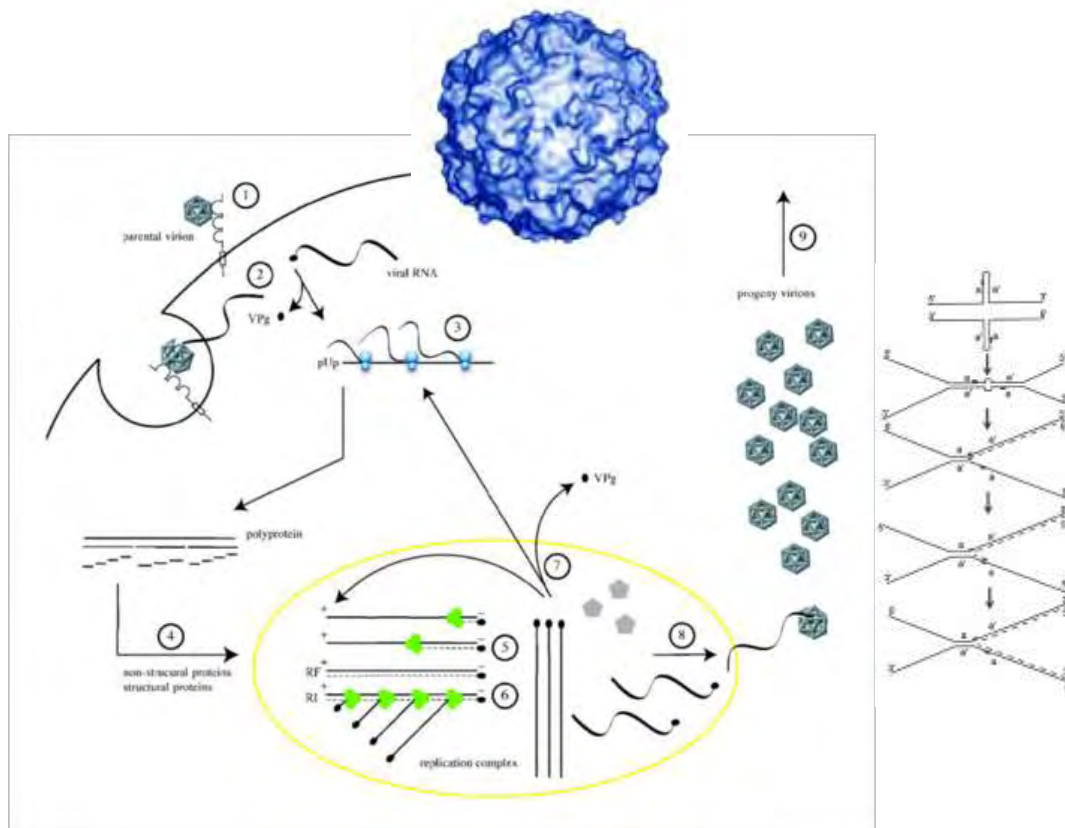




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΑΠΟ ΤΗ VP1
ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΩΣ ΚΑΙ ΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ
ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ



ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
& ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από το Μάρτιο του 2010 έως τον Ιανουάριο του 2011.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος αυτής της πτυχιακής εργασίας, για την εμπιστοσύνη, τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και τη βοήθεια κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο και τον Λέκτορα κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Πλιάκα Βάια για την καθοδήγηση και την βοήθεια κατά την διάρκεια των πειραμάτων και την συμπαράσταση σε όποιες δυσκολίες παρουσιάστηκαν κατά την τέλεση τους.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας – Ιολογίας: Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, Τσακογιάννη Δημήτρη, Ρούτερ Ειρήνη, Πατάκο Ιπποκράτη, Δαρμή Φραγκίσκο, Μπλέτσα Μάγδα, Δασταμάνη Ξένια, Γκορτσίλα Πασχάλη, Παπαδή Γωγώ και Τόσκα Ελένη τόσο για την βοήθεια και συμπαράστασή τους, όσο και για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και απασχόλησης μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 11 κλινικά δείγματα Sabin που προέρχονταν από ασθενείς που είχαν εμβολιαστεί με το OPV. Συγκεκριμένα τα δείγματα μελετήθηκαν για τον εντοπισμό σπάνιων γενετικών ανασυνδυασμών στη μη δομική περιοχή του ιικού γενώματος. Προκειμένου να εντοπιστούν οι γενετικοί αυτοί ανασυνδυασμοί ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία: εκχύλιση του ιικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA και μετατροπή σε cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων ικανών να εντοπίσουν και να ταυτοποιήσουν τους γενετικούς ανασυνδυασμούς της κάθε γενωμικής περιοχής μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, επιβεβαίωσαν τους σπάνιους γενετικούς ανασυνδυασμούς που είχαν σε προηγούμενη εργασία εντοπιστεί με αλληλούχιση. Έτσι, η μέθοδος αυτή επέτρεψε την γρήγορη ανίχνευση σπάνιων γενετικών ανασυνδυασμών σε κλινικά δείγματα ατόμων που είχαν εμβολιαστεί με OPV και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου οι τεχνικές αλληλούχισης είναι δυσπρόσιτες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ – ΕΜΒΟΛΙΩΝ	1
2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ	3
2.1 Ταξινόμηση των πολιοϊών.....	3
2.2 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων	5
2.3 Οργάνωση του ιικού γενόματος.....	9
3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	11
3.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.	13
3.2 Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης	16
3.3 Αντιγραφή του ιικού RNA	18
3.4 Καπιδίωνση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων.....	20
4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	22
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	26
6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	27
6.1 Μεταλλάξεις	27
6.2 Ανασυνδυασμός.....	29
7. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ	31
7.1 IPV	31
7.2 OPV.....	31
7.3 VAPP – VDPV	33
ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	37
2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ.....	37
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ RNA	39
4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT).....	39
5. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (PRIMERS).....	40
6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	42
7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR.....	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ – ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Η πολιομυελίτιδα πιστεύεται ότι είναι μια αρχαία πάθηση. Σε μια αιγυπτιακή στήλη της 2^{ης} χιλιετίας π.Χ. που απεικόνιζε ένα νεαρό με ατροφικό άκρο πιστεύεται ότι αναπαριστά το αποτέλεσμα της πολιομυελίτιδας [71]. Οι πρώτες κλινικές περιγραφές της πολιομυελίτιδας εντοπίζονται γύρω στο 1800, με αναφορές σε περιπτώσεις παράλυσης με πυρετό. Το 1840 ο Von Heine δημοσίευσε [64] μια μονογραφία όπου περιέγραφε με λεπτομέρεια την οδύνη. Οι συνεισφορές του και αυτές που εκδόθηκαν αργότερα από τον Σουηδό Medin [85] οδήγησαν στην αναφορά της παραλυτικής πολιομυελίτιδας ως ασθένεια *Heine-Medin*. Ακόμη μια αναφορά, από τους Charcot και Joffroy [27], περιέγραφε τις παθολογικές αλλαγές στους πρόσθιους κερατοειδείς κινητικούς νευρώνες της σπονδυλικής στήλης εξαιτίας της πολιομυελίτιδας.



Εικόνα 1.1: Πορτραίτο του Roma, ενός Αιγύπτιου θυρωρού. Η εικόνα αυτή μπορεί να είναι η πιο αρχαία απεικόνιση ενός θύματος της πολιομυελίτιδας

Στον 20^ο αιώνα ξεκίνησε μια νέα εποχή στην έρευνα γύρω από την πολιομυελίτιδα και άρχισε να γίνεται αντιληπτή η μολυσματική φύση της ασθένειας αυτής. Ο Wickman και άλλοι [119] αναγνώρισαν την μεταδοτική φύση της πολιομυελίτιδας, τη σημασία των ασυμπτωματικών μολυσμένων ατόμων στην μετάδοση του πολιοϊού και τον ρόλο της εντερικής μόλυνσης στην παθογένεια της ασθένειας. Ο ρόλος του γαστρεντερικού σωλήνα στην είσοδο και εξάπλωση του ιού της πολιομυελίτιδας επιβεβαιώθηκε αργότερα από τον Task και άλλους [116]. Στην κλασική μελέτη, οι ερευνητές από τη Βιέννη Landsteiner και Popper [77] απέδειξαν την μολυσματική

φύση της πολιομυελίτιδας μεταδίδοντας επιτυχώς την κλινική πάθηση και την παθολογία της σε πίθηκους εμβολιάζοντας τους με ομογενοποιημένο ιστό κεντρικού νευρικού συστήματος από ανθρώπους με πολιομυελίτιδα.

Παρά την πρόοδο αυτή, εμφανίστηκε ένας αριθμός άτυχων παρανοήσεων που αρχικά μπέρδευσε τους επιστήμονες και αποπροσανατόλισε τις προσπάθειες για έλεγχο της ασθένειας . Οι παρανοήσεις αυτές βασίζονταν στην πίστη ότι ο ιός ήταν αποκλειστικά νευρότροπος, ότι ο ρινοφάρυγγας ήταν η κύρια οδός εισόδου του ιού στο ΚΝΣ και ότι ο ιός εξαπλώνονταν στο νευρικό σύστημα πριν την αιμία και μέσω του οσφρητικού νεύρου. Το αποτέλεσμα των παρανοήσεων αυτών και της αποτυχίας αρκετών μη κατανοητών προσπαθειών ανοσοποίησης, μερικές με καταστροφικά αποτελέσματα [99], ήταν η ύπαρξη ενός κλίματος απαισιοδοξίας στα μέσα του 20^{ου} αιώνα σχετικά με το ενδεχόμενο ελέγχου της πολιομυελίτιδας, ακόμα και μεταξύ των επιστημόνων που εργάζονταν στον τομέα αυτό. Το 1945, ο Burnet έγραψε χαρακτηριστικά: «Το πρακτικό πρόβλημα της πρόληψης της παιδικής παράλυσης δεν έχει λυθεί. Είναι ακόμη αμφίβολο εάν θα μπορέσει να λυθεί ποτέ.» [23]. Η αντίληψη ότι ο ιός εισέρχονταν μέσω της στοματο-γαστρικής οδού και ότι η πάθηση του ΚΝΣ ακολουθούσε την αιμία ήταν αρκετά για να τονώσουν τις ελπίδες για αποτελεσματική ανοσοποίηση [13].

Στηριζόμενοι σε έρευνες άλλων, ο Enders [46] διεξήγαγε μια μελέτη – ορόσημο που έδειχνε ότι ο πολιοϊός μπορούσε να αναπαραχθεί σε μη-νευρική καλλιέργεια ιστών. Οι έρευνες αυτές είχαν επιπτώσεις για όλη την ιολογία καθώς έδειχναν, αρχικά, ότι ο πολιοϊός αναπτύσσονταν σε διάφορες καλλιέργειες ιστών που δεν αντιστοιχούν με τους ιστούς που μολύνονταν κατά τη διάρκεια της πάθησης και, δεύτερον, ότι ο πολιοϊός κατέστρεφε κύτταρα με συγκεκριμένη κυτταροπαθολογική δράση. Τεστ εξουδετέρωσης έδειξαν ότι ο πολιοϊός έχει τρεις ορότυπους [17], και ορολογικά τεστ [10] επιβεβαίωσαν ότι τα περισσότερα μολυσμένα άτομα δεν εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν στη δημιουργία μιας κρίσιμης δομής για την ανάπτυξη ενός εμβολίου και διασαφήνισαν ένα πλήθος μπερδεμένων δεδομένων, όπως την φαινομενική παρουσία δευτερευόντων επιθέσεων της πολιομυελίτιδας.



Εικόνα 1.2: Jonas Salk ή Polio Fighter Salk όπως τον ονόμασε το περιοδικό TIME της εποχής εκείνης

Διάφορα εμβόλια παράγονταν διαδοχικά, με τα πιο γνωστά να είναι το IPV (Salk inactivated polio vaccine), το οποίο χορηγούταν μέσω της ενδομυϊκής οδού

(αδειοδοτήθηκε το 1955 στις ΗΠΑ) και το ζωντανό-εξασθενημένο Sabin εμβόλιο OPV (oral polio vaccine) μέσω της στοματικής οδού (αδειοδοτήθηκε το 1961-1962). Η σημασία των εμβολίων αυτών και των ατόμων που τα παρήγαγαν μπορεί να γίνει αντιληπτή μέσω του γεγονότος ότι περισσότεροι Αμερικανοί γνώριζαν το όνομα του Jonas Salk παρά του προέδρου των ΗΠΑ. Ο πραγματικός αντίκτυπος των εμβολίων αυτών θα γίνει αντιληπτός όταν η πολιομυελίτιδα εξαλειφθεί από τον πλανήτη. Η εξάλειψη αναμφίβολα θα δώσει ένα δραματικό τέλος στη βίαιη ιστορία της πολιομυελίτιδας.

Η εργασία πάνω στους πολιοϊούς είχε μια συνεχή σημαντική επιρροή πάνω στον τομέα της μοριακής ιολογίας. Ο πολιοϊός ήταν ο πρώτος ζωικός ιός που κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε πλήρως [75,106], το πρώτο RNA ζωικού ιού για του οποίου δημιουργήθηκε ένας μολυσματικός κλώνος [105] και ο πρώτος ανθρώπινος ιός που είχε αποτυπωθεί η τρισδιάστατη δομή του μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες-X [65]. Το 1989, ο Mendelson [87] ταυτοποίησε τον υποδοχέα του πολιοϊού, CD155, εύρημα το οποίο οδήγησε στην γένεση διαγονιδιακών ποντικών που έφεραν τον CD155 υποδοχέα [76,107].

2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Οι πολιοϊοί ανήκουν στην οικογένεια των *Picornaviridae*. Είναι ιοί χωρίς έλυτρο και το γένωμά τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας. Η οικογένεια αυτή των ιών περιλαμβάνει κι άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως π.χ. ιός της ηπατίτιδας Α και FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα της οικογένειας αυτής των ιών είναι σύνθετο, περιγράφοντας έτσι το μικρό μέγεθος των ιών (*pico*), και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γένωμα (RNA).

2.1 Ταξινόμηση των πολιοϊών

Η οικογένεια των ιών *Picornaviridae* αποτελείται από εννέα γένη: arthovirus, cardiovirus, enterovirus, erbovirus, hepatovirus, kobuvirus, parechovirus, rhinovirus και teschovirus (πίνακας 2.1.1). Όλοι οι ιοί της οικογένειας *Picornaviridae* μολύνουν

σπονδυλωτά. Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών και διαχωρίζονται σε τρεις διαφορετικούς οροτύπους: Sabin1, 2 και 3 ή αλλιώς PV 1, 2 και 3.

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

Πίνακας 2.1.1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας *Picornaviridae*

πολιοϊούς, ιούς coxsackie A ή B και ιούς echo, βασισμένοι στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιομυελίτιδα) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και *herpangina* (ιοί coxsackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντι-ορών.

Το αρχικό σχήμα ταξινόμησης κατέρρευσε με την ταυτοποίηση ιών οροτυπικά ταυτόσημων με γνωστούς ιούς echo που βρέθηκαν να προκαλούν νόσο σε ποντικούς και ανθρώπους. Αυτή και άλλες ανακολουθίες στο σύστημα ταξινόμησης οδήγησε στην αρίθμηση νέων οροτύπων εντεροϊών ξεκινώντας με τον EV68. Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ανοσολογική ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς.

Οι ιοί picorna είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Παρ' όλο το περιορισμένο γενετικό υλικό και τα δομικά εμπόδια, η εξέλιξη στους ιούς picorna έχει σαν αποτέλεσμα ένα μεγάλο αριθμό εύκολα διακριτών μελών. Η ποικιλία αυτή έχει καταχωρηθεί αντιγονικά ως ορότυπος.

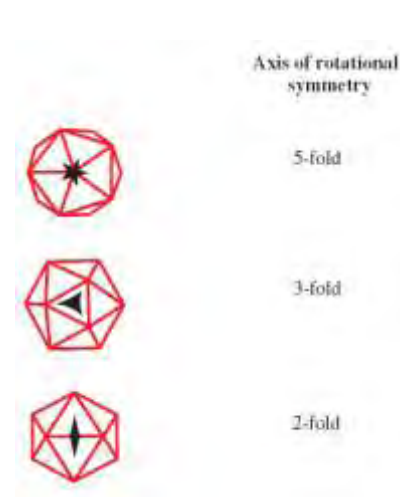
Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και, σε μικρότερη κλίμακα, το φάσμα της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί, παρ' όλα αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε

Γένος και είδη	Αριθμός Οροτύπων
<i>Γένος Enterοοϊών</i>	
Human Enterovirus A	13
Human Enterovirus B	41
Human Enterovirus C	12
Human Enterovirus D	2
Bovine Enterovirus	2
Porcine Enterovirus A	1
Porcine Enterovirus B	2
Simian Enterovirus A	2
Human Rhinovirus A	18
Human Rhinovirus B	3

Πίνακας 2.1.2: Ταξινόμηση των εντεροϊών με βάση την οργάνωση του γονιδιώματος και την ομοιότητα των αλληλουχιών (Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών – Ομάδα Μελέτης Ιών Picorna)

2.2 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Τα ιοσωμάτια του πολιοϊού είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό RNA. Τα ιοσωμάτια δεν έχουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητά τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες. Οι πολιοϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και διατηρούν τη μολυσματικότητά τους σε τιμές pH 3 και μικρότερες.



Εικόνα 2.2.1: Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο

Τα καψίδια των πολιοϊών συντίθενται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Κατά την εκπόνησή τους στις αρχές δόμησης των ιών, ο Caspar και ο Klug [25] κατέληξαν στο ότι ο καλύτερος τρόπος για να χτίσεις ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διατάξεις τις πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ένα εικοσάεδρο είναι ένα στερεό σώμα που αποτελείται από είκοσι τριγωνικές πλευρές και δώδεκα κορυφές. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. 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. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των πολιοϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [111]. Η αντίληψή μας για την δομή των πολιοϊών έκανε ένα μεγάλο άλμα το 1985 όταν οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 [65] καθορίστηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X.

Ο θεμέλιος λίθος του καψιδίου των πολιοϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Το κέλυφος σχηματίζεται από την VP1 έως τη VP3 και η VP4 υπάρχει στην εσωτερική επιφάνεια. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία ομολογία αλληλουχίας, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελιού. Η περιοχή αυτή είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα. Το ένα β'-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας και το δεύτερο, που έχει μια κάμψη στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον «τοίχο» όσο και το «πάτωμα» της γωνίας. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο επαφών πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Το δίκτυο αυτό, που σχηματίζεται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4, είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου. Η VP4 διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες στο ότι παρουσιάζει μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι παρόμοια στη θέση και τη διαμόρφωση με τις N-τελικές αλληλουχίες των VP1 και VP3 και λειτουργεί σαν μια αποσπώμενη N-τελική επέκταση της VP2 παρά σαν μια ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου.

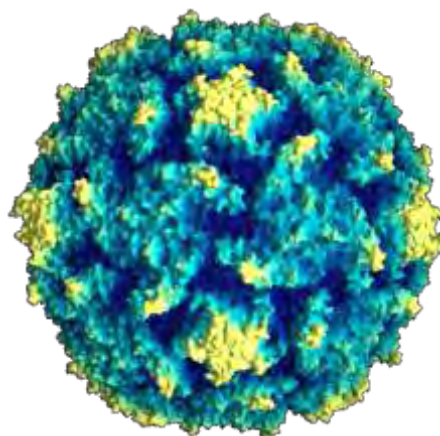
Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 απόκινονται στους βρόγχους που συνδέουν τα β'-strands και τις N- και C-τελικές αλληλουχίες που εξέχουν της περιοχής του β'-βαρελιού. Αυτές οι αμινοξικές αλληλουχίες δίνουν σε κάθε ιό *picorna* την ξεχωριστή μορφολογία και αντιγονικότητα. Τα C-τελικά άκρα βρίσκονται στην επιφάνεια του ιοσωματίου και τα N-τελικά στο εσωτερικό του, δείχνοντας ότι προκύπτουν σημαντικές αναδιατάξεις του P1 προδρόμου κατά τον πρωτεολυτικό τεμαχισμό. Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2

και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIΑ και N-AgIIIΒ, [103].

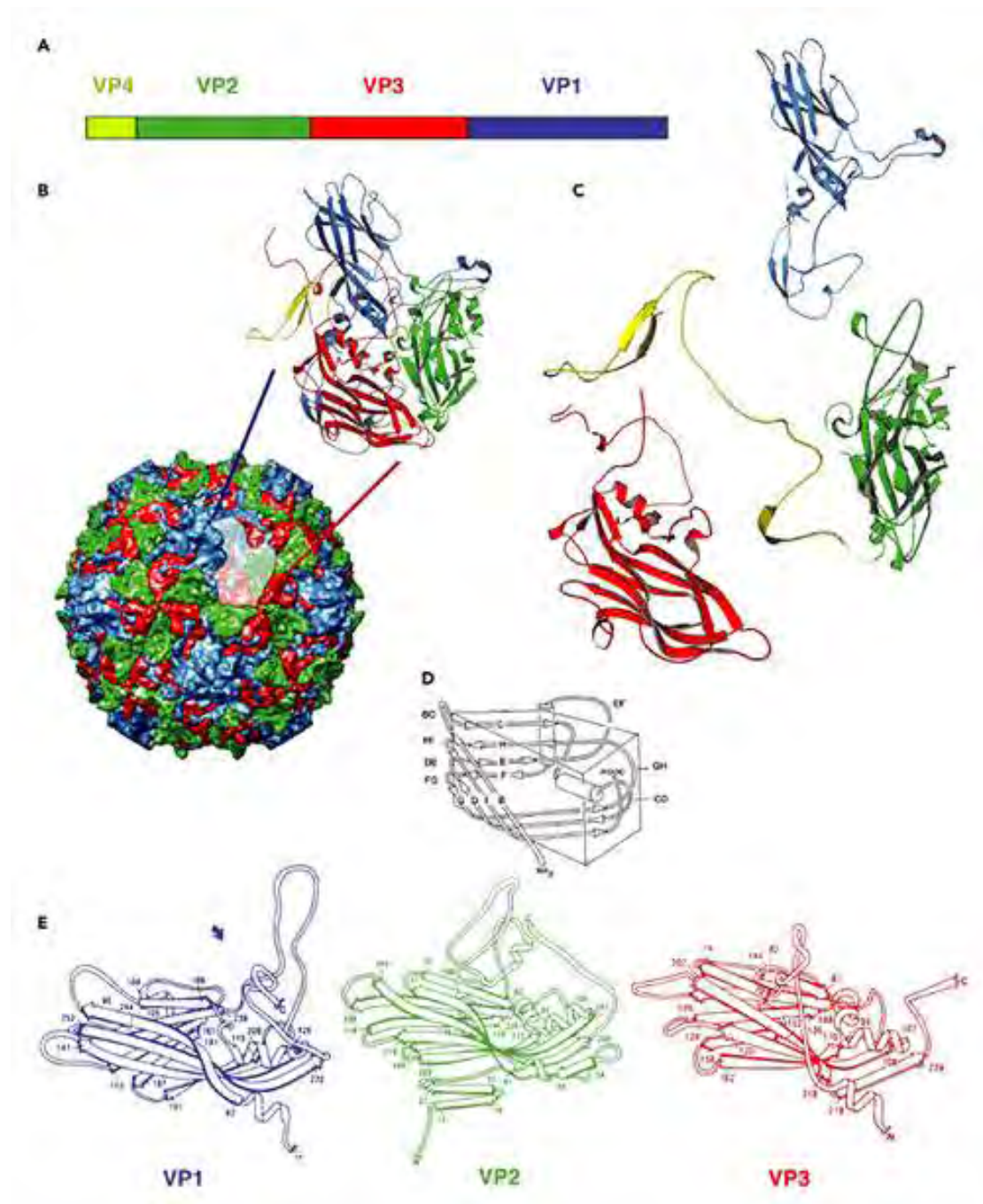
- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1.
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIΒ από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.

Σχετικά με την επιφάνεια του ισωματίου ανάλυση των δομών των πολιοϊών αποκάλυψε ότι έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή (plateau), με σχήμα αστεριού, βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενος από μία αυλάκωση (canyon) και ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Αρχικά προτάθηκε ότι η αύλακα αποτελεί την θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς και η υπόθεση αυτή αποδείχθηκε στη συνέχεια.

Στο εσωτερικό των ισωματίων, στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα πέντε μορίων της VP3 πρωτεΐνης σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β'-φύλλο. Η δομή αυτή περιβάλλεται από πέντε τριπλά πλέγματα β'-φύλλων σχηματισμένα από το N-τελικό άκρο των VP4 και VP1. Η ομάδα του μυριστικού οξέος συνδεδεμένη στο N-άκρο της VP4 επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αυτών δομών [31]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται από ένα πλέγμα β'-φύλλων, που συντίθεται από τέσσερα β'-πλέγματα του VP3 βαρελιού και ένα πλέγμα από το N-άκρο της VP1 που περιβάλλει ένα διπλό πλέγμα β'-φύλλου του N-άκρου της VP2 ενός γειτονικού πενταμερούς [49].



Εικόνα 2.2.2: Τρισδιάστατη δομή του πολιοϊού τύπου 1, όπου φαίνονται η αύλακα και η προεξοχή που σχηματίζουν οι δομικές πρωτεΐνες (J.M. Hogle, M.Chow, D.J.Filman 1985)

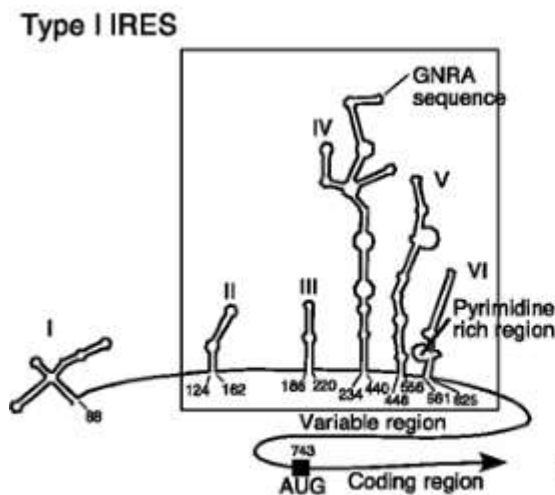


Εικόνα 2.2.3: Δομικά χαρακτηριστικά των πολιοϊών. *A.* Η οργάνωση των δομικών πρωτεϊνών στο γένωμα του ιού. *B.* Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου του πολιοϊού, όπου φαίνεται το πακετάρισμα των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. *C.* Τρισδιάστα μοντέλα των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4. *D.* Διάγραμμα που απεικονίζει το πώς τα οχτώ β'-πλέγματα κάθε πρωτεΐνης σχηματίζουν μια σφηνοειδή δομή με βρόγχους που συνδέουν τα πλέγματα μεταξύ τους. *E.* Διάγραμμα τύπου ribbon των VP1, VP2, VP3 και VP4 όπου φαίνεται η κοινή δομή β'-βαρελίου, δομή που είναι κοινή και σε άλλες ιικές πρωτεΐνες του καψιδίου.

Ακόμα και πολιοϊοί, που περιέχουν επιπλέον 1500 νουκλεοτίδια, μπορούν επιτυχώς να πακετάρουν το γονιδιώμά τους στο καψίδιο, ένδειξη που σημαίνει ότι το εσωτερικό του καψιδίου δεν είναι πλήρως κατειλημμένο [3]. Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των Picorna ιών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το γενωμικό RNA, βασισμένο σε ευρήματα με τον ιό *bean pod*, ο οποίος σχετίζεται με τους ιούς picorna. Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την διάταξη του RNA των ιών Picorna. Στην ατομική δομή του πολιοϊού P2, οι βάσεις του RNA έχει παρατηρηθεί ότι συσσωρεύονται με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα της VP4 [79]. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σταθερότητα του καψιδίου ή την απέκδυση.

2.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος

Το γένωμα των πολιοϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA. Το ικό RNA είναι μολυσματικό καθώς μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο με σκοπό να παράγει όλες τις ικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το γενωμικό RNA των πολιοϊών είναι μοναδικό επειδή είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [50,78]. Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA με δεσμό O₄-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. Η τυροσίνη που είναι συνδεδεμένη στο ικό RNA είναι πάντα το τρίτο αμινοξύ πριν το N-άκρο. Η VPg δεν απαιτείται για την μόλυνση κυττάρων από τους πολιοϊούς. Εάν αφαιρεθεί από το ικό RNA με πρωτεϊνάση, η ειδική μολυσματικότητα του ιού δεν μειώνεται. Η VPg δεν βρίσκεται σε ικά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα και την μετέπειτα μετάφραση. Τα mRNA αυτά περιέχουν μόνο ουριδινο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους. Το mRNA των πολιοϊών διαφέρει από το ικό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg [95,102]. Η VPg αφαιρείται από το ικό RNA από μια πρωτεΐνη του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού [6]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [94,101].



Εικόνα 2.3.1: Η 5' αμετάφραση περιοχή των πολιοϊών μαζί με το IRES το οποίο φαίνεται μέσα στο πλαίσιο.

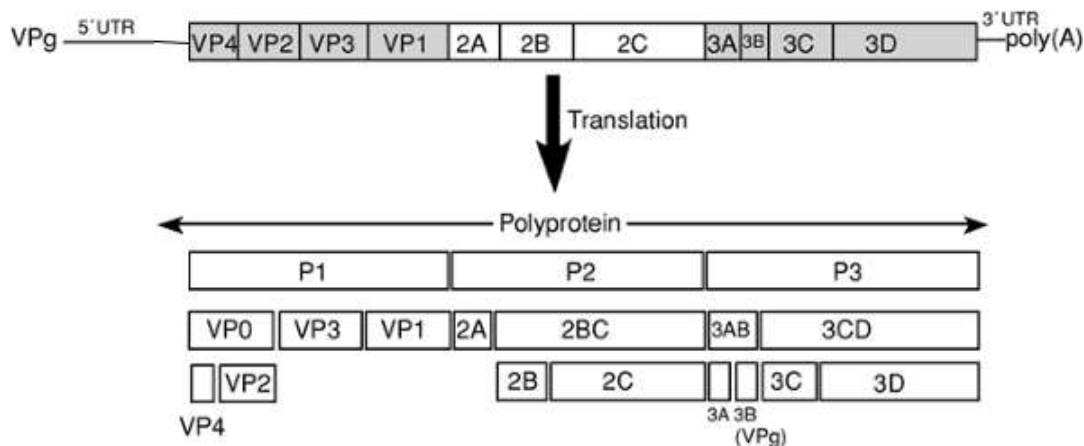
Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκάλυψε αρχικά ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των πολιοϊών είναι μακριές και υψηλά δομημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος. Η 5' μη-κωδική περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα.

Η 3' μη-κωδική περιοχή των πολιοϊών είναι μικρή και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [70]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των πολιοϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [22,115]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των πολιοϊών φέρει μια πολύ(A) ουρά [123]. Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(A) του θετικού κλώνου [122]. Ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό [113].

Τα αποτελέσματα βιοχημικών μελετών σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες [114]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί ένα μοναδικό ORF [75,106]. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από το ιικό γένωμα για να αποδώσουν στο τέλος 11 με 12 τελικά προϊόντα τεμαχισμού. Μερικά από τα πρόδρομα ατεμάχιστα μόρια έχουν επίσης ορισμένες λειτουργίες κατά την αντιγραφή.

Η πολυπρωτεΐνη χωρίζεται σε τρεις περιοχές: P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου, ενώ οι P2 και P3 περιοχές

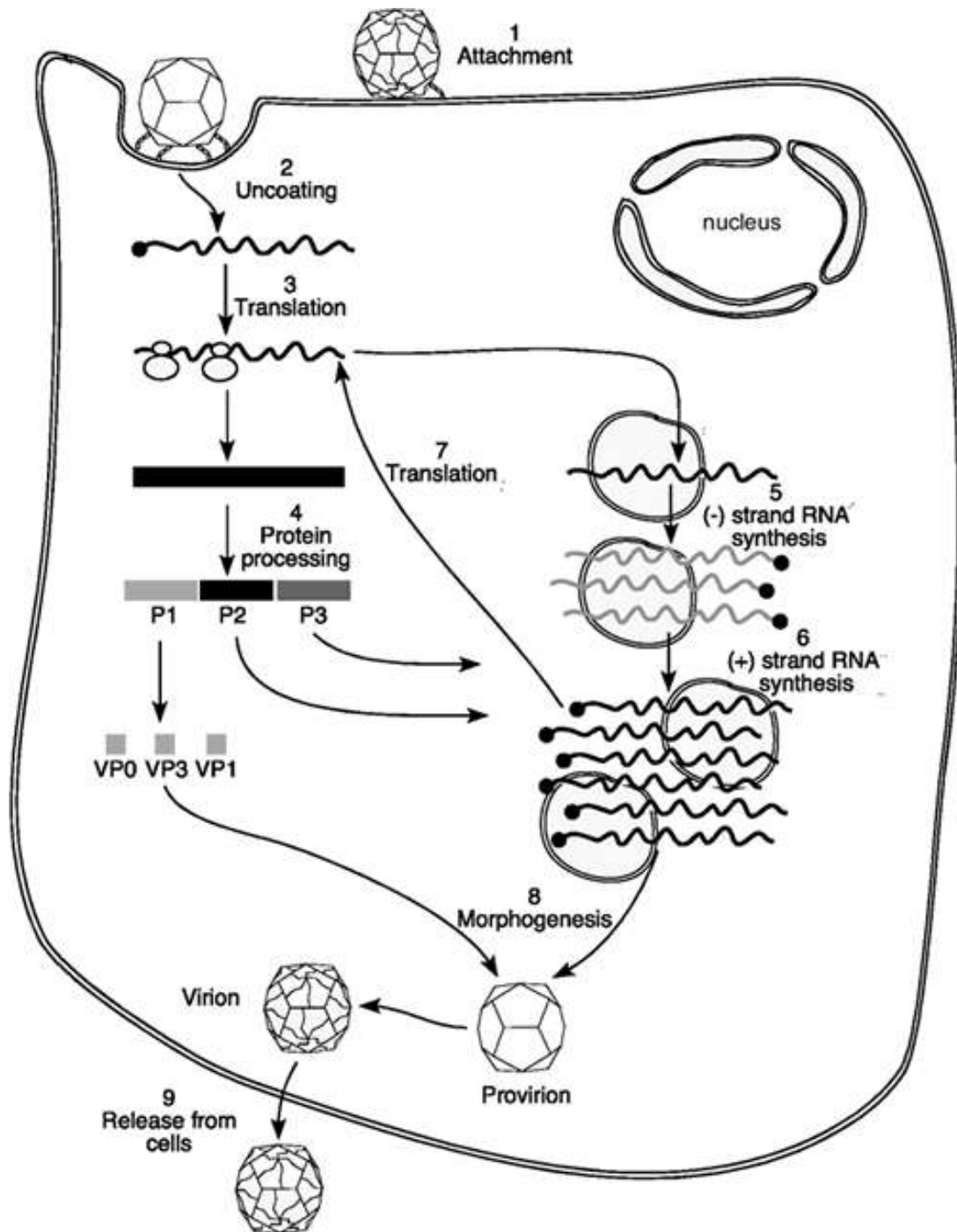
κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$, $3CD^{pro}$) και την αντιγραφή του γενώματος ($2B$, $2C$, $3AB$, $3B^{VPg}$, $3CD^{pro}$, $3D^{pol}$)



Εικόνα 2.3.2: Οργάνωση του γενώματος των πολιοϊών. **Πάνω:** διάγραμμα του ιικού RNA γενώματος, με την VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, το 5'UTR, τα γονίδια των πρωτεϊνών, την 3' UTR και την πολύ(A) ουρά. **Κάτω:** Ο τεμαχισμός της αρχικής πολυπρωτεΐνης αρχικά σε τρεις περιοχές P1, P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ιικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού.

3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Η αντιγραφή των πολιοϊών γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Το RNA τότε απεκδύεται, μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Όταν εισέρθει το θετικής πολικότητας ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν ικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γενώματος και την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της. Οι τεμαχισμοί γίνονται κυρίως από δύο ικές πρωτεΐνάσες: την $2A^{pro}$ και την $3C^{pro}$ ή $3C^{pro}$. Μεταξύ των πρωτεϊνών που συντίθενται είναι και οι ικές RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες και οι βοηθητικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του γενώματος και τη σύνθεση του mRNA. Το πρώτο βήμα της αντιγραφής του γενώματος είναι η αντιγραφή του θετικού κλώνου RNA έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας ενδιάμεσος αρνητικός κλώνος, το βήμα αυτό ακολουθείται από την παραγωγή επιπρόσθετων



Εικόνα 3.1.1: Σύνοψη του κύκλου ζωής του πολιοϊού. Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα (1) και απέκδυση του ιικού γενώματος (2). Αφαιρείται η VPg από το ιικό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται (3). Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (4). Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια (δεν έχουν σχεδιαστεί σε κλίμακα στο διάγραμμα αυτό). Ο ιικός (+) RNA κλώνος αντιγράφεται από τις ιικές RNA πολυμεράσες για να σχηματιστούν πλήρους μήκους (-) RNA κλώνοι (5), οι οποίοι αντιγράφονται στη συνέχεια για να παραχθεί επιπρόσθετο (+) RNA (6). Η σύνθεση του RNA γίνεται στα μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από τις ιικές πρωτεΐνες. Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο νέο-συντεθειμένος (+) RNA κλώνος μεταφράζεται για να παράγει επιπρόσθετες ιικές πρωτεΐνες (7). Στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, οι (+) κλώνοι εισέρχονται στο μορφογενετικό μονοπάτι (8). Τα νέο-συντεθειμένα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση (9).

θετικών κλώνων. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από αρκετές ικές πρωτεΐνες. Όταν πλέον ο αριθμός των πρωτεϊνών του καψιδίου είναι αρκετός, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράγει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή. Τα νέο-συντεθειμένα, θετικής πολικότητας RNA συνδέονται στα πενταμερή και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό. Άδεια καψίδια που βρίσκονται σε μολυσμένα κύτταρα πιθανόν να είναι ένα αποθηκευτικό σχήμα των πενταμερών.

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός πολιοϊού ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες, κάτι που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστής και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης.

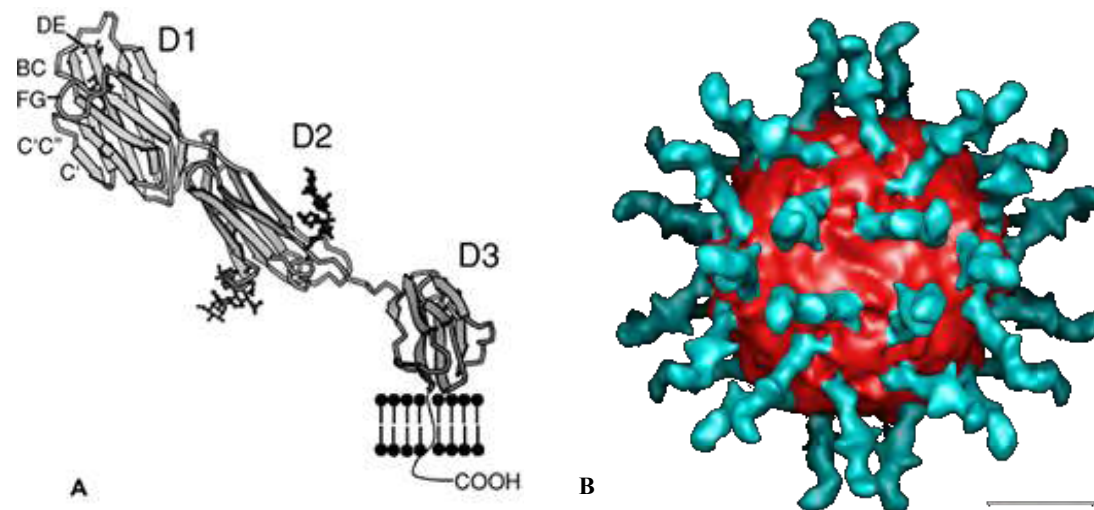
Τα στάδια του κύκλου ζωής που περιγράφηκαν πιο πάνω αναλύονται στη συνέχεια:

3.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.

Οι πολιοϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων με τη σύνδεσή τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών [87].

Πολλοί τύποι μορίων κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους ιούς. Συγκεκριμένα για τους πολιοϊούς ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπεροικογένειας των ανασοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές (εικόνα 3.1.2). Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών. Μοντέλα των συμπλόκων πολιοϊών-PVR που παρήχθησαν από δεδομένα κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι η πρώτη περιοχή έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ιού.

Ορθόλογα του *pvr* γονιδίου βρίσκονται στα γονιδιώματα ενός αριθμού θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και αυτών που δεν είναι ευάλωτοι στην μόλυνση των πολιοϊών [68]. Η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής 1 του PVR ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των μη-ευάλωτων θηλαστικών, ειδικά στις περιοχές που είναι



Εικόνα 3.1.2: Αλληλεπίδραση των πολιοϊών με τον κυτταρικό υποδοχέα. **A:** μοντέλο του PVR όπου φαίνονται οι Ig-like περιοχές. Ο υποδοχέας έρχεται σε επαφή με τον ιό μόνο μέσω της περιοχής 1. Επίσης φαίνονται οι κύριοι βρόγχοι που συμμετέχουν στην επαφή [11]. **B:** Αναδημιουργία εικόνας του πολιοϊού τύπου 1 και η διαλυτή μορφή του PVR, απουσία των διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών περιοχών. Η περιοχή 1 του PVR συνδέεται στην αύλακα του ιού. Υπάρχουν 60 θέσεις πρόσδεσης σε κάθε ιικό καψίδιο. Τα σύμπλοκα παρήχθησαν με κορεσμένη ποσότητα PVR και όλες οι θέσεις σύνδεσης του καψιδίου είναι κατειλημμένες [11].

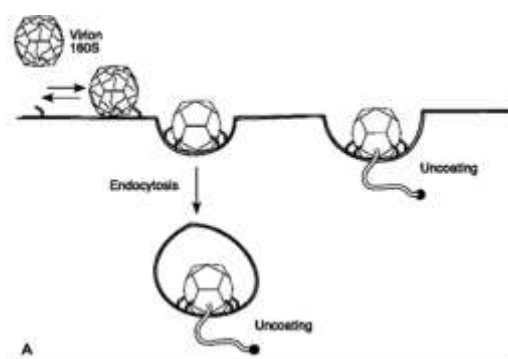
γνωστό ότι έρχονται σε επαφή με τους πολιοϊούς. Η απουσία θέσης σύνδεσης πολιοϊών σε αυτά τα μόρια PVR εξηγεί γιατί η μόλυνση των πολιοϊών είναι περιορισμένη στους πίθηκους.

Ο PVR είναι ένα μόριο προσκόλλησης που συμμετέχει στο σχηματισμό ενώσεων προσκόλλησης μέσω της αλληλεπίδρασης με την νεκτίνη-3, μια πρωτεΐνη που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη [91]. Ο PVR είναι επίσης ένα μόριο αναγνώρισης για τα NK (natural killer) κύτταρα και αλληλεπιδρά με το CD226 και το CD96 των NK κυττάρων διεγείροντας την κυτοτοξική τους ενεργότητα [20,53].

Οι αύλακες των πολιοϊών είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Μετάλλαξη των αμινοξέων που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς [32,33,63,80]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.2 τα μοντέλα αλληλεπίδρασης των ιών με τους υποδοχείς τους έδειξαν ότι μόνο η περιοχή 1 του PVR διεισδύει στην αύλακα. Αρχικά πιστεύονταν ότι οι αύλακες των πολιοϊών ήταν πολύ βαθιές και στενές για να επιτρέψουν διείσδυση από μόρια αντισωμάτων, τα οποία περιέχουν παρακείμενες περιοχές ανοσοσφαιρινών [110]. Αυτός ο φυσικός φραγμός πιστεύονταν ότι έκρυβε κρίσιμα αμινοξέα για την δέσμευση των υποδοχέων από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο,

έπειτα από μελέτες φαίνεται ότι το σχήμα της αύλακας των πολιοϊών δεν παίζει ενδεχομένως κάποιο ρόλο στο κρύψιμο του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η αλληλεπίδραση του πολιοϊού με τον υποδοχέα του οδηγεί σε μείζονες δομικές αλλαγές του ιού. Τα επακόλουθα σωματίδια που ονομάζονται *altered* ή *σωμάτια A*, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική πρωτεΐνη του καψιδίου VP4. Επιπροσθέτως, το N-άκρο της VP1, που συνήθως βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στην επιφάνεια του σωματίου A [51]. Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματία A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του πολιοϊού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση του πολιοϊού που οδηγούν στην απόδυσή του επάγονται από τον PVR.



Εικόνα 3.1.3: Μοντέλο εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ιοσωμάτιο δεσμεύεται στον PVR και υφίσταται μια αλλαγή στην διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωματίων A. Τα σωματία αυτά, τα οποία είναι ενδιάμεσα εισόδου, είναι υδρόφοβα και έχουν χάσει την VP4. Το N-άκρο της VP1, κανονικά στο εσωτερικό του καψιδίου, έχει μετατοπιστεί στην επιφάνεια. Το ιικό RNA που φαίνεται σαν καμπυλωτή γραμμή εξέρχεται από το σωματίο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων.

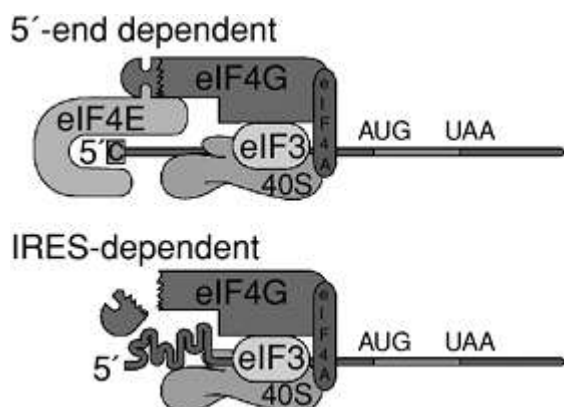
Δεν είναι γνωστό εάν η VP4 που απελευθερώνεται από το ιικό καψίδιο εγκαταλείπει το κύτταρο ή συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου. Είναι όμως ξεκάθαρο ότι η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται στα αρχικά στάδια της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ένας ιός που φέρει μετάλλαξη στο 28^ο αμινοξύ της VP4 μπορεί να συνδεθεί σε κύτταρα και να μετατραπεί σε σωματίο A, αλλά μπλοκάρεται σε επακόλουθο στάδιο κατά την είσοδο του ιού [90].

3.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-κεφαλής, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [5]. Ο καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [75,106]. Το εύρημα αυτό οδήγησε στην διαπίστωση ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει την εσωτερική σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES (Internal Ribosome Entry Site)*.

Τα IRES των ιών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε ομάδες με βάση ένα αριθμό κριτηρίων όπως η αρχική αλληλουχία, η δευτεροταγής δομή, η τοποθεσία του κωδικονίου έναρξης και η ενεργότητα σε διάφορα κύτταρα. Οι πολιοϊοί φέρουν IRES που ανήκει στην πρώτη ομάδα. Στα τύπου I IRES το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται 50 με 100 νουκλεοτίδια πριν το 3'-άκρο του IRES.

Η έναρξη της μετάφρασης μέσω του τύπου I IRES περιλαμβάνει τη σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο IRES, ακολουθούμενη από ανίχνευση του κωδικονίου έναρξης από την υπομονάδα 40S. Η 40S υπομονάδα μπορεί να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, ή στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με μεταφραστικές πρωτεΐνες έναρξης. Στην δεύτερη περίπτωση, η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με την eIF3 συνδεδεμένη στην C-τελική περιοχή της eIF4G, που συνδέεται απευθείας στο IRES (εικόνα 3.2.1).



Εικόνα 3.2.1: Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Πάνω φαίνεται η 5'-άκρο εξαρτώμενη έναρξη ενώ κάτω φαίνεται η IRES-εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης όπου το 5' άκρο δεν απαιτείται. Το eIF3-40S σύμπλοκο στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το IRES.

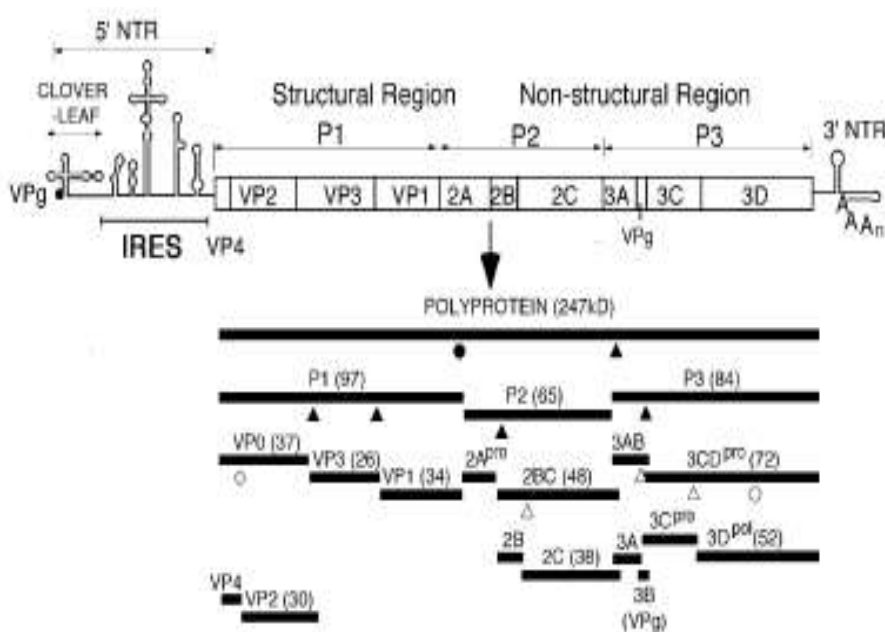
Καμία κυτταρική πρωτεΐνη δεν έχει βρεθεί να είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των ιικών IRES. Μια κοινή ιδιότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών που χρειάζονται για την δράση του IRES είναι ότι συνδέονται στο RNA και σχηματίζουν πολυμερή που έρχονται σε επαφή με το IRES σε πολλαπλά σημεία. Η παρατήρηση αυτή έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τέτοιες πρωτεΐνες μπορούν να δρουν ως RNA συνοδοί (chaperones), διατηρώντας το IRES σε δομή τέτοια που επιτρέπει την άμεση σύνδεση στο μηχανισμό μετάφρασης [69].

Οι πρωτεΐνες των πολιοϊών συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το ιικό θετικής πολικότητας RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (*in cis*) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες *in cis* ή *in trans* (διαμοριακές). Το γένωμα των πολιοϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεϊνάσες: την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro}.

Στα κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό το αρχικό τεμάχισμα της πολυπρωτεΐνης μεταξύ P1 και P2 γίνεται από την 2A^{pro}. Στην πρόδρομη πρωτεΐνη των πολιοϊών η θέση τεμαχισμού για την 2A^{pro} είναι μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Η 3C^{pro} είναι η πρωτεϊνάση που κάνει τον αρχικό τεμαχισμό μεταξύ 2C και 3A περιοχής. Σε αντίθεση με την 2A^{pro}, η 3C^{pro} τεμαχίζει και σε δεύτερο στάδιο τα P1 και P2 πρόδρομα μόρια. Η 3C^{pro} των πολιοϊών τεμαχίζει μόνο διπεπτίδια Gln-Gly.

Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 2A^{pro} είναι ενεργές στο πολυπεπίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με αυτό-τεμαχισμό. Αφού απελευθερωθούν οι πρωτεϊνάσες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Ο αρχικός τεμαχισμός στον καταρράκτη επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης ξεκινάει με την απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2A^{pro}. Στη συνέχεια η 3CD^{pro} απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Η πρωτεϊνάση αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, κάνει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον τύπου 1 πολιοϊό πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3C^{pro}. Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 3CD^{pro} επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. 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. Η 3D^{pol} αλληλουχία μέσα στην 3CD^{pro} απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το 3C^{pro} μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Η παρουσία πολλαπλών δράσεων σε μια μοναδική πρωτεΐνη δεν υπάρχει στις ευκαρυωτικές πρωτεϊνάσες και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ιικών γενομάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί.



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

3.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Αν και η διαδικασία της αντιγραφής του πολιοϊού είναι ένα αντικείμενο μελέτης για τα τελευταία χρόνια, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ένα απλό μοντέλο της αντιγραφής θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+)→σύνθεση RNA(-)→RF→ σύνθεση RNA(+)→RI→ RNA(+) όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους

και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών.

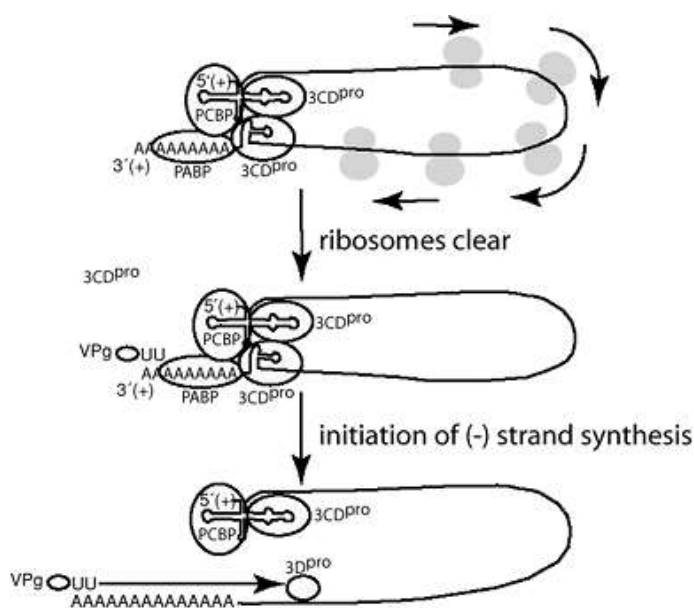
Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού ($3D^{pol}$) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης $3CD^{pro}$, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεΐνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης.

Η $3D^{pol}$ είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η $3D^{pol}$ δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους πολιοϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg. Η VPg είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των πολιοϊών [98,108,121]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [89,92].

Η σύνθεση του ιικού mRNA και του ιικού γενώματος γίνονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών. Μία μόλυνση με πολιοϊό οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι το ΕΔ και το σύμπλεγμα Golgi καταστρέφονται κατά τη διαδικασία αυτή και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης [37,112]. Η ιική σύνθεση του RNA γίνεται στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών [12,30,45]. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των ιικών πρωτεϊνών αντιγραφής του RNA διασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής και γι αυτό το λόγο αυξάνονται τα επίπεδα δραστηριότητας των αντιδράσεων της αντιγραφής.

Τουλάχιστον δύο ιικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανώδη κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την $3D^{pol}$ και την $3CD^{pro}$, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [44].

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή και των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η cloverleaf δομή (τριφυλλίου) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει πότε το RNA αντιγράφεται και πότε μεταφράζεται [55]. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η σύνδεση της πολυ- $r(C)$ -δεσμευτικής πρωτεΐνης ($PCBP$ -βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) στην δομή αυτή επάγει τη μετάφραση. Όταν η $3CD^{pro}$ συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει την μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα.



Εικόνα 3.3.1: Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου. Οι ικές πρωτεΐνες $3CD^{pro}$, VPg , $PABP$ και $PCBP$ αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τα άκρα του RNA, σχηματίζοντας ένα κυκλικό RNP. Κατά την αναστολή της μετάφρασης, αρχικά, απομακρύνονται τα ριβοσώματα από το ικό RNA. Στη συνέχεια, η VPg - $pUpU$ αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του ικού RNA και σχηματίζει το κυκλικό πρωταρχικό RNA σύμπλοκο αντιγραφής. Η σύνθεση του (-)RNA κλώνου ξεκινάει με την επιμήκυνση του VPg - $pUpU$ από την $3D^{pol}$.

3.4 Κασιδίωση και απελευθέρωση νέων ικών σωματιδίων

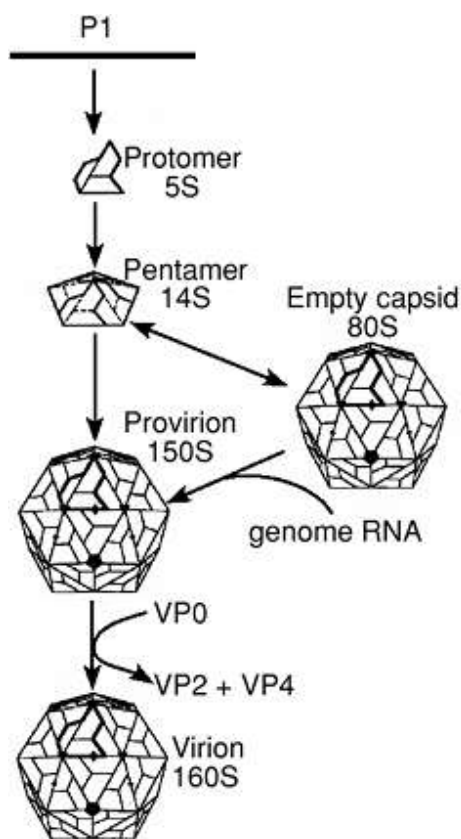
Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, της πρόδρομης κασιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β -βαρελιού και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Όταν η P1 απελευθερώνεται από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί $VP0$ - $VP3$ και $VP3$ - $VP1$ τεμαχίζονται από την πρωτεϊνάση $3CD^{pro}$. Αυτές οι θέσεις τεμαχισμού βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β -βαρελίων. Στο ώριμο κανίδιο, το

καρβοξυτελικό άκρο της VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο τους βρίσκεται στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Η επεξεργασία αυτή παράγει το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δηλαδή δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο των VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή στη συνέχεια συγκροτούν σχηματίζοντας ένα πενταμερές, με συντελεστή καθίζησης 14S.

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 + VP2. Η πρωτεΐνωση που κάνει αυτόν τον τελευταίο τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που κόβεται βρίσκεται στο εσωτερικό των άδειων καψιδίων και ώριμων ισοωματίων και δεν είναι προσιτός σε ικές ή κυτταρικές πρωτεΐνάσες.

Η διαδικασία καψιδίωσης του πολιοϊού είναι ειδική, καταλήγοντας στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι των ικών mRNA, αρνητικών ικών RNA ή οποιοδήποτε κυτταρικό RNA [95,96].

Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των πολιοϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι πολιοϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή με λύση του [117].



Εικόνα3.4.1: Μορφογένεση του πολιοϊού. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται σε VP0+VP3+VP1 πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν το πρωτομερές 5S. Τα πρωτομερή σχηματίζουν τα πενταμερή 14S και αυτά με τη σειρά τους τα άδεια ικά καψίδια 80S. Τέλος, το (+)RNA εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2+VP4 σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 160S ισοωμάτιο.

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το πεδίο των πολιοϊών είχε την τύχει να έχει περισσότερα του ενός εξαιρετικά εμβόλια, καθώς ήταν διαθέσιμα τόσο το νεκρό ενδομυϊκό εμβόλιο του Salk όσο και το εξασθενημένο από στόματος εμβόλιο του Sabin. Και τα δύο εμβόλια οδήγησαν στην παραγωγή αντι-PV αντισωμάτων με την επακόλουθη προστασία από τη νόσο [93]. Παρόλο που υπήρχε μια συνεχόμενη προάσπιση του ενός ή του άλλου εμβολίου για αρκετά χρόνια, είναι ξεκάθαρο ότι το καθένα έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Τώρα, που τα κρούσματα πολιομυελίτιδας φθίνουν συνεχώς, έχουν αναπτυχθεί νέες οδηγίες στις ΗΠΑ από το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) και την ACIP (Συμβουλευτική Επιτροπή Εφαρμογών Ανοσοποίησης), με μια στροφή από το στοματικό εμβόλιο (OPV) στην αποκλειστική χρήση του ενδομυϊκού εμβολίου (IPV) (σε ηλικία 2 μηνών, 4 μηνών, 6 έως 18 μηνών και 4 έως 6 χρονών). Το κύριο αναμενόμενο όφελος της αλλαγής αυτής ήταν η εξάλειψη του VAPP (εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα – Vaccine-associated paralytic poliomyelitis) και μελέτες στη συνέχεια απέδειξαν ότι αυτό ήταν επιτυχές [4].

Το πρόγραμμα εμβολιασμού κατά των πολιοϊών ήταν επιτυχές. Ως αποτέλεσμα της χρήσης του OPV, δεν προέκυψε κανένα περιστατικό παραλυτικής πολιομυελίτιδας από αγρίου τύπου πολιομυελίτιδα στις ΗΠΑ από το 1980 ή σε ολόκληρη την Αμερική από το 1991, θέτοντας έτσι ένα θεωρητικό και πρακτικό πλαίσιο για την παγκόσμια εξάλειψη του πολιοϊού. Η απόλυτη εξάλειψη του πολιοϊού φαίνεται αληθοφανής με δεδομένο τις βιολογικές ιδιότητες και τη διαθεσιμότητα δραστικών εμβολίων. Η επιβίωση του πολιοϊού εξαρτάται από σχεδόν συνεχή επαφή για τη μεταφορά του από άτομο σε άτομο, καθώς δεν υπάρχουν μη ανθρώπινες δεξαμενές και καθώς ο ιός αντέχει για ένα σχετικά μικρό χρόνο στο περιβάλλον. Η ανοσοποίηση ρουτίνας είτε με OPV ή με IPV στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες ήταν επιτυχής στην εξουδετέρωση της τοπικής κυκλοφορίας του ιού. Όμως πολλές αναπτυσσόμενες χώρες παρέμεναν ενδημικές επί δεκαετίες μετά την εισαγωγή των εμβολίων κατά των πολιοϊών. Λίγο περισσότερο από δύο δεκαετίες μετά την διαθεσιμότητα του OPV, επιχειρήθηκε η εξάλειψη της νόσου, ξεκινώντας από την Αμερική [38].

Το 1988, ο ΠΟΥ, βασιζόμενος εν μέρει στην ταχεία πρόοδο των ενεργειών της εξάλειψης στην Αμερική, υιοθέτησε μια ανάλυση που συγκαλούσε για την

παγκόσμια εξάλειψη του πολιοϊού πριν το τέλος του 20^{ου} αιώνα. Η ανάλυση αυτή επαναβεβαιώθηκε το Μάιο του 1999 και του 2004 και παροτρύνθηκε μια επιτάχυνση των ενεργειών με συγκεκριμένη εστίαση στις απομείναντες ενδημικές περιοχές. Οι ενέργειες αυτές περιλαμβάνουν επιπρόσθετες περιόδους της Εθνικής Ημέρας Εμβολιασμού, εκτεταμένη επιτήρηση στις κοινωνίες υψηλού κινδύνου και «ξεκαθάρισμα» στις εστιακές δεξαμενές.

Μια αναφορά προόδου πάνω στις παγκόσμιες προσπάθειες για εξάλειψη του PV παρέχεται στο διαδίκτυο του ΠΟΥ (www.polioeradication.org). Τέσσερα βασικά συστατικά περιλαμβάνει η στρατηγική της εξάλειψης των PV [67]. Πρώτο είναι η επίτευξη και η διατήρηση των υψηλών επιπέδων της ανοσοποίησης ρουτίνας. Με τις επιταχυνόμενες ενέργειες του επεκταμένου προγράμματος ανοσοποίησης του ΠΟΥ, η κάλυψη ρουτίνας, με τρεις δόσεις του OPV σε παιδιά κάτω του ενός έτους, έφτασε κοντά στο 90% των παιδιών παγκοσμίως το 1990. Ωστόσο, η διατήρηση αυτών των επιπέδων, ιδιαίτερα σε περιοχές χωρίς κρούσματα πολιοϊών, δεν ήταν εντελώς επιτυχής και προέκυψε μια διάβρωση της ανοσοποίησης ρουτίνας. Δόθηκε έμφαση για τη σημασία της ανοσοποίησης ρουτίνας για την εξάλειψη και βρίσκονται σε εξέλιξη επιπρόσθετες ενέργειες για τη βελτίωση της απόδοσης στις περιοχές αυτές [8].

Λόγω της αδυναμίας της ανοσοποίησης ρουτίνας με σκοπό τον έλεγχο της κυκλοφορίας των PV στις αναπτυσσόμενες χώρες, το δεύτερο στοιχείο της στρατηγικής είναι η χρήση του θεσμού της Εθνικής Ημέρας Εμβολιασμού για την διανομή εμβολίων σε όλα τα παιδιά κάτω των 5 ετών σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως από μια έως δυο ημέρες [13]. Η μαζική ανοσοποίηση παρεμβάλλεται με την εξάπλωση του αγρίου τύπου PV μέσω μιας γρήγορης αύξησης στην ανοσία του πληθυσμού και αιφνίδιας μείωσης των *αλυσίδων μετάδοσης* σε μια χώρα. Η στρατηγική αυτή χρησιμοποιήθηκε σε πολλές αρχικές προσπάθειες ανοσοποίησης το 1960 και εφαρμόστηκε επιτυχώς στην Κούβα για να κατορθώσει και να διατηρήσει την εξουδετέρωση των πολιοϊών από τη χώρα αυτή ακολουθώντας τρεις χρονιές αλληπάληλων ετήσιων εκστρατειών [109].

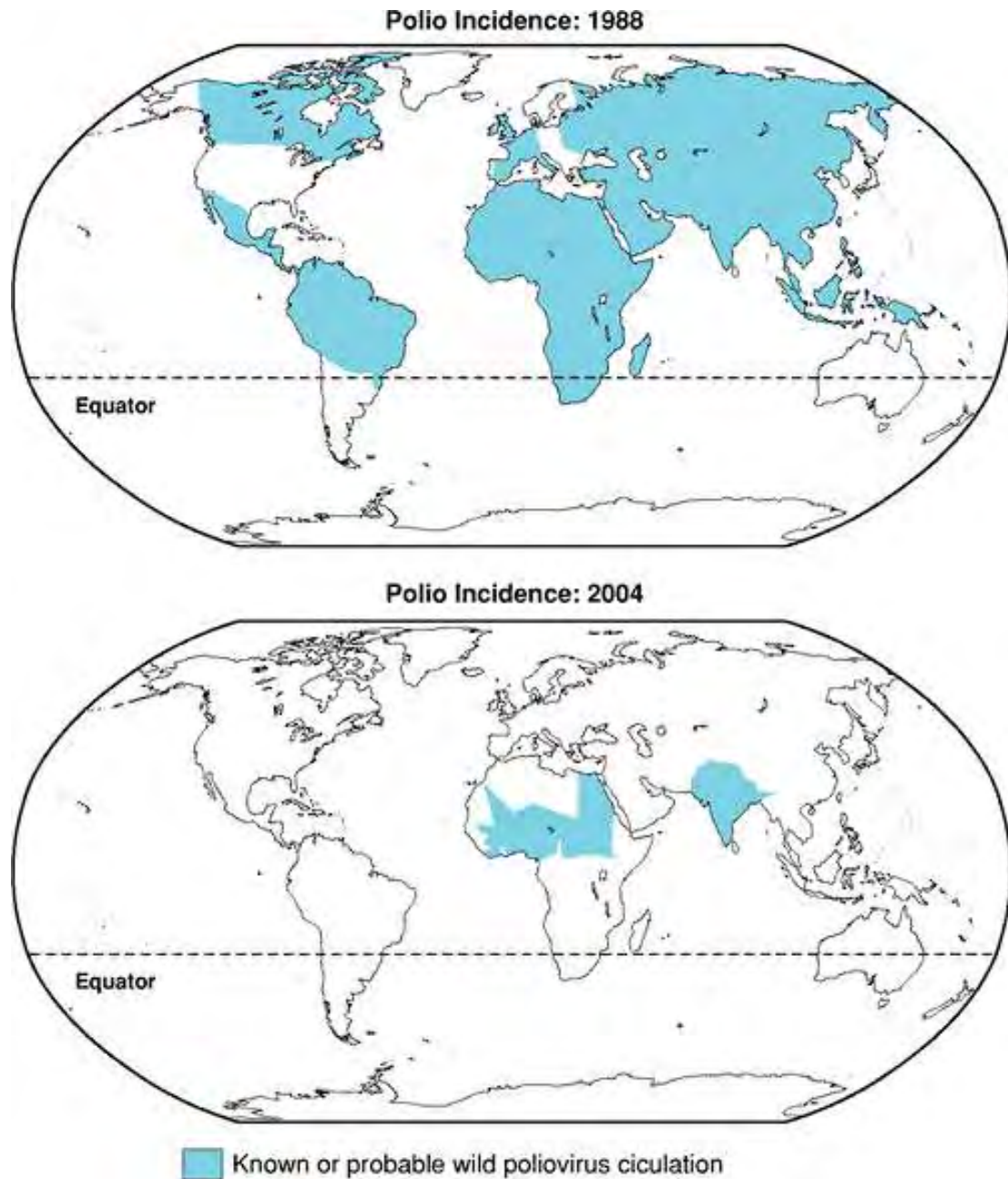
Το τρίτο βασικό στοιχείο είναι η χρήση επίβλεψης βασισμένη σε περιπτώσεις οξείας χαλαρής παράλυσης [14]. Μια από τις μείζονες διαφορές μεταξύ του προγράμματος της εξάλειψης του ιού *smallpox* και των προσπαθειών εξάλειψης των PV είναι τα χαμηλά επίπεδα των κλινικών νοσημάτων που ακολουθούν την μόλυνση από τον PV. Επειδή λιγότερο του 1% των ευαίσθητων μολυσμένων ατόμων θα αναπτύξουν παραλυτική ασθένεια, οι περισσότερες μολύνσεις δεν αναγνωρίζονται

κλινικά. Για να βελτιωθεί η ευαισθησία ανίχνευσης μόλυνσης με PV και να επιτευχθεί ένα πρακτικό σύστημα, αναπτύχθηκε μια επιτήρηση γύρω από τη σπάνια κλινική παρουσίαση της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Το υπόλοιπο μέρος της επιτήρησης εστιάστηκε στην ανίχνευση του ιού. Συγκεντρώθηκαν δυο δείγματα κοπράνων από όλες τις περιπτώσεις οξείας χαλαρής παράλυσης και δοκιμάστηκαν σε ένα παγκόσμιο δίκτυο εργαστηρίων έτσι ώστε να εκπαιδευθούν κατάλληλα για την ταχεία απομόνωση των πολιοϊών [66]. Τα πλεονεκτήματα του συστήματος επιτήρησης είναι η απλότητα, η πρακτικότητα και η ισορροπημένη ευαισθησία για την ανίχνευση των PV. Τα μειονεκτήματα όμως είναι οι απαιτήσεις για τη γρήγορη συγκέντρωση, μεταφορά και δοκιμή ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε υψηλού ποιοτικού επιπέδου εργαστήρια .

Το τελευταίο στοιχείο της στρατηγικής εξάλειψης του ιού είναι η χρήση των *εκκαθαριστικών ενεργειών* [39]. Η στρατηγική αυτή εστιάζει σε περιοχές ή χώρες όπου οι προηγούμενες ενέργειες είχαν μειώσει αρκετά τον αριθμό των περιπτώσεων μολύνσεων με PV και η επιτήρηση είχε εντοπίσει τις εναπομείναντες δεξαμενές μετάδοσης. Τότε εντείνονται οι ενέργειες ανοσοποίησης σε αυτές τις κοινωνίες στόχους όπου κυκλοφορεί ο ιός. Οι ενέργειες αυτές περιλαμβάνουν συνήθως αναζητήσεις στις κοινωνίες αυτές για παιδιά και ακόμα και εμβολιασμούς από σπίτι σε σπίτι [7].

Τα στοιχεία αυτά της στρατηγικής εξάλειψης των PV αποδείχθηκαν επιτυχημένα σε πολλά σημεία του κόσμου. Από τη στιγμή που ξεκίνησε το πρόγραμμα, πολλές χώρες απαλλάχθηκαν από την κυκλοφορία εντόπιων PV. Αυτό φαίνεται από την εικόνα 4.1, όπου το 1988 ο PV βρισκόταν σε όλες τις ηπείρους (εκτός από την Αυστραλία), με εκτιμήσεις για πάνω από 350.000 περιστατικά κάθε χρόνο. Το 2005, ο αριθμός των χωρών με αποδεδειγμένα ή εκτιμώμενα περιστατικά πολιοϊών ήταν μόνο 15 και η Αμερική, Ευρώπη και η Άπω Ανατολή ήταν πιστοποιημένα απαλλαγμένες από PV [9]. Το 2003, οι μόνες έξι χώρες με ενδημικά περιστατικά PV βρίσκονταν στην Νότια Ασία (Ινδία, Πακιστάν και Αφγανιστάν), Αφρική (Νιγηρία, Νίγηρας και Αίγυπτος). Ως αποτέλεσμα της αδιαφορίας πολλών χωρών και της αναστολής της ανοσοποίησης στις βόρειες περιοχές της Νιγηρίας από το 2003 έως το 2005, ένας μοναδικός γενότυπος του πολιοϊού τύπου 1 εξαπλώθηκε σε 18 χώρες της δυτικής, κεντρικής και ανατολικής Αφρικής, στη Μέση Ανατολή και μέχρι την Ινδονησία. Σε αρκετές από αυτές τις χώρες, η μετάδοση του ιού συνεχίστηκε για περισσότερο από 6 μήνες, κάτι που σήμαινε ότι η κυκλοφορία των

PV ανασυστάθηκε. Έτσι εντάθηκαν οι ενέργειες ελέγχου της περαιτέρω εξάπλωσης και εξάλειψης του ιού σε αυτές τις περιοχές που άλλοτε ήταν απαλλαγμένες από τον PV [26].



Εικόνα 4.1: Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει την κυκλοφορία του άγριου τύπου PV το 1998 και το 2004. Πηγή: WHO-Centers for Disease Control, unpublished data.

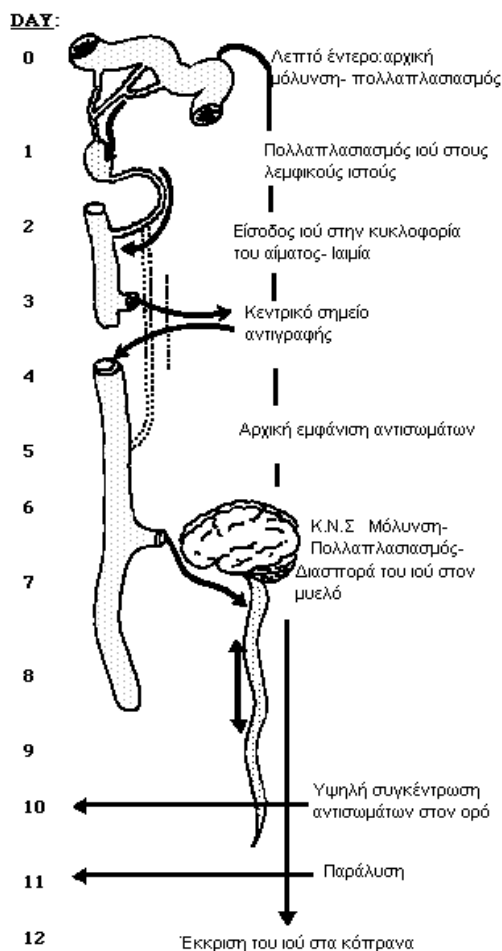
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Σχετικά με την παθογένεια των πολιοιών έχουν προταθεί κυρίως τρία μοντέλα [88]:

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

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

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



Εικόνα 5.1: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοιών [86]

6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Οι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία των πολιοϊών είναι δύο: ι) οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιικού RNA και ιι) ο μοριακός ανασυνδυασμός [40].

6.1 Μεταλλάξεις

Η μοριακή βάση του υψηλού ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA βρίσκεται i) στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια και ii) στην απουσία μηχανισμών για την επιδιόρθωση των λαθών που έχουν γίνει κατά την αντιγραφή. Έτσι, οι πολιοϊοί εμφανίζουν έναν υψηλό ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων ($6,3 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των λυτικών RNA ιών. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει τις εξής συνέπειες [120]:

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

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι transitions (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι transversions (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες [48].

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των πολιοϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών (π. χ στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών

ενζύμων). Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές δεν είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Επίσης, cis-acting γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ική αντιγραφή (cloverleaf και CRE) ή στην ική μετάφραση (IRES) δέχονται ακόμα πιο λίγες μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής τους. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που ερμηνεύει τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης των διαφόρων γενωμικών περιοχών είναι ο ομοτυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών συνυπαρχόντων γενεαλογιών, ο οποίος όμως δεν μπορεί να αναγνωριστεί. Η ευκολία με την οποία συμβαίνει ο ετεροτυπικός ανασυνδυασμός δείχνει ότι ο ομοτυπικός συμβαίνει ακόμα πιο συχνά [28].

Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση των μεταλλάξεων σε έναν ικό πληθυσμό είναι λιγότερο κατανοητοί. Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη οικολογική θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη. Οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις που οδηγούν σε αλλαγές στο "νόημα" των κωδικονίων (μη-συνώνυμες μεταλλάξεις) είναι λιγότερο πιθανό να είναι ουδέτερες σε σύγκριση με τις υποκαταστάσεις που δεν επηρεάζουν το "νόημα" των κωδικονίων (συνώνυμες μεταλλάξεις). Η εγκαθίδρυση μεταλλάξεων που παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα είναι εύκολα κατανοητή στα πλαίσια της θετικής επιλογής του Δαρβίνου. Αντίθετα, μεταλλάξεις που παρέχουν ένα επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται από την αρνητική επιλογή [40].

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

απαραιτήτως προσαρμοστικού χαρακτήρα αλλά είναι πιθανόν ότι οφείλονται στην τυχαία δειγματοληψία [40].

6.2 Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών αρχικά περιγράφηκε για τους πολιοϊούς από τον Hirst το 1962. Επακόλουθες μελέτες προσδιόρισαν ότι η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει με συχνότητα ισότιμη με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή, και επίσης ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων και από την απόσταση μεταξύ των γενετικών δεικτών. Ο King το 1988 υπολόγισε ότι το 10-20% των ιικών γενωμάτων υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού [43].

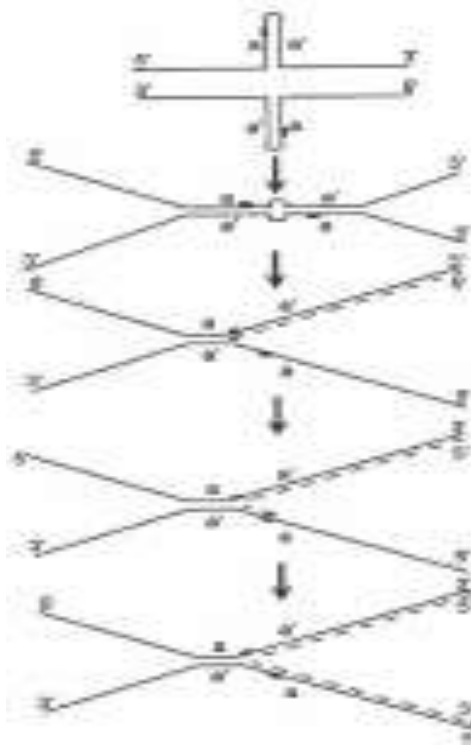
Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών: i) βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στην διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου, ii) συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη και iii) επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή και ακόμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη [120].

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

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

ανασυνδυασμό όπως π. χ σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός είναι πιο πιθανός στις μη-κωδικές περιοχές του ιικού γενώματος. 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 κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, **ii)** οι RNA (-) βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία.

Όσον αφορά τον αντιγραφικό μηχανισμό, πρέπει να υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που διευκολύνουν τον τερματισμό της RNA σύνθεσης πάνω στο πρώτο εκμαγείο, τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου κλώνου (πιθανόν μαζί με την RNA πολυμεράση) και την αναγνώριση της σωστής θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο. Ο πρώτος τερματισμός της RNA σύνθεσης είναι πιθανόν ότι προκαλείται από κάποιες δευτεροταγές δομές του εκμαγείου ή/και από την ενσωμάτωση ενός μη-συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου. Ο εμπλουτισμός μιας RNA περιοχής με U (και πιθανόν A) είναι πιθανόν ότι διευκολύνει τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου RNA κλώνου μετά τον πρώτο τερματισμό [2]. Είναι πιθανόν ότι η ακριβής αναγνώριση της θέσης σύνδεσης



Εικόνα 6.2.1.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτο-συμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως *a* και *a'*. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντιθέμενο RNA μόριο [2]

πάνω στο δεύτερο εκμαγείο εξασφαλίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του 3' άκρου του αναπτυσσόμενου κλώνου και της συμπληρωματικής περιοχής του δεύτερου εκμαγείου. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται πως εμπλέκει μόνο λίγα νουκλεοτίδια και έτσι η σύνδεση μπορεί εύκολα να είναι μη ακριβής λόγω των πολλαπλών μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο ιικό RNA. Ένας παράγοντας που ενδεχομένως μπορεί να φέρει τις κατάλληλες περιοχές των δύο

εκμαγείων κοντά είναι ο σχηματισμός ενός ετεροδιμερούς από ανεστραμμένες επαναλήψεις που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές φουρκετών (εικόνα 6.2.1.1) [1].

2) ο μη-αντιγραφικός μηχανισμός (nonreplicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από την σύνδεση προσυντεθειμένων RNA τμημάτων προερχόμενων από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Θεωρητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκύπτουν αυτά τα RNA τμήματα: i) από την πρόωμη λήξη της αντιγραφής, ii) από την αποικοδόμηση του ιικού RNA από κυτταρικές RNases, iii) από δραστικότητα ριβοενζύμου του ίδιου του ιικού RNA [2]. Κατόπιν, η σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκει είτε μία RNA λιγάση είτε κάποια δραστικότητα ριβοενζύμου [1].

7. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

7.1 IPV

Το απενεργοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine) προέκυψε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεύδη. Το IPV είναι ασφαλές και επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στα θετικά του προστίθεται και το στοιχείο ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια και ανοσοκαταστολή. Δυστυχώς όμως, το IPV επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία. Επίσης είναι ακριβότερο σε σχέση με το OPV και εμφανίζει μειωμένη γαστρεντερική ανοσία σε σχέση με τη φυσική μόλυνση. Τέλος, εγκυμονούν ορισμένοι κίνδυνοι καθώς για την παραγωγή του χρησιμοποιούνται πολιοϊοί αγρίου τύπου [16].

7.2 OPV

Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A.B Sabin ύστερα από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων *in vitro* και *in vivo* κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin

(P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα άγρια νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41 και P2/P712/56 αντίστοιχα τα οποία απομονώθηκαν από τα κόπρανα υγιών παιδιών. Το εξασθενημένο στέλεχος P3/Sabin (P3/Leon 12a₁, b) προήλθε από το άγριο νευροτοξικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας [52].

Η μοριακή βάση της εξασθένησης (όπου ο ιός καθίσταται λιγότερο ικανός να προκαλεί ασθένεια) ή της μετατροφής των εμβολιακών στελεχών (όπου ο ιός επανακτά την ικανότητα να προκαλεί ασθένεια) έχει μελετηθεί συγκρίνοντας την αλληλουχία του εμβολιακού στελέχους του κάθε οροτύπου με αυτή ενός συγγενούς στελέχους, είτε του προδρόμου του εμβολιακού στελέχους είτε ενός νευρομολυσματικού στελέχους που απομονώθηκε από περίπτωση VAPP (vaccine-associated paralytic poliomyelitis) [16]. Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P3/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P3/Leon/37) σε 11 βάσεις από τις οποίες όμως μόνο οι δύο είναι ισχυροί καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου: μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 472 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 91 της VP3 περιοχής. Επίσης, η αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 6 της VP1 είναι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στον εξασθενημένο φαινότυπο. Στην περίπτωση του εμβολιακού στελέχους P2/Sabin, μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 481 της 5'-NTR περιοχής και μία αμινοξική υποκατάσταση στη θέση 143 της VP1 περιοχής είναι οι κύριοι καθοριστές του εξασθενημένου / νευρομολυσματικού φαινότυπου. Το γένωμα του εμβολιακού στελέχους P1/Sabin διαφέρει από αυτό του προδρόμου του (P1/Mahoney/41) σε 54 βάσεις. Οι καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου του P1/Sabin βρέθηκε ότι κατανέμονται σε όλο το γένωμα καθιστώντας την ανάλυσή τους πιο περίπλοκη από αυτή των άλλων δύο οροτύπων. Μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση στη θέση 480 της 5'-NTR περιοχής και πιθανόν μία δεύτερη στη θέση 189 της ίδιας περιοχής έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Τέσσερις επιπλέον αμινοξικές υποκατάστασεις στην περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στον εξασθενημένο φαινότυπο. Οι δύο από αυτές (τα αμινοξέα 65 της VP4 και 134 VP1) βρίσκονται στο εσωτερικό του ιού καψιδίου ενώ οι άλλες δύο (τα αμινοξέα 106 της VP1 και 225 της VP3) βρίσκονται στο εξωτερικό του. Επιπλέον ασθενείς καθοριστές του εξασθενημένου/νευρομολυσματικού φαινότυπου βρίσκονται στο 3'τελικό άκρο του ιικού γενώματος και συγκεκριμένα στη θέση 73 της 3D^{pol} περιοχής.

Το OPV έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με το IPV. Κατ' αρχήν το OPV χορηγείται από το στόμα και όχι σε ενέσιμη μορφή όπως γίνεται στην περίπτωση του IPV. Επιπλέον το OPV επάγει μία ισχυρή και μεγάλης διάρκειας ανοσολογική απόκριση περιλαμβανομένης τοπικής ανοσίας στο έντερο. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του OPV μπορεί να θεωρηθεί η διασπορά των ζωντανών στελεχών του εμβολίου από τα εμβολιασμένα άτομα σε άλλα άτομα του στενού περιβάλλοντός τους με αποτέλεσμα την επίτευξη ευρύτερης ανοσοποίησης. Γι' αυτούς τους λόγους το OPV επικράτησε έναντι του IPV στο μεγαλύτερο μέρος του κόσμου και βοήθησε στην εξάλειψη της πολιομυελίτιδας από τις περισσότερες χώρες [41]. Το OPV όμως, έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά απαιτείται η χρήση του εμβολίου πρώτα σε πιθήκους για δοκιμές ασφαλείας. Επίσης, αντενδείκνυται για άτομα με ανοσοανεπάρκεια ή ανοσοκαταστολή. Τέλος, επειδή πρόκειται για ζωντανό ιό υπάρχει η πιθανότητα πρώτον να μεταλλαχθεί σε νευροτοξική μορφή, προκαλώντας εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) και δεύτερον να οδηγήσει στην εμφάνιση εμβολιο-προερχόμενων πολιοϊών (VDPV) προκαλώντας εκ νέου ξέσπασμα πολιομυελίτιδας.

7.3 VAPP – VDPV

Σε έναν πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων ο εμβολιασμός με το OPV συνδέεται με την εμφάνιση εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) η οποία επηρεάζει είτε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, λόγω σημειακών μεταλλάξεων και γενετικού ανασυνδυασμού. Πράγματι, νευρομολυσματικά στελέχη που προέρχονται από τα αντίστοιχα Sabin εμβολιακά στελέχη έχουν βρεθεί στο έντερο υγιών εμβολιασμένων ατόμων και στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών με VAPP. Νευρομολυσματικά στελέχη προερχόμενα από τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις (περίπου το 88% των περιπτώσεων) πιο συχνά σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το στέλεχος PV-1/Sabin. Προφανώς αυτό σχετίζεται με τον μεγαλύτερο αριθμό των μεταλλάξεων που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στο στέλεχος PV-1/Sabin σε σύγκριση με τα PV-2/Sabin και PV-3/Sabin εμβολιακά στελέχη [41].

Ο παθογόνος χαρακτήρας αυτών των νευρομολυσματικών στελεχών σχετίζεται γενικά με δύο ειδών μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στα εμβολιακά στελέχη των πολιοϊών έχει βρεθεί ότι αντιστρέφονται (μέσω μεταλλάξεων στα σημεία που αποτελούν τους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου) ή καταστέλλονται (μέσω μεταλλάξεων σε άλλα σημεία εκτός των καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου) σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από VAPP περιπτώσεις. Η απομόνωση νευρομολυσματικών στελεχών από VAPP περιπτώσεις χωρίς επαναμεταλλάξεις σε σημαντικούς καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου έχει οδηγήσει στην άποψη ότι πιθανόν οι επαναμεταλλάξεις δεν είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση της ασθένειας. Είναι πιθανόν ότι άλλες μεταλλάξεις (όπως μεταλλάξεις καταστολής ή μεταλλάξεις στις αντιγονικές θέσεις) θα μπορούσαν να αυξήσουν την νευρομολυσματικότητα ή να συμμετέχουν με κάποιο τρόπο στην εγκαθίδρυση της ασθένειας [52].

Ο ανασυνδυασμός είναι επίσης ένα συχνό γεγονός σε άτομα εμβολιασμένα με το OPV οδηγώντας σπάνια σε VAPP. Η ανάλυση VAPP περιπτώσεων παρουσιάζει ανασυνδυασμούς πολιοϊών με μία συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 2 κατά 50% και κατά 67% συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 3. Αντίθετα η συμμετοχή στελεχών Sabin τύπου 1 σε ανασυνδυασμούς είναι πιο σπάνια [82]. Πιθανόν ο αιτιολογικός παράγοντας αυτού του φαινομένου είναι ο μικρότερος χρόνος παραμονής στο έντερο των στελεχών Sabin τύπου 1 σε σύγκριση με τα στελέχη Sabin τύπου 2 και τύπου 3. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι ο ανασυνδυασμός είναι κυρίως διατυπικός και συμβαίνει: i) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin [35,60], ii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου [36,56] και iii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (NPEVs: non-polio Enteroviruses) [21]. Μυστήριο παραμένει ακόμα ο εντοπισμός των θέσεων ανασυνδυασμού σε επιλεγμένες περιοχές του γενώματος των πολιοϊών. Έτσι έχει βρεθεί ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κυρίως σε εκείνες τις περιοχές του ιικού γενώματος που κωδικοποιούν τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (P2 και P3 περιοχές) [35,62]. Μία πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου στηρίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το καψίδιο είναι οι πιο ποικιλόμορφες μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών (δυσμενή συνθήκη για ομόλογο ανασυνδυασμό) και επιπλέον η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων του καψιδίου είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία των προδρόμων τους. Έτσι οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών προτιμούν τον ανασυνδυασμό στις περιοχές P2 και P3

οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας [42]. Ωστόσο, σε κάποιες πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμός έχει εντοπιστεί στα άκρα της περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο (P1) [15,28,84]. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων στελεχών χαρακτηρίζονται μόνο από μία θέση ανασυνδυασμού, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες έχουν εντοπιστεί πολλαπλά σημεία ανασυνδυασμού [56,72].

Η απομόνωση στελεχών Sabin με παρόμοιες γενετικές τροποποιήσεις τόσο από περιπτώσεις VAPP όσο και από υγιή εμβολιασμένα άτομα οδήγησε στην άποψη ότι παράγοντες του ξενιστή παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας. Πιθανόν, κάποιοι τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσε να ήταν αυτοί που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με την 5'-NTR περιοχή. Επίσης ως παράγοντες του ξενιστή θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι ανοσοανεπάρκειες (π. χ λόγω μόλυνσης με τον HIV). Επιπλέον ενδομυϊκές ενέσεις μέσα σε περίοδο 30 ημερών μετά την έκθεση στο OPV αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση VAPP περιπτώσεων [52]. Ο συνεχής γενετικός χαρακτηρισμός στελεχών πολιοϊών που απομονώνονται από VAPP περιπτώσεις και υγιή άτομα ίσως βοηθήσει στην διαλεύκανση των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων παραγόντων του ιού και του ξενιστή που είναι σημαντικές για την εγκαθίδρυση της πολιομυελίτιδας [52].

Η συνεχιζόμενη χρήση του OPV εμβολίου, εκτός από τους κινδύνους που επιφέρει η VAPP, μπορεί να επιφέρει ξέσπασμα εμβολιοπροερχόμενων πολιοϊών (VDPV). Οι VDPV προέρχονται από το OPV, αλλά διαφέρουν από τα στελέχη του OPV και τους πολιοϊούς που απομονώνονται από άτομα έπειτα από εμβολιασμό με OPV, έχοντας περισσότερες του 1% νουκλεοτιδικές αλλαγές στην κωδική περιοχή της VP1. Τα περισσότερα δείγματα OPV-like και PV από ασθενείς με VAPP φέρουν λιγότερες του 1% νουκλεοτιδικές αλλαγές στην VP1 κωδική περιοχή και γι αυτό το λόγο δεν ταξινομούνται ως VDPV – παρόλο που επανεμφανίζουν νευρομολυσματικότητα – πιθανότατα επειδή η διάρκεια της μόλυνσης είναι μικρή κι επειδή συγκεντρώνονται τυχαίες μεταλλάξεις όπως παρατηρούνται στους VDPV. Οι VDPV μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: α) VDPV που κυκλοφορούν (cVDPV), β) VDPV που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPV) και γ) αμφιλεγόμενοι VDPV (aVDPV) στους οποίους η πηγή της μόλυνσης είναι άγνωστη.

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για την εκτέλεση PCR δοκιμασιών με σκοπό την ανίχνευση και την ταυτοποίηση σπάνιων γενετικών ανασυνδυασμών στη μη δομική περιοχή εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής 11 κλινικά δείγματα, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται, η γενωμική περιοχή στην οποία εντοπίστηκε ο ανασυνδυασμός, ο τύπος του ανασυνδυασμού (δηλαδή μεταξύ ποιών οροτύπων ιών sabin) και η θέση του ανασυνδυασμού.

Δείγμα - Προέλευση	Ανιχνεύσιμος Τύπος ανασυνδυασμού	Ανασυνδυασμός υπό μελέτη	Θέση ανασυνδυασμού	Γενωμική Περιοχή
LK3	S3/S2/S1	2 ^{ος}	4942-4958	2C
LK6	S3/S2/S1	2 ^{ος}	4942-4958	2C
LK10	S3/S2/S1	2 ^{ος}	4942-4958	2C
I34	S2/S1/S2/S1	1 ^{ος}	4984-4994	2C
EP9 (580)	S2/S1		5314-5318	3A
ID	S2/S1		5521-5526	3C
738	S3/S2/S1	1 ^{ος}	5804-5814	3C
I34	S2/S1/S2/S1	2 ^{ος}	5999-6005	3D
IF	S2/S1		6247-6281	3D
EP12 (730)	S2/S1		6337-6362	3D
ENP6	S2/S1		6337-6362	3D
I34	S2/S1/S2/S1	3 ^{ος}	6388-6389	3D
584	S3/S2/S1	2 ^{ος}	7150-7172	3D

Πίνακας 1.1 : Τα κλινικά δείγματα και τα χαρακτηριστικά τους ως προς τον τύπο, τη θέση και τη γενωμική περιοχή του ανασυνδυασμού.

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε erpendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π. χ στο πρώτο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erpendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των erpendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (εικόνα 2.1) οι οποίες περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε erpendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την

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

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

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

3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [24]. Συγκεκριμένα, μέσα σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (4×10^3 μg/ml) (-20 °C) και τέλος 100μl δείγματος από τη φλάσκα. Ακολούθησε vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Τα eppendorf παρέμειναν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

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

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N6) (Bioline) (50nmol/ μl) (2μl/tube), 40mM dNTPs (1μl/tube) και ddH₂O (4μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε ειδικό μηχάνημα. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M DTT (2μl/tube) και RNase out (20units/μl) (0,5μl/tube), RT (Invitrogen) (100units/μl) (0,5μl/tube) και ddH₂O (1μl/tube). Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf , ξανά φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 12 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 42 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

5. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (PRIMERS)

Πριν εφαρμόσουμε την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), πρέπει πρώτα να σχεδιαστούν τα εκκινητικά μόρια από τα οποία θα ξεκινάει η σύνθεση των νέων κλώνων, με σκοπό την ενίσχυση του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

Ο σχεδιασμός αυτός έγινε μέσω του προγράμματος Primer3 (version 0.4.0 - <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) και με βάση τα εξής κριτήρια:

- Σε κάθε κλινικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα έτσι ώστε να ενισχύουν μόνο τα κλινικά δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες τα στελέχη Sabin 1,2 και 3. Για το λόγο αυτό οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ανοδικά και καθοδικά της θέσης ανασυνδυασμού, έτσι ώστε κάθε εκκινητής του ζεύγους να εμφανίζει συμπληρωματικότητα με διαφορετικό ορότυπο των στελεχών Sabin (s1,s2,s3), ανάλογα με τον υπό μελέτη ανασυνδυασμό.
- Μήκος εκκινητών από 20 έως 22 βάσεις
- Θερμοκρασία υβριδισμού (Tm) από 57°C έως 63°C
- Ποσοστό σε GC από 50% έως 60%

Από τα ζεύγη εκκινητών που προέκυπταν, επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκείνα που εμφάνιζαν τη λιγότερη δυνατή συμπληρωματικότητα τόσο στα άκρα όσο και σε όλο το μήκος τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η δημιουργία δομών φουρκέτας στους εκκινητές, φαινόμενο που παρεμποδίζει τη διαδικασία της PCR.

Τέλος μέσω του προγράμματος CLUSTALW διαπιστώθηκε το ποσοστό συμπληρωματικότητας των εκκινητών με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin (δηλαδή τους αρνητικούς μάρτυρες). Επειδή οι τρεις ορότυποι Sabin φέρουν περιοχές που είναι αρκετά συντηρημένες, έπρεπε να διαπιστωθεί ότι οι εκκινητές δεν ανεγνώριζαν τέτοιες περιοχές. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τελικά εκκινητές οι οποίοι δεν ήταν συμπληρωματικοί (κυρίως στο 3' άκρο τους) με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Για να γίνει πιο εύκολα αντιληπτός ο τρόπος με τον οποίο έγινε ο σχεδιασμός και η επιλογή των εκκινητών θα δοθεί ένα παράδειγμα:

Το δείγμα LK3 φέρει έναν ανασυνδυασμό S2/S1 στη θέση 4942-4958 του γενόματος. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το δείγμα αυτό είναι ανοδικά και καθοδικά της θέσης ανασυνδυασμού. Ο νοηματικός εκκινητής (sense) βρίσκεται στη θέση 4777 και είναι συμπληρωματικός στο ορότυπο s2, ενώ ο αντινοηματικός εκκινητής (antisense) βρίσκεται στη θέση 5340 και είναι συμπληρωματικός στο ορότυπο s1. Έτσι μετά από την PCR θα έχουμε ενίσχυση του τμήματος 4777 – 5340, το οποίο θα περιλαμβάνει τον ανασυνδυασμό στο κλινικό δείγμα LK3. Στους αρνητικούς μάρτυρες όμως (πρότυπα στελέχη s1 και s2, αλλά και s3) δεν θα έχουμε ενίσχυση κάποιου τμήματος καθώς μόνο ο ένας από τους δύο εκκινητές θα είναι συμπληρωματικός με το γονιδίωμα τους, με αποτέλεσμα να μην γίνεται η ενίσχυση του ανωτέρω τμήματος.

Έτσι έπειτα από τα παραπάνω κριτήρια σχεδιάστηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητών:

ΟΝΟΜΑ	SABIN	SENSE/ ANTISENSE	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')	ΘΕΣΗ (bp)	ΠΡΟΪΟΝ (bp)
2CS2S	S2	SENSE	ttagcctccaccaactccag	4777	564
2CS1Ab	S1	ANTISENSE	tagacaactccagccactgc	5340	
3AS2S	S2	SENSE	tctattccagggaccactgc	5101	368
3AS1A	S1	ANTISENSE	catagccactgctaatcga	5469	
3CS2S	S2	SENSE	tctattccagggaccactgc	5101	504
3CS1A	S1	ANTISENSE	tctccacttctttgcatcg	5604	
3CS3S	S3	SENSE	caaaggggagttcacaatgc	5491	623
3CS2A	S2	ANTISENSE	aggactgctggttccttcac	6114	
3DS1S	S1	SENSE	ccagccaggttcaaacagaa	5551	1167
3DS2A	S2	ANTISENSE	agtctccgcatttccttggg	6718	
3DS2S	S2	SENSE	cgacggtaaagaggtggaaa	5583	1040
3DS1A	S1	ANTISENSE	gcaccctactgctgaacctg	6623	
3DS2Sb	S2	SENSE	tggggacaggggtggattata	6759	475
3DS1Ab	S1	ANTISENSE	gagcgaacgtgatcctgagt	7233	

Πίνακας 5.1: Τα ζεύγη εκκινητών, οι αλληλουχίες τους, η θέση τους στο γονιδίωμα και το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύεται έπειτα από την διαδικασία της PCR. Η θέση των εκκινητών στο γονιδίωμα αντιστοιχεί στο 5' άκρο του εκκινητή.

6. ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR αποτελεί μια επαναστατική ανακάλυψη της Μοριακής Βιολογίας, η οποία σταδιακά αποκτά συνεχώς διευρυνόμενες κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές. Εφαρμόστηκε αρχικά από τον εφευρέτη Kary Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993.

Έχει πάρει το όνομά της από ένα αντιδραστήριο που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση αυτή, την DNA πολυμεράση, η οποία είναι ένζυμο που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος. Οδηγεί στην απομόνωση και στον πολλαπλασιασμό μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους. Οι περισσότερες εφαρμογές της PCR χρησιμοποιούν θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq DNA πολυμεράση) και θερμοκυκλοποιητή.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύουν μόνο τα επιθυμητά τμήματα τα οποία περιέχουν τους υπό μελέτη ανασυνδυασμούς.

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), διάλυμα MgCl₂ 50mM (τελικής συγκέντρωσης όπως φαίνεται στον πίνακα 6.1), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x), 2μl primers (1 μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2.5 Units ενζύμου Taq πολυμεράσης (Invitrogen) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Όπως προαναφέρθηκε, το γονιδίωμα του sabin φέρει περιοχές οι οποίες είναι αρκετά συντηρημένες, με αποτέλεσμα οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων (s1, s2, s3) να είναι πολύ λίγες. Για το λόγο αυτό κάθε διαφορετικός ανασυνδυασμός απαιτούσε και διαφορετικές συνθήκες. Έτσι, στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι συνθήκες οι οποίες εφαρμόστηκαν στα προς μέλετη δείγματα.

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Εκκινητές	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
2C	S2/S1	2CS2S 2CS1A	LK3 LK6 LK10 I34	1.5 mM	72° C	1 sec
3A	S2/S1	3AS2S 3AS1A	EP9 (580)	2 mM	68° C	10 sec
3C	S2/S1	3CS2S 3CS1A	ID	2mM	66° C	10 sec
3C	S3/S2	3CS3S 3CS2A	738	2 mM	67° C	5 sec
3D	S1/S2	3DS1S 3DS2A	I34	2 mM	53° C	30 sec
3D	S2/S1	3DS2S 3DS1A	IF EP12(730) ENP6 I34	2mM	65° C	1 sec
3D	S2/S1	3DS2Sb 3DS1Ab	584	1.5 mM	65° C	10 sec

Πίνακας 6.1: Παρουσιάζονται τα δείγματα και ο ανασυνδυασμός που εντοπίστηκε στα δείγματα αυτά, τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα, η συγκέντρωση του MgCl₂ του Buffer σε κάθε αντίδραση καθώς και οι συνθήκες (θερμοκρασία και χρόνος) υβριδισμού που εφαρμόστηκαν κατά την αντίδραση της PCR

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	3 λεπτά στους 94 °C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 94 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -για τον υβριδισμό των primers στους κλώνους του cDNA εφαρμόστηκαν συνθήκες διαφορετικές για κάθε δείγμα όπως αναφέρονται στον πίνακα 6.1 -30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση* *Σε περίπτωση που το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος ήταν μεγαλύτερο των 1000bp, ο χρόνος επιμήκυνσης αυξανόταν στα 2 λεπτά.
1 κύκλος	5 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Σε μια τυπική αντίδραση, αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στο στάδιο έναρξης με θέρμανση στους 94-96°C για 1-5 λεπτά. Το στάδιο της αποδιάταξης, που αποτελεί το πρώτο βήμα των κυκλικών γεγονότων θέρμανσης και

ψύξης, γίνεται σε θερμοκρασία 94-98°C για 30 δευτερόλεπτα-1 λεπτό. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται σπάσιμο των υδρογονικών δεσμών και κατ' επέκταση αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA. Στη συνέχεια, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών, οι εκκινητές σε περίσσια υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50-65°C για 30 δευτερόλεπτα-1 λεπτό. Η πολυμεράση συνδέεται στο υβρίδιο του εκκινητή και της μονόκλωνης αλυσίδας και αρχίζει τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας το 3' ελεύθερο άκρο του εκκινητή. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για το στάδιο επιμήκυνσης των εκκινητών από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Η πολυμεράση συνθέτει μια νέα αλυσίδα DNA, προσθέτοντας dNTPs, τα οποία είναι συμπληρωματικά στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA, με κατεύθυνση 5' → 3'. Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο τελικής επιμήκυνσης, το οποίο λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία επίσης 72°C για 5-15 λεπτά και συμβαίνει μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR, ώστε οποιαδήποτε μονόκλωνη αλυσίδα DNA να επεκταθεί πλήρως. Τέλος, έχουμε το τελικό στάδιο σε θερμοκρασία 4°C για ακαθόριστο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας την προσωρινή αποθήκευση της αντίδρασης.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κ.α.

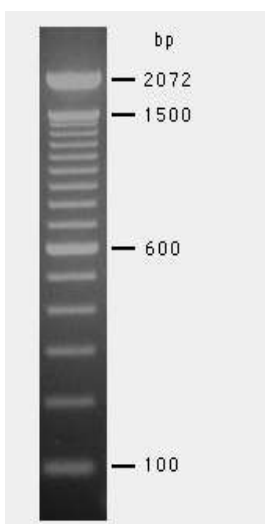
Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια διαδικασία που ακολουθεί τις αντιδράσεις PCR, για ποιοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων αντιδράσεων.

Η πηκτή, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, εισαγόταν σε οριζόντιες δεξαμενές. Την πηκτή, διαπερνούσε ηλεκτρικό ρεύμα έντασης από 90 - 120 Volts, το οποίο ανάγκαζε το αρνητικά φορτισμένο DNA, να μετακινηθεί από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση αυτή οδηγούσε σε διαχωρισμό των τμημάτων του DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Κομμάτια DNA μικρότερου μεγέθους κινούνται γρηγορότερα από κομμάτια μεγαλύτερου μεγέθους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (100 bp DNA Ladder).

Στη συνέχεια, με τη χρήση συσκευής με UV ακτινοβολία, η οποία ανιχνεύει το βρωμιούχο αιθίδιο, οπτικοποιούμε το DNA και φωτογραφίζουμε τα αποτελέσματά μας. Το βρωμιούχο αιθίδιο συνδέεται ισχυρά με το DNA παρεμβαίνοντας ανάμεσα στις δίκλωνες βάσεις και απορροφά στο αόρατο υπεριώδες φως ενώ εκπέμπει στο ορατό πορτοκαλί φως.

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης [INVITROGEN AGAROSE]. Το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA). Σε περίπτωση που το αναμενόμενο προϊόν ήταν μεγαλύτερο από 1000bp το πήκτωμα αγαρόζης είχε μικρότερη συγκέντρωση: 1.5%. Επίσης προστέθηκαν 100μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl). Στα πηγαδάκια του πηκτώματος φορτώνουμε 10μl από κάθε προϊόν PCR, αναμεμιγμένα με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους της εταιρίας INVITROGEN (100 bp DNA Ladder). Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή



ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόζεται τάση από 90 – 120 V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε κατάλληλη συσκευή υπεριώδων ακτίνων.

Εικόνα 7.1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (DNA Ladder), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Όπως φαίνεται και στην εικόνα κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε τμήμα DNA μοριακού βάρους αυξανόμενου από κάτω προς τα επάνω κατά 100bp ανά ζώνη.

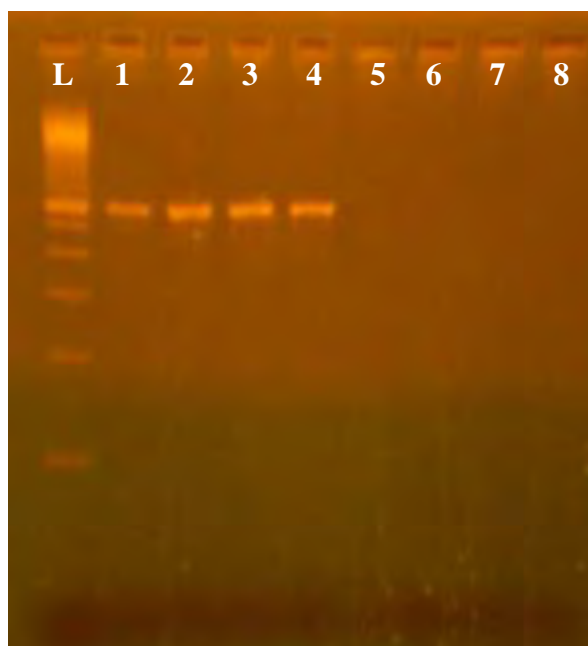
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για κάθε τύπο ανασυνδυασμού δημιουργήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει την περιοχή του ανασυνδυασμού. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη Sabin s1, s2 και s3 καθώς επίσης και αποστειρωμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR. Έτσι μετά από κάθε PCR και έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πήραμε τα εξής αποτελέσματα.

A. Ζεύγος 2CS2S / 2CS1Ab

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
2C	S2/S1	LK3 LK6 LK10 I34	1.5 mM	72° C	1 sec



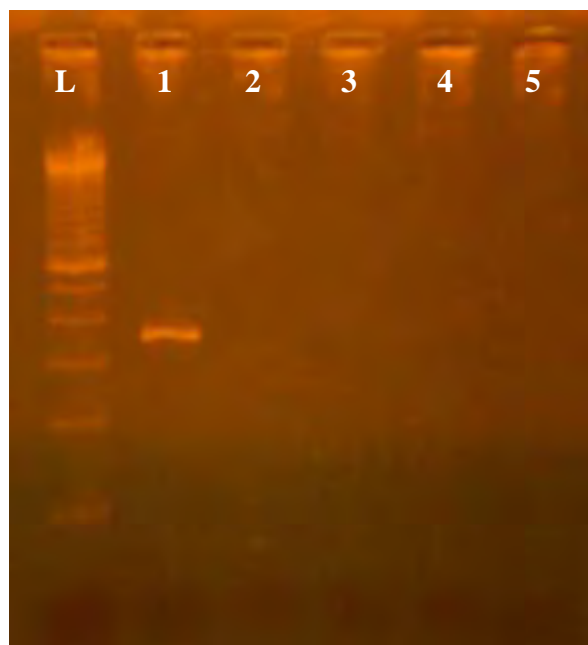
1: LK3
2: LK6
3: LK10
4: I34
5: s1
6: s2
7: s3
8: ddH₂O

} PCR Προϊόν
564bp

} Αρνητικοί
Μάρτυρες

B. Ζεύγος 3AS2S / 3AS1A

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
3A	S2/S1	EP9 (580)	2 mM	68° C	10 sec



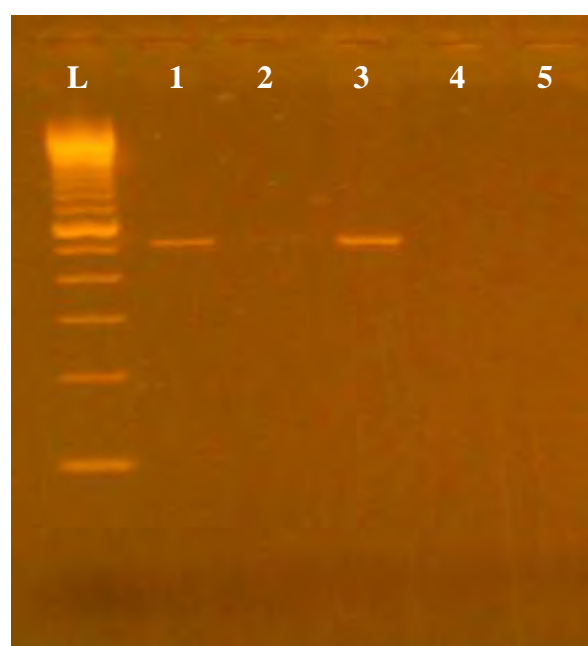
1: EP9 (580) PCR Προϊόν 368bp

2: s1
3: s2
4: s3
5: ddH₂O

} Αρνητικοί
Μάρτυρες

Γ. Ζεύγος 3CS2S / 3CS1A

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
3C	S2/S1	ID	2mM	66° C	10 sec



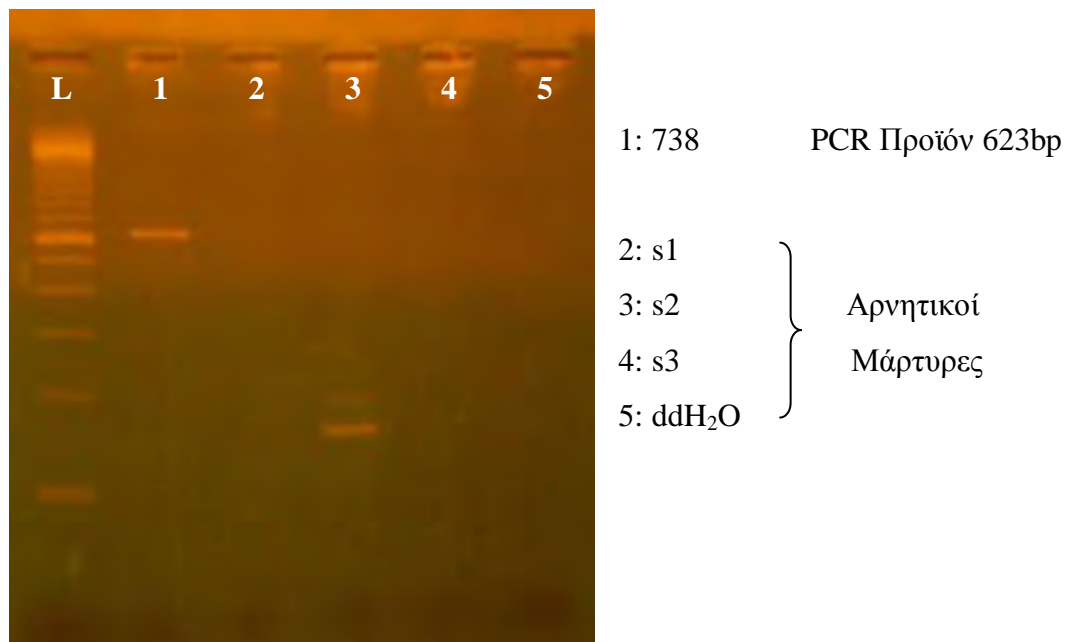
1: ID PCR Προϊόν 504bp

2: s1
3: s2
4: s3
5: ddH₂O

} Αρνητικοί
Μάρτυρες

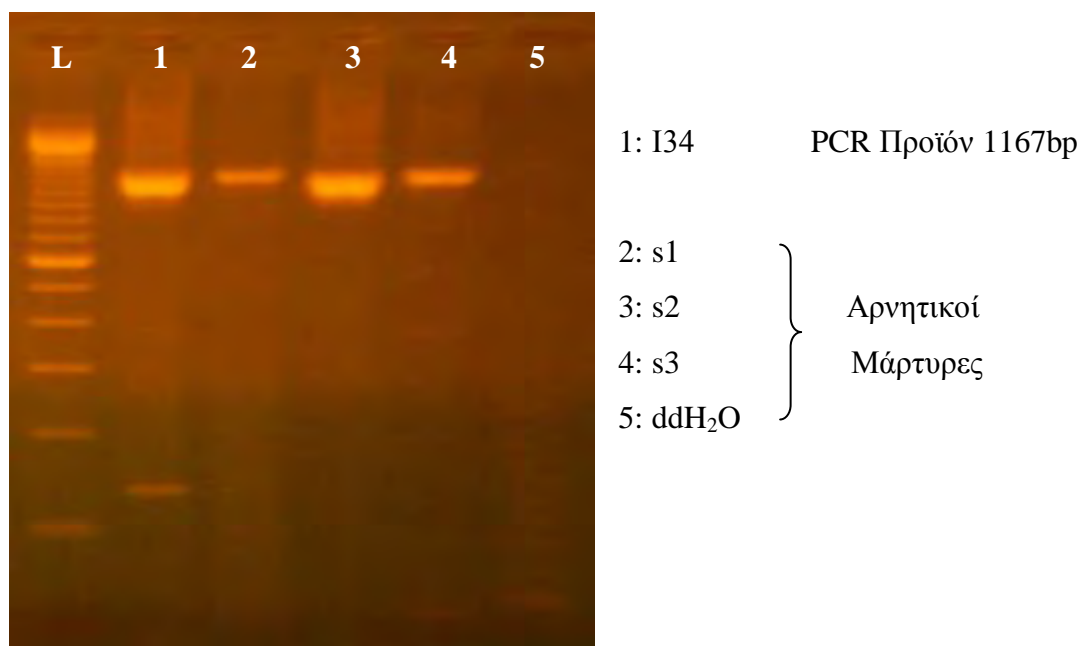
Δ. Ζεύγος 3CS3S / 3CS2A

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
3C	S3/S2	738	2 mM	67° C	5 sec



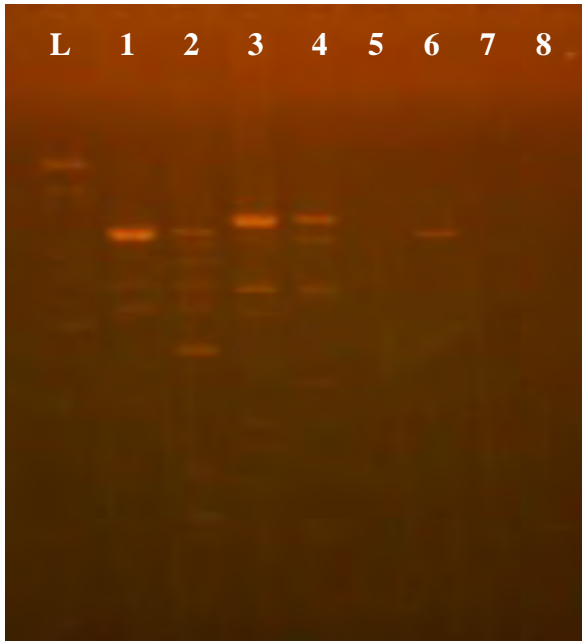
Ε. Ζεύγος 3DS1S / 3DS2A

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
3D	S1/S2	I34	2 mM	53° C	30 sec



ΣΤ. Ζεύγος 3DS2S / 3DS1A

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
3D	S2/S1	IF EP12(730) ENP6 I34	2mM	65° C	1 sec



1: IF
2: ENP6
3: EP12
4: I34

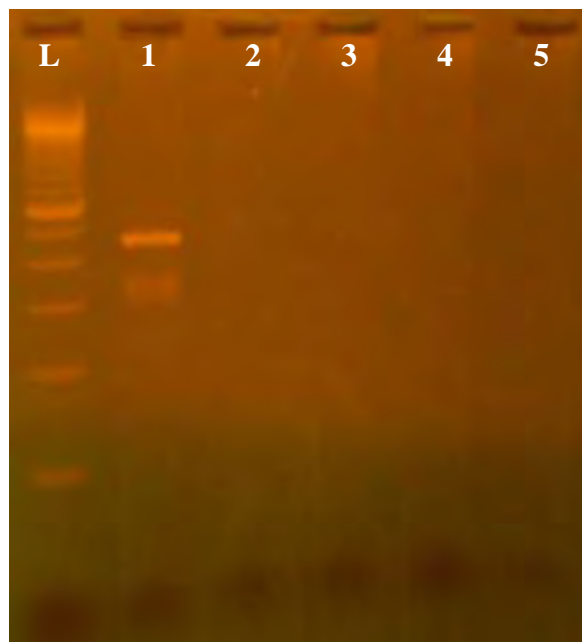
5: s1
6: s2
7: s3
8: ddH₂O

PCR Προϊόν
1040bp

Αρνητικοί
Μάρτυρες

Ζ. Ζεύγος 3DS2Sb / 3DS1Ab

Περιοχή	Ανασυνδυασμός	Δείγμα	MgCl ₂	Θερμοκρασία υβριδισμού	Χρόνος υβριδισμού
3D	S2/S1	584	1.5 mM	65° C	10 sec



1: 584

2: s1
3: s2
4: s3
5: ddH₂O

PCR Προϊόν 475bp

Αρνητικοί
Μάρτυρες

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το OPV ήταν το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε εκτενέστατα από το 1964, συντελώντας στην δραστική μείωση των κρουσμάτων πολιομυελίτιδας από 350.000 περιπτώσεις σε 125 ενδημικές χώρες το 1988 σε μόλις 232 περιπτώσεις σε τέσσερις χώρες (Πακιστάν, Ινδία, Αφγανιστάν και Νιγηρία) το 2010 [118]. Παρόλα αυτά η εμφάνιση των VDPV άλλαξε τελείως την αντίληψη γύρω από το OPV, καθώς η εμφάνιση αυτή εθεωρείτο ως αμελητέος κίνδυνος καθώς προκαλούσε σπάνιες και μεμονωμένες περιπτώσεις VAPP. Η απομόνωση ιικών στελεχών με αυξημένη νευρομολυσματικότητα απετέλεσε ένα μεγάλο πρόβλημα για την ασφάλεια του OPV[47,61,97]. Κατά τον πολλαπλασιασμό των εμβολιακών στελεχών στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα, μεταλλάξεις σε καθοριστές του εξασθενημένου φαινοτύπου τους και γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ των τριών στελεχών Sabin του εμβολίου OPV μπορούν να συντελέσουν στην απώλεια του εξασθενημένου φαινοτύπου των στελεχών OPV και την απόκτηση ιδιοτήτων χαρακτηριστικών των πολιοϊών αγρίου τύπου[29,54,57].

Η τρισθενής φύση του OPV και η κατανομή των μεταλλάξεων εξασθένισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα των εμβολιακών στελεχών Sabin, ευνοούν τον διαοροτυπικό ανασυνδυασμό που οδηγεί σε νέα ιικά στελέχη με αυξημένη αρμοστικότητα. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, τα συνήθη σημεία ανασυνδυασμού βρίσκονται στη μέση ή στο 3' μέσο της 2C γενωμικής περιοχής για ανασυνδυασμούς τύπου S3/Sx και στην μέση ή στο 3' μέσο της 3D γενωμικής περιοχής για ανασυνδυασμούς τύπου S2/Sx [15,19,34,58,60,72-74,81,100]. Ωστόσο, έχουν επίσης χαρακτηριστεί παράγωγα του OPV που έχουν σπάνιους τύπους ανασυνδυασμού και βρίσκονται σε μη δομικές γενωμικές περιοχές διαφορετικές των 2C και 3D [34,59, 100,104].

Στην εργασία αυτή, περιγράφουμε επτά PCR δοκιμασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση σπάνιων τύπων ανασυνδυασμού που βρίσκονται στις 2C, 3A, 3C και 3D μη δομικές γενωμικές περιοχές των παραγώγων του OPV. Έντεκα ανασυνδυασμένα παράγωγα του OPV που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί με αλληλούχιση επιλέχθηκαν με σκοπό να αναλυθεί η ακρίβεια της προτεινόμενης PCR δοκιμασίας. Έξι από αυτά (LK3, LK6, LK10, 738, 584 και I34) βρέθηκαν να φέρουν διπλούς ανασυνδυασμούς ή και πολλαπλούς ενώ πέντε από αυτά (EP9, ID, IF, EP12 και ENP6) έφεραν μόνο μια θέση ανασυνδυασμού.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι από τις επτά PCR μόνο οι τέσσερις μπορούν να θεωρηθούν επιτυχείς, καθώς στις υπόλοιπες τρεις τα προϊόντα που εμφανίζονται στους αρνητικούς μάρτυρες δεν επιτρέπουν τον ακριβή εντοπισμό δειγμάτων με γενετικούς ανασυνδυασμούς σε σχέση με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Οι τέσσερις αυτές PCR δοκιμασίες είναι οι A, B, Δ και Z όπως εμφανίζονται πιο πάνω στα αποτελέσματα.

Ο λόγος που δεν ήταν δυνατή η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών (συγκέντρωση $MgCl_2$, χρόνος και θερμοκρασία υβριδισμού) και για τις υπόλοιπες τρεις PCR έτσι ώστε να μην εμφανίζονται προϊόντα στους αρνητικούς μάρτυρες είναι η μεγάλη συμπληρωματικότητα των εκκινητικών μορίων σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Όπως περιγράφηκε και πιο πάνω, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ενισχύουν μόνο τα δείγματα που έφεραν τους ανασυνδυασμούς και όχι τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη, στηριζόμενοι στα *mismatch* στο 3' άκρο του εκκινητή σε σχέση με τα πρότυπα στελέχη. Δεν ήταν δυνατό όμως, κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, να βρεθούν εκκινητικά μόρια που να καλύπτουν όλες τις απαραίτητες συνθήκες και επιπλέον να έχουν τουλάχιστον δυο *mismatch* στα τέσσερα

τελευταία νουκλεοτίδια του 3' άκρου των εκκινητών, έτσι ώστε να μην ενισχύονται και οι αρνητικοί μάρτυρες.

Το εκκινητικό ζεύγος 2CS2S / 2CS1Ab επιτρέπει την ταυτοποίηση των σπάνιων τύπων ανασυνδυασμού S2/S1 που βρίσκεται στο 3' άκρο της 2C γενωμικής περιοχής δίνοντας ένα προϊόν ενίσχυσης 564bp (από το νουκλεοτίδιο 4777 στο νουκλεοτίδιο 5340). Η PCR αυτή επιβεβαίωσε τον ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 τεσσάρων δειγμάτων (LK3, LK6, LK10 και I34). Τρία από αυτά (LK3, LK6 και LK10) βρέθηκαν να είναι διπλά ανασυνδυασμένα S3/S2/S1 στην 2C γενωμική περιοχή, με την πρώτη θέση ανασυνδυασμού στο 5' άκρο της 2C και τη δεύτερη θέση ανασυνδυασμού S2/S1 στο 3' άκρο της 2C. Τέτοιοι ανασυνδυασμοί που οδηγούν σε μια τριμερή υβριδική 2C πρωτεΐνη είναι σπάνια γεγονότα. Τα τριμερή (S3/S2/S1) στελέχη Sabin βρίσκονται συνήθως ανασυνδυασμένα στις 2C και 3D περιοχές. Το I34 δείγμα ταυτοποιήθηκε ως S2/S1/S2/S1 πολύ-ανασυνδυασμένο με τη πρώτη θέση ανασυνδυασμού S2/S1 να βρίσκεται στο 3' άκρο της 2C περιοχής, τη δεύτερη S1/S2 στο 5' άκρο της 3D περιοχής και τη τρίτη S2/S1 στη μέση της 3D περιοχής. Η απομόνωση των πολύ-ανασυνδυασμένων OPV παραγώγων είναι σπάνιο γεγονός [15, 19,34,58,60,72-74,81,100], καθώς η πλειοψηφία τους φέρει μια ή δυο θέσεις ανασυνδυασμού. Επιπλέον, ο πρώτος και δεύτερος τύπος ανασυνδυασμού του δείγματος I34 αποτελούν σπάνια γεγονότα καθώς οι κυρίαρχοι τύποι ανασυνδυασμού είναι S3/Sx και S2/Sx για τις 2C και 3D γενωμικές περιοχές. Οι Cuervo και συν [34] περιέγραψαν επίσης την απομόνωση ενός παραγώγου του OPV με σπάνιο ανασυνδυασμό. Συγκεκριμένα, το δείγμα αυτό ταυτοποιήθηκε ως S2/S1 ανασυνδυασμένο με τη θέση του να βρίσκεται στο 3' άκρο της 2C περιοχής. Η PCR που έγινε στην εργασία αυτή (εκκινητικό ζεύγος 2CS2S / 2CS1Ab) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση όλων των S2/S1 ανασυνδυασμών που

βρίσκονται στο εσωτερικό της 2C γενωμικής περιοχής από το νουκλεοτίδιο 4777 στο νουκλεοτίδιο 5340.

Το ζεύγος εκκινητών 3AS2S / 3AS1A επιτρέπει την ταυτοποίηση των σπάνιων ανασυνδυασμών τύπου S2/S1 που βρίσκονται στο 3' άκρο της 3A γενωμικής περιοχής δίνοντας ένα προϊόν ενίσχυσης 368bp (από το νουκλεοτίδιο 5100 έως το νουκλεοτίδιο 5467). Η PCR αυτή επιβεβαίωσε τον τύπου S2/S1 ανασυνδυασμό του δείγματος EP9. Το δείγμα αυτό ταυτοποιήθηκε ως S2/S1 ανασυνδυασμένο με τη θέση ανασυνδυασμού να βρίσκεται στο 3' άκρο της 3A περιοχής.

Το ζεύγος εκκινητών 3CS3S / 3CS2A επιτρέπει την ταυτοποίηση των σπάνιων ανασυνδυασμών τύπου S3/S2 που βρίσκονται στο 3' άκρο της 3C γενωμικής περιοχής δίνοντας ένα προϊόν ενίσχυσης 623bp (από το νουκλεοτίδιο 5491 έως το νουκλεοτίδιο 6113). Η PCR αυτή επιβεβαίωσε τον τύπου S3/S2 ανασυνδυασμό του δείγματος 738. Το δείγμα αυτό ταυτοποιήθηκε ως S3/S2/S1 ανασυνδυασμένο. Η πρώτη θέση ανασυνδυασμού S3/S2 βρίσκεται στο 3' άκρο της 3C περιοχής, ενώ η δεύτερη θέση ανασυνδυασμού S2/S1 βρίσκεται στο 3' άκρο της 3D περιοχής.

Το ζεύγος εκκινητών 3DS2Sb / 3DS1Ab επιτρέπει την ταυτοποίηση των σπάνιων ανασυνδυασμών τύπου S2/S1 που βρίσκονται στο 3' άκρο της 3D γενωμικής περιοχής δίνοντας ένα προϊόν ενίσχυσης 475bp (από το νουκλεοτίδιο 6759 έως το νουκλεοτίδιο 7233). Η PCR αυτή επιβεβαίωσε τον τύπου S2/S1 ανασυνδυασμό του δείγματος 584. Το δείγμα αυτό ταυτοποιήθηκε ως S3/S2/S1 ανασυνδυασμένο. Η πρώτη θέση ανασυνδυασμού S3/S2 βρίσκεται στο 5' άκρο της 2C περιοχής, ενώ η δεύτερη θέση ανασυνδυασμού S2/S1 βρίσκεται στο 3' άκρο της 3D περιοχής. Η κυρίαρχη θέση ανασυνδυασμού του τύπου S2/Sx βρίσκεται στη μέση ή στο 3' μέσο της 3D γενωμικής περιοχής.

Εν κατακλείδι, οι τέσσερις δοκιμασίες PCR που περιγράφηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση σπάνιων τύπων ανασυνδυασμού που βρίσκονται στην μη δομική γενωμική περιοχή των παραγώγων του OPV. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, είχαν επίσης περιγραφεί δυο διαδικασίες PCR για την ταυτοποίηση των κυρίαρχων τύπων ανασυνδυασμού S3/Sx στην 2C και S2/Sx στην 3D γενωμική περιοχή αντίστοιχα των παραγώγων του OPV [104]. Η εφαρμογή όλων αυτών των δοκιμασιών της PCR θα επιτρέψει την γρήγορη ταυτοποίηση των θέσεων ανασυνδυασμού που βρίσκονται στη μη δομική περιοχή των παραγώγων του OPV, η οποία μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που δεν έχουν την ευκολία χρήσης τεχνικών αλληλούχισης ως πρώτη μέθοδο για την γρήγορη ανίχνευση και χαρακτηρισμό των ανασυνδυασμένων ιικών στελεχών.

Στην εποχή μετά την εξάλειψη των άγριων στελεχών των πολιοϊών, οι μόνες απομεινάντες πηγές μόλυνσης με πολιοϊούς παγκοσμίως θα είναι τα παράγωγα του OPV. Συνεπώς, η πρόιμη ανίχνευση παραγώγων του OPV είναι περισσότερο από ποτέ σημαντική με σκοπό να αποφευχθούν επιδημίες λόγω της κυκλοφορίας νευρομολυσματικών ιικών στελεχών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Agol V. I. 1997.** Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
2. **Agol V. I., 2002.** Picornavirus genome:an overview. In: Semler B. L., Wimmer E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 127-148.
3. **Alexander L, Lu HH, Wimmer E.** Polioviruses containing picornavirus type 1 and/or type 2 internal ribosomal entry site elements: genetic hybrids and the expression of a foreign gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1406–1410.
4. **Alexander LN, Seward JF, Santibanez TA, et al.** Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA*2004;292:1696–1701.
5. **Ambros V, Baltimore D.** Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'- terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem*1980: 255:6739–6744.
6. **Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D.** An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* 1978;15:1439–1446.
7. **Anonymous.** From the Centers for Disease Control and Prevention. Final stages of poliomyelitis eradication—Western Pacific Region, 1997–1998. *JAMA* 1999;281:1690–1691.
8. **Anonymous.** Global Polio Eradication Initiative, strategic plan 2004–2008. *Wkly Epidemiol Rec* 2004;79(6):55–57.
9. **Anonymous.** Performance of acute flaccid paralysis (AFP) surveillance and incidence of poliomyelitis, 1998–1999 (as of 4 March 1999). *Wkly Epidemiol Rec* 1999;74:81–84.
10. **Aycock WL.** The significance of the age distribution of poliomyelitis: evidence of transmission through contact. *Am J Hyg* 1928;8:35–54.
11. **Belnap DM, McDermott Jr BM, Filman DJ, et al.** Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*2000;97:73–78.
12. **Bienz K, Egger D, Pasamontes L.** Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 1987;160:220–226.
13. **Birmingham ME, Aylward RB, Cochi SL, et al.** National immunization days: state of the art. *J Infect Dis* 1997;175[Suppl 1]:S183–S188.
14. **Birmingham ME, Linkins RW, Hull BP, et al.** Poliomyelitis surveillance: the compass for eradication. *J Infect Dis* 1997;175[Suppl 1]:S146–S150.
15. **Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T (2003)** Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* 84:573–580

16. **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.
17. **Bodian D, Morgan IM, Howe HA.** Differentiation of types of poliomyelitis viruses. III. The grouping of fourteen strains into three basic immunological types. *Am J Hyg* 1949;49:234–245.
18. **Bodian D.** Some emerging concepts of poliomyelitis infection. *Science* 1955;122:105–108.
19. **Boot HJ, Schepp RM, van Nunen FJ, 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
20. **Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al.** Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 2003;198:557–567.
21. **Brown B., S. Oberste, K. Maher, and M. Pallansch. 2003.** Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(16):8973-8984.
22. **Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al.** An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005;79:11962–11973.
23. **Burnet FM. Poliomyelitis in the light of recent experimental work.** *Health Bulletin.* Victoria, Australia: Department of Health; 1945.
24. **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
25. **Caspar DL, Klug A.** Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:1–22.
26. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Progress toward interruption of wild poliovirus transmission—worldwide, January 2004–March 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54(16):408–412.
27. **Charcot JM, Joffroy A.** Cas de paralysie infantile spinale avec lesins des cornes anterieures de la substance grise de la moelle epiniere. *Arch Physiol Norm Pathol* 1870;3:134–152
28. **Cherkasova E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002.** Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76(13):6791-6799.
29. **Cherkasova EA, Yakovenko ML, Rezapkin GV, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP, Krasnoproshina LI, Romanenkova NI, Rozaeva NR, Sirota L, Agol VI, Chumakov KM (2005)** Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol* 79:1062–1070

30. **Cho MW, Teterina N, Egger D, et al.** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 1994;202:129–145.
31. **Chow M, Newman JF, Filman D, et al.** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 1987;327:482–486.
32. **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;13:5855–5862.
33. **Colston EM, Racaniello VR.** Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol* 1995;69:4823–4829.
34. **Cuervo N, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, et al. (2001)** Genomic features of intertypic recombinant Sabin strains excreted by primary vaccinees. *J Virol* 75:5740–5751
35. **Cuervo N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic, and F. Delpeyroux. 2001.** Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.*75(13):5740-5751.
36. **Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. 2002.** Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.
37. **Dales S, Eggers HJ, Tamm I, et al.** Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology* 1965;26:379–389.
38. **de Quadros CA, Andrus JK, Olive JM, et al. Polio eradication from the Western Hemisphere. Annu Rev Public Health** 1992;13:239–252.
39. **de Quadros CA, Andrus JK, Olive JM, et al.** Strategies for poliomyelitis eradication in developing countries. *Public Health Rev* 1993;21:65–81.
40. **Domingo E. and J. J. Holland. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
41. **Dowdle W. R., E. De Gourville, O. M. Kew, M. A. Pallansch, and D. J. Wood. 2003.** Polio eradication: the OPV paradox. *Rev. Med. Virol.* 13:277-291.
42. **Duggal R. and E. Wimmer. 1999.** Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology* 258:30-41.
43. **Duggal R., A. Cuconati, M. Gromeier, and E. Wimmer. 1997.** Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13786-13791.
44. **Echeverri AC, Dasgupta A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. Virology** 1995;208:540–553.
45. **Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al.** Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 2000;74:6570–6580.
46. **Enders JF, Weller TH, Robbins FC.** Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 1949;109:85–87.

47. **Equestre M, Genovese D, Cavalieri F, Fiore L, Santoro R, Perez Bercoff R (1991)** Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J Virol* 65: 2707–2710
48. **Figlerowicz M, Magdalena Alekska, A. Kurzynska-Kokorniak.** Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518 (2003)
49. **Filman DJ, Syed R, Chow M, et al.** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* 1989;8:1567–1579.
50. **Flanegan JB, Petterson RF, Ambros V, et al.** Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:961–965.
51. **Fricks CE, Hogle JM.** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990;64:1934–1945.
52. **Friedrich F. 1996.** Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.
53. **Fuchs A, Cella M, Giurisato E, et al.** Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 2004;172:3994–3998.
54. **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(1):199–208
55. **Gamarnik AV, Andino R.** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 1998;12:2293–2304.
56. **Georgescu M. M., F. Delpeyroux, and R. Crainic. 1995.** Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* 76(9):2343-2348.
57. **Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, Crainic R, Delpeyroux F (1997)** Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 71:7758–7768
58. **Georgescu MM, Delpeyroux F, Crainic R (1995)** Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J Gen Virol* 76:2343-8
59. **Georgescu MM, Delpeyroux F, Tardy-Panit M, Balanant J, Combiescu M, Combiescu AA, Guillot S, Crainic R (1994)** High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 68(12):8089–8101
60. **Georgopoulou A, Markoulatos P (2001)** Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20(11):792–799

61. **Gnanashanmugam D, Falkovitz-Halpern MS, Dodge A et al. (2007)** Shedding and reversion of oral polio vaccine type 3 in Mexican vaccinees: comparison of mutant analysis by PCR and enzyme cleavage to a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 45:2419–2425
62. **Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert- Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2000.** Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74(18):8434-8443.
63. **Harber J, Bernhardt G, Lu H-H, et al.** Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* 1995;214:559–570.
64. **Heine J.** Beobachtungen uber Lahmungs Zustände der untern Extremitäten und deren Behandlung. *Stuttgart, Germany: Kohler; 1840.*
65. **Hogle JM, Chow M, Filman DJ.** Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 1985;229:1358–1365.
66. **Hull BP, Dowdle WR.** Poliovirus surveillance: building the global Polio Laboratory Network. *J Infect Dis* 1997;175[Suppl 1]:S113–S116.
67. **Hull HF, Ward NA, Hull BP, et al.** Paralytic poliomyelitis: Seasoned strategies, disappearing disease. *Lancet* 1994;343:1331–1337.
68. **Ida-Hosonuma M, Sasaki Y, Toyoda H, et al.** Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch Virol* 2003;148:29–44.
69. **Jackson RJ, Hunt SL, Reynolds JE, et al.** Cap-dependent and cap-independent translation—Operational distinctions and mechanistic interpretations. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;203:1–29.
70. **Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P.** 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* 1993;67:2961–2971.
71. **Johnson R.** Viral Infections of the Nervous System, 2nd ed. *Philadelphia: JB Lippincott-Raven; 1998.*
72. **Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorchis T (2004)** Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes* 18:103-9
73. **Karakasiliotis I, Paximadi E, Markoulatos P (2005)** Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol* 86(Pt 11):3137-42
74. **Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, et al. (2002)** Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 296:356–35
75. **Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981;291:547–553.
76. **Koike S, Taya C, Kurata T, et al.** Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:951–955.

- 77. Landsteiner K, Popper E.** Mikroskopische Präparate von einem menschlichen und zwei Affenrückenmarken. *Wien Klin Wochenschr* 1908;21:1830.
- 78. Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al.** A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:59–63.
- 79. Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, et al.** Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* 1997;5:961–978.
- 80. Liao S, Racaniello V.** Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* 1997;71:9770–9777.
- 81. Liu H, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA (2003)** Serial recombination during circulation of type 1 wild vaccine recombinant polioviruses in China. *J Virol* 77:10994–11005
- 82. Liu H. M., D. P. Zheng, L. B. Zhang, M. S. Oberste, M. A. Pallansch, and O. M Kew.** Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* 74(23):11153-11161 (2000)
- 83. Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, John A, Marsden S, Taffs F, Reeve P, Hamada N, Wareham K, Almond J, Cammack N, Minor PD (1989)** Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* 172:408–414
- 84. Martin J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor. 2002.** Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76(21):1092-10928.
- 85. Medin O.** Ueber eine Epidemie von spinaler Kinderlähmung. *Verh X Int Med Kongr*, 1891.
- 86. Melnick JL.** Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996:655–712.
- 87. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 1989;56:855–865.
- 88. Minor D. P. 1999.** Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- 89. Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 2003;77:5136–5144.
- 90. Moscufo N, Yafal AG, Rogove A, et al.** A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* 1993;67:5075–5078.
- 91. Mueller S, Wimmer E.** Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J Biol Chem* 2003;278:31251–31260.

- 92. Murray KE, Barton DJ.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 2003;77:4739–4750.
- 93. Neu N, Rose NR, Beisel KW, et al.** Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 1987;139:3630–3636.
- 94. Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al.** The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 1977;268:208–213.
- 95. Nomoto A, Kitamura N, Golini F, et al.** The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5345–5349.
- 96. Novak JE, Kirkegaard K.** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 1991;65:3384–3387
- 97. Otelea D, Guillot S, Furione M et al. (1993)** Genomic modifications in naturally occurring neurovirulent revertants of Sabin 1 polioviruses. *Dev Biol Stand* 78:33–38
- 98. Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al.** Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 2000;74:10359–10370.
- 99. Paul JR.** *A History of Poliomyelitis*. New Haven: Yale University Press; 1971.
- 100. Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P.** Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* 32:203-10 (2006)
- 101. Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D.** Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* 1978;27:357–365.
- 102. Pettersson RF, Flanagan JB, Rose JK, et al.** 5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* 1977;268:270–272.
- 103. Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer.** *Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e. 1999*
- 104. Pliaka V, Dedepsidis E, Kyriakopoulou Z et al.** A new RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains. *Mol Cell Probes* 24: 115–123 (2010)
- 105. Racaniello VR, Baltimore D.** Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981;214:916–919.
- 106. Racaniello VR, Baltimore D.** Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4887–4891.
- 107. Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, et al.** Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 1990;63(2):353–362.

- 108.Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al.** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000;74:10371–10380.
- 109.Rodriguez Cruz R.** Cuba: mass polio vaccination program, 1962—1982. *Infect Dis* 1984;6[Suppl 2]:S408–S412.
- 110.Rossmann MG.** The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 1989;264:14587–14590.
- 111.Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM.** The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:912–919.
- 112.Schlegel A, Giddings Jr TH, Ladinsky MS, et al.** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 1996;70:6576–6588.
- 113.Spector DH, Baltimore D.** Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2983–2987.
- 114.Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966–971.
- 115.Todd S, Towner JS, Brown DM, et al.** Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol* 1997;71:8868–8874.
- 116.Trask JD, Vignec AJ, Paul JR.** Poliomyelitis virus in human stools. *JAMA* 1938;111:6–11.
- 117.Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993.** Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
- 118.WHO (2010)** Progress towards eradicating poliomyelitis in India, January 2009 –October 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 85:497-508
- 119.Wickman I.** Beitrage zur Kenntnis der Heine-Medinschen Krankheit (Poliomyelitis acuta und verwandter Erkernkungen). Berlin: Karger; 1907.
- 120.Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
- 121.Yin J, Paul AV, Wimmer E, et al.** Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* 2003;77:5152–5166.
- 122.Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1101–1109.
- 123.Yogo Y, Wimmer E.** Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1877–1882.