



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ MULTIPLEX RT-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΠΑΝΙΩΝ ΤΥΠΩΝ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΣΤΙΣ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ
ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Ανάπτυξη μιας multiplex RT-PCR μεθόδου για την ταυτοποίηση σπάνιων τύπων
ανασυνδυασμού στις γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών

Development of a Multiplex RT-PCR assay for the identification of rare
recombination types at genomic regions of vaccine-derived polioviruses

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

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ
ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από το Σεπτέμβριο του 2011 έως τον Ιούνιο του 2013.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, για την εμπιστοσύνη, τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή της.

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

Επιπλέον, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την Δρ. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και τους υποψήφιους διδάκτορες Ρούτερ Ειρήνη, Τσακογιάννη Δημήτρη και Νικολούλη Κατερίνα για την βοήθεια και συμπαράστασή τους, όσο και για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και απασχόλησης μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιώργο και Αγλαΐα, και τα αδέρφια μου, Δόμνα και Θαλασσινό, για την οικονομική, αλλά κυρίως για την πνευματική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Για τις χαρές που μοιραστήκαμε μαζί, αλλά και για τη συμπαράσταση, τη καθοδήγηση και το κουράγιο στις δύσκολες στιγμές.

Abstract

Polioviruses belong to *enterovirus* genus of Picornaviridae family. Polioviruses' genome is a single-strand positive sense RNA and is surrounded by an icosahedral capsid. Polioviruses are the causal agents of paralytic poliomyelitis and exist as three distinct serotypes (PV1, PV2 and PV3). Since the 1960s, poliomyelitis has been effectively controlled by the use of two vaccines containing all three serotypes of PV, the inactivated poliovirus vaccine (IPV) and the live attenuated oral poliovirus vaccine (OPV). Despite the success of OPV in polio eradication program, a significant disadvantage was revealed: the emergence of vaccine associated paralytic poliomyelitis (VAPP). VAPP is a result of accumulated mutations and/or recombination events located at the genome of attenuated vaccine Sabin strains. Many groups have studied the localization of mutations and/or recombinations on Sabin strains isolated from VAPP patients or healthy vaccinees in order to correlate them with the increased neurovirulence.

In the present thesis 14 Sabin isolates derived from OPV vaccinees and environmental samples were studied in order to identify rare recombination types located from VP1 to 3D genomic region of virus genome. The experimental procedure that was followed consisted of: virus RNA extraction, reverse transcription to convert the virus genome into double-stranded cDNA, PCR and Multiplex PCR using specific designed primers able to confine and identify each recombination site on an agarose gel electrophoresis.

The results of this thesis identified rare recombination types that have been previously characterized by genome sequencing. Hence this multiplex PCR assay allows for the immediate detection and identification of multiple rare recombination types located at the viral genome of OPV derivatives.

Περίληψη

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας *Picornaviridae*. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο. 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 εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: vaccine-associated paralytic poliomyelitis) μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμών στο γένωμα των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών Sabin. Πολλές μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά τον εντοπισμό μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμών 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 14 δείγματα Sabin προερχόμενα από ασθενείς που είχαν εμβολιαστεί με το OPV αλλά και από το περιβάλλον. Συγκεκριμένα τα δείγματα μελετήθηκαν για την ταυτοποίηση σπάνιων γενετικών ανασυνδυασμών από τη VP1 έως και την 3D γενωμική περιοχή του ιικού γενώματος. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν 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) και Multiplex-PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων ικανών να εντοπίσουν και να ταυτοποιήσουν ταυτόχρονα γενετικούς ανασυνδυασμούς της κάθε γενωμικής περιοχής μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, ταυτοποίησαν τους σπάνιους γενετικούς ανασυνδυασμούς που είχαν σε προηγούμενη εργασία εντοπιστεί με αλληλούχιση. Έτσι, η μέθοδος αυτή επέτρεψε την γρήγορη ανίχνευση σπάνιων γενετικών ανασυνδυασμών στο ιικό γονιδίωμα των παραγώγων του OPV.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| 1.1 | ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ – ΕΜΒΟΛΙΩΝ | 1 |
| 1.2 | ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ | 3 |
| 1.2.1 | Ταξινόμηση των πολιοϊών | 3 |
| 1.2.2 | Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων | 5 |
| 1.2.3 | Οργάνωση του ιικού γενόματος | 8 |
| 1.3 | ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ | 11 |
| 1.3.1 | Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο | 11 |
| 1.3.2 | Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης | 15 |
| 1.3.3 | Αντιγραφή του ιικού RNA | 17 |
| 1.3.4 | Καριδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων | 19 |
| 1.4 | ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ | 21 |
| 1.5 | ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ | 22 |
| 1.5.1 | Μεταλλάξεις | 22 |
| 1.5.2 | Ανασυνδυασμός | 24 |
| 1.6 | ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ | 26 |
| 1.6.1 | IPV | 26 |
| 1.6.2 | OPV | 26 |
| 1.6.3 | VAPP – VDPV | 28 |
| 1.7 | ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ | 31 |
| 2 | ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 34 |
| 3 | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 35 |
| 3.1 | ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ | 35 |
| 3.2 | ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ | 35 |
| 3.3 | ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ | 37 |
| 3.4 | ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ RNA | 38 |
| 3.5 | ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT) | 39 |
| 3.6 | ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (PRIMERS) | 39 |
| 3.7 | ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) | 41 |
| 3.8 | MULTIPLEX PCR | 42 |
| 3.9 | ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR | 44 |
| 4 | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 45 |
| 4.1 | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR | 45 |
| 4.2 | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MULTIPLEX-PCR | 46 |
| 5 | ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 51 |
| 6 | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 55 |

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ – ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Η πολιομυελίτιδα είναι μια από τις αρχαιότερα γνωστές ασθένειες. Η πρώτη αναφορά της ασθένειας εμφανίζεται σε μια αιγυπτιακή στήλη της 2^{ης} χιλιετίας π.Χ. που απεικόνιζε ένα νεαρό με ατροφικό άκρο [64]. Οι πρώτες κλινικές περιγραφές της πολιομυελίτιδας εντοπίζονται γύρω στο 1800, με αναφορές σε περιπτώσεις παράλυσης με πυρετό. Οι συνεισφορές του Von Heine το 1840[60] και αυτές που εκδόθηκαν αργότερα από τον Σουηδό Medin [80] οδήγησαν στην αναφορά της παραλυτικής πολιομυελίτιδας ως ασθένεια *Heine-Medin*. Ακόμη μια αναφορά, από τους Charcot και Joffroy [24], περιέγραφε τις παθολογικές αλλαγές στους πρόσθιους κερατοειδείς κινητικούς νευρώνες της σπονδυλικής στήλης εξαιτίας της πολιομυελίτιδας.

Τον 20^ο αιώνα ξεκίνησε μια νέα εποχή στην έρευνα γύρω από την πολιομυελίτιδα και άρχισε να γίνεται αντιληπτή η μολυσματική φύση της ασθένειας. Ο Wickman [113] ανακάλυψε την μεταδοτική φύση της πολιομυελίτιδας, τη σημασία των ασυμπτωματικά 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 [111]. Στην κλασική μελέτη, οι ερευνητές από τη Βιέννη Landsteiner και Popper [72] 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, ένας αριθμός άτυχων παρανοήσεων αρχικά μπέρδευσε τους επιστήμονες και αποπροσανατόλισε τις προσπάθειες για έλεγχο της ασθένειας. Οι λάθος αντιλήψεις 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 ιαιμία και μέσω του οσφρητικού νεύρου. Επιπρόσθετα απέτυχαν αρκετές προσπάθειες ανοσοποίησης, με ορισμένες να επιφέρουν καταστροφικά αποτελέσματα [94]. Αποτέλεσμα των παραπάνω 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 εργαζόνταν 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.» [20]. Η ανακάλυψη 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 [11].

Στηριζόμενος σε έρευνες άλλων, ο Enders [43] διεξήγαγε μια μελέτη – ορόσημο που έδειχνε ότι ο πολιοϊός μπορούσε να αναπαραχθεί σε μη-νευρική καλλιέργεια ιστών. Οι έρευνες αυτές είχαν επιπτώσεις για όλο τον τομέα της ιολογίας 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 οροεξουδετέρωσης έδειξαν ότι ο πολιοϊός έχει τρεις ορότυπους [15], και ορολογικά τεστ [8] 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 συμπτωμάτων της πολιομυελίτιδας.



Εικόνα 1.1.1: *Jonas Salk ο δημιουργός του πρώτου εμβολίου (IPV)*

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 από το γεγονός 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 μελέτη των πολιοϊών είχε μια συνεχή σημαντική επιρροή πάνω στον τομέα της μοριακής ιολογίας. Ο πολιοϊός ήταν ο πρώτος ζωικός ιός που κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε πλήρως [69,101], το πρώτο RNA ζωικού ιού για του οποίου δημιουργήθηκε ένας μολυσματικός κλώνος [100] και ο πρώτος ανθρώπινος ιός που είχε αποτυπωθεί η τρισδιάστατη δομή του μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες-X [61]. Το 1989, ο Mendelson [82] ταυτοποίησε τον υποδοχέα του πολιοϊού, CD155, οδηγώντας στην γένεση διαγονιδιακών ποντικών που έφεραν τον υποδοχέα [71,103].

1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Οι πολιοϊοί ανήκουν στην οικογένεια ιών *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).

1.2.1 Ταξινόμηση των πολιοϊών

Η οικογένεια των ιών *Picornaviridae* αποτελείται από δεκαεπτά γένη: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicpivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Parechovirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* and *Tremovirus* [1,70] (πίνακας 1.2.1.1). Όλοι οι ιοί της οικογένειας *Picornaviridae* μολύνουν σπονδυλωτά. Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών και διαχωρίζονται σε τρεις ορότυπους: PV 1, 2 και 3.

Οι ιοί *picornaviridae* 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 *picornaviridae* 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 πολιοϊούς, ιούς coxsackie A ή B και ιούς echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (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.

| Οικογένεια | Γένος | Γένος Εντεροϊών | Αριθμός Οροτύπων |
|-----------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| <i>Picornaviridae</i> | <i>Aphovirus</i> | Enterovirus A | 23 |
| | <i>Aquamavirus</i> | Enterovirus B | 60 |
| | <i>Avihepatovirus</i> | Enterovirus C | 23 |
| | <i>Cardiovirus</i> | Enterovirus D | 5 |
| | <i>Cosavirus</i> | Enterovirus E | 4 |
| | <i>Dicripivirus</i> | Enterovirus F | 6 |
| | <i>Enterovirus</i> | Enterovirus G | 6 |
| | <i>Erbovirus</i> | Enterovirus H | 1 |
| | <i>Hepatovirus</i> | Enterovirus J | 6 |
| | <i>Kobuvirus</i> | Rhinovirus A | 77 |
| | <i>Megrivirus</i> | Rhinovirus B | 25 |
| | <i>Parechovirus</i> | Rhinovirus C | 51 |
| | <i>Salivirus</i> | | |
| | <i>Sapelovirus</i> | | |
| | <i>Senecavirus</i> | | |
| <i>Teschovirus</i> | | | |
| <i>Tremovirus</i> | | | |

Πίνακας 1.2.1.1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας *Picornaviridae* σε γένη

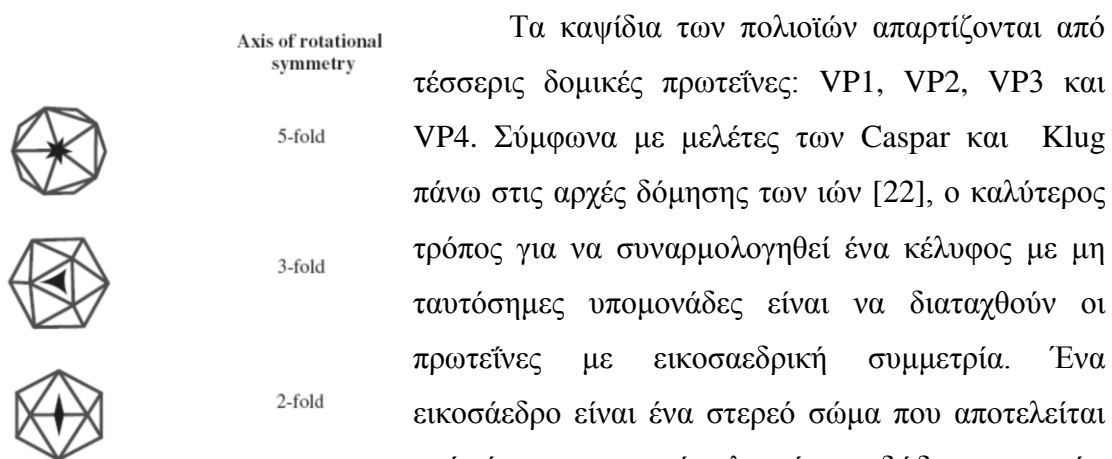
Πίνακας 1.2.1.2: Νέα ταξινόμηση των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποί τους (Πηγή: ICTV-2013)

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 σχετιζόνταν

ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ανοσολογική ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [102].

1.2.2 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 1.2.2.1: Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο

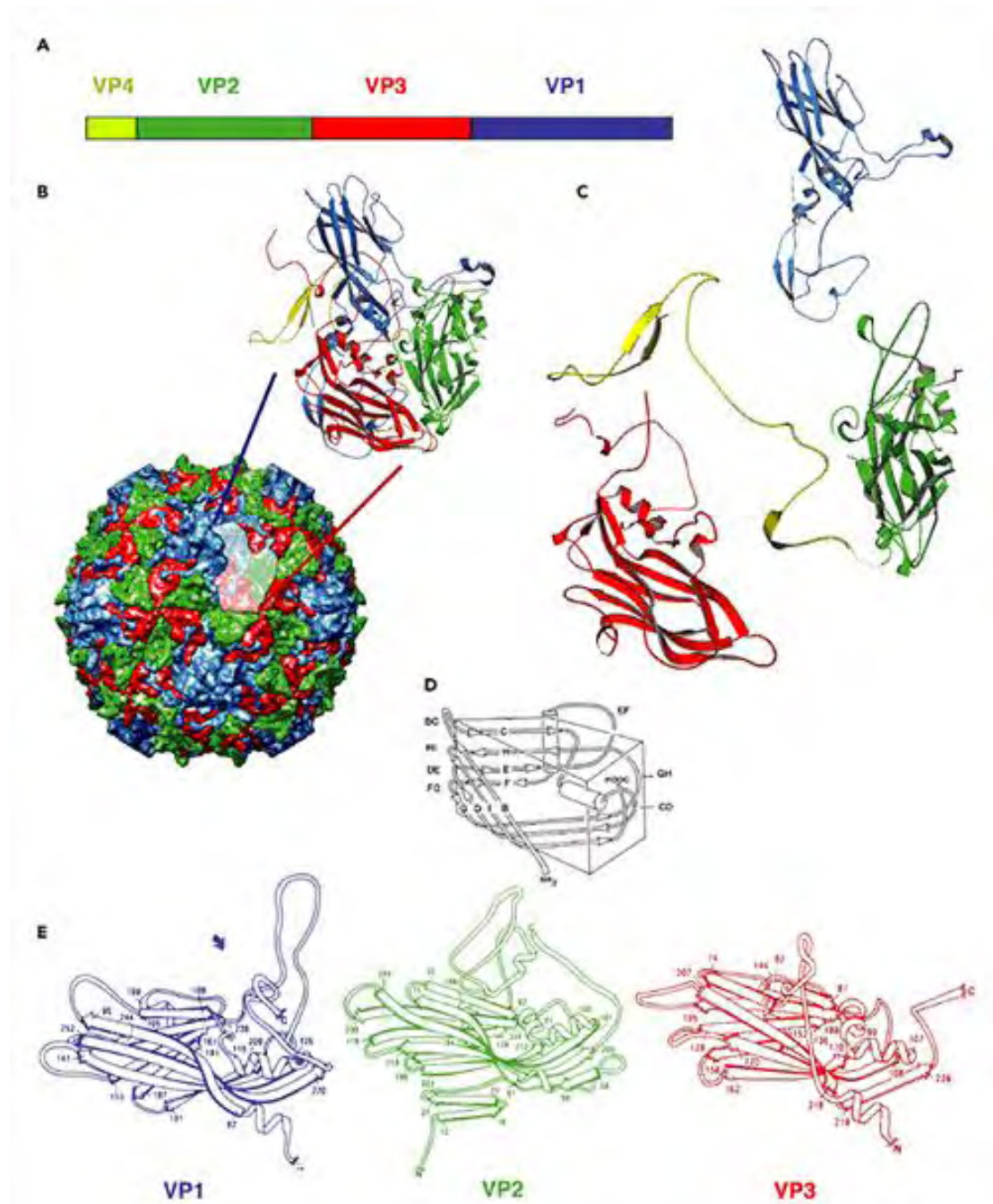
Τα καψίδια των πολιοϊών απαρτίζονται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών [22], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. 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 [106]. Η αντίληψή μας για την δομή των πολιοϊών έκανε ένα μεγάλο άλμα το 1985 όταν οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 [61] καθορίστηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων 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 αλληλουχική ομολογία, 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 οφείλονται 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-AgIII_A και N-AgIII_B, [98].

- 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-AgIII_A αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIII_B από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.



Εικόνα 1.2.2.2: 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. Τρισδιάστατα 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 και VP3 όπου φαίνεται η κοινή δομή β'-βαρελιού.

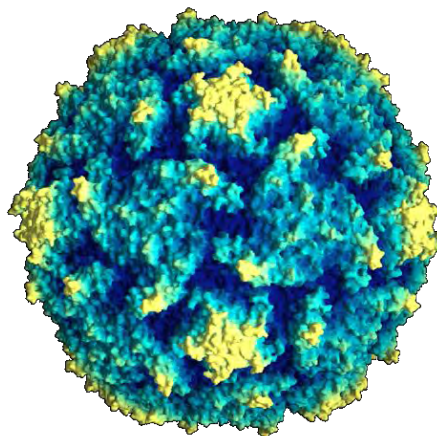
Σχετικά με την επιφάνεια του ισωματίου ανάλυση των δομών των πολιοϊών αποκάλυψε ότι έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή (plateau), σε σχήμα αστεριού, βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενος από μία αυλάκωση (canyon) και ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Αρχικά προτάθηκε ότι η αύλακα αποτελεί την θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς, υπόθεση η οποία αποδείχθηκε σωστή 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 [28]. 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 [46].

Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των Picorna ιών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το γενωμικό RNA, πρόταση βασισμένη 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 [74]. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σταθερότητα του καψιδίου ή την απέκδυση.

1.2.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος

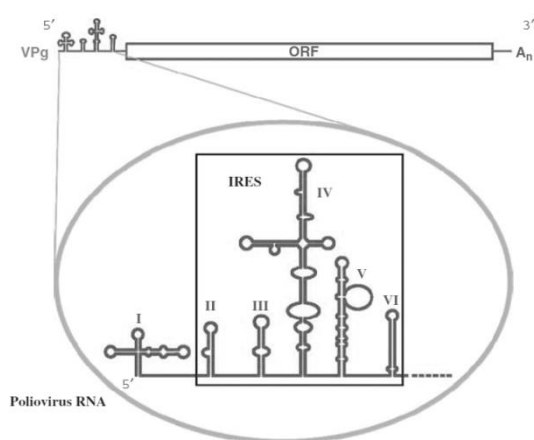
Το γένωμα των πολιοϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA. Το ιικό RNA είναι μολυσματικό καθώς μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο με σκοπό να παράγει όλες τις ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή



Εικόνα 1.2.2.3: 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)

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) [47,73].

Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA με δεσμό O₄-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. Η VPg δεν είναι απαραίτητη για την μόλυνση κυττάρων από τους πολιοϊούς. Εάν αφαιρεθεί από το ιικό RNA με πρωτεϊνάση, δεν παρατηρείται μείωση της ειδικής μολυσματικότητας του ιού. Το mRNA των πολιοϊών διαφέρει από το ιικό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Τα ιικά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα δεν φέρουν τη VPg πρωτεΐνη, αλλά περιέχουν μόνο ουριδινο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους [90,97]. Η αφαίρεση της VPg από το ιικό RNA καταλύεται 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 [89,96].



Εικόνα 1.2.3.1: Η 5' αμετάφραση περιοχή των πολιοϊών μαζί με το IRES το οποίο φαίνεται σε μεγέθυνση.

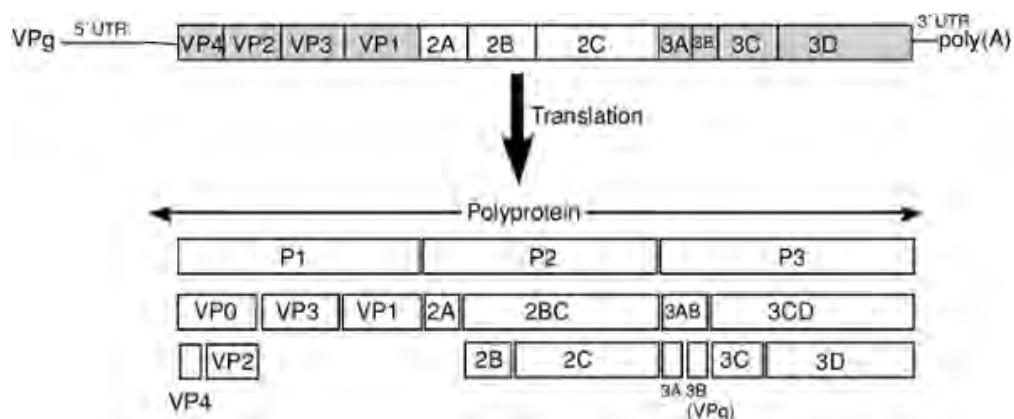
Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας απεκάλυψε αρχικά ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των πολιοϊών έχουν μεγάλο μήκος νουκλεοτιδίων με έντονη δευτεροταγή δομή. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος. Η 5' μη-κωδική περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [102].

Η 3' μη-κωδική περιοχή των πολιοϊών είναι μικρή και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [63]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των πολιοϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [19,110]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των πολιοϊών φέρει μια πολύ(A) ουρά [117]. Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U)

ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(A) του θετικού κλώνου [116]. Ικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό [108].

Τα αποτελέσματα βιοχημικών μελετών σε κύτταρα μολυσμένα από πολιοϊούς προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες [109]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ικό RNA κωδικοποιεί ένα μοναδικό ORF [69,101]. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το ικό 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 ικού καψιδίου, ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία (2^{Apro} , $3C^{pro}$, $3CD^{pro}$) και την αντιγραφή του γενώματος ($2B$, $2C$, $3AB$, $3B^{VPg}$, $3CD^{pro}$, $3D^{pol}$)



Εικόνα 1.2.3.2: Οργάνωση του γενώματος των πολιοϊών. **Πάνω:** διάγραμμα του ικού 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 ικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού.

1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

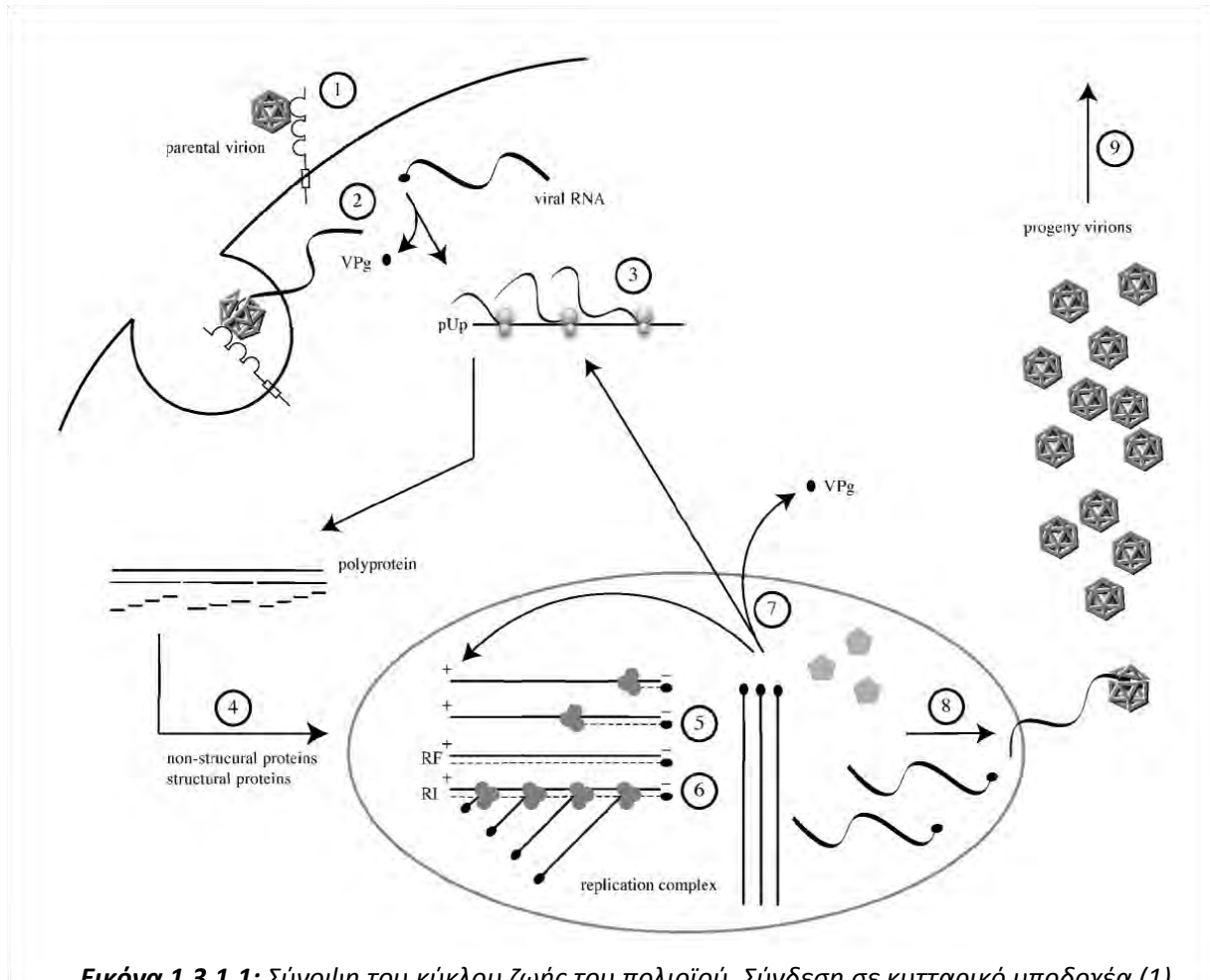
Η αντιγραφή των πολιοϊών γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Το RNA τότε απεκδύεται, μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Όταν εισέρθει το θετικής πολικότητας ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν 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 3CD^{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 RNA κλώνου έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας ενδιάμεσος αρνητικός κλώνος, το βήμα αυτό ακολουθείται από την παραγωγή επιπρόσθετων 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.

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 [102].

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

1.3.1 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 [82].



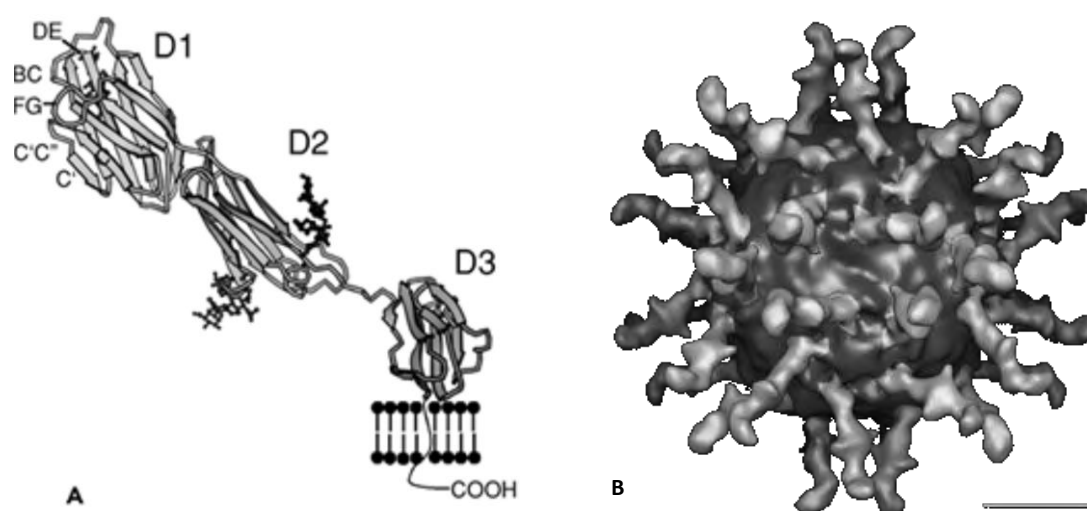
Εικόνα 1.3.1.1: Σύνοψη του κύκλου ζωής του πολιοϊού. Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα (1) και απέκδυση του ιικού γενώματος (2). Αφαιρείται η VPg από το ιικό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται (3). Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (4). Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια. 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). 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).

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 υπερικογένειας των ανασοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές (εικόνα 1.3.1.2). 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 [62]. Η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής 1 του PVR ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των μη-ευάλωτων θηλαστικών, ειδικά στις περιοχές που είναι 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.

Οι αύλακες στο καψίδιο των πολιοϊών είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Μεταλλάξεις στα αμινοξέα που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς [29,30,59,75]. 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 επικρατούσε η άποψη ότι οι αύλακες των πολιοϊών ήταν πολύ βαθιές και στενές για να επιτρέψουν τη διείσδυση στα μόρια αντισωμάτων, τα οποία περιέχουν παρακείμενες περιοχές ανασοσφαιρινών [105].

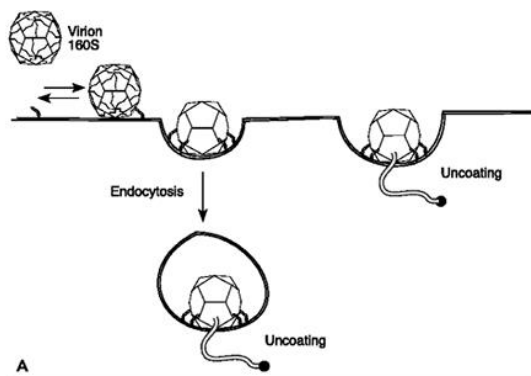


Εικόνα 1.3.1.2: Αλληλεπίδραση των πολιοϊών με τον κυτταρικό υποδοχέα. **A:** μοντέλο του PVR όπου φαίνονται οι Ig-like περιοχές. Ο υποδοχέας έρχεται σε επαφή με τον ιό μόνο μέσω της περιοχής 1 [9]. **B:** Αναδημιουργία εικόνας του πολιοϊού τύπου 1 και η διαλυτή μορφή του PVR, απουσία των διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών περιοχών. Υπάρχουν 60 θέσεις πρόσδεσης σε κάθε ιικό καψίδιο. Τα σύμπλοκα παρήχθησαν με κορεσμένη ποσότητα PVR και όλες οι θέσεις σύνδεσης του καψιδίου είναι κατειλημμένες [9].

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 στην απόκρυψη του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα [102].

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 πλέον στην επιφάνεια του σωματίου A [48]. 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 απέκδυσή του επάγονται από τον PVR [102].

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 [85].



Εικόνα 1.3.1.3: 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. Το ιικό RNA που φαίνεται σαν καμπυλωτή γραμμή εξέρχεται από το σωματίο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων.

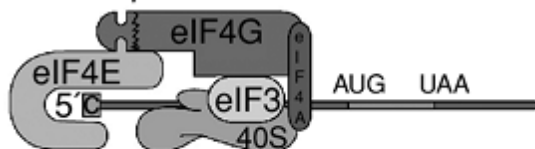
1.3.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

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 καμινιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [5]. Η αλληλούχηση του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [69,101]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*).

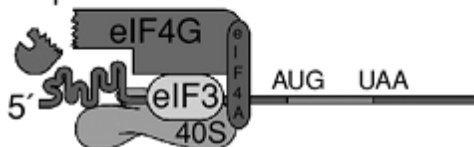
Τα *IRES* των ιών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε ομάδες με βάση ένα αριθμό κριτηρίων όπως: η αρχική αλληλουχία, η δευτεροταγής δομή, η τοποθεσία του κωδικονίου έναρξης και η ενεργότητα σε διάφορα κύτταρα. Οι πολιοϊοί φέρουν *IRES* που ανήκει στην πρώτη ομάδα. Στα τύπου I *IRES* το κωδικόνιο έναρξης 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* και την ανίχνευση του κωδικονίου έναρξης. 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 1.3.2.1).

5'-end dependent



IRES-dependent



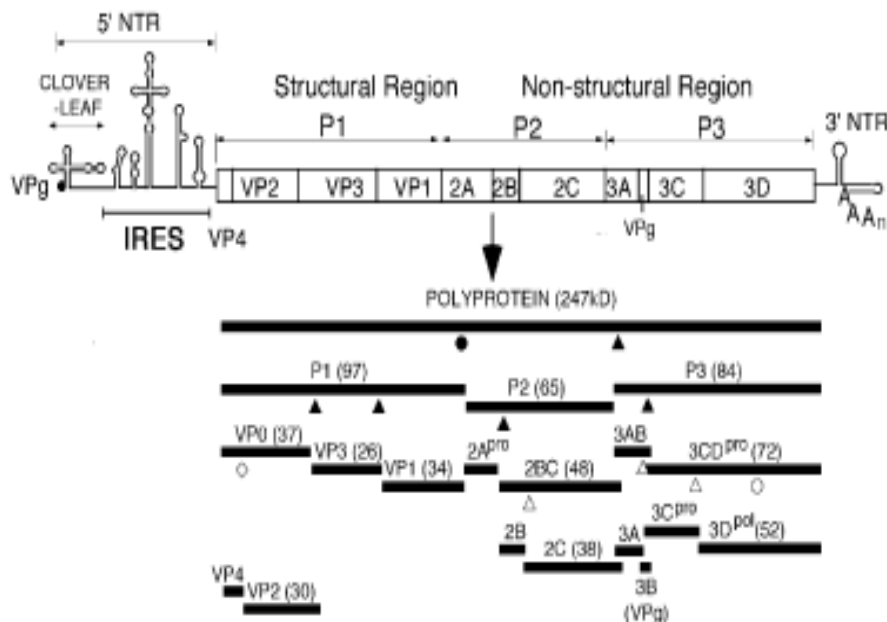
Εικόνα 1.3.2.1: Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Πάνω φαίνεται η 5'-καλύπτρα-εξαρτώμενη έναρξη ενώ κάτω φαίνεται η *IRES*-εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης. Το eIF3-40S σύμπλοκο στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το *IRES*.

Οι πρωτεΐνες των πολιοϊών συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό 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}.

Σε μολυσμένα με πολιοϊό κύτταρα ο αρχικός τεμαχισμός 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 πρωτεΐνάση 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 διπεπίδια 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 πρωτεΐνάση αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, κάνει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπίδια 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 διάσπασης *in-trans* 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 δραστηκή 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 πρωτεΐνάσες και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ιικών γενωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί [102].



Εικόνα 1.3.2.2: 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 [86].

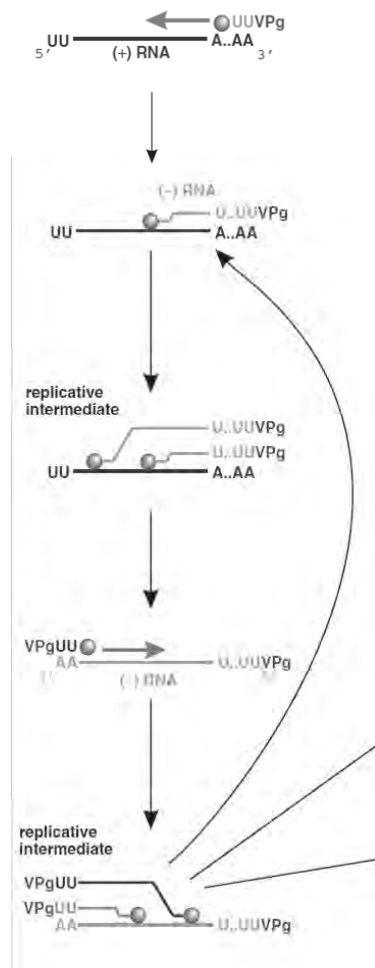
1.3.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Αν και η διαδικασία της αντιγραφής του πολιοϊού είναι αντικείμενο μελέτης κατά 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 πρωτεϊνάση 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 οποία είναι συνδεδεμένη στο ικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να



Εικόνα 1.3.3.1: Ο μηχανισμός αντιγραφής του ικού RNA.

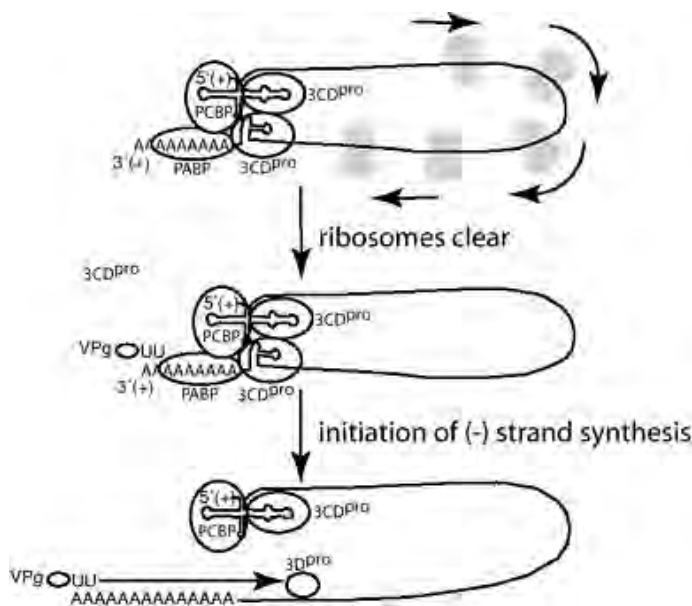
σηματίζει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των πολιοϊών [93,104,115]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [84,87].

Η σύνθεση του ικού mRNA και του ικού 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 [34,107]. Η ική σύνθεση του RNA γίνεται στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών [10,27,42]. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των ικών πρωτεϊνών αντιγραφής του RNA διασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής αυξάνοντας τα επίπεδα δραστικότητας των αντιδράσεων της αντιγραφής.

Τουλάχιστον δύο ικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά 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 [41].

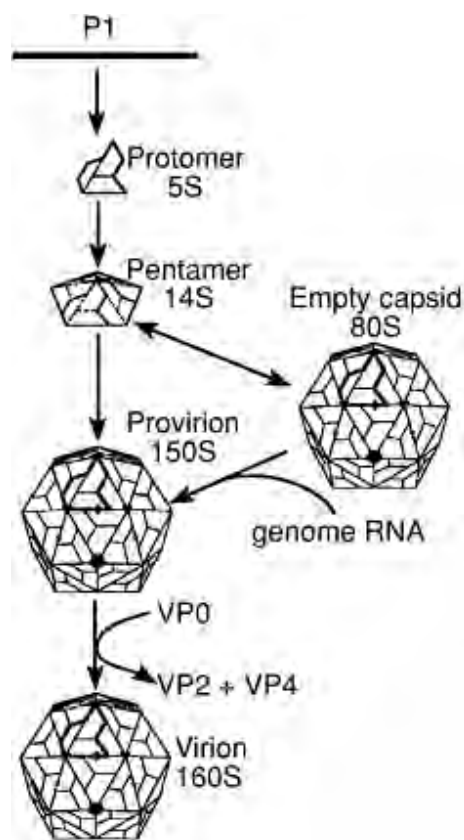
Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή και των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει πότε το RNA αντιγράφεται και πότε μεταφράζεται [51]. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-*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 1.3.3.2: Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου. Οι ιικές 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 ιικό RNA. Στη συνέχεια, η VPg-rUpU αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του ιικού RNA και σχηματίζει το κυκλικό πρωταρχικό RNA σύμπλοκο αντιγραφής. Η σύνθεση του (-)RNA κλώνου ξεκινάει με την επιμήκυνση του VPg-rUpU από την $3D^{pol}$.

1.3.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελιού και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών



Εικόνα 1.3.4.1: 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 ιικά καψίδια 80S. Τέλος, το (+)RNA εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2+VP4 σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 160S ιοσωμάτιο.

μονάδων. Όταν η P1 απελευθερώνεται από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 τεμαχίζονται από την πρωτεΐνάση 3CD^{pro}. Αυτές οι θέσεις τεμαχισμού βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, 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 σχηματίζουν ένα πενταμερές, με συντελεστή καθίζησης 14S.

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 + VP2. Η πρωτεΐνάση που πραγματοποιεί αυτόν τον τελευταίο τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που κόβεται βρίσκεται στο εσωτερικό των άδειων καψιδίων και ώριμων ιοσωματίων 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 [90,91].

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 [112].

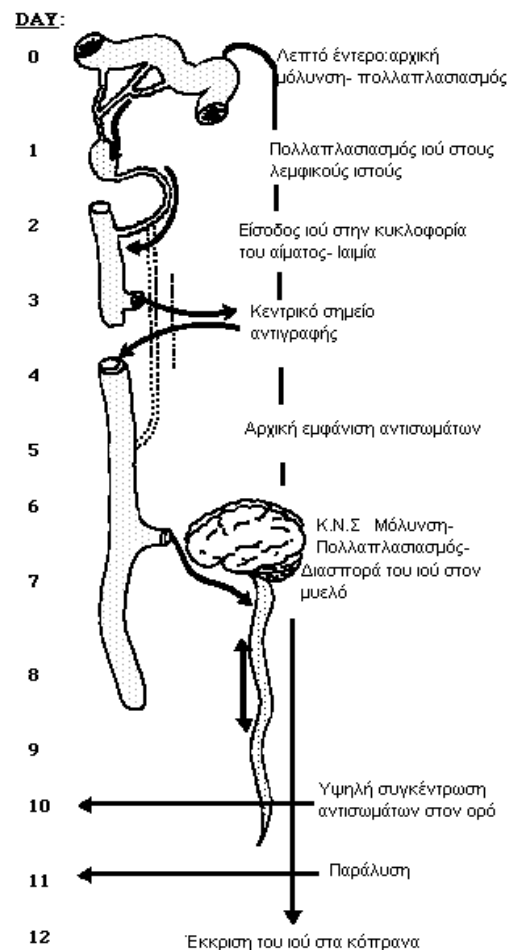
1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Σχετικά με την παθογένεια των πολιοϊών έχουν προταθεί κυρίως τρία μοντέλα [83]:

-**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 [16].

-**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 ιικού φορτίου και τελικά είναι πιθανόν να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ανοσίας του ατόμου.



Εικόνα 1.4.1: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών [81]

1.5 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 [37].

1.5.1 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 επιδιορθωτικών μηχανισμών. 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 για τους πολιοϊούς [114]:

1. Έχουν εξελιχθεί ώστε να έχουν ένα μικρό γένωμα.
2. Αντιγράφονται κοντά στο όριο της καταστροφής λόγω μεταλλάξεων.
3. 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 μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (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 [45].

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 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 [25].

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 μέσω της αρνητικής επιλογής [37].

Η πιθανότητα 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 ιικούς 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 [37].

1.5.2 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 ικών γενωμάτων υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού [40].

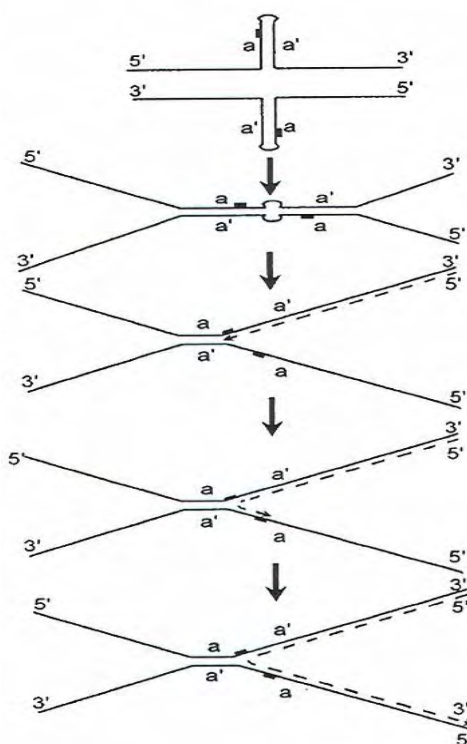
Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στην διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου. Επίσης, συμβάλλει στην δημιουργία ικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, 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 [114].

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

A. 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 ικό RNA και ξαφνικά σταματά και ξανασυνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ικό 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. 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. Επίσης οι (-)RNA κλώνοι 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 κάποιος 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 [3]. Είναι πιθανόν ότι η ακριβής αναγνώριση της θέσης σύνδεσης 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



Εικόνα 1.5.2.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτοσυμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως *a* και *a'*. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντιθέμενο RNA μόριο [2]

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 1.5.2.1) [1].

B. 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 [3]. Κατόπιν, η σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκει είτε μία RNA λιγάση είτε κάποια δραστικότητα ριβοενζύμου [1].

1.6 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

1.6.1 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 [14].

1.6.2 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 [49].

Η μοριακή βάση της εξασθένησης (όπου ο ιός καθίσταται λιγότερο ικανός να προκαλεί ασθένεια) ή της μεταστροφής 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) [14].

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 συμπεριλαμβανομένης 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 [38]. 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 εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) και δεύτερον να οδηγήσει στην εμφάνιση εμβολιο-προερχόμενων πολιοϊών (VDPV) προκαλώντας εκ νέου ξέσπασμα πολιομυελίτιδας.

1.6.3 VAPP – VDPV

Σε έναν πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων ο εμβολιασμός με το OPV συνδέεται με την εμφάνιση εμβολιοσυνδεδεμένης 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 ή/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 [38].

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 [49].

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 [77]. 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 [32,56], ii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και πολιοϊών αγρίου τύπου [33,52] και iii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών Sabin και άλλων εντεροϊών (NPEVs: non-polio Enteroviruses) [18]. 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) [32,58]. 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 [39]. Ωστόσο, σε κάποιες πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανασυνδυασμός έχει εντοπιστεί στα άκρα της περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο (P1) [12,25,79]. 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 [52,66].

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 [49]. 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 [49].

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. Οι VDPV μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: α) στελέχη VDPV που κυκλοφορούν στο περιβάλλον (cVDPV), β) VDPV που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPV) και γ) αμφιλεγόμενοι VDPV (aVDPV) στους οποίους η πηγή της μόλυνσης είναι άγνωστη.

1.7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

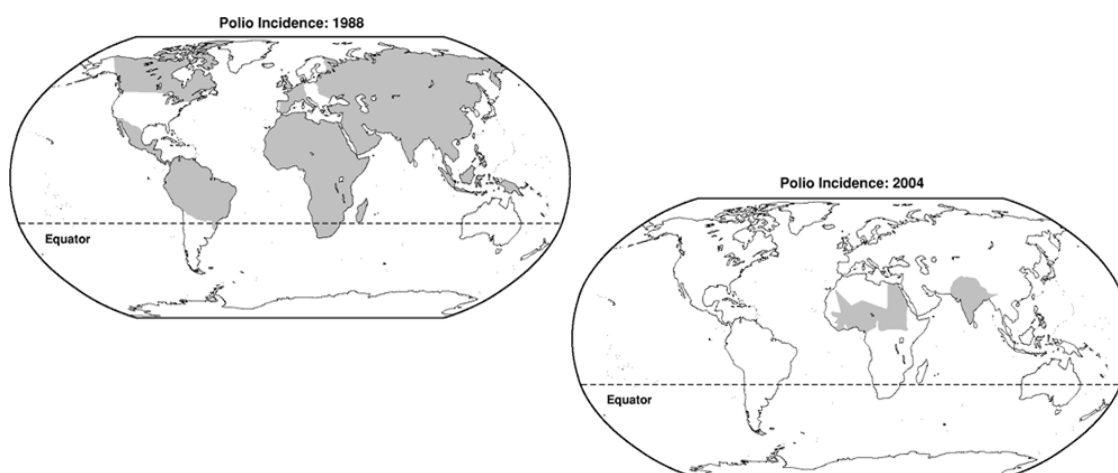
Το πεδίο των πολιοϊών είχε την τύχει να έχει περισσότερα του ενός εξαιρετικά εμβόλια, καθώς ήταν διαθέσιμα τόσο το νεκρό ενδομυϊκό εμβόλιο του Salk όσο και το εξασθενημένο από στόματος εμβόλιο του Sabin. Και τα δύο εμβόλια οδήγησαν στην παραγωγή αντι-PV αντισωμάτων με την επακόλουθη προστασία από τη νόσο [88]. 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 της VAPP και μελέτες στη συνέχεια απέδειξαν ότι αυτό ήταν επιτυχές [4].

Το πρόγραμμα εμβολιασμού κατά των πολιοϊών αποδείχθηκε επιτυχημένο. Ως αποτέλεσμα της χρήσης του OPV, δεν προέκυψε κανένα περιστατικό παραλυτικής πολιομυελίτιδας από αγρίου τύπου πολιομυελίτιδα από το 1980 στις ΗΠΑ 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 ο ιός αντέχει για ένα σχετικά μικρό χρόνο στο περιβάλλον. Οι εμβολιασμοί ρουτίνας 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 [35].

Το 1988, ο ΠΟΥ, βασιζόμενος εν μέρει στην ταχεία πρόοδο των ενεργειών της εξάλειψης στην Αμερική, εξέδωσε ένα ψήφισμα για την παγκόσμια εξάλειψη του πολιοϊού πριν το τέλος του 20^{ου} αιώνα. Το ψήφισμα αυτό επιβεβαιώθηκε το Μάιο του 1999 και του 2004 και παροτρύνθηκε μια επιτάχυνση των ενεργειών με συγκεκριμένη

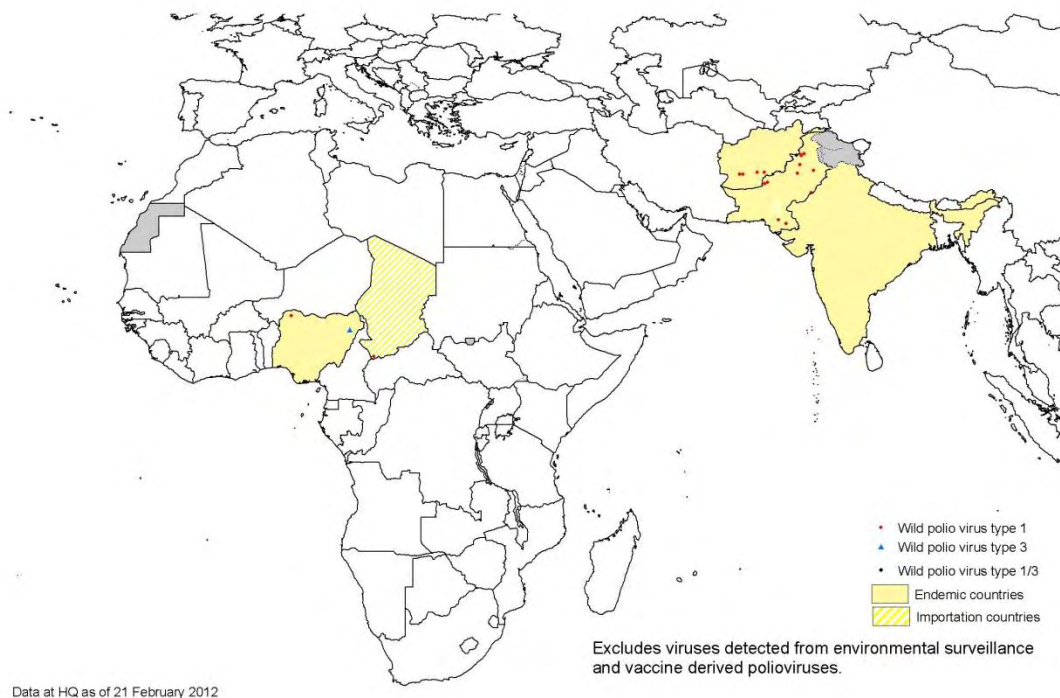
εστίαση στις απομεινάντες ενδημικές περιοχές. Οι ενέργειες αυτές περιλαμβάνουν επιπρόσθετες περιοδείες της Εθνικής Ημέρας Εμβολιασμού, εκτεταμένη επιτήρηση στις κοινωνίες υψηλού κινδύνου και «ξεκαθάρισμα» των εστιακών δεξαμενών.

Τα στοιχεία αυτά της στρατηγικής εξάλειψης των PVs αποδείχθηκαν επιτυχημένα σε πολλά σημεία του κόσμου. Από τη στιγμή που ξεκίνησε το πρόγραμμα, πολλές χώρες απαλλάχθηκαν από την κυκλοφορία εντόπιων PVs. 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, ενώ το 2005 ο αριθμός των χωρών με αποδεδειγμένα ή εκτιμώμενα κρούσματα πολιοϊών ήταν μόνο 15 και η Αμερική, Ευρώπη και η Άπω Ανατολή ήταν πιστοποιημένα απαλλαγμένες από PVs [7]. 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 των εμβολιασμών 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 ακόμα και 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 PVs ανασυστάθηκε. Έτσι εντάθηκαν οι ενέργειες ελέγχου της περαιτέρω εξάπλωσης και εξάλειψης του ιού σε αυτές τις περιοχές που άλλοτε ήταν απαλλαγμένες από πολιοϊούς [23].



Εικόνα 1.7.1: Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει την κυκλοφορία του άγριου τύπου PV το 1998 και το 2004. Πηγή: WHO-Centers for Disease Control, unpublished data.

Σήμερα τα κρούσματα πολιομυελίτιδας έχουν ελαττωθεί σε 175 το χρόνο σε τέσσερις μόνο ενδημικές χώρες: Πακιστάν, Αφγανιστάν, Ινδία και Νιγηρία. Αξίζει να σημειωθεί πως όλες αυτές οι περιπτώσεις πολιομυελίτιδας ήταν αποτέλεσμα μόλυνσης με άγριο στέλεχος PV1 ή PV3. Ένδειξη η οποία θα οδηγήσει στην κατάργηση της χορήγησης του Sabin 2 στελέχους, μέσω του OPV εμβολίου, στις μαζικές εκστρατείες εμβολιασμού. Η κίνηση αυτή γίνεται με σκοπό την αποφυγή περαιτέρω περιπτώσεων πολιομυελίτιδας λόγω του τύπου 2 cVDPV. Πέντε εκδηλώσεις εμβολιο-συνδεόμενης πολιομυελίτιδας λόγω του τύπου 2 cVDPV το 2012 είχαν ως αποτέλεσμα να αφήσουν παράλυτα 37 παιδιά στο Πακιστάν και σε 5 χώρες της Αφρικής (Κένυα, Τσάντ, Δημοκρατία του Κονγκό, Νιγηρία και Σομαλία) [65].



Εικόνα 1.7.2: Χάρτης των κρουσμάτων πολιομυελίτιδας για το 2012. Πηγή: *Global Polio Eradication Initiative*

2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν ο σχεδιασμός συγκεκριμένων εκκινητικών μορίων, η επιλογή των κατάλληλων ανασυνδυασμένων εμβολιο-προερχόμενων στελεχών και η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για την εκτέλεση PCR δοκιμασιών με σκοπό την ανάπτυξη μιας Multiplex RT-PCR μεθόδου για την ταυτοποίηση σπάνιων γενετικών ανασυνδυασμών από τη VP1 έως και τη 3D γενωμική περιοχή εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής 14 δείγματα, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται, η γενωμική περιοχή, ο τύπος και η θέση του ανασυνδυασμού.

| Δείγμα | Προέλευση | Τύπος ανασυνδυασμού | Ανα/σμός υπό μελέτη | Θέση ανα/σμού | Γενωμική Περιοχή |
|------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|------------------|
| IK | Ουδετεροπενία | S3/S2 | | 3275-3285 | VP1 |
| 742 | Περιβάλλον | S1/S3/S2 | 1 ^{ος} | 3461-3465 | 2A |
| 415 | VAPP | S3/S1 | | 4880-4887 | 2C |
| LK3 | Περιβάλλον | S3/S2/S1 | 2 ^{ος} | 4942-4958 | 2C |
| LK6 | Περιβάλλον | S3/S2/S1 | 2 ^{ος} | 4942-4958 | 2C |
| LK10 | Περιβάλλον | S3/S2/S1 | 2 ^{ος} | 4942-4958 | 2C |
| I34 | VAPP | S2/S1/S2/S1 | 1 ^{ος} | 4984-4994 | 2C |
| EP9 (580) | Υγιής – OPV | S2/S1 | | 5314-5318 | 3A |
| ID | VAPP | S2/S1 | | 5521-5526 | 3C |
| 738 | Περιβάλλον | S3/S2/S1 | 1 ^{ος} | 5804-5814 | 3C |
| I34 | VAPP | S2/S1/S2/S1 | 2 ^{ος} | 5999-6005 | 3D |
| IF | Υγιής – OPV | S2/S1 | | 6247-6281 | 3D |
| EP12 (730) | Υγιής – OPV | S2/S1 | | 6337-6362 | 3D |
| ENP6 | Περιβάλλον | S2/S1 | | 6337-6362 | 3D |
| I34 | VAPP | S2/S1/S2/S1 | 3 ^{ος} | 6388-6389 | 3D |
| 584 | Περιβάλλον | S3/S2/S1 | 2 ^{ος} | 7150-7172 | 3D |

Πίνακας 3.1.1 : Τα κλινικά δείγματα και τα χαρακτηριστικά τους ως προς τον τύπο, τη θέση και τη γενωμική περιοχή του ανασυνδυασμού.

3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων τα οποία είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε κυτταροκαλλιέργειες, 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 μικροτιλοποίησης (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 χαρακτηριστικής κυτταροπαθογόνου δράσης (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 με τη μεγαλύτερη αραιώση που παρουσίασε 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 3.2.1: 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.

3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΪΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ο αριθμός των ιϊκών σωματιδίων που περιέχονται σε 100 μl του ιϊκού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιϊκός τίτλος υπολογίστηκε και για τα 14 δείγματα όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και για τα πρότυπα Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3. Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (εικόνα 3.2.1) προστέθηκαν 100 μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στις πλάκες, για κάθε ιϊκό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10^{-6} . Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπολογίστηκε ο τίτλος 2 διαφορετικών ιϊκών στελεχών. Συγκεκριμένα, για κάθε ιϊκό στέλεχος, σε 6 πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (τύπου erpendorf) τοποθετήθηκαν 900 μl MM. Στη συνέχεια, 100 μl από το απόθεμα κάθε ιϊκού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στον πρώτο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας έτσι την 10^{-1} αραιώση του ιϊκού δείγματος· 100 μl από την 10^{-1} αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στο δεύτερο πλαστικό σωλήνα δημιουργώντας την 10^{-2} αραιώση του ιϊκού δείγματος κ.ο.κ. Η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι τη δημιουργία της 10^{-6} αραιώσης. Στη συνέχεια, 400 μl της 10^{-1} αραιώσης του πρώτου ιϊκού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις B2-B5 (100 μl/θέση), ενώ 400 μl της 10^{-1} αραιώσης του δεύτερου ιϊκού στελέχους ενοφθαλμίστηκαν στις θέσεις B6-B9 (100 μl/θέση). Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι και τον ενοφθαλμισμό της 10^{-6} αραιώσης στην πλάκα. Στις στήλες 10 και 11 δεν προστέθηκε ιϊκό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Η πλάκα τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C και η παρακολούθησή της για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκησε 5 μέρες. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιϊκός τίτλος είναι:

$$\log\text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

CCID: Cell Culture Infective Dose

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

Στον πίνακα 3.1 φαίνονται οι τιμές CCID_{50} των δειγμάτων που προέκυψαν σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο. Στις PCR που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν φθίνουσες συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος με σκοπό να μετρηθεί και η ευαισθησία της κάθε PCR δοκιμασίας. Για το λόγο αυτό έγιναν σειριακές αραιώσεις του κάθε

δείγματος (όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 2) έτσι ώστε κάθε δείγμα να υπάρχει σε συγκεντρώσεις των τιμών 10^5 , 10^3 , 10 και 1 CCID₅₀/0,1ml. Η συγκέντρωση των πρότυπων στελεχών Sabin που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR ήταν 10^5 CCID₅₀/0,1ml.

| Δείγμα | CCID ₅₀ |
|------------|--------------------|
| IK | 10^6 |
| 742 | 10^8 |
| 415 (MB1) | $10^{7.5}$ |
| LK3 | $10^{6.25}$ |
| LK6 | $10^{6.25}$ |
| LK10 | $10^{6.25}$ |
| I34 | $10^{5.5}$ |
| EP9 (580) | $10^{6.75}$ |
| ID | $10^{7.25}$ |
| 738 | $10^{8.5}$ |
| I34 | $10^{5.5}$ |
| IF | 10^6 |
| EP12 (730) | $10^{6.25}$ |
| ENP6 | $10^{5.5}$ |
| I34 | $10^{5.5}$ |
| 584 | 10^8 |

Πίνακας 3.3.1: Οι τιμές CCID₅₀ για κάθε δείγμα.

3.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [21]. 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 φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. 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.

3.5 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(N7) (Metabion) (100pmol/μl) (1μl/tube), 40mM dNTPs (1μl/tube) και ddH₂O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρωση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Techne TC-512. 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), RNase out (20units/μl) (0,5μl/tube), M-MLV (Invitrogen) (100units/μl) (0,5μl/tube) και ddH₂O (1μl/tube). Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, ξανά φυγοκέντρωση 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.

3.6 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.

- Να εμφανίζονται τουλάχιστον 2 αταίριαστα ζευγαρώματα μεταξύ του εκκινητή και των υπόλοιπων 2 στελεχών Sabin στα τελευταία 4 νουκλεοτίδια του 3' άκρου του εκκινητή
- 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 μικρότερη συμπληρωματικότητα τόσο στα άκρα όσο και σε ολόκληρο το μήκος τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία δομών φουρκέτας στους εκκινητές, φαινόμενο που παρεμποδίζει τη διαδικασία της PCR.

Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια σχεδιάστηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητών:

| Εκκινητές | Αλληλουχία (5'→3') | Πολικότητα | Θέση |
|-------------|------------------------|------------|------------------------|
| VP1-S3/S2-S | GTACAGCGCCATGACAGTTG | Sense | 3157-3176 ^c |
| VP1-S3/S2-A | TTTCTGGTAGTGGGGTGAGC | Antisense | 3348-3367 ^b |
| 2A-S1/S3-S | GGTACGCTTACACCCCTCTC | Sense | 3344-3363 ^a |
| 2A-S1/S3-A | CCTTGCTATTGAGTCGGTACCT | Antisense | 3517-3538 ^c |
| 2C-S3/S1-S | AGCCTCCACCAACTCCAGTC | Sense | 4771-4790 ^c |
| 2C-S3/S1-A | CCTGGTGTCCAGCAAACAGT | Antisense | 5353-5372 ^a |
| 2C-S2/S1-S | AGTACTCCAGAGACGGAAAGC | Sense | 4880-4900 ^b |
| 2C-S2/S1-A | CCTGGCTGGTGATGTTGACT | Antisense | 5239-5258 ^a |
| 3C-S2/S1-S | TAGCCGGTGTCGTGTACGTT | Sense | 5324-5342 ^b |
| 3C-S2/S1b-A | AGCGCTTTGGCATCCAAG | Antisense | 5606-5623 ^a |
| 3C-S3/S2-S | CCACTCAAATCACCGAGACG | Sense | 5700-5719 ^c |
| 3C-S3/S2-A | TGATCGGGTATCCCACTTCT | Antisense | 6015-6034 ^b |
| 3D-S1/S2-S | TCCACGACAACGTGGCTATT | Sense | 5526-5545 ^a |
| 3D-S1/S2-A | GTTGGCCAGCGTAATGATCC | Antisense | 6219-6238 ^b |
| 3D-S2/S1-S | AAGGAACCAGCAGTCCTTACC | Sense | 6097-6117 ^b |
| 3D-S2/S1-A | GATCGCACCCCTACTGCTGAA | Antisense | 6607-6626 ^a |
| 3D-S2/S1b-S | TTGGGGACAGGGTGGATTAT | Sense | 6758-6777 ^b |
| 3D-S2/S1b-A | GCCAAGCTAATAGGCACAGA | Antisense | 7234-7253 ^a |

Πίνακας 3.6.1: Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν, η αλληλουχία, η πολικότητα και η θέση τους στο γονιδίωμα των στελεχών Sabin 1(a), Sabin 2(b), Sabin3(c).

3.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

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 3.7.1), 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 Polymerase-Recombinant (Invitrogen) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Techne TC-512) στις εξής συνθήκες:

| | |
|------------|--|
| 1 κύκλο | 3 λεπτά στους 94 °C για την αποδιάταξη του cDNA -30 δευτερόλεπτα στους 94 °C για την αποδιάταξη του cDNA. |
| 50 κύκλους | -10 δευτερόλεπτα στις αντίστοιχες θερμοκρασίες για κάθε δείγμα όπως αναφέρονται στον πίνακα 3.7.1 -30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση |
| 1 κύκλο | 5 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων |

Όπως προαναφέρθηκε, το γονιδίωμα του sabin φέρει περιοχές οι οποίες είναι αρκετά συντηρημένες, με αποτέλεσμα οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων (s1, s2 και s3) να είναι πολύ λίγες. Για το λόγο αυτό κάθε διαφορετικός ανασυνδυασμός (ζεύγος εκκινητών) απαιτούσε και διαφορετικές συνθήκες (συγκέντρωση MgCl₂ και θερμοκρασία υβριδισμού). Οι συνθήκες αυτές αντιστοιχούν στις PCR για τις οποίες ενισχύονται τα τμήματα μεταξύ των εκκινητών στα ανασυνδυασμένα δείγματα, σε όσο το δυνατόν μικρότερη συγκέντρωση (CCID₅₀/0.1ml), χωρίς να ενισχύονται τα αντίστοιχα τμήματα στα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin. Πετυχαίνοντας έτσι τη μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία και εξειδίκευση για κάθε ζεύγος εκκινητών. Έτσι, στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι συνθήκες οι οποίες εφαρμόστηκαν στα προς μελέτη δείγματα:

| | Ζεύγος εκκινητών | Μήκος Προϊόντος (bp) | Συγκέντρωση MgCl ₂ | Θερμοκρασία υβριδισμού | Τύπος ανασυνδυασμού & περιοχή |
|----|----------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 1 | VP1-S3/S2-S VP1-S3/S2-A | 203 bp | 2mM | 60° C | S3/S2 VP1 |
| 2 | 2A-S1/S3-S 2A-S1/S3-A | 204 bp | 1mM | 63° C | S1/S3 2A |
| 3 | 2C-S3/S1-S 2C-S3/S1-A | 593 bp | 1,2mM | 64° C | S3/S1 2C |
| 4 | 2C-S2/S1-S 2C-S2/S1-A | 378 bp | 1,5mM | 63° C | S2/S1 2C |
| 5 | 2C-S2/S1-S 3C-S2/S1b-A | 742 bp | 1,5mM | 55° C | S2/S1 3A |
| 6 | 3C-S2/S1-S 3C-S2/S1b-A | 298 bp | 1,5mM | 55° C | S2/S1 3C |
| 7 | 3C-S3/S2-S 3C-S3/S2-A | 327 bp | 1,5mM | 60° C | S3/S2 3C |
| 8 | 3D-S1/S2-S 3D-S1/S2-A | 714 bp | 1mM | 60° C | S1/S2 3D |
| 9 | 3D-S2/S1-S 3D-S2/S1-A | 529 bp | 1,2mM | 64° C | S2/S1 3D |
| 10 | 3D-S2/S1b-S 3D-S2/S1b-A | 495 bp | 1,5mM | 60° C | S2/S1 3D |

Πίνακας 3.7.1: Παρουσιάζονται η συγκέντρωση του MgCl₂ καθώς και η θερμοκρασία υβριδισμού που εφαρμόστηκαν σε κάθε ζεύγος εκκινητών κατά τις PCR αντιδράσεις.

3.8 MULTIPLEX PCR

Στη Multiplex PCR οι παραπάνω 10 απλές PCR αντιδράσεις ομαδοποιήθηκαν σε 4 αντιδράσεις. Η ομαδοποίηση των αντιδράσεων σε 4 group έγινε σύμφωνα με ορισμένους παράγοντες:

A. Τα προϊόντα σε κάθε group να διαφέρουν τουλάχιστον κατά 50bp έτσι ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός των προϊόντων κατά την ηλεκτροφόρηση.

B. Οι θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών να είναι παρόμοιες.

Γ. Οι θέσεις των ανασυνδυασμών που μελετούνται να μην βρίσκονται σε γειτονικές γενωμικές περιοχές, καθώς, σύμφωνα με τον σχεδιασμό των εκκινητών στην παρούσα εργασία, υπάρχει η περίπτωση να εμφανιστεί προϊόν στα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin.

Έτσι σύμφωνα με τους παραπάνω παράγοντες η ομαδοποίηση των 10 PCR αντιδράσεων σε 4 multiplex PCR αντιδράσεις φαίνεται στον πίνακα 3.8.1

| | Γενωμικές Περιοχές | Τύποι Ανα/σμού | Εκκινητές | Προϊόν (bp) | Θερμοκρασία Υβριδισμού | Συγκέντρωση MgCl ₂ |
|----------------|--------------------|----------------|----------------------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| Group 1 | VP1 | S3/S1 | VP1-S3/S1-S VP1-S3/S1-A | 203bp | 61° C | 2.5mM |
| | 2C | S2/S1 | 2C-S2/S1-S 2C-S2/S1-A | 378bp | | |
| | 3A | S2/S1 | 2C-S2/S1-S 3C-S2-S1b-A | 742bp | | |
| Group 2 | 2A | S1/S3 | 2A-S1/S3-S 2A-S1/S3-A | 204bp | 67° C | 2mM |
| | 2C | S3/S1 | 2C-S3/S1-S 2C-S3/S1-A | 593bp | | |
| | 3D | S2/S1 | 3D-S2/S1-S 3D-S2/S1-A | 529bp | | |
| Group 3 | 3C | S3/S2 | 3C-S3/S2-S 3C-S3/S2-A | 327bp | 65° C | 2mM |
| | 3D | S1/S2 | 3D-S1/S2-S 3D-S1/S2-A | 714bp | | |
| Group 4 | 3C | S2/S1 | 3C-S2/S1-S 3C-S2/S1b-A | 298bp | 66° C | 2mM |
| | 3D | S2/S1 | 3D-S2/S1b-S 3D-S2/S1b-A | 495bp | | |

Πίνακας 3.8.1: Τα 4 group των multiplex-PCR αντιδράσεων. Παρουσιάζονται οι εκκινητές, οι γενωμικές περιοχές, οι τύποι ανασυνδυασμού και τα αντίστοιχα προϊόντα για κάθε group, καθώς επίσης και οι συνθήκες (θερμοκρασία υβριδισμού και συγκέντρωση MgCl₂) για κάθε αντίδραση.

Και στην περίπτωση των Multiplex-PCR αντιδράσεων, όπως και στις απλές PCR αντιδράσεις, εφαρμόστηκαν διάφορες συνθήκες, έως ότου καταλήξουμε σε αυτές του πίνακα 3.8.1. Οι συνθήκες αυτές αντιστοιχούν στις Multiplex-PCR για τις οποίες ενισχύονται τα τμήματα μεταξύ των εκκινητών στα ανασυνδυασμένα δείγματα, σε όσο το δυνατόν μικρότερη συγκέντρωση (CCID₅₀/0.1ml), χωρίς να ενισχύονται τα αντίστοιχα τμήματα στα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin. Πετυχαίνοντας έτσι τη μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία και εξειδίκευση για κάθε ζεύγος εκκινητών.

Επίσης στις αντιδράσεις αυτές ελέγχθηκε και η ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης όλων των εξεταζόμενων ανασυνδυασμών για κάθε group. Έτσι δημιουργήθηκαν Mix για κάθε group τα οποία περιείχαν ίσες ποσότητες ανασυνδυασμένων δειγμάτων.

Η κάθε αντίδραση της multiplex PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος του κάθε μικροσωληναρίου ήταν 25μl. Αυτά τα 25μl αποτελούνται από: 2.5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), διάλυμα MgCl₂

50mM (τελικής συγκέντρωσης όπως φαίνεται στον πίνακα 3.8.1), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (KAPA2G Buffer A 5x), 0.25μl από κάθε εκκινητή (50pmol/μl), 0.5 Units ενζύμου KAPA2G Fast Hot Start (KAPA), 2μl cDNA από κάθε δείγμα και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 25μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Techne TC-512) στις εξής συνθήκες:

| | |
|------------|--|
| 1 κύκλο | 2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA -15 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. |
| 50 κύκλους | -10 δευτερόλεπτα στις αντίστοιχες θερμοκρασίες για κάθε δείγμα όπως αναφέρονται στον πίνακα 3.8.1 -10 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση |

3.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

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

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

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για κάθε τύπο ανασυνδυασμού δημιουργήθηκε ένα ζεύγος εκκινήτων που ενισχύει την περιοχή του ανασυνδυασμού. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, 2 και 3 καθώς επίσης και δις απεσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε PCR αντίδραση που εκτελέστηκε σύμφωνα με τον πίνακα 3.7.1

| | ΠΕΡΙΟΧΗ | ΑΝΑΣΥΝΔ | ΠΡΟΪΟΝ (bp) | ΔΕΙΓΜΑ | CCID ₅₀ /0.1ml | | | | S1 | S2 | S3 | ddH ₂ O |
|----|---------|---------|-------------|-----------|---------------------------|-----------------|----|---|----|----|----|--------------------|
| | | | | | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 | 1 | | | | |
| 1 | VP1 | S3/S2 | 203 | IK | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 2 | 2A | S1/S3 | 204 | 742 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 3 | 2C | S3/S1 | 593 | 415 | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 2C | S2/S1 | 378 | LK3 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | | | | LK6 | | | | | | | | |
| | | | | LK10 | | | | | | | | |
| | | | | I34 | | | | | | | | |
| 5 | 3A | S2/S1 | 742 | EP9 (580) | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 6 | 3C | S2/S1 | 298 | ID | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 3C | S3/S2 | 327 | 738 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 8 | 3D | S1/S2 | 714 | I34 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 9 | 3D | S2/S1 | 529 | IF | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | | | | EP12(730) | | | | | | | | |
| | | | | ENP6 | | | | | | | | |
| | | | | I34 | | | | | | | | |
| 10 | 3D | S2/S1 | 495 | 584 | + | + | - | - | - | - | - | - |

Πίνακας 4.1.1: Συγκεντρικός πίνακας των 10 PCR αντιδράσεων . Παρουσιάζονται οι θέσεις και οι τύποι ανασυνδυασμού, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση και το αποτέλεσμα της κάθε PCR. Με (+) σημειώνονται τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν το αναμενόμενο προϊόν, ενώ με (-) σημειώνεται η απουσία του αναμενόμενου προϊόντος.

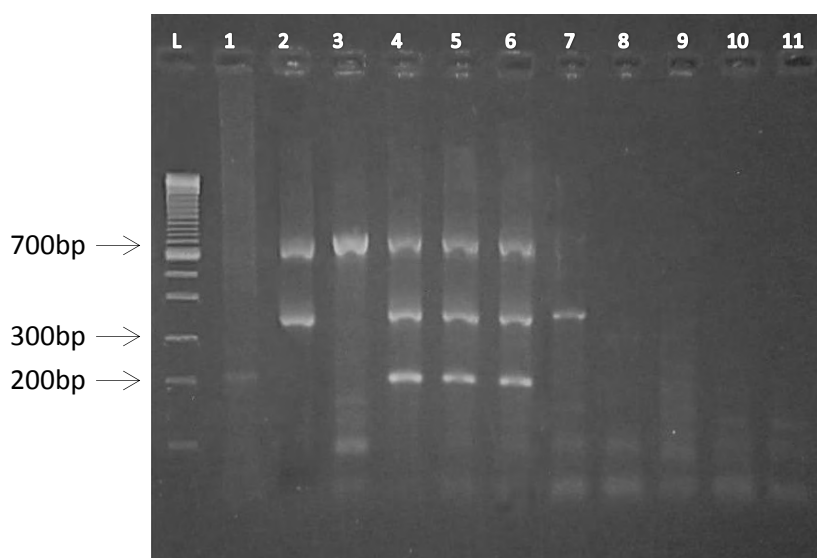
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MULTIPLEX-PCR

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.8.1 εφαρμόστηκαν τέσσερις Multiplex-PCR αντιδράσεις. Τα αποτελέσματα κάθε αντίδρασης όπως αυτά προέκυψαν έπειτα από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσιάζονται παρακάτω:

Group 1:

| Γενομικές Περιοχές | Τύποι Ανα/σμού | Εκκινητές | Προϊόν (bp) | Θερμοκρασία Υβριδισμού | Συγκέντρωση MgCl ₂ |
|--------------------|----------------|----------------------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| VP1 | S3/S1 | VP1-S3/S1-S VP1-S3/S1-A | 203bp | | |
| 2C | S2/S1 | 2C-S2/S1-S 2C-S2/S1-A | 378bp | 61°C | 2.5mM |
| 3A | S2/S1 | 2C-S2/S1-S 3C-S2-S1b-A | 742bp | | |

Στο Group 1 επαληθεύτηκαν και οι τρεις τύποι ανασυνδυασμού δίνοντας τα αντίστοιχα αναμενόμενα προϊόντα στα ανασυνδυασμένα δείγματα, συγκέντρωσης μέχρι και 10 CCID₅₀/0.1ml, ενώ τα πρότυπα στελέχη δεν απέδωσαν κανένα προϊόν.

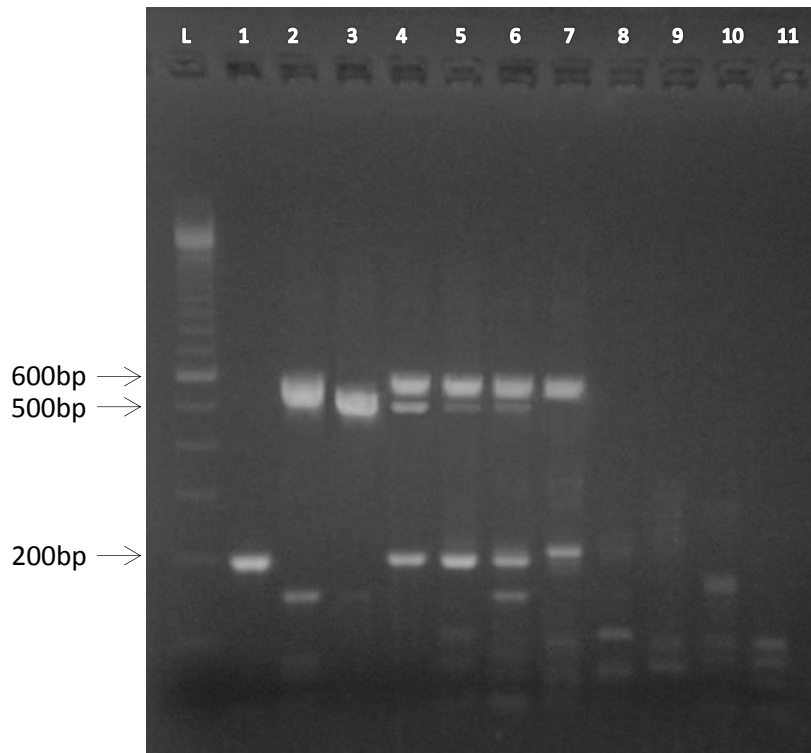


| Θέση | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Δείγμα | IK | LK3 | EP9 | Mix | Mix | Mix | Mix | S1 | S2 | S3 | ddH ₂ O |
| CCID ₅₀ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 | 1 | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | - |

Group 2:

| Γενωμικές Περιοχές | Τύποι Ανα/σμού | Εκκινητές | Προϊόν (bp) | Θερμοκρασία Υβριδισμού | Συγκέντρωση MgCl ₂ |
|--------------------|----------------|--------------------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| 2A | S1/S3 | 2A-S1/S3-S 2A-S1/S3-A | 204bp | 67° C | 2mM |
| 2C | S3/S1 | 2C-S3/S1-S 2C-S3/S1-A | 593bp | | |
| 3D | S2/S1 | 3D-S2/S1-S 3D-S2/S1-A | 529bp | | |

Στο Group 2 επαληθεύτηκαν και οι τρεις τύποι ανασυνδυασμού δίνοντας τα αντίστοιχα αναμενόμενα προϊόντα στα ανασυνδυασμένα δείγματα, συγκέντρωσης μέχρι και 10 CCID₅₀/0.1ml, ενώ τα πρότυπα στελέχη δεν απέδωσαν κανένα προϊόν.

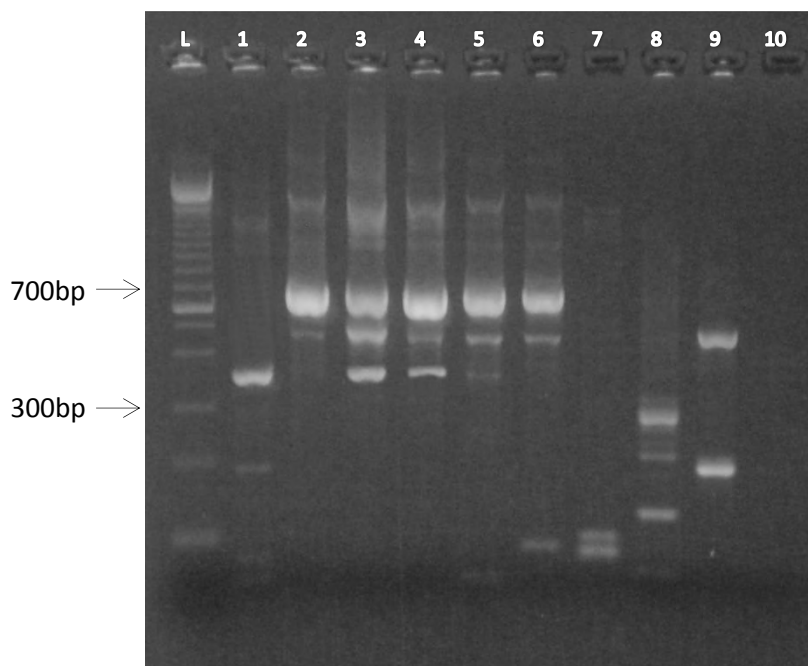


| Θέση | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Δείγμα | 742 | 415 | IF | Mix | Mix | Mix | Mix | S1 | S2 | S3 | ddH ₂ O |
| CCID ₅₀ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 | 1 | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | - |

Group 3:

| Γενωμικές Περιοχές | Τύποι Ανα/σμού | Εκκινητές | Προϊόν (bp) | Θερμοκρασία Υβριδισμού | Συγκέντρωση MgCl ₂ |
|--------------------|----------------|--------------------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| 3C | S3/S2 | 3C-S3/S2-S 3C-S3/S2-A | 327bp | 65° C | 2mM |
| 3D | S1/S2 | 3D-S1/S2-S 3D-S1/S2-A | 714bp | | |

Στο Group 3 επαληθεύτηκαν και οι δύο τύποι ανασυνδυασμού δίνοντας τα αντίστοιχα αναμενόμενα προϊόντα στα ανασυνδυασμένα δείγματα, συγκέντρωσης μέχρι και 10 CCID₅₀/0.1ml, ενώ τα πρότυπα στελέχη δεν απέδωσαν κανένα προϊόν. Η ζώνη που εντοπίζεται στο μήκος περίπου 450bp δεν αντιστοιχεί σε κανένα από τους δύο εξεταζόμενους ανασυνδυασμούς αλλά προκύπτει από τον συνδυασμό των εκκινητών 3D-S1/S2-S και 3C-S3/S2-A.

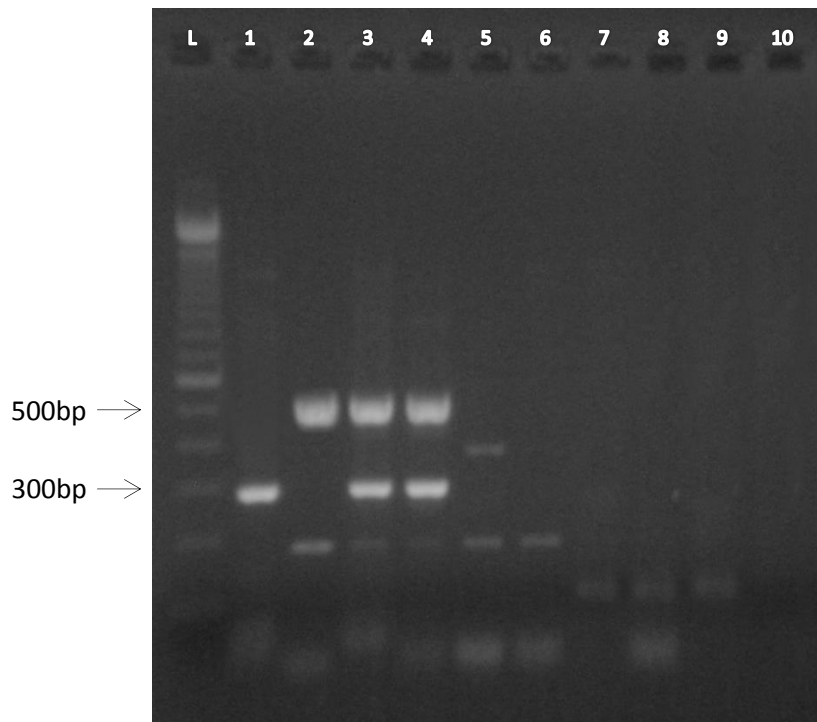


| Θέση | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Δείγμα | 738 | I34 | Mix | Mix | Mix | Mix | S1 | S2 | S3 | ddH ₂ O |
| CCID ₅₀ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 | 1 | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | - |

Group 4:

| Γενωμικές Περιοχές | Τύποι Ανα/σμού | Εκκινητές | Προϊόν (bp) | Θερμοκρασία Υβριδισμού | Συγκέντρωση MgCl ₂ |
|--------------------|----------------|----------------------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| 3C | S2/S1 | 3C-S2/S1-S 3C-S2/S1b-A | 298bp | 66° C | 2mM |
| 3D | S2/S1 | 3D-S2/S1b-S 3D-S2/S1b-A | 495bp | | |

Στο Group 4 επαληθεύτηκαν και οι δύο τύποι ανασυνδυασμού δίνοντας τα αντίστοιχα αναμενόμενα προϊόντα στα ανασυνδυασμένα δείγματα, συγκέντρωσης μέχρι και 10³ CCID₅₀/0.1ml, ενώ τα πρότυπα στελέχη δεν απέδωσαν κανένα προϊόν.



| Θέση | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Δείγμα | ID | 584 | Mix | Mix | Mix | Mix | S1 | S2 | S3 | ddH ₂ O |
| CCID ₅₀ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 | 1 | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | - |

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται συγκεντρωτικά όλα τα αποτελέσματα των τεσσάρων Multiplex-PCR αντιδράσεων.

| | Γενωμικές Περιοχές | Τύποι Ανα/σμού | Εκκινητές | Προϊόν (bp) | ΔΕΙΓΜΑ | CCID ₅₀ /0.1ml | | | | S1 | S2 | 1 | ddH ₂ O |
|----------------|--------------------|----------------|----------------------------|-------------|--------|---------------------------|-----------------|----|---|----|----|---|--------------------|
| | | | | | | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 | 1 | | | | |
| Group 1 | VP1 | S3/S1 | VP1-S3/S1-S VP1-S3/S1-A | 203bp | IK | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | 2C | S2/S1 | 2C-S2/S1-S 2C-S2/S1-A | 378bp | LK3 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| | 3A | S2/S1 | 2C-S2/S1-S 3C-S2-S1b-A | 742bp | EP9 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Group 2 | 2A | S1/S3 | 2A-S1/S3-S 2A-S1/S3-A | 204bp | 742 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| | 2C | S3/S1 | 2C-S3/S1-S 2C-S3/S1-A | 593bp | 415 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| | 3D | S2/S1 | 3D-S2/S1-S 3D-S2/S1-A | 529bp | IF | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Group 3 | 3C | S3/S2 | 3C-S3/S2-S 3C-S3/S2-A | 327bp | 738 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| | 3D | S1/S2 | 3D-S1/S2-S 3D-S1/S2-A | 714bp | I34 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Group 4 | 3C | S2/S1 | 3C-S2/S1-S 3C-S2/S1b-A | 298bp | ID | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | 3D | S2/S1 | 3D-S2/S1b-S 3D-S2/S1b-A | 495bp | 584 | + | + | - | - | - | - | - | - |

Πίνακας 4.2.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των 4 Multiplex-PCR αντιδράσεων. Παρουσιάζονται οι θέσεις και οι τύποι ανασυνδυασμού, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση και το αποτέλεσμα της κάθε PCR. Με (+) σημειώνονται τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν το αναμενόμενο προϊόν, ενώ με (-) σημειώνεται η απουσία του αναμενόμενου προϊόντος.

5 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 175 περιπτώσεις σε τέσσερις χώρες (Πακιστάν, Αφγανιστάν, Ινδία και Νιγηρία) το 2012 [65]. 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 [44,57,92]. 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 [26,50,53].

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 [12,17,31,54,56,66-68,76,95]. Ωστόσο, έχουν επίσης χαρακτηριστεί παράγωγα του OPV που έχουν σπάνιους τύπους ανασυνδυασμού και βρίσκονται σε μη δομικές γενωμικές περιοχές διαφορετικές των 2C και 3D [31,55, 95,99].

Εκτός από τις μη-δομικές γενωμικές περιοχές, ανασυνδυασμοί έχουν εντοπιστεί και στις δομικές περιοχές. Συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εμφάνισης ανασυνδυασμού στη VP1 γενωμική περιοχή [12, 36, 79, 13]. Ο ανασυνδυασμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος με διατυπικό καψίδιο που εμφανίζει αυξημένη αρμοστικότητα. Επίσης, παρόλο που ο συγκεκριμένος ανασυνδυασμός αποτελεί ένα σπάνιο γεγονός, έχει προταθεί η πιθανότητα ύπαρξης ενός «θερμού σημείου» (hotspot) για τη συγκεκριμένη θέση.

Αυτό το σημείο εντοπίζεται στο 3' άκρο της VP1 γενωμικής περιοχής και ευνοεί τον ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 [36].

Στην εργασία αυτή, περιγράφουμε αρχικά δέκα PCR δοκιμασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση σπάνιων τύπων ανασυνδυασμού που βρίσκονται στις VP1, 2A, 2C, 3A, 3C και 3D γενωμικές περιοχές των παραγώγων του OPV. Δεκατέσσερα ανασυνδυασμένα παράγωγα του OPV που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί με αλληλούχιση επιλέχθηκαν με σκοπό να αναλυθεί η ακρίβεια της προτεινόμενης PCR δοκιμασίας. Επτά από αυτά (742, LK3, LK6, LK10, 738, 584 και I34) βρέθηκαν να φέρουν διπλούς ανασυνδυασμούς ή και πολλαπλούς ενώ επτά από αυτά (IK, 415, EP9, ID, IF, EP12 και ENP6) έφεραν μόνο μια θέση ανασυνδυασμού.

Στη συνέχεια οι δέκα απλές PCR αντιδράσεις ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις Multiplex-PCR αντιδράσεις. Σκοπός της ομαδοποίησης ήταν η ταυτόχρονη ταυτοποίηση περισσότερων τύπων ανασυνδυασμού που εντοπίζονται σε διαφορετικές γενωμικές περιοχές με μια μόνο αντίδραση PCR.

Πιο συγκεκριμένα μέσω του group 1 καθίσταται δυνατή η ανίχνευση και ταυτοποίηση τριών τύπων ανασυνδυασμού. Οι ανασυνδυασμοί αυτοί είναι S3/S1 στο 3' άκρο της VP1 γενωμικής περιοχής, S2/S1 στο 3' άκρο της 2C γενωμικής περιοχής και S2/S1 στο 3' άκρο της 3A γενωμικής περιοχής. Ο πρώτος τύπος ανασυνδυασμού (S3/S1 – VP1) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους VP1-S3/S2-S, VP1-S3/S2-A ενισχύοντας ένα προϊόν μήκους 203bp από το νουκλεοτίδιο (nt) 3157 στο 3367 nt. Ο δεύτερος τύπος ανασυνδυασμού (S2/S1 – 2C) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 2C-S2/S1-S, 2C-S2/S1-A ενισχύοντας ένα προϊόν μεγέθους 378bp από το 4880 nt στο 5258 nt. Ο τρίτος τύπος ανασυνδυασμού (S2/S1 – 3A) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 2C-S2/S1-S, 3C-S2/S1b-A ενισχύοντας ένα προϊόν μεγέθους 742bp από το 4880 nt στο 5623 nt. Σε αυτό το group λόγω της χρήσης ενός κοινού εκκινητή για δυο τύπους ανασυνδυασμού (2C-S2/S1-S) αναμένουμε την εμφάνιση δύο προϊόντων 378bp και 742bp στην περίπτωση που ο ανασυνδυασμός εντοπίζεται στην 2C περιοχή, ενώ αναμένουμε μόνο την εμφάνιση του προϊόντος των 742bp στην περίπτωση που ο ανασυνδυασμός εντοπίζεται στην 3A περιοχή.

Στο group 2 γίνεται δυνατή η ανίχνευση και ταυτοποίηση, επίσης, τριών τύπων ανασυνδυασμού. Οι ανασυνδυασμοί αυτοί είναι S1/S3 στο 5' άκρο της 2A γενωμικής περιοχής, S3/S1 στο 3' άκρο της 2C γενωμικής περιοχής και S2/S1 στο μέσο της 3D γενωμικής περιοχής. Ο πρώτος τύπος ανασυνδυασμού (S1/S3 – 2A)

ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 2A-S1/S3-S, 2A-S1/S3-A ενισχύοντας ένα προϊόν μήκους 204bp από το 3344 nt στο 3538 nt. Ο δεύτερος τύπος ανασυνδυασμού (S3/S1 – 2C) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 2C-S3/S1-S, 2C-S3/S1-A ενισχύοντας ένα προϊόν μεγέθους 593bp από το 4771 nt στο 5372 nt. Ο τρίτος τύπος ανασυνδυασμού (S2/S1 – 3D) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 3D-S2/S1-S, 3D-S2/S1-A ενισχύοντας ένα προϊόν μεγέθους 529bp από το 6097 nt στο 6607 nt.

Στο group 3 γίνεται δυνατή η ανίχνευση και ταυτοποίηση δύο τύπων ανασυνδυασμού. Οι ανασυνδυασμοί αυτοί είναι S3/S2 στο 3' άκρο της 2C γενωμικής περιοχής και S1/S2 στο 5' άκρο της 3D γενωμικής περιοχής. Ο πρώτος τύπος ανασυνδυασμού (S3/S2 – 2C) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 2C-S3/S2-S, 2C-S3/S2-A ενισχύοντας ένα προϊόν μήκους 327bp από το 5700 nt στο 6034 nt. Ο δεύτερος τύπος ανασυνδυασμού (S1/S2 – 3D) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 3D-S1/S2-S, 3D-S1/S2-A ενισχύοντας ένα προϊόν μεγέθους 714bp από το 5526 nt στο 6238 nt.

Στο group 4 γίνεται δυνατή η ανίχνευση και ταυτοποίηση, επίσης, δυο τύπων ανασυνδυασμού. Οι ανασυνδυασμοί αυτοί είναι S2/S1 στο 5' άκρο της 3C γενωμικής περιοχής και S2/S1 στο 3' ακραίο όριο της 3D γενωμικής περιοχής. Ο πρώτος τύπος ανασυνδυασμού (S2/S1 – 3C) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 3C-S2/S1-S, 3C-S2/S1b-A ενισχύοντας ένα προϊόν μήκους 298bp από το 5324 nt στο 5623 nt. Ο δεύτερος τύπος ανασυνδυασμού (S2/S1 – 3D) ταυτοποιείται μέσω του εκκινητικού ζεύγους 3D-S2/S1b-S, 3D-S2/S1b-A ενισχύοντας ένα προϊόν μεγέθους 495bp από το 6758 nt στο 7253 nt.

Επίσης, παρατηρούμε τις μικρότερες τιμές CCID₅₀/0.1ml τις οποίες έχει την ικανότητα η κάθε Multiplex-PCR αντίδραση να ανιχνεύσει. Οι τιμές αυτές κυμαίνονται μεταξύ του 10³ και 10 CCID₅₀/0.1ml. Οι τιμές αυτές είναι ικανοποιητικές καθώς δεν απαιτείται μεγάλος αριθμός περασμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες των υπό ανίχνευση δειγμάτων.

Επιπλέον, οι αρνητικοί μάρτυρες σε κάθε αντίδραση (πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, 2 και 3) είχαν ιικό φορτίο της τάξης των 10⁵ CCID₅₀/0.1ml. Η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση αυτή των πρότυπων δειγμάτων μεταφράζεται ως ένας πολύ καλός δείκτης της εξειδίκευσης της κάθε αντίδρασης, καθώς οι αρνητικοί μάρτυρες είτε σε ίσες συγκεντρώσεις, είτε σε μεγαλύτερες σε σχέση με τα

ανασυνδυασμένα δείγματα δεν αποδίδουν κανένα από τα προβλεπόμενα προϊόντα, που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους τύπους ανασυνδυασμού.

Εν κατακλείδι, οι τέσσερις Multiplex-PCR αντιδράσεις που περιγράφηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση σπάνιων τύπων ανασυνδυασμού που εντοπίζονται από τη VP1 έως και τη 3D 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 [99]. Η εφαρμογή όλων αυτών των PCR αντιδράσεων θα επιτρέψει την γρήγορη ταυτοποίηση των θέσεων ανασυνδυασμού που βρίσκονται από τη VP1 έως και τη 3D γενωμική περιοχή των παραγώγων του OPV, η οποία μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε εργαστήρια που δεν έχουν την δυνατότητα 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 απομείναντες 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.

6 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 **Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of Virology* (2013), ahead of print. doi: 10.1007/s00705-013-1688-5.
- 2 **Agol V. I. 1997.** Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
- 3 **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.
- 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.** 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.
- 8 **Aycock WL.** The significance of the age distribution of poliomyelitis: evidence of transmission through contact. *Am J Hyg* 1928;8:35–54.
- 9 **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.
- 10 **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.
- 11 **Birmingham ME, Aylward RB, Cochi SL, et al.** National immunization days: state of the art. *J Infect Dis* 1997;175[Suppl 1]:S183–S188.
- 12 **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
- 13 **Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Paananen A, Bassioni L, Maamoon Nasr E, Firstova L et al.** Recurrent isolation of poliovirus 3 strains with chimeric capsid protein Vp1 suggests a recombination hot-spot site in Vp1. *Virus Research* 2010; 151:246–251
- 14 **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.
- 15 **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.
- 16 **Bodian D.** Some emerging concepts of poliomyelitis infection. *Science* 1955;122:105–108.
- 17 **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
- 18 **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.
- 19 **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.
- 20 **Burnet FM. Poliomyelitis in the light of recent experimental work.** *Health Bulletin.* Victoria, Australia: Department of Health; 1945.

- 21 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.
- 22 Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:1–22.
- 23 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.
- 24 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
- 25 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.
- 26 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
- 27 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.
- 28 Chow M, Newman JF, Filman D, et al. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 1987;327:482–486.
- 29 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.
- 30 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.
- 31 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
- 32 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.
- 33 Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. 2002. Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.
- 34 Dales S, Eggers HJ, Tamm I, et al. Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology* 1965;26:379–389.
- 35 de Quadros CA, Andrus JK, Olive JM, et al. Polio eradication from the Western Hemisphere. *Annu Rev Public Health* 1992;13:239–252.
- 36 Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulias C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52:343-51
- 37 Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
- 38 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.
- 39 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.
- 40 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.

- 41 Echeverri AC, Dasgupta A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995;208:540–553.
- 42 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.
- 43 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.
- 44 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
- 45 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)
- 46 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.
- 47 Flanagan 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.
- 48 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.
- 49 Friedrich F. 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.
- 50 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
- 51 Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 1998;12:2293–2304.
- 52 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.
- 53 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
- 54 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
- 55 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
- 56 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
- 57 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
- 58 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.
- 59 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.

- 60 **Heine J.** Beobachtungen uber Lahmungszustande der untern Extermitaten und deren Behandlung. *Stuttgart, Germany: Kohler; 1840.*
- 61 **Hogle JM, Chow M, Filman DJ.** Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 1985;229:1358–1365.
- 62 **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.
- 63 **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.
- 64 **Johnson R.** *Viral Infections of the Nervous System, 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott-Raven; 1998.*
- 65 **IMB. Independent Monitoring Board of the Global Polio Eradication Initiative.** Polio's Last Stand. *Sixth IMB Report - November 2012*
- 66 **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
- 67 **Karakasiliotis I, Paximadi E, Markoulatos P (2005)** Evolution of a rare vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J Gen Virol* 86(Pt 11):3137-42
- 68 **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
- 69 **Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981;291:547–553.
- 70 **Knowles, N.J., Hovi, T, Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R.** Picornaviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: (2012) Elsevier, pp 855-880.*
- 71 **Koike S, Taya C, Kurata T, et al.** Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:951–955.
- 72 **Landsteiner K, Popper E.** Mikroskopische Präparate von einem menschlichen und zwei Affenrückenmarken. *Wien Klin Wochenschr* 1908;21:1830.
- 73 **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.
- 74 **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.
- 75 **Liao S, Racaniello V.** Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* 1997;71:9770–9777.
- 76 **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
- 77 **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)
- 78 **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
- 79 **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.

- 80 **Medin O.** Ueber eine Epidemie von spinaler Kinkerlahmung. *Verh X Int Med Kongr.* 1891.
- 81 **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.
- 82 **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.
- 83 **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.*
- 84 **Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 2003;77:5136–5144.
- 85 **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.
- 86 **Mueller S, Wimmer E, Cello J.** Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research* 2005; 111(issue 2): 175-193
- 87 **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.
- 88 **Neu N, Rose NR, Beisel KW, et al.** Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 1987;139:3630–3636.
- 89 **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.
- 90 **Nomoto A, Kitamura N, Golini F, et al.** The 5'-terminal structures of poliovirus RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5345–5349.
- 91 **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
- 92 **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
- 93 **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.
- 94 **Paul JR.** *A History of Poliomyelitis.* New Haven: Yale University Press; 1971.
- 95 **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)
- 96 **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.
- 97 **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.
- 98 **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer.** *Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e. 1999*
- 99 **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)
- 100 **Racaniello VR, Baltimore D.** Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981;214:916–919.

- 101 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.
- 102 Racaniello V.** Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 796-830.
- 103 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.
- 104 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.
- 105 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.
- 106 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.
- 107 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.
- 108 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.
- 109 Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966–971.
- 110 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.
- 111 Trask JD, Vignec AJ, Paul JR.** Poliomyelitis virus in human stools. *JAMA* 1938;111:6–11.
- 112 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.
- 113 Wickman I.** Beitrage zur Kenntnis der Heine-Medinschen Krankheit (Poliomyelitis acuta und verwandter Erkernkungen). Berlin: Karger; 1907.
- 114 Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
- 115 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.
- 116 Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1101–1109.
- 117 Yogo Y, Wimmer E.** Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1877–1882.