and LK10) while the mutations U6732C → [Leu-249-Pro] and C6947U in two isolates (LK3 and LK10) in a Sabin 1 genomic background.

Discussion

Sabin vaccine strains differ from their progenitors in biological properties other than neurovirulence, some of which have been used as in vitro markers to monitor the quality of new batches of vaccine prior to monkey neurovirulence assays. RCT test and one-step growth curve tests have been used as in vitro phenotypic markers to identify vaccine-derived polioviruses with increased neurovirulence [3–7, 10, 14, 17, 34, 50–54].

In the present study, the growth phenotype in Hep2 cells at two different temperatures (37 and 40°C) of eight vaccine-derived polioviruses (two non-recombinants and six bi-recombinants) as well as those of Sabin vaccine strains was evaluated using two different assays, RCT test and one-step growth curve test.

In both Sabin-1 derivatives (742 and II), the presence of mutations at known determinants of attenuation and thermo sensitivity or in other positions of 5'-NCR and VP1 regions involved in virus replication, does not affect their growth phenotype at both 37 and 40°C as they replicate similar to Sabin 1 vaccine strain. However, both of these strains show partial reversion to non-ts phenotype (RCT values = 2.0). The discrepancy of the results of the two assays may correlate with the fact that they show the viral multiplication for different time periods. In general, the presence of many other determinants of thermo sensitivity (nt 935, 1944, 2438, and 2741) in the 5' end of the genome of Sabin 1

vaccine strain makes difficult the reversion of Sabin-1 derivatives to a non-ts phenotype [6].

The presence of S1/SX (SX: S2 or S3) recombinants is extremely rare. Moreover, sequences of Sabin type 1 origin are regularly found in SX/S1 recombinant strains [4, 50, 55–58]. This observation correlates with the increased fitness of SX/S1 recombinants compared to those of S1/SX recombinants. The determinants of attenuation and thermo sensitivity of Sabin 1 vaccine strain are scattered along the whole genome but most of them are situated in the 5'-NCR and capsid region [6]. The Sabin 1 vaccine strain may exchange the 5' end of its genome with that of Sabin 2 or Sabin 3 vaccine strains in order to get rid of these fitness-decreasing mutations. The Sabin 1 vaccine origin of the 5' end of isolate 742 (S1/S3/S2) results in the acquisition of many determinants of attenuation and thermo sensitivity. As a result, the isolate 742 replicates similar to Sabin 1 vaccine strain although carrying traits of reversion in a major determinant of attenuation and thermo sensitivity (nt 480). Moreover, the recombination type of isolate 742 does not affect its phenotype because it shows partial reversion to a non-ts phenotype in RCT test as the non-recombinant Sabin-1 derivative (II).

All Sabin-3 isolates showed mutations at the same known determinants of attenuation and thermo sensitivity located in 5'-NCR and VP1 regions. Consequently, the different phenotypes of isolates LK3, LK6, and LK10 in comparison with those of isolates EPA, EPB, and 729 are probably associated with the presence of other mutations in their genome and the recombination type. Such positions are the substitution His-73-Tyr of 3D polymerase which is a known determinant of attenuation and thermo sensitivity of Sabin 1 vaccine strain and mutations in 5'-NCR, VP1, 3A, 3C, and 3D regions of isolates LK3, LK6, and LK10 (Tables 4, 5). The functional role of these mutations has not been determined yet but their presence in isolates LK3, LK6, and LK10 shows that they confer a selective

Table 5 Location of mutations in 2C-3D genomic region of isolates 742, EPA, EPB, LK3, LK6, and LK10 in comparison with the corresponding nucleotide and amino acid positions in Sabin vaccine strains

Origin	Region	Isolate	Nucleotide position ^a	Sabin	Isolate	Amino acid position	Sabin	Isolate	Accession numbers of 2C-3D sequences
S3/S2	2C	742	4929/S2	C	U	–			EU598488
			5029/S2	A	G	303	Ile	Val	
S3/S2		EPA	–	–	–	–			AY738635
S3/S2		EPB	4167/S3	U	G	18	Leu	Trp	AY738636
			<u>4171/S3</u>	A	G	–			
S3/S2/S1		LK3	<u>4171/S3</u>	A	G	–			DQ150697
			4213/S3	A	G	–			
			4332/S3	A	U	73	Gln	Leu	
			4907/S2	U	G	262	Met	Arg	
S3/S2/S1		LK6	–	–	–			DQ150698	
S3/S2/S1		LK10	4316/S3	C	U	68	Pro	Ser	DQ150699
			4800/S2	G	U	–			
S2	3A	742	–	–	–	–			
S2		EPA	<u>5214</u>	U	C	–			
S2		EPB	<u>5214</u>	U	C	–			
S1		LK3	<u>5269</u>	A	G	–			
S1		LK6	<u>5270</u>	A	G	–			
S1		LK10	<u>5272</u>	G	A	54	Arg	Gly	
S2		3B	742	<u>5269</u>	A	G	–		
S2	EPA		–	–	–	–			
S2	EPB		–	–	–	–			
S1	LK3		–	–	–	–			
S1	LK6		–	–	–	–			
S1	LK10		–	–	–	–			
S2	3C	742	–	–	–	–			
S2		EPA	5781	C	U	–			
S2			5784	U	C	–			
		EPB	–	–	–	–			
S1		LK3	<u>5641</u>	C	U	–			
	<u>5769</u>		A	U	111	Asn	Ile		
S1	LK6	<u>5641</u>	C	U	–				
		<u>5769</u>	A	U	111	Asn	Ile		
			5911	C	U	–			
S1	3D	LK10	<u>5641</u>	C	U	–			
S2		742	6114	U	A	–			
S2/S3		EPA	6071/S2	C	U	29	Ala	Val	
S2/S3		EPB	–	–	–	–			
S1		LK3	<u>6019</u>	A	G	–			
			<u>6151</u>	G	A	–			
			<u>6203</u>	C	U	73	His	Tyr	
	<u>6732</u>		U	C	249	Leu	Pro		
			6784	C	U	–			
			<u>6947</u>	C	U	–			

Table 5 continued

Origin	Region	Isolate	Nucleotide position ^a	Sabin	Isolate	Amino acid position	Sabin	Isolate	Accession numbers of 2C-3D sequences
S1	LK6		<u>6019</u>	A	G	–			
			<u>6151</u>	G	A	–			
			<u>6203</u>	C	U	73	His	Tyr	
			6492	A	G	169	Glu	Gly	
			6493	G	A	–			
			6495	A	C	170	Gln	Pro	
			6496	G	A	–			
			6741	U	G	252	Val	Gly	
			6779	A	U	265	Ile	Phe	
		S1	LK10		5991	A	G	2	Glu
	<u>6019</u>			A	G	–			
	<u>6151</u>			G	A	–			
	<u>6203</u>			C	U	73	His	Tyr	
	6499			G	A	–			
	6607			U	G	–			
	<u>6732</u>			U	A	249	Leu	His	
	6733			A	C	–			
	<u>6947</u>			C	U	–			
	7051			U	C	–			

Numbering according to vaccine strains, Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220), and Sabin 3 (AY184221). Mutations identified in more than one isolates are underlined

^a Numbering according to Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220), or Sabin 3 (AY184221) vaccinal strains

advantage and support the reversion of Sabin derivatives towards neurovirulent ones. Moreover, the recombination type S3/S2/S1 of isolates LK3, LK6, and LK10 results in the elimination of the major determinants of attenuation and thermo sensitivity situated in the 5' end of Sabin 1 vaccine strain in opposition with what was observed with the isolate 742 (S1/S3/S2).

The results of our study show that the presence of Sabin 1 vaccine strain as a 3' partner in recombinants vaccine-derived polioviruses favors their reversion towards neurovirulent ones. This is in accordance with the fact that recombinants Sabin-2 and Sabin-3 derivatives have been frequently isolated from VAPP cases while none of the Sabin-1 derivatives isolated from VAPP cases were found to be recombinants [4, 16, 50, 59]. Moreover, recombinants Sabin-2 and Sabin-3 derivatives with Sabin 1 vaccine strain as a 3' partner have been more frequently isolated from VAPP cases than those with Sabin 2 or Sabin 3 as a 3' partner. In a previous study, all recombinant Sabin-3 derivatives with Sabin 1 as a 3' partner (two S3/S2/S1 and one S3/S1) had been isolated from VAPP cases while three out of four recombinant Sabin-3 derivatives with Sabin 3 as a 3' partner (S3/S2/S3) had been isolated from healthy vaccinees [4]. In our study, both of S3/S2/S3 recombinant

derivatives have been also isolated from healthy vaccinees. The presence of strains with increased neurovirulence in environment such as the three recombinants S3/S2/S1 (LK3, LK6, and LK10), highlights the need for environmental surveillance.

Our study shows that both mutations and recombination may affect the phenotype traits of Sabin derivatives and lead to neurovirulent viral strains. Moreover, the recombination allows either the congregation of reversed determinants of attenuation and thermo sensitivity in the viral genome or the elimination of some determinants of attenuation and thermo sensitivity from the viral genome. However, Sabin 1 vaccine strain is genetically more stable than Sabin 2 and Sabin 3 vaccine strains as Sabin 1 carries more determinants of attenuation and thermo sensitivity. This may explain why Sabin-2 and Sabin-3 derivatives are more frequently isolated from VAPP cases than are Sabin-1 (only about 12% of cases) [60, 61].

In the post-eradication era of wild polioviruses, the only remaining sources of poliovirus infection worldwide will be vaccine-derived polioviruses. As the preponderance of countries certified to be polio-free have switched from OPV to IPV vaccine and taking into consideration the fact that IPV does not induce the same immunity levels as OPV,

importation of recombinant evolved derivatives of vaccine strains would have serious implications for public health. The history of OPV strains include passages in non-optimal hosts, multiple cloning and deliberate selection of attenuated (less fit) variants. The error-prone replication generates variants devoid of fitness-decreasing mutations where the revertants are readily selected for. As a result, evolution of OPV occurs in the organisms of vaccinees and their immediate contacts early after vaccination and consists of mutations, mostly represented by non-synonymous replacements within coding sequences and/or alterations of important control elements in the non-coding region of the viral genome. Most of these mutations are of an adaptive nature and aim at reducing the adverse effects of the fitness-decreasing mutations accumulated during the original selection of the vaccine strains. The improvement of the phenotype takes some time, with the more detrimental mutations being eliminated at first. It is widely accepted that recombination helps RNA viruses prevent accumulation of adverse mutations. Genetic determinants of attenuation usually decrease virus fitness and although certain of these determinants may be similarly located in the genome of all three Sabin strains it is likely that there are also type-specific attenuating mutations. If so, recombination may be crucial in getting rid of these fitness decreasing mutations where some attenuating mutations may be efficiently eliminated by recombination events, thereby increasing viral neurovirulence.

References

1. E. Wimmer, C.U. Hellen, X. Cao, *Ann. Rev. Genet.* **27**, 353–436 (1993)
2. A.B. Sabin, L.R. Boulger, *J. Biol. Stand.* **1**, 115–118 (1973)
3. C. Christodoulou, F. Colbere-Garapin, A. Macadam, L.F. Taffs, S. Marsden, P. Minor, F. Horaud, *J. Virol.* **64**, 4922–4929 (1990)
4. A.J. Macadam, C. Arnold, J. Howlett, A. John, S. Marsden, F. Taffs, P. Reeve, N. Hamada, K. Wareham, J. Almond, N. Cammack, P.D. Minor, *Virology* **172**, 408–414 (1989)
5. A.J. Macadam, S.R. Pollard, G. Ferguson, G. Dunn, R. Skuce, J.W. Almond, P.D. Minor, *Virology* **81**, 451–458 (1991)
6. M.J. Bouchard, D.H. Lam, V.R. Racaniello, *J. Virol.* **69**, 4972–4978 (1995)
7. M.M. Georgescu, M. Tardy-Panit, S. Guillot, R. Crainic, F. Delpeyroux, *J. Virol.* **69**, 5278–5286 (1995)
8. N. Kawamura, M. Kohara, S. Abe, T. Komatsu, K. Tago, M. Arita, A. Nomoto, *J. Virol.* **63**, 1302–1309 (1989)
9. T. Omata, M. Kohara, S. Kuge, T. Komatsu, S. Abe, B.L. Semler, A. Kameda, H. Itoh, M. Arita, E. Wimmer, A. Nomoto, *J. Virol.* **58**, 348–358 (1986)
10. M. Tardy-Panit, B. Blondel, A. Martin, F. Tekaia, F. Horaud, F. Delpeyroux, *J. Virol.* **67**, 4630–4638 (1993)
11. P.D. Minor, G. Dunn, D.M. Evans, D.I. Magrath, A. John, J. Howlett, A. Phillips, G. Westrop, K. Wareham, J.W. Almond, J.M. Hogle, *J. Gen. Virol.* **70**, 1117–1123 (1989)
12. G.D. Westrop, K.A. Wareham, D.M. Evans, G. Dunn, P.D. Minor, D.I. Magrath, F. Taffs, S. Marsden, M.A. Skinner, G.C. Schild, J.W. Almond, *J. Virol.* **63**, 1338–1344 (1989)
13. S. Guest, E. Pilipenko, K. Sharma, K. Chumakov, R.P. Roos, *J. Virol.* **78**, 11097–11107 (2004)
14. A.L. Gutiérrez, M. Denova-Ocampo, V.R. Racaniello, R.M. del Angel, *J. Virol.* **71**, 3826–3833 (1997)
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **46**, 1–25 (1997)
16. M. Furione, S. Guillot, D. Otelea, J. Balanant, A. Candrea, R. Crainic, *Virology* **196**, 199–208 (1993)
17. M.M. Georgescu, J. Balanant, A. Macadam, D. Otelea, M. Combiescu, A.A. Combiescu, R. Crainic, F. Delpeyroux, *J. Virol.* **71**, 7758–7768 (1997)
18. E.A. Cherkasova, M.L. Yakovenko, G.V. Rezapkin, E.A. Korotkova, O.E. Ivanova, T.P. Ereemeeva, L.I. Krasnoproshina, N.I. Romanenkova, N.R. Rozaeva, L. Sirota, V.I. Agol, K.M. Chumakov, *J. Virol.* **79**, 1062–1070 (2005)
19. A. Georgopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, N.C. Vamvakopoulos, *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4337–4342 (2000)
20. J. Balanant, S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux, R. Crainic, *Virology* **184**, 645–654 (1991)
21. M.S. Oberste, K. Maher, M.R. Flemister, G. Marchetti, D.R. Kilpatrick, M.A. Pallansch, *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1170–1174 (2000)
22. E. Dedepisidis, I. Karakasiliotis, E. Paximadi, Z. Kyriakopoulou, D. Komiotis, P. Markoulatos, *Virus Genes* **33**(2), 183–191 (2006)
23. M.N. Mulders, G.Y. Lipskaya, H.G. Van der Avoort, M.P. Koopmans, O.M. Kew, A.M. van Loom, *J. Infec. Dis.* **171**, 1399–1405 (1995)
24. V. Caro, S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux, R. Crainic, *J. Gen. Virol.* **82**, 79–91 (2001)
25. S. Guillot, V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, R. Crainic, *J. Virol.* **74**, 8434–8443 (2000)
26. E. Paximadi, I. Karakasiliotis, Z. Mamuris, C. Stathopoulos, V. Krikelis, P. Markoulatos, *Virus Genes* **32**, 203–210 (2006)
27. I. Karakasiliotis, P. Markoulatos, T. Katsorchis, *Mol. Cell. Probes* **18**, 103–109 (2004)
28. I. Karakasiliotis, E. Paximadi, P. Markoulatos, *J. Gen. Virol.* **86**(11), 3137–3142 (2005)
29. E. Paximadi, I. Karakasiliotis, D. Papaventsis, G. Papageorgiou, P. Markoulatos, *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1153–1162 (2008)
30. E. Paximadi, I. Karakasiliotis, E. Bolanaki, A. Krikelis, P. Markoulatos, *Virus Genes* **35**, 541–548 (2007)
31. J.H. Nakano, M.H. Hatch, W. Thieme, B. Nottay, *Prog. Med. Virol.* **24**, 178–206 (1978)
32. C.E. Malnou, T.A. Pöyry, R.J. Jackson, K.M. Kean, *J. Virol.* **76**(21), 10617–10626 (2002)
33. G.V. Rezapkin, K.M. Chumakov, Z. Lu, Y. Ran, E.M. Dragunsky, I.S. Levenbook, *Virology* **202**(1), 370–378 (1994)
34. A. McGoldrick, A.J. Macadam, G. Dunn, A. Rowe, J. Burlison, P.D. Minor, J. Meredith, D.J. Evans, J.W. Almond, *J. Virol.* **69**, 7601–7605 (1995)
35. E.A. Cherkasova, E.A. Korotkova, M.L. Yakovenko, O.E. Ivanova, T.P. Ereemeeva, K.M. Chumakov, V.I. Agol, *J. Virol.* **76**, 6791–6799 (2002)
36. P.D. Minor, M. Ferguson, D.M. Evans, J.W. Almond, J.P. Icenogle, *J. Gen. Virol.* **67**, 1283–1291 (1986)
37. J. Harber, G. Bernhardt, H.H. Lu, J.Y. Sgro, E. Wimmer, *Virology* **214**, 559–570 (1995)
38. Y. He, V.D. Bowman, S. Mueller, C.M. Bator, J. Bella, X. Peng, T.S. Baker, E. Wimmer, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 79–84 (2000)
39. N. La Monica, J.W. Almond, V.R. Racaniello, *J. Virol.* **61**, 2917–2920 (1987)
40. N. La Monica, V.R. Racaniello, *J. Virol.* **63**, 2357–2360 (1989)
41. K.M. Chumakov, L.B. Powers, K.E. Noonan, I.B. Roninson, I.S. Levenbook, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 199–203 (1991)

42. V. Pliaka, E. Dedepsidis, Z. Kyriakopoulou, I. Papadopoulou, S. Levidiotou, P. Markoulatos, *Mol. Cell. Probes* **21**, 267–275 (2007)
43. C. Weeks-Levy, J.M. Tatem, S.J. DiMichele, W. Waterfield, A.F. Georgiu, S.J. Mento, *Virology* **185**, 934–937 (1991)
44. J.M. Tatem, C. Weeks-Levy, A. Georgiu, S.J. DiMichele, E.J. Gorgacz, V.R. Racaniello, F.R. Cano, S.J. Mento, *J. Virol.* **66**, 3194–3197 (1992)
45. S.J. Mento, C. Weeks-Levy, J.M. Tatem, E.J. Gorgacz, W.F. Waterfield, *Dev. Biol. Stand.* **78**, 93–100 (1993)
46. C.E. Fricks, J.M. Hogle, *J. Virol.* **64**, 1934–1945 (1990)
47. P.E. Lobert, N. Escriou, J. Ruelle, T. Michiels, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**(20), 11560–11565 (1999)
48. K.L. McKnight, S.M. Lemon, *J. Virol.* **70**(3), 1941–1952 (1996)
49. A. Martin, D. Benichou, T. Couderc, J.M. Hogle, C. Wychowski, S. Van der Werf, M. Girard, *Virology* **180**, 648–658 (1991)
50. M.M. Georgescu, F. Delpeyroux, M. Tardy-Panit, J. Balanant, M. Combiescu, A.A. Combiescu, S. Guillot, R. Crainic, *J. Virol.* **68**, 8089–8101 (1994)
51. J. Martín, K. Odoom, G. Tuite, G. Dunn, N. Hopewell, G. Cooper, C. Fitzharris, K. Butler, W.W. Hall, P.D. Minor, *J. Virol.* **78**, 13839–13847 (2004)
52. J. Cello, H. Toyoda, N. Dejesus, E.Y. Dobrikova, M. Gromeier, E. Wimmer, *J. Med. Virol.* **80**, 352–359 (2008)
53. C.E. Malnou, A. Werner, A.M. Borman, E. Westhof, K.M. Kean, *J. Biol. Chem.* **279**, 10261–10269 (2004)
54. N. De Jesus, D. Franco, A. Paul, E. Wimmer, J. Cello, *J. Virol.* **79**, 14235–14243 (2005)
55. N.S. Cuervo, S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic, F. Delpeyroux, *J. Virol.* **75**, 5740–5751 (2001)
56. G. Driesel, S. Diedrich, U. Kunkel, E. Schreier, *Eur. J. Epidemiol.* **11**, 647–654 (1995)
57. G.V. Gavrilin, E.A. Cherkasova, G.Y. Lipskaya, O.M. Kew, V.I. Agol, *J. Virol.* **74**, 7381–7390 (2000)
58. C. Savolainen-Kopra, E. Samoilovich, H. Kahelin, A.K. Hiekka, T. Hovi, M. Roivainen, *J. Gen. Virol.* **90**(Pt 8), 1859–1868 (2009)
59. D. Otelea, S. Guillot, M. Furione, A.A. Combiescu, J. Balanant, A. Candrea, R. Crainic, *Dev. Biol. Stand.* **78**, 33–38 (1993)
60. P.M. Strebel, R.W. Sutter, S.L. Cochi, R.J. Biellik, E.W. Brink, O.M. Kew, M.A. Pallansch, W.A. Orenstein, A.R. Hinman, *Clin. Infect. Dis.* **14**, 568–579 (1992)
61. P.M. Strebel, A. Aubert-Combiescu, N. Ion-Nedelcu, S. Biberi-Moroeanu, M. Combiescu, R.W. Sutter, O.M. Kew, M.A. Pallansch, P.A. Patriarca, S.L. Cochi, *Am. J. Epidemiol.* **140**, 1111–1124 (1994)

Fw: Acceptance for publication, Clinical Microbiology and Infection

- > Clinical Microbiology and Infection
- > Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
- >
- > 28-Jan-2010
- >
- > CLM-09-1637.R1
- > **A seroprevalence study of Poliovirus antibody against a collection of recombinant and non-recombinant Poliovirus vaccinal strains in population of Southern Greece**
- > MARKOULATOS, PANAYOTIS; Pliaka, Vaia
- >
- >
- > Dear Professor Markoulatos
- >
- > Your submission has now been provisionally accepted for publication in Clinical Microbiology and Infection (Note).
- >
- > The manuscript will be edited prior to creation of proof pages and you will be contacted if there are author queries that require your attention. If not, you will have an opportunity to review the edited manuscript at the stage of proofs.
- >
- > Please see important details concerning the publication process below.
- >
- > Your efforts during the process of revision are acknowledged and I hope you also are pleased with the final result.
- >
- > We appreciate being able to publish your work and look forward to seeing your paper online as soon as possible.
- >
- > Yours sincerely
- > Professor Ernest Gould
- > Editor
- > Clinical Microbiology and Infection
- >
- > DETAILS (Copyright, Proofs)
- >
- > As the Corresponding Author, you remain the copyright owner of the article; however, an Exclusive License Form (ELF) grants to Blackwell Publishing the exclusive right to publish your article on behalf of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
- >
- > The ELF is available via Manuscript Central (Instructions and Forms). In order to avoid delay in publication, the ELF should be sent directly to the Publisher at the address indicated on the form.
- >

A seroprevalence study towards a collection of Poliovirus vaccine strains in Greek population

V. Pliaka^a, Router IGA^a, Z. Kyriakopoulou^a, P. Kioussi^a, E. Plakokefalos^a, M. Megalou^a, A. Pratti^a, S. Levidiotou-Stefanou^b, P. Markoulatos^{a,*}

^aUniversity of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology, Microbiology-Virology Laboratory, Larissa, Greece

^bUniversity of Ioannina, Medical School, Department of Microbiology, Ioannina, Greece

*Corresponding Author: Professor P. Markoulatos

University of Thessaly, School of Health Sciences

Department of Biochemistry & Biotechnology

Ploutonos 26 & Aiolou

41221 Larissa, Greece

Tel.: +302410 565274, Fax: +302410 565294

E-Mail: markoulatos@bio.uth.gr

Abstract

In this study, the serological status of southern Greek population of age groups 1-10, 11-20, 21-30 and 31-40 against Sabin vaccine strains and a collection of 15 recombinant and 4 non-recombinant Poliovirus vaccine strains was determined. For all three Polioviruses types, the highest NT titers were observed in age group 1-10, indicating a good response to vaccination. In general the serological status of the population of southern Greece against poliovirus is better for types 1 and 2 than type 3. The presence of the lowest NT titer in age group 21-30 towards Poliovirus type 3 suggests the need for a booster dose of monovalent Sabin 3 vaccine to ensure personal and herd immunity.

Keywords: Polioviruses, OPV-derivatives, immunity, Greece

Since the 1960s, poliovirus, the causal agent of poliomyelitis, has been effectively controlled by the use of inactivated poliovirus vaccine (IPV) or live attenuated oral poliovirus vaccine (OPV). The OPV is constituted of attenuated strains of each of the three serotypes (Sabin 1, 2, and 3) [1].

By 1964, OPV was the vaccine adopted throughout most of the world due to several advantages over IPV, such as: simplicity of administration, induction of mucosal immunity and neutralizing antibodies, and low cost. Since the Poliomyelitis Eradication Initiative (PEI) was launched in 1988, extraordinary progress has been made to stop transmission of wild-type poliovirus and to achieve global certification of eradication by 2005 [2]. The number of poliomyelitis cases due to infections with wild-type polioviruses decreased from an estimated 350,000 cases in over 125 endemic countries in 1988 to just 1,310 cases in four countries in 2007 [3]. Poliomyelitis transmission has been interrupted in the American, European and Western Pacific regions and by the end of 2002 more than 180 countries and territories were declared as polio-free. At present, the virus remains endemic in four countries: Afghanistan, India, Nigeria and Pakistan [2].

The eradication strategies recommended by the WHO include: i) high, routine infant immunization coverage with at least three doses of OPV plus a dose at birth in polio-endemic countries, ii) national immunization days (NIDs) targeting all children <5 years, iii) acute flaccid paralysis (AFP) surveillance and laboratory investigations and iv) mop-up immunization campaigns with OPV to interrupt final chains of transmission [2].

In the late 1990s it was recognized that polio outbreaks can be caused by circulating live-attenuated vaccine viruses (Sabin strain) that have reverted and re-acquired neurovirulence. By late-2005, six outbreaks caused by such circulating

vaccine-derived polioviruses (cVDPVs), had been documented. Moreover, in rare cases (1 case per 750,000 primary vaccinees), OPV strains have been implicated in vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) [4-7].

Emerging concerns such as the VAPP cases and the isolation of VDPV in a number of countries has prompted WHO, in its 2004-2008 strategic plans, to recommend cessation of OPV administration as soon as possible after interruption of wild-type poliovirus circulation and continuing immunization schedules mainly with IPV [8].

OPV was introduced into Greece in 1964 and a standard vaccination schedule was initiated including four doses at the age of 2, 4, 6 and 18 months, with a booster dose at 4-6 years. This vaccination schedule has led to the elimination of indigenous cases of poliomyelitis since 1982 [9]. However, Greece has switched to the exclusive use of IPV since 2005 as it occurs also in most polio-free countries.

In this study, the immunity level of southern Greek population of age groups 1-10, 11-20, 21-30 and 31-40 was measured towards Sabin vaccine strains and a collection of 15 recombinant and 4 non-recombinant OPV-derivatives. The study was carried out in 2008-2009 and the serum samples were provided by volunteers from regions of Southern Greece. The serotype of all OPV-derivatives was determined by microneutralization assay with type-specific rabbit antisera (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) according to enclosed instructions and using standard procedures [10].

The immunity level of human population against poliovirus types 1, 2 and 3 was determined with a microneutralisation assay, according to the WHO guidelines. Pooled sera (mixed 40 serum samples) were used from each age group for the NT assay [11]. Serum pools were diluted 1:10 in MEM, heat-inactivated for 50 min at 56°C, diluted two-fold from 1:10 to 1:1280 and incubated in duplicates for 1 h at 37°C

with 100 TCID₅₀ (50 % tissue culture infective dose) with each one of the 19 OPV-derivatives as well as with the Sabin vaccine strains (Sabin1, Sabin2 and Sabin3). Finally a cell suspension containing 10⁴ Hep2 cells/0.1 ml was added. Cell and virus controls were included in each batch. The plates were examined daily (3-5 days) for the development of CPE. When the virus controls showed complete CPE, the final results were recorded 24 hours later. The highest dilution of serum pool that protected the cultures was recorded. Results were expressed as log₁₀ reciprocal titres (log₁₀ titre 1:10 = 1). Student's t-test (Paired samples test) was used to compare the mean value of NT titer of four age groups 1-10, 11-20, 21-30 and 31-40 towards each Sabin vaccine strain (1, 2 or 3) with that towards each of the same serotype OPV-derivative. Oneway ANOVA test (Duncan's Multiple Range Test) was used to compare the mean values of NT titer towards the Sabin vaccine strain and OPV-derivatives of the same serotype between age groups 1-10, 11-20, 21-30 and 31-40.

Table 1 shows the serotype and the recombination site of each of the 19 OPV-derivatives which were identified in previous studies [12-17]. The serotype of OPV-derivatives was identified as P1 for five of them, as P2 for six of them and as P3 for eight of them. The majority of OPV-derivatives was characterized as OPV-related polioviruses displaying <1% divergence from the VP1 region of reference Sabin vaccine strain. However, an OPV-derivative of serotype 1 was characterized as VDPV in a previous study [12]. Specifically, it revealed 1.87% divergence from the VP1 region of reference strain Sabin 1 and a recombination event between Sabin 1 vaccine strain and a member of Enterovirus group C in 2A genomic region.

Table 2 shows the statistical analysis of the log₁₀ reciprocal NT titres towards Sabin vaccine strains and OPV-derivatives. Human population of age group 1-40 years old shows significant lower NT titer towards two Sabin-1 derivatives (742 and

522) in comparison with Sabin 1 vaccine strain. No significant differences in NT titers were observed for Sabin-2 and Sabin-3 derivatives in comparison with Sabin 2 and Sabin 3 vaccine strains, respectively.

A sequential decrease in NT titer was observed from age group 1-10 to 11-20 and 21-30 in all three Poliovirus types (P1, P2 and P3). Specifically, significant decrease was observed from age group 1-10 to 11-20 in Poliovirus type 1 and from age group 1-10 to 11-20 and 21-30 in Poliovirus types 2 and 3. An increase in NT titer was observed from age group 21-30 to 31-40 in Poliovirus types 1 and 3 but not in Poliovirus type 2. However, this increase is significant only in Poliovirus type 3. For all three types, the highest NT titers were observed in age group 1-10, indicating a good response to vaccination. The lowest NT titer was observed in age group 21-30 towards Poliovirus type 3. This indicates an unsatisfactory level of immunity against Poliovirus type 3 in young adults. These results are consistent with those of some previous studies [18-20].

In general the serological status of the population of southern Greece against poliovirus is better for types 1 and 2 than type 3. The presence of the lowest NT titer in age group 21-30 towards Poliovirus type 3 suggests the need for a booster dose of monovalent Sabin 3 vaccine to ensure personal and herd immunity. Moreover, the higher NT titers of age group 31-40 towards polioviruses 1 and 3 in comparison with that of age group 21-30 could be attributed to the acquisition of antibodies following natural infection with circulating poliovirus strains of types 1 and 3 during the first ten years of their life (time period 1967-1977). Moreover, a booster effect from the babies to the parents could contribute to the rise in NT titers observed in age group 31-40. On the contrary, the age groups 21-30 and 31-40 displayed the same NT titers towards polioviruses 2 which could be attributed to the earlier eradication of poliovirus type 2

than types 1 and 3 from Greece and worldwide. Type 2 is the easiest of the three to protect against, thus its worldwide transmission was successfully interrupted by 1999 [21].

The existence of cVDPVs, their ability to produce outbreaks and the fact that they exhibit pathogenicity similar to wild-type strains significantly changed the risk-benefit analysis associated with the endgame of the polio eradication campaign. It became obvious that the emergence of populations of unvaccinated individuals following OPV cessation could risk re-starting a polio pandemic caused by either cVDPV or wild type polioviruses. Today following the replacement of OPV from IPV in most developed countries, well maintained herd immunity consists a priority. It is tempting to assume that changes in antigenic properties frequently observed on OPV-derivatives represent selection of viral variants less prone to be neutralized by human antibodies. Taking into consideration that IPV does not induce the same immunity as OPV, the need for immunological studies in all age groups is urgent in order to avoid epidemics due to the circulation of highly-evolved OPV-derivatives and the importation of wild polioviruses from endemic countries.

References

- [1] Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived poliovirus and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59:587–635.
- [2] World Health Organization. *Manual for the virological investigation of poliomyelitis*. WHO/EPI/GEN/04. Geneva: WHO, 2004.
- [3] Centers for Disease Control. Progress toward interruption of wild poliovirus transmission-worldwide, January 2007-April 2008. *MMWR* 2008; 57:489-494.
- [4] Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M *et al*. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002; 296(5566):356–359.
- [5] Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ *et al*. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 2004; 78:13512–13521.
- [6] Rousset D, Rakato-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R *et al*. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 885–887.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention. Acute flaccid paralysis surveillance for expansion to other diseases, 2003–2004. *MMWR* 2004; 53:1113–1116.
- [8] Heymann DL, Sutter RW, Aylward RB. A vision of a world without polio: the OPV cessation strategy. *Biologicals* 2006; 34(2):75-9.
- [9] Frantidou-Adamopoulou F. Poliomyelitis cases in Northern Greece 1976-1990. *Eur J Epidemiol* 1992; 8:112-113.
- [10] World Health Organization. *Manual for the virological investigation of polio*. WHO/EPI/GEN 97.01. Geneva: WHO, 1997.

- [11] Gracia Ahufinger I, Tamames Gomez S, Eiros Bouza JM *et al.* HIV seroprevalence in the population treated in a hospital emergency department: analysis by pooled batches of serum. *Rev Clin Esp.* 2009; 209 (2): 73-77.
- [12] Dedepsideis E, Kyriakopoulou Z, Pliaka V *et al.* Retrospective Characterization of a Vaccine-Derived Poliovirus Type 1 Isolate from Sewage in Greece. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6697–6704.
- [13] Karakasiliotis I, Paximadi E, Markoulatos P. Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol* 2005; 86:3137-3142.
- [14] Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P. Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* 2006; 32:203-210.
- [15] Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorchis T. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes* 2004; 18:103-109.
- [16] Paximadi E, Karakasiliotis I, Bolanaki E, Krikelis A, Markoulatos P. Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* 2007; 35:541-548.
- [17] Dedepsideis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z *et al.* Complete genomic characterization of an intertypic Sabin3/Sabin2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52:343–351.
- [18] Frantzidou F, Diza E, Halkia D, Antoniadis A. A seroprevalence study of poliovirus antibody in the population of northern Greece. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:68-71.
- [19] Mastroeni I, Patii AM, Fabrizi A *et al.* Immunity status against poliomyelitis in persons 13–14 years old living in Rome. *Vaccine* 1997; 15:745–750.

[20] White PM, Green J. Prevalence of antibody to polioviruses in England and Wales 1984–6. *BMJ* 1986; 293:1153–1155.

[21] Katz Samuel L. Polio-New challenges in 2006. *J Clin Virol.* 2006; 36: 163-165.

Table 1. The serotype, the recombination type and the recombination sites of all OPV-derivatives are shown. All isolates were characterized as OPV-related polioviruses except one which was characterized as a vaccine-derived poliovirus strain (VDPV). The recombinations sites of some OPV-derivatives were identified previously by our group (References are indicated).

Serotype 1 (P1)	Serotype 2 (P2)	Serotype 3 (P3)
742 S1 / S3 / S2 ^a (2A / 2C) ^b (This study)	I34 S2 / S1 / S2 / S1 (2C/3D/3D) Karakasiliotis et al. 2005 [11]	EPC S3 / S2 / S3 (2C / 3D) Paximadi et al. 2007 [14]
7/b/97 S1 / EVC ^c (2A) Dedepsidis et al. 2007 [10]	EP9 S2 / S1 (3A) Paximadi et al. 2006 [12]	EPB S3 / S2 / S3 (2C / 3D) Paximadi et al. 2007 [14]
522 S1 (non-recombinant) (This study)	EP12 S2 / S1 (3D) Paximadi et al. 2006 [12]	738 S3 / S2 / S1 (3C / 3D) (This study)
II S1 (non-recombinant) (This study)	ID S2 / S1 (3C) Karakasiliotis et al. 2004 [13]	584 S3 / S2 / S1 (2C / 3D) (This study)
152 S1 (non-recombinant) (This study)	IF S2 / S1 (3D) Karakasiliotis et al. 2004 [13]	EPA S3 / S2 / S3 (2C / 3D) Paximadi et al. 2007 [14]
	8001 S2 (non-recombinant) (This study)	K/2002 S3 / S2 (VP1) Dedepsidis et al. 2008 [15]
		EP16 S3 / S2 (2C) Paximadi et al. 2006 [12]
		EP23 S3 / S1 (2C) Paximadi et al. 2006 [12]

^a The recombinations of OPV-related polioviruses are among Sabin vaccine strains (S1: Sabin 1, S2: Sabin 2, S3: Sabin 3).

^b Recombination sites are located in 2A, 2C, 3A, 3C, 3D or VP1 genomic regions.

^c Isolate 7/b/97 showed a recombination event between Sabin 1 vaccine strain and a member of Enterovirus group C in 2A genomic region. Moreover, it revealed 1.87% divergence from the VP1 region of reference strain Sabin 1. As a result, it was characterized as VDPV.

Table 2. The mean values of \log_{10} reciprocal NT titres of four age groups 1-10, 11-20, 21-30 and 31-40 towards each poliovirus strain (Sabin vaccine strains and OPV-derivatives) are presented. Moreover, the mean values of \log_{10} reciprocal NT titres of all the same serotype polioviruses (P1, P2 or P3) towards each age group (1-10, 11-20, 21-30 or 31-40) are presented.

Serotype	Virus strain	Mean value in age group 1-40*	Mean value in age group†			
			1-10	11-20	21-30	31-40
1	Sabin1	2,8061800 ^a				
	742	2,3546350 ^b (p=0,014)				
	7/b/97	2,8061800 ^a (p=1,0)	3,0068666 ^b (p=1,0)	2,4549783 ^a (p=0,087)	2,1037767 ^a (p=0,087)	2,4048067 ^a (p=0,087)
	522	2,3546350 ^b (p=0,014)				
	II	2,4298925 ^a (p=0,080)				
	152	2,2041200 ^a (p=0,066)				
2	Sabin2	2,3546350 ^a				
	I34	2,3546350 ^a (p=1,0)				
	EP9	2,4298925 ^a (p=0,761)	3,0212014 ^c (p=1,0)	2,5481543 ^b (p=1,0)	2,1611157 ^a (p=1,0)	2,1611157 ^a (p=1,0)
	EP12	2,5804075 ^a (p=0,215)				
	ID	2,5051500 ^a (p=0,182)				
	IF	2,5051500 ^a (p=0,182)				
	8001	2,5804075 ^a (p=0,058)				
3	Sabin3	2,2793775 ^a				
	EPC	2,4298925 ^a (p=0,495)				
	EPB	2,1288625 ^a (p=0,182)	2,9943238 ^d (p=1,0)	2,2417488 ^c (p=1,0)	1,6396888 ^a (p=1,0)	1,8654613 ^b (p=1,0)
	738	1,9783475 ^a (p=0,092)				
	584	2,2793775 ^a (p=1,0)				
	EPA	2,1288625 ^a (p=0,182)				
	K/2002	1,9783475 ^a (p=0,092)				
	EP16	2,2793775 ^a (p=1,0)				

	EP23	2,1288625 ^a (p=0,182)				
--	------	-------------------------------------	--	--	--	--

* Means with the same alphabet letter in each Poliovirus serotype have no significant differences according to Student's t-test (Paired samples test).

† Means with the same alphabet letter in each Poliovirus serotype have no significant differences according to ANOVA test (Duncan's Multiple Range Test).