



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΠΜΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επιδημιολογική Επιτήρηση της Αντοχής στην Αντιρετροϊκή
Θεραπεία σε Νεοδιαγνωσθέντα Άτομα με τον ιό HIV**

POST GRADUATE THESIS

Surveying Antiretroviral Resistance in Newly Diagnosed with HIV

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Ειρήνη Α. Τζανέτου

Eirini A. Tzanetou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Απόστολος Μπελούκας

Apostolos Beloukas

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Surveying Antiretroviral Resistance in Newly Diagnosed with HIV

Eirini Tzanetou

20050

eirinitzanetou@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Apostolos Beloukas

SECOND SUPERVISOR

Chrysanthi Vogiatzaki

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 10/2/2023

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Απόστολος Μπελούκας

2^{ος} Εξεταστής Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τζανέτου Ειρήνη του Ανδρέα, με αριθμό μητρώου 20050 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Τζανέτου Ειρήνη

Ευχαριστίες

Έχοντας την τιμή να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του ΠΜΣ με τίτλο "Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση" η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας- Ε.Μ.Μ.Α., του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Απόστολο Μπελούκα, θα ήθελα να αδράξω την ευκαιρία για ευχαριστίες.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα για τις εγκαταστάσεις και τις παροχές που προσφέρονται και αμέσως μετά τον Επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ.Απόστολο Μπελούκα. Η παρούσα έρευνα δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την υποστήριξη και τη πολύτιμη καθοδήγηση του. Σας ευχαριστώ θερμά που με δεχτήκατε στην ομάδα σας και μου δώσατε την ευκαιρία να παραβρεθώ σε σημαντικές διοργανώσεις όπως το Πανελλήνιο Συνέδριο του AIDS. Δίχως την εμπιστοσύνη σας δεν θα μπορούσα να αποκτήσω γνώσεις και πολύτιμη εργαστηριακή εμπειρία στον καινούργιο για μένα τομέα της Μοριακής Ιολογίας. Εξίσου σημαντικό ρόλο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας είχε η Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Κασσάνδρα Πρόκτερ, η οποία υπήρξε υπεύθυνη για την πορεία μου στο εργαστήριο από τη πρώτη κιόλας μέρα. Ήταν η παρέα μου στα αποτυχημένα πειράματα αλλά και στα λίγα επιτυχημένα, υπήρξε καταπληκτική συνεργάτης.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια και τους φίλους μου που μού στάθηκαν σε καλές και δύσκολες στιγμές στη διάρκεια αυτών των δύο ετών. Μαμά, μπαμπά, Μαράκι μου υπήρξατε εξαιρετικοί υποστηρικτές μου σε κάθε μου βήμα και σας ευχαριστώ πολύ, δε το θεωρώ δεδομένο. Sisterio, Δήμητρα, Μαρία, Σοφία, Ελευθερία, Γιώργο, Ηλία και Νικόλα σας ευχαριστώ για την αγάπη και τη παρέα σας και σε αυτή τη διαδρομή...

Αφιέρωσεις

Θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία μου στην οικογένεια μου.

Περίληψη

Εισαγωγή: Τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες ο ρετροϊός HIV που προκαλεί τη νόσο του AIDS αποτέλεσε την αιτία μιας θανατηφόρας και εξαιρετικά μολυσματικής πανδημίας. Για τα σχεδόν 40 εκατομμύρια άτομα που ζουν σήμερα με HIV (PLWH), η υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART) έχει μετατρέψει τη θανατηφόρα λοίμωξη σε μια διαχειρίσιμη χρόνια λοιμώδη νόσο με υψηλό προσδόκιμο ζωής. Ωστόσο, η εμφάνιση μεταλλάξεων αντοχής στο γονιδίωμα του ιού που προκαλούν μείωση της δραστηριότητας των θεραπευτικών σχημάτων, παραμένει μία σημαντική απειλή για την υγεία των ατόμων που ζουν με τον ιό HIV και μείζον θέμα δημόσιας υγείας.

Σκοπός: Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η συσχέτιση των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών με την εμφάνιση αντοχής σε άτομα που διαγνώστηκαν θετικά στον ιό κατά τη χρονική περίοδο του Ιανουαρίου- Δεκεμβρίου 2022.

Μέθοδος: Από κάθε δείγμα ορού απομονώθηκε ολικό RNA του ιού, το οποίο υποβλήθηκε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής ενός βήματος (RT-PCR) για τη μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό cDNA και έπειτα σε δίκλωνο DNA. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση ένθετης πολυμεράσης (Nested PCR) για την ενίσχυση μικρότερου και ειδικότερου τμήματος εντός του δίκλωνου DNA που παράχθηκε στο προηγούμενο βήμα. Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν τα προϊόντα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Για όσα δείγματα εμφανίστηκε μπάντα στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, αραιώθηκαν καταλλήλως και αποστάλθηκαν σε συνεργαζόμενη εταιρία για αλληλούχηση κατά Sanger. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων αλληλούχησης έγινε με το λογισμικό SeqScape™ Software και η ανάλυση των δεδομένων για την εύρεση μεταλλάξεων και γονοτύπων πραγματοποιήθηκε με χρήση της διαδικτυακής βάσης HIV Drug Resistance Database. Τέλος, για την επιδημιολογική μελέτη των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν 61 δείγματα νεοδιαγνωσθέντων ατόμων του έτους 2022 και εκτιμήθηκαν τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων αντοχής συναρτήσει χαρακτηριστικών όπως φύλο, ηλικία και ομάδα κινδύνου (χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, άνδρες που κάνουν σεξ με άνδρες, απροφύλακτη ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή).

Αποτελέσματα: Το ποσοστό εμφάνισης αντοχής ανέρχεται σε 13% (n=8). Ο επιπολασμός μεταδιδόμενης αντοχής για τα φάρμακα NNRTIs βρέθηκε [7/61; 11,48%] με τη μετάλλαξη ανθεκτικότητας E138A/G/K να επικρατεί [5/61; 8,2%], ξεπερνώντας των NRTIs [1/61; 1,6%] με την M184V να εμφανίζεται σε πολύ χαμηλό ποσοστό [1/61; 1,6%]. Η πλειοψηφία των δειγμάτων με αντοχή αφορούσαν άνδρες, ελληνικής εθνικότητας [7/8; 87,5%] με διάμεση ηλικία τα 36 έτη (IQR: 26-47) που μολύνθηκαν με στέλεχος υπότυπου A [5/8; 62,5%], τρεις ανήκουν στην MSM ομάδα κινδύνου [3/8; 37,5%] και τρεις στους PWID [3/8; 37,5%].

Συμπεράσματα: Η επιδημιολογική επιτήρηση της αντοχής είναι αναγκαία για τη καλύτερη αντιμετώπιση και διαχείριση της HIV λοίμωξης.

Λέξεις κλειδιά: HIV, αντοχή, αντιρετροϊκή θεραπεία, επιδημιολογία

Abstract

Introduction: Over the past four decades, the HIV retrovirus that causes AIDS has been the cause of a lethal and highly infectious pandemic. For over 40 million people living with HIV (PLWH) today, highly active antiretroviral therapy (HAART) has transformed the fatal infection into a manageable chronic infectious disease with high life expectancy. However, the emergence of resistance mutations in the viral genome that cause a reduction in the efficacy of treatment regimens remains a major health threat to people living with HIV and a major public health issue.

Purpose: The aim of this thesis is to correlate the epidemiological characteristics and the emergence of resistance in newly diagnosed with HIV-1 infection during the period from January to December 2022.

Method: Total viral RNA was isolated from each plasma sample and subjected to a one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to convert the RNA to complementary cDNA and then to double-stranded DNA. Subsequently, a nested polymerase chain reaction (nested PCR) was performed to amplify a smaller and more specific segment within the double-stranded DNA produced in the previous step. The products were then identified by agarose gel electrophoresis. For those samples for which a band appeared on the electrophoresis gel, they were appropriately diluted and sent to a partner company for Sanger sequencing. The sequencing chromatograms were processed using SeqScape™ Software and data analysis was performed to identify mutations and genotypes using the online HIV Drug Resistance Database. Finally, 61 samples of newly diagnosed individuals in the year 2022 were used for the epidemiological study of the results and the incidence rates of resistance mutations were estimated in accordance with characteristics such as gender, age and risk group (injecting drug use, men who have sex with men, unprotected heterosexual sexual intercourse).

Results: The incidence of resistance is 13% (n=8). The prevalence of transmitted resistance for the NNRTIs drugs was found [7/61; 11.48%] with the E138A/G/K resistance mutation being predominant [5/61; 8.2%], outperforming the NRTIs [1/61; 1.6%] with M184V occurring at a very low rate of [1/61; 1.6%]. The majority of samples with resistance were male, of Hellenic nationality [7/8; 87.5%] with a median age of 36 years [IQR: 26-47] infected with subtype A strain [5/8; 62.5%], three of which are MSM [3/8; 37.5%] and three of which are PWID [3/8; 37.5%].

Discussion: Epidemiological surveillance of resistance is mandatory for better treatment and management of HIV infection.

Key words: HIV, resistance, antiretroviral therapy, epidemiology

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας	iv
Ευχαριστίες	vi
Αφιερώσεις	vii
Περίληψη	viii
Abstract	ix
Συνομογραφίες	xi
Πρόλογος	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	3
1.1 HIV/AIDS	3
1.2 Γενικά Χαρακτηριστικά του ιού HIV	3
1.3 Δομή του ιού HIV-1	5
1.4 Γονιδίωμα του ιού HIV-1	7
1.5 Αντιρετροϊκή Θεραπεία	9
1.5.1 Αναστολείς Εισόδου-Σύντηξης (EFIs)	10
1.5.1.A Ρόλος των πρωτεϊνών GP120, GP41	10
1.5.2 Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RTIs)	15
1.5.2.A Ρόλος του ενζύμου Αντίστροφη Μεταγραφάση	15
1.5.3 Αναστολείς της Ιντεγκράσης (INSTIs)	17
1.5.3.A Ρόλος του ενζύμου Ιντεγκράση	17
1.5.4 Αναστολείς της Πρωτεάσης (PIs)	22
1.5.4.A Ρόλος του ενζύμου Πρωτεάση	22
1.6 Αντοχή στην Αντιρετροϊκή Θεραπεία	23
1.7 Η Επιδημιολογία της HIV-λοίμωξης	24
Κεφάλαιο 2. Πειραματικές Μέθοδοι-Τεχνικές	26
2.1 Ενδεικτική Πειραματική Διαδικασία	26
2.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription, RT-PCR)	26
2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	28
2.4 Αλληλούχηση κατά Sanger	29
Κεφάλαιο 3. Πειραματικό Μέρος	31
3.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός-Αναλώσιμα	31
3.2 Πειραματικό Πρωτόκολλο	31
3.2.1 Απομόνωση RNA γενετικού υλικού	31
3.2.2 RT-PCR	33
3.2.3 Nested PCR	33
3.2.4 Ηλεκτροφόρηση	33
3.2.5 Καθαρισμός προϊόντος (PCR purification)	34
3.2.6 Αλληλούχηση κατά Sanger	35
3.2.7 Ανάλυση Αποτελεσμάτων στη διαδικτυακή βάση HIVdb	37
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	38
4.1 Πηκτώματα Ηλεκτροφόρησης	38
4.2 Επιδημιολογική Ανάλυση Αποτελεσμάτων	42
4.3 Συζήτηση των Αποτελεσμάτων	49
Βιβλιογραφία	53

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
PLWH	People Living with HIV	Άτομα που ζουν με τον ιό HIV
ART	Anti-retroviral Therapy	Αντιρετροϊκή Θεραπεία
PrEP	Pre-exposure Prophylaxis	Προφύλαξη πριν την έκθεση
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy	Αντιρετροϊκή Θεραπεία Υψηλής Δραστικότητας
PR	Protease	Πρωτεάση
RT	Reverse Transcriptase	Αντίστροφη Μεταγραφάση
INT	Integrase	Ιντεγκράση
DRAMs	Drug Resistance Associated Mutations	Μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή σε αντιρετροϊκή θεραπεία
EFIs	Entry-Fusion Inhibitors	Αναστολείς Εισαγωγής-Σύντηξης
PIs	Protease Inhibitors	Αναστολείς της Πρωτεάσης
NRTIs	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς της Αντίστροφής Μεταγραφάσης
NNRTIs	Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	Μη-Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς της Αντίστροφής Μεταγραφάσης
NRTTIs	Nucleoside Reverse Transcriptase Translocation Inhibitors	Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Μετατόπισης της Αντίστροφής Μεταγραφάσης
INSTIs	Integrase Strand Transfer Inhibitors	Αναστολείς Μεταφοράς Κλώνου της Ιντεγκράσης
HIV-PDR	Pre-Treatment HIV Drug Resistance	Προϋπάρχουσα Αντοχή
HIV-ADR	Acquired HIV Drug Resistance	Επίκτητη Αντοχή
HIV-TDR	Transmitted HIV Drug Resistance	Μεταδιδόμενη Αντοχή
MDR	Multi-Drug Resistance	Πολλαπλή Αντοχή
XEN	People who inject drugs, PWID	Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών Ουσιών
Nested-PCR	Nested Polymerase Chain Reaction	Ένθετη Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφής Μεταγραφής
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	Συμπληρωματικό Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	Υποδοχέας χημειοκινών C-C τύπου 5
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	Υποδοχέας χημειοκινών C-X-C τύπου 4
CRFs	Circulated Recombinant Forms	Κυκλοφορούσες Ανασυνδιασμένες Μορφές
URFs	Unique Recombinant Forms	Μοναδικά Ανασυνδιασμένες Μορφές
(U.S.)FDA	(U.S.) Food and Drug Administration	Διοίκηση Τροφίμων και Φαρμάκων Αμερικής
ΠΟΥ	World Health Organization, WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Πρόλογος

Το 1984 έλαβε χώρα η πρώτη επίσημη συσχέτιση του ιού HIV με το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS), που είχε ήδη κλινικά αναγνωριστεί από το 1981. Τα τελευταία 40 χρόνια το HIV/AIDS αποτέλεσε υπαίτιο παράγοντα θνησιμότητας του ανθρώπινου πληθυσμού και υπήρξε σημαντική απειλή για την παγκόσμια υγεία (Agarwal-Jans, 2020; Gallo & Montagnier, 2003).

Με το πέρασμα των χρόνων η διευκρίνιση της δομικής βιολογίας του ιού HIV-1 αποτέλεσε εργαλείο για την αναγνώριση των μοριακών μηχανισμών δράσης του και έθεσε τα θεμέλια για το σχεδιασμό αποτελεσματικών αντιρετροϊκών φαρμάκων. Σήμερα, το προσδόκιμο ζωής των ατόμων που ζουν με τον ιό έχει αυξηθεί λόγω της χρήσης κατάλληλης αντιρετροϊκής θεραπείας (ART) και η HIV λοίμωξη από θανατηφόρα έχει μετατραπεί σε διαχειρίσιμη χρόνια λοιμώδη νόσο (Xavier Ruiz & Arnold, 2020). Στην πλειοψηφία τους τα αντιρετροϊκά φάρμακα αναστέλλουν τη λειτουργία των βασικών ενζύμων του ιού, πρωτεάση (PR), αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και ιντεγκράση (INT), χωρίς τα οποία ο ιός δεν μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του. Η επιτυχημένη αντιρετροϊκή θεραπεία φέρει ως αποτέλεσμα τη καταστολή του ιού, δηλαδή τη κατάσταση όπου τα ιικά αντίγραφα είναι λιγότερα από 50 ανά mL αίματος. (Arts & Hazuda, 2012). Δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες ανέλυσαν ζευγάρια που είχαν απροφύλακτες σεξουαλικές επαφές μεταξύ τους για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους, ενώ ο ένας εκ των δύο λάμβανε αντιρετροϊκά φάρμακα και βρισκόταν σε ιική καταστολή. Τα αποτελέσματα των μελετών συμφωνούσαν πως το ποσοστό μετάδοσης του ιού HIV ανάμεσα στα παραπάνω ζευγάρια ήταν 0% (Rodger et al., 2019; Rodger et al., 2016). Με άλλα λόγια όταν ο ιός βρίσκεται σε καταστολή, δεν είναι δυνατόν να μεταδοθεί σε άλλο άτομο, μη-ανιχνεύσιμος σημαίνει μη-μεταδιδόμενος (Undetectable= Untransmittable, U=U).

Η σύγχρονη πρόκληση όσον αφορά στον ιό του AIDS βρίσκεται στη μόλυνση από ανθεκτικά ιικά στελέχη που οδηγεί σε μείωση της ευαισθησίας ή πλήρη αναποτελεσματικότητα των χορηγούμενων φαρμάκων. Η ανθεκτικότητα των στελεχών, γνωστή ως αντοχή, οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις σε επίπεδο γονιδιώματος, με πιο σημαντικές τις μεταλλάξεις που εντοπίζονται στα ιικά γονίδια της γονιδιακής περιοχής *pol*. (Ng et al., 2014; Wensing et al., 2019) Υπάρχουν δύο τύποι αντοχής στην

αντιρετροϊκή θεραπεία, η προϋπάρχουσα ανοχή (HIV-PDR) και η επίκτητη (HIV-ADR). Σημειώνεται πως κύρια πηγή των HIV μεταλλάξεων είναι τα συχνά λάθη της αντίστροφης μεταγραφάσης σε συνδυασμό με την έλλειψη κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών του συγκεκριμένου ενζύμου (Clutter, Jordan, Bertagnolio, & Shafer, 2016; Duffy, Shackelton, & Holmes, 2008).

Η παρούσα ερευνητική μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη. Αρχικά γίνεται μια σύντομη εισαγωγή στη δομή, το γονιδίωμα και το κύκλο ζωής του ιού HIV-1. Ταυτόχρονα, αναλύεται η σύγχρονη αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστηριότητας (HAART), όπου δίνεται έμφαση στον τρόπο δράσης και αναστολής των ιικών ενζύμων από τα αντίστοιχα αντιρετροϊκά φάρμακα. Συμπληρωματικά, αναφέρονται οι σημαντικές μεταλλάξεις του ιικού γονιδιώματος, που προσδίδουν ανοχή στη θεραπεία και μελετάται η επιδημιολογία των ανθεκτικών στελεχών στον ανθρώπινο πληθυσμό. Στο δεύτερο μέρος δίνεται μια εκτενής περιγραφή των πειραματικών πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν, καθώς και των υλικών, μεθόδων και τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγμάτωση της συγκεκριμένης μελέτης. Επιπροσθέτως, παρατίθενται εικόνες των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης για την αξιολόγηση της απόδοσης των πειραματικών διεργασιών. Τέλος, δημιουργούνται γραφήματα για τη παρουσίαση των αποτελεσμάτων της χρονικής περιόδου Ιανουαρίου-Δεκεμβρίου 2022 για άτομα θετικά στον HIV-1 που δεν είχαν λάβει στο παρελθόν αντιρετροϊκή θεραπεία (νεοδιαγνωσθείσες λοιμώξεις), αποσκοπώντας στην κατανόηση της μετάδοσης μεταλλάξεων ανθεκτικότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, διερευνάται η σύνδεση του φύλου, της ηλικιακής ομάδας και του σεξουαλικού προσανατολισμού του φορέα καθώς και της χρήσης ή μη ναρκωτικών ουσιών με την εμφάνιση ανοχής στη θεραπεία.

Εν κατακλείδι, η συγκεκριμένη μελέτη είναι πιθανό να συνεισφέρει στην βελτίωση της ποιότητας και του προσδόκιμου ζωής των ατόμων που ζουν με τον ιό. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την αξία της εις βάθος κατανόησης της ανοχής καθώς αποτελεί τον βασικό οδηγό για την καλύτερη κλινική και φαρμακευτική διαχείριση των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων τόσο σε εγχώριο όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο.

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 HIV/AIDS

Από το σύνολο των δυνητικά θανατηφόρων ασθενειών που οφείλονται σε κάποιο ιό, το AIDS υπήρξε μία από τις πιο μολυσματικές ασθένειες που εμφανίστηκε το 1981 και εξελίχθηκε σε πανδημία που κορυφώθηκε κατά το χρονικό διάστημα 1981-2010. (Sharp & Hahn, 2011) Ως αιτιολογικός παράγοντας του AIDS αναγνωρίστηκε ο Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), HIV τύπου 1 και 2, HIV-1 και HIV-2 αντίστοιχα (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo & Montagnier, 2003).

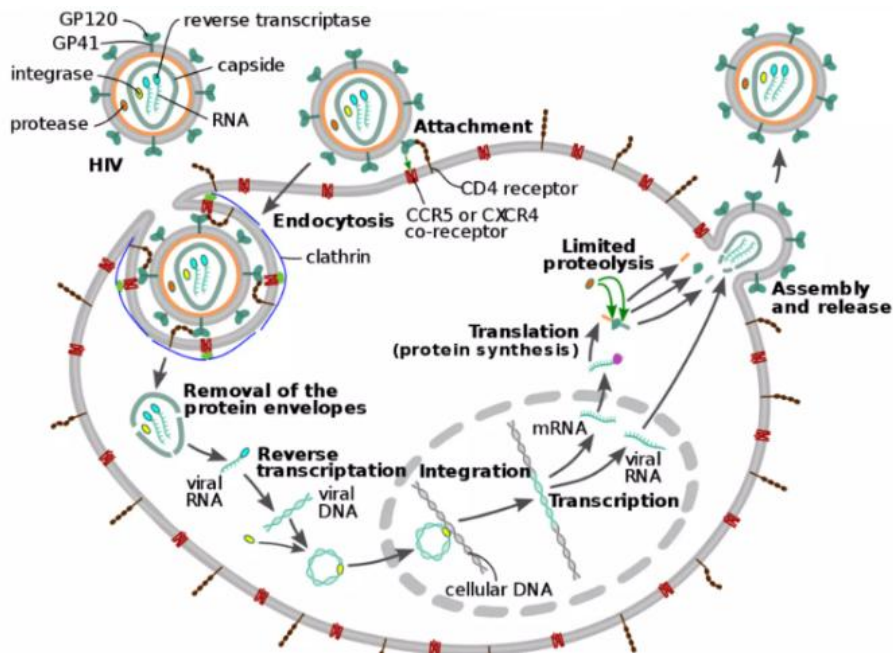
Οι συγκεκριμένοι τύποι υποστηρίζεται πως εξελίχθηκαν από ανασυνδυασμούς του συγγενικού ιού SIV, Simian Immunodeficiency Virus των χιμπατζήδων και των μαϊμούδων, ξεπερνώντας το φράγμα των ειδών (Schmitt et al., 2020). Η εμφάνιση του ιού HIV τοποθετείται χρονικά μεταξύ των δεκαετιών του 1920 και του 1940 με τόπο έναρξης τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό στη Κεντρική Αφρική (Agarwal-Jans, 2020). Θεωρίες συσχετίζουν τη μετάδοση του ιού από το ζώο στον άνθρωπο με το κυνήγι και την αυξημένη κατανάλωση ωμού κρέατος από χιμπατζήδες, χαρακτηρίζοντας την HIV-λοίμωξη αρχικά ως ζωνόσο που αργότερα εξελίχθηκε στη σημερινή της μορφή (Sharp & Hahn, 2011). Σε μια διαφορετική, μη επιβεβαιωμένη θεωρία, ο ιός HIV προϋπήρχε ήδη από την εποχή της πανώλης (1348-1353), ωστόσο, η εξάπλωση του στον ανθρώπινο πληθυσμό φαίνεται να περιοριζόταν σημαντικά από την μετάλλαξη CCR5Δ32 του ανθρώπινου γονιδίου CCR5 (Zajac, 2018).

1.2 Γενικά Χαρακτηριστικά του ιού HIV

Ο Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας, γνωστός και ως HIV, ανήκει στην τάξη των *Ortevirales*, της οικογένειας των ρετροϊών του γένους *Lentivirus* και είναι οριζόντια-μεταδιδόμενος εξωγενής ιός που διαθέτει θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό (De Clercq & Li, 2016). Ο χαρακτηρισμός του ως ρετροϊός έγκειται στην ικανότητα του να μεταγράφει το RNA σε ιικό DNA μόλις εισαχθεί στα κύτταρα του ξενιστή. Η έννοια της οριζόντιας μεταφοράς εξηγεί τη μετάδοση του ιού HIV ανάμεσα στον ανθρώπινο πληθυσμό. Στους επικρατέστερους τρόπους μετάδοσης συγκαταλέγονται η μετάδοση μέσω αίματος (αιματογενώς), μέσω κολπικών, πρωκτικών ή σπερματικών υγρών και από τη μητέρα στο έμβρυο κατά τον τοκετό ή το θηλασμό.

Ανάμεσα στα διάφορα είδη θηλαστικών τα οποία προσβάλλονται από το στέλεχος HIV-1 ανήκει και ο άνθρωπος (Sharp & Hahn, 2010). Στόχος του ιού αποτελούν τα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με δείκτη CD4 θετικό. Η μόλυνση από τον ιό HIV συνοδεύεται από την εναρκτήρια ασυμπτωματική περίοδο, ακολουθείται από τα στάδια της οξείας και της χρόνιας λοίμωξης, κατά την οποία εμφανίζονται κλινικά συμπτώματα και λαμβάνει χώρα ο ιικός πολλαπλασιασμός, και σε τελικό στάδιο εμφανίζεται το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) που χαρακτηρίζεται από πλήρη αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος και μείωση των επιπέδων των κυττάρων CD4 (Clinicalinfo, 2022).

Σε κυτταρικό επίπεδο γίνονται με σειρά οι εξής διαδικασίες: 1) πρόσδεση στους υποδοχείς CD4 των Τ-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων υποβοηθούμενη από συνυποδοχείς χημειοκίνης, CXCR4 ή CCR5, 2) σύντηξη των μεμβρανών ιού-ξενιστή και εισαγωγή στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, 3) αντίστροφη μεταγραφή του μονόκλωνου ιικού RNA σε δίκλωνο DNA, 4) ενσωμάτωση του παραγόμενου ιικού DNA στο χρωμόσωμα του ξενιστή, 5) έκφραση των απαραίτητων πρωτεϊνών του ιού, συναρμολόγηση νέων ιοσωμάτων HIV-1 και τέλος η απομάκρυνση από το CD4 κύτταρο. Σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής χρησιμοποιούνται ένζυμα του ιού. Για παράδειγμα, η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του ιικού RNA σε DNA, το στάδιο της ενσωμάτωσης τελείται από το ένζυμο της ιντεγκράσης και τέλος, η πρωτεάση είναι το υπεύθυνο ένζυμο για τη πρωτεολυτική διάσπαση της παραγόμενης πολυπρωτεΐνης Gag-GaGPol (Engelman & Cherepanov, 2012).



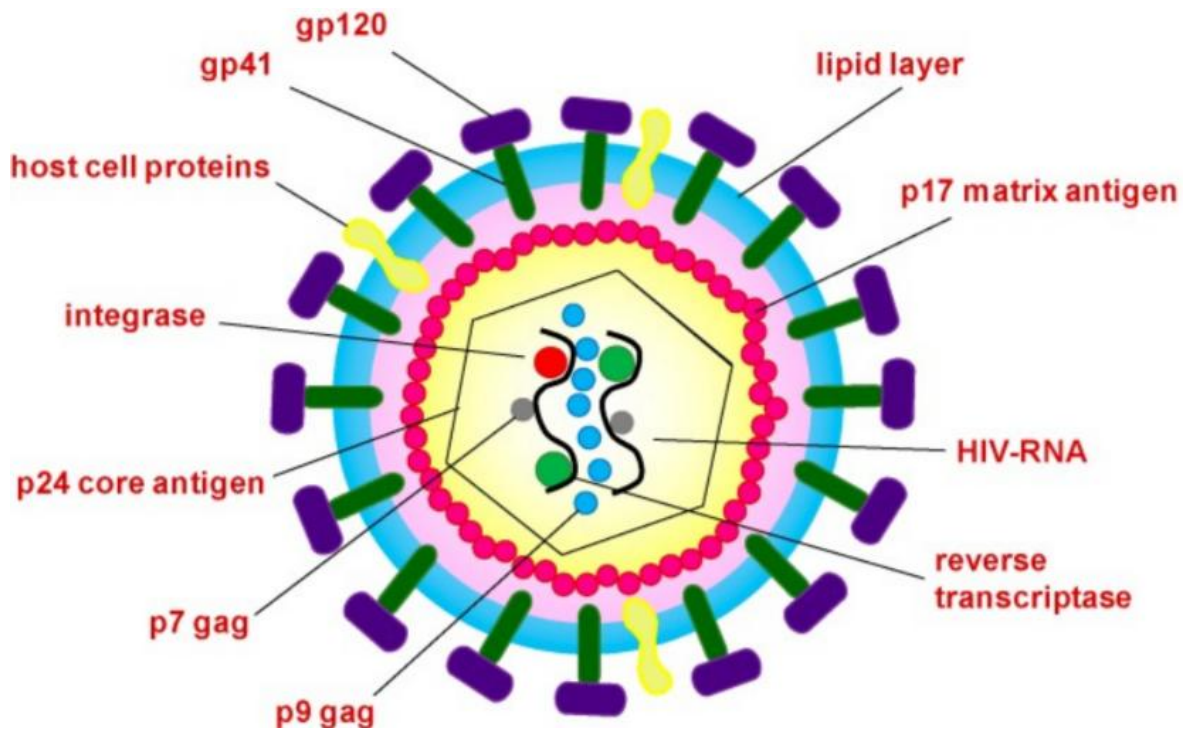
Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής του ιού HIV-1. Παρουσιάζεται η σειρά των βημάτων που ακολουθείτε προκειμένου ο ιός να πολλαπλασιαστεί σε ένα κύτταρο CD4: 1) Πρόσδεση στους CD4 υποδοχείς και συνυποδοχείς CCR5 ή CXCR4 (Attachement), 2) Ενδοκυττάρωση (Endocytosis), 3) Απελευθέρωση των ιικών πρωτεϊνών του φακέλου στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και αντίστροφη μεταγραφή του μονόκλωνου ιικού RNA σε δίκλωνο DNA (Removal of the protein envelopes and Reverse transcription), 4) ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γενετικό υλικό του ξενιστή (Integration), 5) μεταγραφή και πρωτεϊνοσύνθεση (Transcription and Translation), 6) πρωτεόλυση (Limited proteolysis), 7) συναρμολόγηση και εκβλάστηση νέων ιοσωμάτων (Assembly and release) (Boswell, 2019).

1.3 Δομή του ιού HIV-1

Ένα HIV-1 ιοσωμάτιο έχει μέγεθος περίπου 145 nm και σχήμα εικοσάεδρης σφαίρας. Στον πυρήνα του εντοπίζονται δύο θετικής πολικότητας μονόκλωνα RNA αντίγραφα τα οποία προστατεύονται από μία κάψα σε σχήμα κώνου. Τόσο εσωτερικά όσο και εξωτερικά του νουκλεοκαψιδίου εντοπίζονται ιικά ένζυμα απαραίτητα για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του. Η νουκλεοκαψιδιακή επιφάνεια αποτελείται περίπου από δύο χιλιάδες σωματίδια της πρωτεΐνης p24. Με τον ίδιο αριθμό αντιγράφων μίας διαφορετικής πρωτεΐνης, της p17, σχηματίζεται ένα κέλυφος στο οποίο εσωκλείεται το κωνικό νουκλεοκαψίδιο. Με αυτό τον τρόπο οριοθετείται η εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης (Muller & Heilemann, 2013).

Στο εξωτερικό μέρος του ιοσωματίου βρίσκεται μια διπλοστιβάδα λιπιδίων που αποκαλείται ικός φάκελος ή έλυτρο. Κατά μήκος του φακέλου εντοπίζεται μεγάλος αριθμός διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του ξενιστή καθώς και γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών GP41 οι οποίες διαπερνούν τη διπλοστιβάδα και βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με τις γλυκοπρωτεΐνες GP120. Οι υπομονάδες GP120 παρουσιάζονται αγκυροβολημένες στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, γεγονός που διευκολύνει την αναγνώριση και τη σύνδεση του ιού με τους υποδοχείς των CD4 κυττάρων στο στάδιο της μόλυνσης (Turner & Summers, 1999). Πιο συγκεκριμένα, η GP120 χωρίζεται περαιτέρω σε δύο περιοχές, μία εσωτερική (inner) και μια εξωτερική (outer), στην ενδιάμεση επιφάνεια των οποίων βρίσκεται το σημείο αλληλεπίδρασης μεταξύ της ικής GP120 και την CD4 πρωτεΐνη-υποδοχέα του ξενιστή (Kwong et al., 1998).

Αξίζει να αναφερθεί πως η πρωτεΐνη του φακέλου (HIV-1 Env) αρχικά συντίθεται ως μία πρόδρομη τριμερής μορφή της γλυκοπρωτεΐνης (GP160)₃ και έπειτα διασπάται από την πρωτεάση στις δομικές υπομονάδες GP120 και GP41 (Chen, 2019). Τρία αντίγραφα για την κάθε υπομονάδα συγκροτούν την λεγόμενη ακίδα του φακέλου (GP120/GP41)₃ η οποία είναι ικανή να προκαλέσει έντονες ανοσολογικές αποκρίσεις στα μολυσμένα άτομα χωρίς απαραίτητα την ύπαρξη της υπόλοιπης δομής του ιού (T. Χiao, Y. Cai, & B. Chen, 2021).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση ενός ιοσωμάτιου HIV-1. Ξεκινώντας από το εσωτερικό, διακρίνονται οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες RNA, το κωνικό νουκλεοκαψίδιο, το κέλυφος (με ροζ χρώμα) και ο φάκελος (ανοιχτό κυανό χρώμα). Επίσης, σημειώνονται οι σημαντικές πρωτεΐνες p24, p17 καθώς και οι γλυκοπρωτεΐνες GP41 και GP120. Με πράσινο χρώμα διακρίνεται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, με κόκκινο το ένζυμο ιντεγκράση (Carabineiro, 2017).

1.4 Γονιδίωμα του ιού HIV-1

Το γονιδίωμα του ιού HIV-1 είναι οργανωμένο σε διακριτές συστάδες γονιδίων όπως απεικονίζονται στην εικόνα 3. Με εκκίνηση το 5' άκρο και κατεύθυνση προς το 3', η πρώτη γονιδιακή περιοχή που συναντάται είναι η *gag* (P17,P24,P9,P7) και ακολουθούν οι γονιδιακές περιοχές *pol* (P64,P51,P15,P31) και *env* (P120,P41). (Li et al., 2015)

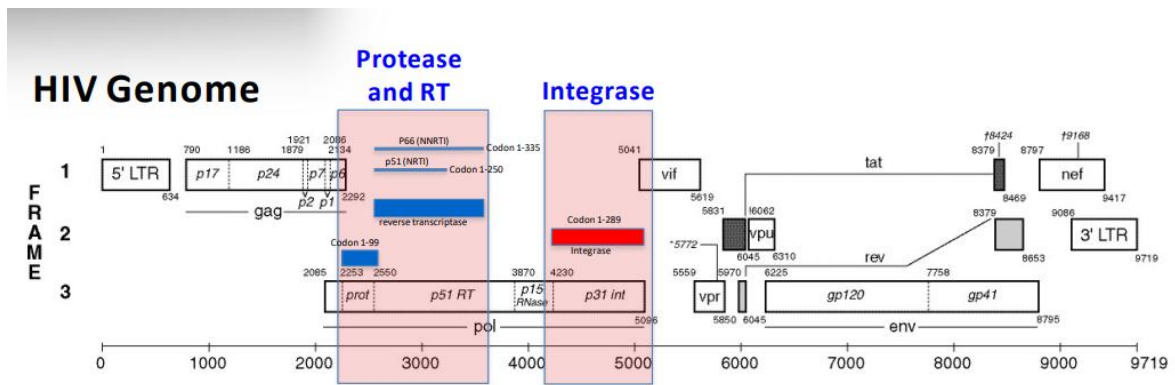
Η περιοχή *gag* περιέχει γονίδια από τα οποία εκφράζονται οι δομικές πρωτεΐνες του ιού, όπως η P24, αντιγόνου ιδιαίτερης σημασίας για τη μοριακή ανίχνευση του ιού και το αντιγόνο μήτρας, P17. Στη γονιδιακή περιοχή της πολυμεράσης (*pol*) εδράζονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τα σημαντικότερα για τη δράση του ιού ένζυμα. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται κατά σειρά εμφάνισης πάνω στο γονιδίωμα τα ένζυμα πρωτεάση, στη γονιδιακή περιοχή που ορίζεται από τα νουκλεοτίδια στις θέσεις nt2253 έως nt2550, αντίστροφη μεταγραφάση (nt2550-nt3870) και ιντεγκράση (nt4230-nt5096).

Τέλος, στην περιοχή *env* (nt6225-nt8795) εμφανίζονται τα γονίδια που αντιστοιχούν στις γλυκοπρωτεΐνες του ιικού φακέλου GP120 και GP41.

Εστιάζοντας στο γονίδιο της GP120 διακρίνονται πάνω στο γονιδίωμα πέντε διατηρημένες περιοχές (C1-C5), οι οποίες εναλλάσσονται με πέντε μεταβλητές περιοχές (V1-V5). Παράλληλα, για το γονίδιο της GP41 εμφανίζονται με σειρά: ένα υδρόφοβο πεπτίδιο σύμπτυξης (Fusion Peptide, FP), δύο περιοχές επταδικής επανάληψης (HR1 και HR2), ένας βρόγχος σχηματιζόμενος από δισουλφιδικό δεσμό (C-C loop), μια εξωτερική περιοχή πλούσια στο αμινοξύ τρυπτοφάνη (MPER), ένα διαμεμβρανικό τμήμα (TM) και μία κυτταροπλασματική ουρά (CT) (Tianshu Xiao, Yongfei Cai, & Bing Chen, 2021).

Επιπλέον, στις γονιδιακές περιοχές που βρίσκονται πριν και μετά του τομέα του φακέλου εδράζονται τα γονίδια των βοηθητικών ιικών πρωτεϊνών Vif, Nef, Vpr και Vpu. Αυτές προάγουν την HIV-1 μόλυνση υπερνικώντας τους ανασταλτικούς μηχανισμούς του κυττάρου του ξενιστή. Συγκεκριμένα, η Vif αντιρροπεί τον περιοριστικό παράγοντα APOBEC3G και η Nef τον SERINC5. Η Vpr εξουδετερώνει τη λυσοσωμική διαμεμβρανική πρωτεΐνη 5 (LAPTM5) για να ενισχύσει τη μόλυνση από τον HIV-1 στα μακροφάγα. Ωστόσο, δεν παρουσιάζει την ίδια αποτελεσματικότητα για τη μόλυνση των CD4 κυττάρων (Zhao et al., 2021). Τέλος, η Vpu διαταράσσει τις πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας του ξενιστή που συμμετέχουν στις διαδικασίες ουβικουϊτινίωσης και πρωτεασωμικής αποικοδόμησης. Η διαταραχή συντελείται μέσω αλληλεπίδρασης της Vpu με τον κυτταρικό παράγοντα β-TrCP (Khan & Geiger, 2021).

Στα δύο άκρα του HIV-1 γονιδιώματος εντοπίζονται περιοχές συντηρημένων αλληλουχιών που ονομάζονται περιοχές μακράς τελικής επανάληψης (Long Terminal Repeat, LTR). Οι περιοχές αυτές είναι χρήσιμες για τη λειτουργία του ενζύμου ιντεγκράση. Λεπτομέρειες για τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση παρατίθενται στην ενότητα της παρούσας διπλωματικής εργασίας με τίτλο [1.5.3.A Ρόλος του ενζύμου Ιντεγκράση](#).



Εικόνα 3 : Απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού HIV. Διακρίνονται οι περιοχές γονιδίων gag, pol και env. Χρωματίζεται η Pol περιοχή όπου εντοπίζονται τα γονίδια για τα κυριότερα ένζυμα πρωτεάσης (PR), αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και ιντεγκράση (INT) του ιού. Πηγή:<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>

1.5 Αντιρετροϊκή Θεραπεία

Με τον όρο HIV αντιρετροϊκή θεραπεία (AntiRetroviral Therapy, ART) ορίζεται η χορήγηση αντιρετροϊκών φαρμάκων, τα οποία το άτομο καλείται να λάβει εφ' όρου ζωής. Στη πλειοψηφία τους τα αντιρετροϊκά φάρμακα για τα άτομα που ζουν με τον ιό HIV στοχεύουν στην παρεμπόδιση της λειτουργίας των βασικών ενζύμων του ιού, πρωτεάση (PR), αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και ιντεγκράση (IN).

Με το πέρασμα των χρόνων η διεκκρίση της δομικής βιολογίας του HIV-1 αποτέλεσε εργαλείο για την εξερεύνηση των μοριακών μηχανισμών δράσης του ιού και παρείχε την βάση για τον σχεδιασμό φαρμάκων με ανασταλτική δράση στη λειτουργία των HIV-1 ενζύμων. Τα συγκεκριμένα φάρμακα ονομάστηκαν αντιρετροϊκά καθώς δρούσαν ενάντια σε ρετροϊούς, όπως ο HIV, και μέχρι σήμερα η λίστα των πιθανών θεραπευτικών αντιρετροϊκών εμπλουτίζεται συνεχώς. Στα πλαίσια ιστορικής αναδρομής, η ART ξεκίνησε το 1987 με την έγκριση της πρώτης κατηγορίας αντιρετροϊκών φαρμάκων, αργότερα, ο συνδυασμός δύο ή τριών αντιρετροϊκών φαρμάκων είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και ο αριθμός συνέχισε να αυξάνεται μέχρι που άγγιξε τα οκτώ χάπια ημερησίως, πριν περιοριστεί σε ένα STR (Single Tablet Regime) ανά ημέρα. Σήμερα, η αγωγή διακρίνεται σε δύο κατηγορίες την HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) και την PrEP (Pre-Exposure prophylaxis). Η πρώτη αντιστοιχεί στα φάρμακα που χορηγούνται ύστερα από επιβεβαιωμένη λοίμωξη με τον HIV-1, ενώ η δεύτερη

λειτουργεί ως προληπτική αγωγή που χορηγείται σε άτομα που δεν έχουν μολυνθεί αλλά διατρέχουν υψηλό κίνδυνο μόλυνσης. Ωστόσο, το ζήτημα της καθημερινής χορήγησης φαρμάκων δεν έχει ακόμα λυθεί.

Σύμφωνα με τελευταίες μελέτες σχετιζόμενες με την ART, μακράς διάρκειας ενέσιμη αγωγή αντιρετροϊκών φαρμάκων έλαβε έγκριση και προσεχώς θα αρχίσει να χρησιμοποιείται. Το συγκεκριμένο φαρμακευτικό σχήμα προτάσσεται για την Αμερική και την Ευρώπη με επαναληψιμότητα στη χορήγηση της ένεσης σε μία φορά τον μήνα και μία φορά στους δύο μήνες αντίστοιχα. Παρακάτω συγκεντρώνονται όλες οι κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων ενάντια στον ιό HIV μαζί με παραδείγματα.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας όπου παρουσιάζονται οι διακριτές κατηγορίες φαρμάκων ενάντια του ιού HIV (πρώτη στήλη), οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως αντιρετροϊκά σκευάσματα (μεσαία στήλη) και οι συντομογραφίες των χημικών ουσιών (τελευταία στήλη).

Κατηγορίες HIV Φαρμάκων	Παραδείγματα Φαρμάκων	Συντομογραφίες Φαρμάκων
NRTIs	Emtricitabine, Lamivudine, Zidovudine & Tenofovir	FTC, 3TC, AZT & TDF
NNRTIs	1η γενιά: Delavirdine, Efavirenz, Nevirapine	1η γενιά: DLV, EFV, NVP
	2η γενιά: Etravirine, Rilpivirine, Dapivirine, Abacavir	2η γενιά: ETR, RPV, DRV, ABC
Pis	Azatanavir, Ritonavir, Lopinavir, Tipranavir, Datunavir	Σήμερα χρησιμοποιείται μόνο Datunavir
EFIs	Maraviroc, Ibalizumab, Fostemsavir, Enfuvirtide	INN, IBA
INSTIs	Elvitegravir, Bictegravir, Dolutegravir, Raltegravir	EVG, BIC, DTG, RAL

1.5.1 Αναστολείς Εισόδου-Σύντηξης (EFIs)

1.5.1.A Ρόλος των πρωτεϊνών GP120, GP41

Η υψηλή συγγένεια που εμφανίζει η GP120 με την πρωτεΐνη CD4 στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων εγγυάται την επιτυχή αναγνώριση του ιού από τα κύτταρα του ξενιστή.

Η εισαγωγή του ιού HIV-1 στο κύτταρο γίνεται με πρόσδεση της ιικής υπομονάδας GP120 στην εξωκυτταρική περιοχή D1 των CD4 υποδοχέων του ξενιστή υποβοηθούμενη από τους 7TM συνυποδοχείς χημειοκίνης, CXCR4, CCR5 και ακολουθείται από σύντηξη της μεμβράνης του ιού με του ξενιστή (Kwong et al., 1998; Shaik et al., 2019). Σημειώνεται ότι οι ιοί κατηγοριοποιούνται σε R5, X4 και R5/X4

ανάλογα με τον συνυποδοχέα που συμμετέχει στη διαδικασία προσκόλλησης και εισόδου τους στο κύτταρο του ξενιστή. Αυτοί που χρησιμοποιούν τους CCR5 ως συνυποδοχείς ονομάζονται R5 ιοί ενώ όσοι χρησιμοποιούν τους CXCR4 χαρακτηρίζονται X4. Οι X4 και οι ιοί διπλού τροπισμού (R5/X4) εμφανίζονται κυρίως κατά τα τελικά στάδια της λοίμωξης, ενώ οι R5 ιοί συνιστούν την κυρίαρχη μορφή του ιού σε όλη τη διάρκεια της ιικής μετάδοσης (Mild et al., 2010).

Επίσης, για τη διαδικασία της σύντηξης των μεμβρανών απαιτείται κινητική ενέργεια η οποία προσφέρεται στο σύστημα μέσω συνεχόμενων αλλαγών στη στερεοχημεία της GP41, μεταβαίνοντας από μια υψηλής ενέργειας διαμόρφωση σε μία σταθερή, χαμηλότερης ενέργειας. Λόγω της δράσης των προαναφερόμενων πρωτεϊνών, η GP120 αναφέρεται και ως πρωτεΐνη εισαγωγής ενώ η GP41 ως πρωτεΐνη σύμπτυξης των μεμβρανών (T. Xiao et al., 2021).

1.2.1.B Μηχανισμός Αναστολής της Εισόδου-Σύντηξης

Από απεικονίσεις κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ (XRD) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) διευκρινίστηκε η δομή και ο τρόπος αλληλεπίδρασης της GP120 με τους υποδοχείς του ξενιστή και η γνώση αυτή αποτέλεσε τη βάση για το σχεδιασμό φαρμάκων-αναστολέων. Ορισμένες κατηγορίες αναστολέων εισόδου-σύντηξης είναι:

Φάρμακα με στόχο τον CD4-κύριο υποδοχέα

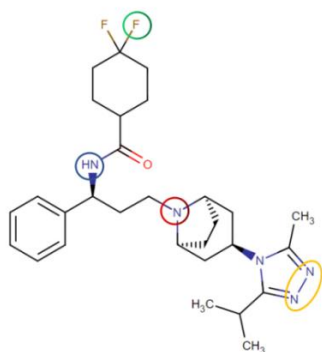
Η χημική ουσία Ibalizumab ή TMB-355 ή TNX-355 εγκρίθηκε ως αντί-HIV φάρμακο το 2018, πωλείται με το φαρμακευτικό όνομα Trogarzo και συνήθως χορηγείται ύστερα από αποτυχία ισχυρών θεραπευτικών σχημάτων, σε περιπτώσεις πολλαπλής αντοχής (Multi-Drug Resistance, MDR) (Chahine & Durham, 2021). Όσον αφορά τη βιολογική του προέλευση, η ιμπαλιζουμάμπη είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό ολικό αντίσωμα που απομονώνεται από ποντίκια και δρα στοχεύοντας τους υποδοχείς CD4 του ξενιστή.

Συγκεκριμένα, προσδένεται με υψηλή ειδικότητα σε ένα διαμορφωμένο επίτοπο στην εξωκυτταρική περιοχή D2 των υποδοχέων CD4 σχηματίζοντας σύμπλοκη ένωση μαζί με τα κατάλοιπα αμινοξέων των θέσεων E77 και S79 της περιοχής D1. Το σύμπλοκο εντοπίζεται στην ενδιάμεση επιφάνεια μεταξύ των δύο περιοχών D1 και D2 του υποδοχέα CD4. Η δράση του χαρακτηρίζεται ως αλλοστερική διότι η πρόσδεση του

φαρμάκου με τον CD4 γίνεται σε περιοχή του υποδοχέα διαφορετική από εκείνη όπου προσδένονται η ιική υπομονάδα GP120 και τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC-II). Συνεπώς, το φάρμακο δεν παρεμβαίνει στις κυτταροδιαμεσολαβούμενες ανοσοποιητικές λειτουργίες του CD4, και αποφεύγεται η ανοσοκαταστολή του θεραπευόμενου. Επιπλέον, η δέσμευση του φαρμάκου στον υποδοχέα δεν παρεμβαίνει στην προσκόλληση του GP120 στο CD4 όμως το σύμπλοκο GP120-CD4 υφίσταται στερεοχημική παρεμπόδιση που δεν του επιτρέπει να αλληλεπιδράσει με τους συνυποδοχείς. Ως αποτέλεσμα αποκλείεται η είσοδος του HIV-1 στα κύτταρα CD4 του ξενιστή (DrugBank, 2022a; Song et al., 2010).

Φάρμακα με στόχο τους συνυποδοχείς CCR5,CXCR4

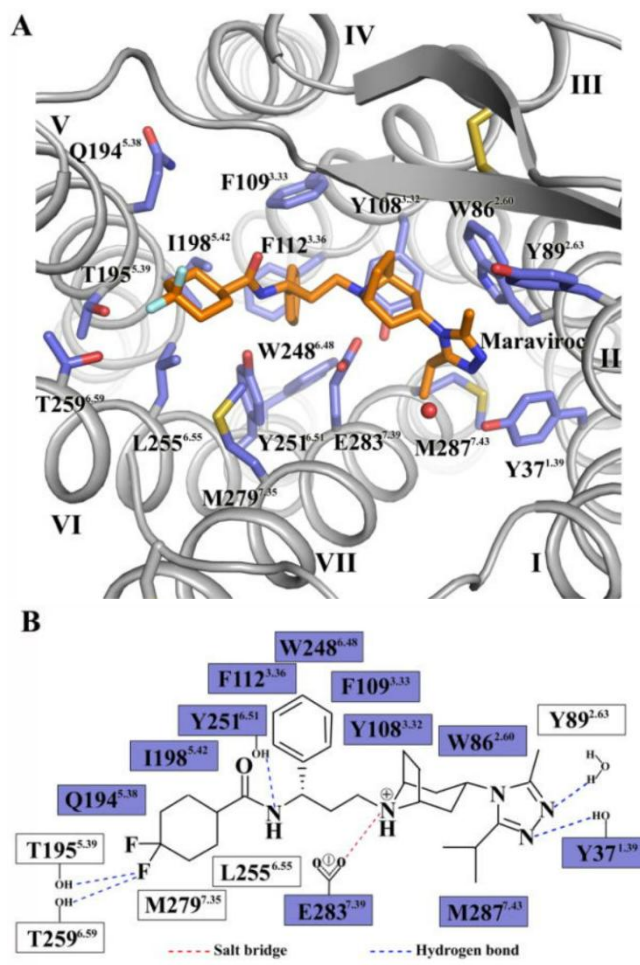
Φάρμακα όπως τα Arlaviros, Maraviros, TAK-779, και Vicriviroc δρουν ως ανταγωνιστές του συνυποδοχέα CCR5, με το Maraviros να επικρατεί έναντι των υπόλοιπων αναστολέων εισόδου-σύντηξης του HIV-1. Το Maraviros (εμπορική ονομασία Celsentri) εγκρίθηκε από τον FDA το 2007, είναι ένα μικρό μόριο με μοριακό βάρος, Mr=514 και χημική δομή όπως φαίνεται στην Εικόνα 4. Η θεραπευτική του δράση βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του αναστολέα με τον συνυποδοχέα CCR5 αποτρέποντας τη πρόσδεση της ιικής GP120. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η εισαγωγή του ιού HIV-1 στα κύτταρα του ξενιστή (DrugBank, 2022b).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της χημικής δομής του φαρμάκου-ανταγωνιστή του συνυποδοχέα CCR5, Maraviros. Διακρίνονται ο αρωματικός δακτύλιος, το καρβοξαμιδικό άζωτο με μπλε χρώμα και το άζωτο του τροπενίου με κόκκινο χρώμα, στο εσωτερικό της δομής. Με κίτρινο χρώμα τονίζονται τα άζωτα της ομάδας τριαζολίου, ενώ με πράσινο το φθορίδιο (DrugBank, 2022b).

Συγκεκριμένα, το Maraviroc προσδένεται στο διαμεμβρανικό θύλακα που σχηματίζεται από κατάλοιπα αμινοξέων, εντοπισμένα στις έλικες I-VI του συνυποδοχέα CCR5 (T. Xiao et al., 2021). Η χημική συμβατότητα της περιοχής με το φάρμακο είναι το κλειδί για την επιλεκτική δέσμευση του φαρμάκου στον υποδοχέα και την αποτελεσματικότητα της αντιαρθρικής δράσης. Σύμφωνα με την εικόνα 5, στο σύμπλοκο CCR5/Maraviroc εντοπίζονται τρία είδη χημικών αλληλεπιδράσεων: α) δεσμοί υδρογόνου, β) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και γ) ο σχηματισμός μίας γέφυρας άλατος.

Εστιάζοντας στο κεντρικό μέρος του Maraviroc εντοπίζονται δύο άτομα αζώτου, το τροπενικό και το καρβοξαμιδικό, τα οποία αλληλεπιδρούν με κατάλοιπα αμινοξέων της έλικας VII του CCR5. Το άζωτο του τροπενίου, όντας πρωτονιωμένο, φαίνεται να συμμετέχει σε ιοντικής φύσης αλληλεπίδραση με το γλουταμινικό αμινοξύ στη θέση 283 (E283) ενώ το καρβοξαμιδικό άζωτο συμμετέχει στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με την τυροσίνη στη θέση 251 (Y251). Επιπλέον δεσμοί υδρογόνου φαίνεται να σχηματίζονται μεταξύ: α) ενός μορίου νερού και της αμίνης της ομάδας τριαζολίου, β) της τυροσίνης (Y37) και της ίδιας αμίνης, και γ) ενός από τα δύο φθορίδια του φαρμάκου μαζί με δύο κατάλοιπα θρεονίνης (T195, T259). Τα προαναφερόμενα αμινοξέα εντοπίζονται σε διαφορετικές έλικες του θύλακα του CCR5, στην έλικα I βρίσκεται το Y37 και στις έλικες V και VI βρίσκονται αντίστοιχα τα T195 και T259. Ακόμη, στο εσωτερικό μέρος του θύλακα, αναπτύσσονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις λόγω του αρωματικού δακτυλίου με πέντε αρωματικά κατάλοιπα του CCR5 στις θέσεις Y108, F109, F112, W248 και Y251. Τέλος, οι ομάδες τριαζολίου, τροπανίου και κυκλοεξανίου ενσωματώνονται σε μικρές εσοχές της δομής και δημιουργούν περισσότερες υδρόφοβες επαφές με το CCR5 (Tan et al., 2013).



Εικόνα 5: Σημείο πρόσδεσης στον συνυποδοχέα CCR5 για το Maraviroc. (A) Παρουσιάζονται σε ραβδωτή αναπαράσταση τα αμινοξικά κατάλοιπα και οι έλικες I-VI (γκρι χρώμα) στο θύλακα της μεμβράνης του CCR5. Με πορτοκαλί χρώμα φαίνονται οι άνθρακες του Maraviroc και με μπλε οι άνθρακες του υποδοχέα που εμπλέκονται στη δέσμευση του φαρμάκου. Χρωματικός κώδικας των άλλων στοιχείων: οξυγόνο με κόκκινο, άζωτο με σκούρο μπλε, θείο με κίτρινο, φθόριο με ανοιχτό κυανό. Το μόριο νερού που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με το Maraviroc απεικονίζεται ως κόκκινη σφαίρα. (B) Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του CCR5 και του Maraviroc. Με μπλε τετράγωνα υποδεικνύονται οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν σημαντικά τη δέσμευση του Maraviroc (Tan et al., 2013).

Αξίζει να αναφερθεί πως έχουν σχεδιαστεί φάρμακα με παρόμοιο τρόπο δράσης με το Maraviroc που στοχεύουν τον συνυποδοχέα CXCR4. Παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων αποτελούν τα AMD3100, AMD3465, και AMD070 τα οποία φαίνονται εν δυνάμει αποτελεσματικοί αναστολείς, ωστόσο, βρίσκονται ακόμα υπό μελέτη (Zhang et al., 2020).

Φάρμακα με στόχο τις GP41,GP120 του ιού

Στο στάδιο μετά την σύντηξη των μεμβρανών HIV-1/ ξενιστή η γλυκοπρωτεΐνη GP41 του ιικού φακέλου αποκαλύπτει μια υδρόφοβη περιοχή που ορίζεται από τις έλικες HR1. Έχουν σχεδιαστεί φάρμακα που εντοπίζουν και προσδένονται στη συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης, ορισμένα παραδείγματα των οποίων είναι τα NB-2, NB-64, και NB-293 (Tianshu Xiao et al., 2021). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί το Fostemsavir ως το τελευταίο φάρμακο-αναστολέας προσκόλλησης που έλαβε έγκριση το 2020. Είναι ένα προφάρμακο που μόλις εισαχθεί στον οργανισμό μεταβολίζεται και απελευθερώνεται η δραστική του ουσία Temsavir, η οποία προσδένεται στην νουκλεοκαψιδιακή πρωτεΐνη GP120 και αποτρέπει την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Όλα τα παραπάνω βρίσκονται υπό μελέτη και δεν χρησιμοποιούνται ακόμη κλινικά.

1.5.2 Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RTIs)

1.5.2.A Ρόλος του ενζύμου Αντίστροφη Μεταγραφάση

Η αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RT) αποτελεί ένζυμο μείζονος σημασίας για τον πολλαπλασιασμό του HIV και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA ώστε να είναι εφικτή η ενσωμάτωσή του στο DNA του κυττάρου ξενιστή (Ha et al., 2021). Ο ρόλος της είναι καθοριστικός για τον κύκλο ζωής του ιού, γεγονός που αντανακλάται στη χρήση τουλάχιστον δύο φαρμάκων-αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης σε κάθε σχήμα θεραπείας. Σημειώνεται πως από το σύνολο των αντιρετροϊκών φαρμάκων που έχουν σχεδιαστεί ενάντια στον HIV-1, περίπου το 50% έχουν ως στόχο την αναστολή του συγκεκριμένου ενζύμου (Xavier Ruiz & Arnold, 2020). Ωστόσο, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής εισάγει μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων διότι στερείται μηχανισμών επιδιόρθωσης, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του ιού (Tee, Thomson, & Hemelaar, 2022).

Εστιάζοντας στη δομή του ενζύμου, η HIV-1 RT υφίσταται ως ομοδιμερές που αφού υποστεί ωρίμανση δρα ως ετεροδιμερές των πρωτεϊνών P66/P51. Η p66 χωρίζεται σε δύο κύριους τομείς, στο πρώτο εμφανίζονται τα ενεργά κέντρα της RNA- και DNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης, ενώ στο δεύτερο εδράζεται μια ριβονουκλεάση η οποία

καταλύει την αποικοδόμηση του RNA (RNase H). Ιόντα μαγνησίου λειτουργούν ως καταλύτες στο μηχανισμό δράσης τόσο της πολυμεράσης όσο και της ριβονουκλεάσης. Η δομή της P66 παρομοιάζεται με το σχήμα ενός χεριού, όπου παλάμη, δάχτυλα και αντίχειρας δίνουν το όνομα τους στις υποπεριοχές της πρωτεΐνης. Φαίνεται πως η P66 αποτελεί μια εκτεταμένη διαμόρφωση που προέκυψε από την αρχική συμπαγή P51. Επίσης, η P51 διαθέτει διαφορετική τριτοταγή δομή εξυπηρετώντας δομικούς σκοπούς (Xavier Ruiz & Arnold, 2020).

Αμέσως μετά την είσοδο του HIV-1 στο κύτταρο σηματοδοτείται η έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής και το tRNA του ξενιστή χρησιμοποιείται ως εκκινητής της διαδικασίας. Αρχικά, από το tRNA αναγνωρίζεται μια αλληλουχία κοντά στο 5' άκρο του ιικού γονιδιώματος που ονομάζεται περιοχή δέσμευσης εκκινητή (primer binding site, PBS). Ακολούθως, η περιοχή της RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης αναλαμβάνει τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού cDNA με μήτρα το μονόκλωνο ιικό RNA. Στο παραγόμενο υβρίδιο RNA/cDNA, το RNA υδρολύεται από την RNάση H και ελευθερώνεται ένα μονόκλωνο ιικό DNA. Τέλος, η μετατροπή του μονόκλωνου σε δίκλωνο DNA καταλύεται στη DNA-εξαρτώμενη περιοχή της πολυμεράσης.

1.5.2.B Μηχανισμός Αναστολής της Αντίστροφης Μεταγραφάσης

Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης (NRTIs)

Οι Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς είναι ανάλογα 2',3'-διδεοξυνουκλεοσιδίων, δηλαδή νουκλεοτίδια που τους λείπει η απαιτούμενη για την κατάλυση της μεταγραφής 3'-υδροξυλομάδα. Ύστερα από φωσφορυλίωση τους από τις μιτοχονδριακές και κυτταροπλασματικές κινάσες του οργανισμού-ξενιστή, τα παραγόμενα νουκλεοσίδια προσδένονται ανταγωνιστικά στην ιική αντίστροφη μεταγραφάση, τερματίζοντας τη διαδικασία του πολυμερισμού. Συνεπώς, παρεμποδίζεται η δράση του ενζύμου αναστέλλοντας την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA. Λόγω του μηχανισμού δράσης τους έχουν λάβει το όνομα “τερματιστές αλυσίδας” (De Clercq & Li, 2016). Φάρμακα τέτοιου τύπου παρουσιάζουν δραστικότητα ενάντια τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2. Δυστυχώς, η μακροχρόνια χρήση των αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης επιφέρει ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως περιφερική νευροπάθεια, παγκρεατίτιδα, λιποτροφία, ενώ η χρήση παλαιότερης γενιάς αναστολέων προκαλείται

συχνά γαλακτική οξέωση (Montessori, Press, Harris, Akagi, & Montaner, 2004). Χαρακτηριστικά παραδείγματα της συγκεκριμένης κατηγορίας που χρησιμοποιούνται με μεγάλη συχνότητα στα θεραπευτικά σχήματα με νουκλεοσιδικούς αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης είναι τα lamivudine (3TC) και emtricitabine (FTC). Σημειώνεται πως οι αναστολείς αυτού του τύπου χορηγούνται πάντα σε ζεύγη εξαιτίας του χαμηλού γενετικού φραγμού στην ανάπτυξη μεταλλάξεων αντοχής (Arts & Hazuda, 2012).

Μη Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης (NNRTIs)

Οι μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης ταξινομούνται σε δύο κλάσεις φαρμάκων στα HEPT ανάλογα και στα TIBO ανάλογα (Miyasaka et al., 1989; Pauwels et al., 1990). Τα εγκεκριμένα για κλινική χρήση φάρμακα dapivirine (DRV), etravirine (ETR), and rilpivirine (RPV) είναι δομικά συγγενείς χημικές ενώσεις παράγωγα της διαρυλοπυριμιδίνης (diarylpyrimidine, DAPY), η οποία προέκυψε από την αρχική TIBO ένωση. Ο μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων φαρμάκων βασίζεται στην παρεμπόδιση της αντίστροφης μεταγραφάσης μέσω αλλοστερικής πρόσδεσης του αναστολέα σε μια περιοχή κοντά στο ενεργό της κέντρο. Η πρόσδεση του αναστολέα προκαλεί αλλαγές στη στερεοχημική διαμόρφωση του ενζύμου και ως αποτέλεσμα παρεμποδίζεται η λειτουργία του (D'Cruz & Uckun, 2006). Δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς και δεν παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου, σε αντίθεση με την πρώτη κατηγορία των νουκλεοσιδικών αναστολέων (NRTIs).

1.5.3 Αναστολείς της Ιντεγκράσης (INSTIs)

1.5.3.A Ρόλος του ενζύμου Ιντεγκράση

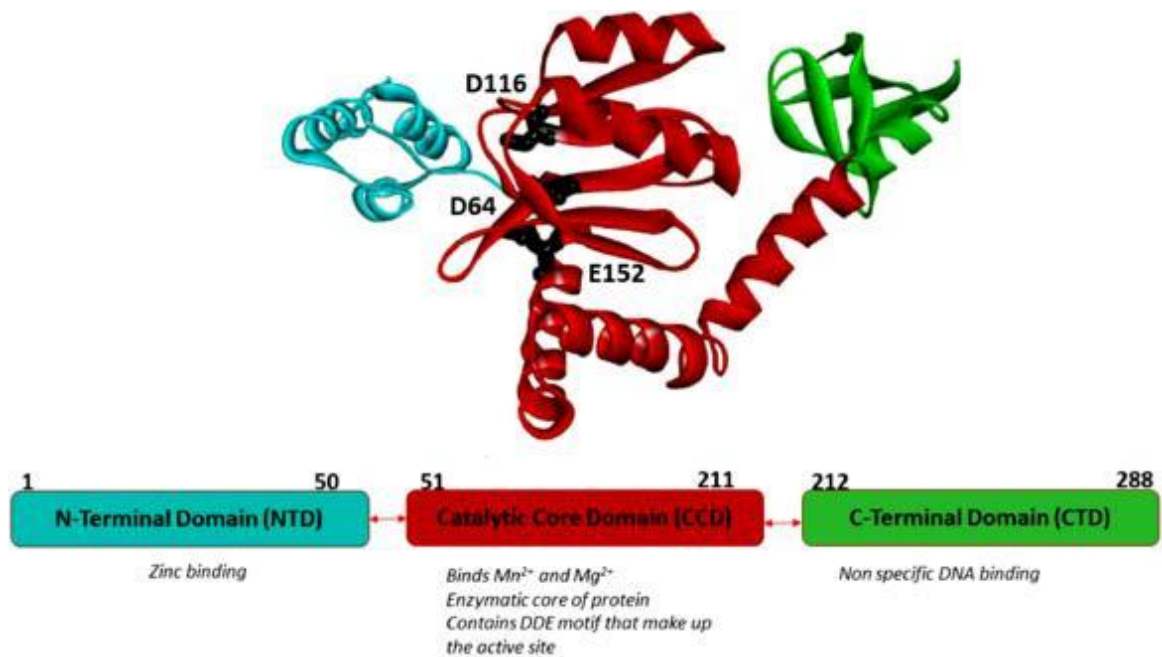
Το ένζυμο της ιντεγκράσης κωδικοποιείται στην περιοχή *pol* του ιικού γονιδιώματος του ιού HIV και αποτελεί ένα από τα τρία βασικά ένζυμα για τον πολλαπλασιασμό του ιού, μαζί με τη πρωτεάση και την αντίστροφη μεταγραφάση. Η δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης χωρίζεται σε τρεις επιμέρους περιοχές, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 6. Η περιοχή κοντά στο αμινοτελικό άκρο (N-Terminal Domain, NTD) εμπλέκεται στη

δέσμευση ιόντων ψευδαργύρου και διαθέτει μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή. Στη κεντρική περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη κατάλυση (Catalytic Core Domain, CCD) δεσμεύονται δισθενή μεταλλικά κατιόντα, μαγγανίου και μαγνησίου, απαραίτητα για την αποσταθεροποίηση του φωσφοδιεστερικού δεσμού του χρωμοσωμικού DNA. Επίσης, εντοπίζονται τρία κατάλοιπα D64, D116 και E152 (DDE μοτίβο) που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο της ιντεγκράσης καθώς και δύο κατάλοιπα λυσίνης K156, K159 που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο και συμβάλλουν στην πρόσδεση του ιικού DNA. Η τρίτη περιοχή που ονομάζεται καρβόξυ-τελικό άκρο (Carboxy-Terminal Domain, CTD) αποτελεί σημείο μη ειδικής πρόσδεσης του DNA.

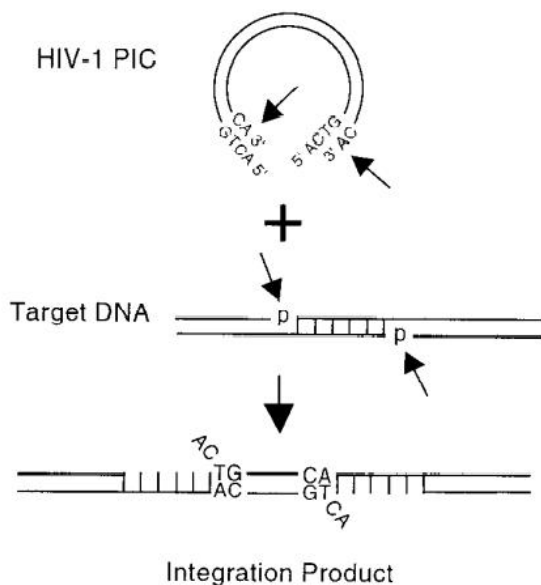
Οι προαναφερόμενες τρεις περιοχές συγκροτούν μια πρωτεΐνη μεγέθους 32 kDa, ο ρόλος της οποίας είναι διττός. Πρώτον, είναι υπεύθυνη για την επεξεργασία του 3'-άκρου του αντίστροφα μεταγραφόμενου προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο αυτό αφαιρούνται δύο νουκλεοτίδια από το 3' άκρο κάθε κλώνου του ιικού DNA. Δεύτερον, είναι το ένζυμο που καταλύει την ενσωμάτωση του νεοσυντιθέμενου ιικού DNA στο DNA του ξενιστή μέσω μεταφοράς κλώνου και σύνδεσης με σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού (Mbhele, Chimukangara, & Gordon, 2021). Τόσο η αποκοπή των δινουκλεοτιδίων όσο και η μεταφορά του κλώνου πραγματοποιούνται με την ιντεγκράση συμπλοκοποιημένη με το ιικό DNA. Αυτό το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο απαρτίζεται από δεκαέξι πρωτομερή ιντεγκράσης συνδεδεμένα στα άκρα του ιικού DNA και ονομάζεται ιντάσωμα (*intasome*) (Cook et al., 2020; Mbhele et al., 2021).

Η εκκίνηση της ενσωμάτωσης σηματοδοτείται με τη σύνδεση του ιντάσωματος με συγκεκριμένη αλληλουχία, που βρίσκεται στο τέλος των περιοχών μακράς τελικής επανάληψης (Long Terminal Repeat, LTR) του HIV-1 DNA (Hazuda et al., 2000). Το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι ιδιαίτερα σταθερό και αναφέρεται ως ενεργό σύμπλοκο μεταφοράς αλυσίδας. Στη συνέχεια, γίνεται αντικατάσταση των δινουκλεοτιδίων GT και TG που βρίσκονται στο 3' άκρο κάθε ιικού κλώνου με ομάδες υδροξυλίου. Τα 3' άκρα υδροξυλίου που δημιουργούνται προσβάλλουν δύο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο DNA-στόχο, σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό. Οι θέσεις της πυρηνόφιλης προσβολής εντοπίζονται σε αντίθετους κλώνους του CD4-DNA και απέχουν μεταξύ τους πέντε νουκλεοτίδια. Σε αυτό το σημείο, βοηθητικό ρόλο έχουν τα επιδιορθωτικά ένζυμα του ξενιστή τα οποία αναλαμβάνουν να ενώσουν τα ασύνδετα

νουκλεοτίδια στα 5' άκρα του μικρού DNA με το DNA του ξενιστή ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ενσωμάτωσης (Craigie & Bushman, 2012; Engelman & Cherepanov, 2012).



Εικόνα 6: Απεικόνιση της τριτοταγής δομής του ενζύμου ιντεγκράση. Διακρίνονται οι τρεις βασικές περιοχές: με μπλε χρώμα, η περιοχή κοντά στο άμινο-τελικό άκρο (N-Terminal Domain, NTD), με κόκκινο χρώμα, η κεντρική καταλυτική περιοχή (Catalytic Core Domain, CCD) και πράσινο χρώμα, το καρβοξύ-τελικό άκρο (Carboxy-Terminal Domain, CTD). Στην καταλυτική περιοχή σημειώνονται τα κατάλοιπα των τριών ασπαραγινικών οξέων D64, D116 και E152 (DDE μοτίβο) από τα οποία σχηματίζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Mbhele et al., 2021).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού ενσωμάτωσης του HIV-1 γονιδιώματος στο DNA-στόχο. Με βέλη υποδηλώνονται τα σημεία επεξεργασίας του ιικού DNA από το ένζυμο της ιντεγκράσης, τα άτομα φωσφόρου στο DNA του ξενιστή που λειτουργούν ως θέσεις πυρηνόφιλης προσβολής και το προϊόν ενσωμάτωσης πριν την επιδιόρθωση από τα επιδιορθωτικά ένζυμα (Hazuda et al., 2000).

1.5.3.B Μηχανισμός Αναστολής της Ιντεγκράσης

Οι Αναστολείς Μεταφοράς Κλώνου της Ιντεγκράσης (Integrase Strand Transfer Inhibitors, INSTIs) χορηγούνταν μέχρι πρόσφατα σε θεραπευτικά σχήματα τρίτης γραμμής. Ωστόσο περισσότερα φάρμακα τέτοιου τύπου συστήνονται πλέον για την πρώτη και δεύτερη γραμμή θεραπείας από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Η επιλογή τους ως αντιρετροϊκά φάρμακα σχετίζεται με την ικανότητα τους να παρεμποδίζουν την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γενετικό υλικό του ξενιστή και κατ' επέκταση να αναστέλλουν τη δράση του ιού. Σημειώνεται πως χορηγούνται συνήθως διά της στοματικής οδού και είναι δραστικά φάρμακα ενάντια και στους δύο τύπους του ιού HIV-1 και HIV-2.

Αναστολείς της Ιντεγκράσης-πρώτης γενεάς

Ένα παράδειγμα αναστολέα μεταφοράς κλώνου της ιντεγκράσης είναι η χημική ουσία elvitegravir (EVG), η οποία φέρει την εμπορική ονομασία Stribild® ή Genvoya®. Ένζυμα

του ηπατικού και εντερικού κυτοχρώματος P450 (CYP)3A4 αποτελούν την πρώτη γραμμή μεταβολισμού του EVG μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό οδηγώντας σε μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μεταβολικές διεργασίες συγχορηγείται ένας εκλεκτικός αναστολέας του CYP3A, ο COBI. Συνεπώς, ο χρόνος ημίσειας ζωής του φαρμάκου αγγίζει τις 9.5 ώρες και καθιστά εφικτή τη χορήγηση του μία φορά ημερησίως (Elliot, Chirwa, & Boffito, 2017).

Έχει αποδειχθεί ότι η εμφάνιση κατασταλτικής ανεπάρκειας σε θεραπευτικά σχήματα με πρώτης γενιάς αναστολείς της ιντεγκράσης οφείλεται στις μεταλλάξεις του γονιδίου του ενζύμου, με τις επικρατέστερες να είναι οι R263K, N155H, Q148HKR, S147G, F121Y, E92Q και T66I, με τις βοηθητικές μεταλλάξεις να είναι οι T97A, E92G και T66AK. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις φαίνεται να αναπτύσσουν διασταυρούμενη αντοχή με το raltegravir (RAL) που αποτελεί αναστολέα της ίδιας γενιάς (Mbhele et al., 2021).

Χαρακτηριστικό των προαναφερόμενων αναστολέων αποτελεί η διαμόρφωση “σκαλωσιάς” του δικυκλικού πυρήνα του φαρμακοφόρου. Αυτή η διαμόρφωση προσφέρεται για χηλική δέσμευση μεταλλικών υποκαταστατών. Με αυτό τον τρόπο οι αναστολείς προσδένονται στα μέταλλα Mn^{2+} , Mg^{2+} και τις αλογονομένες βενζυλικές ομάδες στο ενεργό κέντρο του ιντασώματος, προκαλώντας τη μετατροπή του σε μια “ανοιχτή”, μη λειτουργική διαμόρφωσή (Engelman & Cherepanov, 2012). Επίσης, δυνάμεις van der Waals αναπτύσσονται ανάμεσα στο EVG με το δινουκλεοτίδιο CA του κομμένου κλώνου και το τέταρτο σε σειρά αμινοξύ γουανίνης (G) του 5’ άκρου κλώνου. Αυτές ενισχύουν την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με το ιστάσωμα (Pandey, 2014). Σημειώνεται πως οι αναστολείς αυτού του τύπου δεν παρεμβαίνουν στη διαδικασία της επεξεργασίας του 3’ άκρου, παρά μόνο κατά τη μεταφορά του κλώνου του DNA. Δεδομένου ότι οι δύο διαδικασίες καταλύονται από τα ίδια ακριβώς κατάλοιπα αμινοξέων του ενεργού κέντρου υπογραμμίζεται η ύπαρξη μιας μοναδικής διαμόρφωσης του ενζύμου, ικανής να μεσολαβήσει στη μεταφορά του κλώνου (Hazuda et al., 2000).

Αναστολείς της Ιντεγκράσης-δεύτερης γενιάς

Στους αναστολείς μεταφοράς κλώνου δεύτερης γενιάς ανήκουν τα bictegravir (BIC), cabotegravir (CAB) και το Dolutegravir (DTG). Το τελευταίο εγκρίθηκε για τη θεραπεία της

HIV λοίμωξης το 2013 και χρησιμοποιείται με εμπορικές ονομασίες Tivicay® ή Triumeq® ή Donato® ή Juluca®. Είναι ανάλογο της καρβαμοϋλοπυριδόνης που φέρει μια τρικυκλική κεντρική δομή φαρμακοφόρου και μια ομάδα καρβοξυαμιδίου στη θέση C5. Αυτή η ομάδα προσφέρει σημαντική ευελιξία στη χημική δομή του αναστολέα καθιστώντας ευκολότερη την ενσωμάτωσή του στο ενεργό κέντρο της ιντεγκράσης. Με τη σειρά του, το τρικυκλικό σύστημα αρωματικών δακτυλίων προσφέρεται για υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το θύλακα του ενζύμου στο σημείο κατάλυσης (Mbhele et al., 2021). Δεδομένου του χαμηλού κόστους, του υψηλού γενετικού φραγμού στην ανθεκτικότητα και της υψηλής συχνότητας εμφάνισης αντοχής στους αντιρετροϊκούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και της πρωτεάσης, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ΠΟΥ συνέστησε τη χρήση του DTG για τη θεραπεία πρώτης γραμμής.

1.5.4 Αναστολείς της Πρωτεάσης (PIs)

1.5.4.A Ρόλος του ενζύμου Πρωτεάση

Η διαδικασία της μετάφρασης ολοκληρώνεται με προϊόν μια μακριά αλυσίδα πολυπρωτεΐνης Gag-GaGPol στην οποία περιέχονται γονίδια για την έκφραση δομικών πρωτεϊνών του ιού καθώς και των βασικών ενζύμων του. Στο στάδιο αυτό η πρωτεάση αναλαμβάνει να κόψει σε επιμέρους λειτουργικά θραύσματα τη πολυπρωτεΐνη, υδρολύοντας τους πεπτιδικούς δεσμούς των καταλοίπων ασπαραγίνης-θρεονίνης και σερίνης-γλυκίνης που εντοπίζονται σε μια αυστηρά συντηρημένη περιοχή του πρόδρομου μορίου. Με άλλα λόγια είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την ωρίμανση των νέων ισοματίων. Ο ρόλος της είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς η σωστή ωρίμανση εξασφαλίζει τη μολυσματική δράση των ιικών σωματιδίων (Gulnik, Erickson, & Xie, 2000). Η καταλυτική μορφή του ενζύμου είναι ένα πρωτεϊνικό διμερές με δύο υπομονάδες που απαρτίζονται έκαστος από 99 αμινοξικά κατάλοιπα (Deshmukh, Tugarinov, Louis, & Clore, 2017; Weber, Wang, & Harrison, 2021). Σημειώνεται πως η πρωτεάση λειτουργεί αποτελεσματικά μόνο όταν υφίσταται στη διμερή της μορφή.

1.5.4.B Μηχανισμός Αναστολής της Πρωτεάσης

Στη μακροχρόνια χρήση των αναστολέων της πρωτεάσης οφείλεται το υψηλό ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων αντοχής και σοβαρών ανεπιθύμητων παρενεργειών, γεγονός

που γεννά την ανάγκη διερεύνησης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Μια πρόσφατη μελέτη υπέδειξε τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ως αναστολείς της HIV-πρωτεάσης. Συγκεκριμένα το συνθετικό αντίσωμα mAB1696 (mAB) που απομονώθηκε από ποντικό φαίνεται να παρουσιάζει ανασταλτικές ιδιότητες ενάντια στην ιική πρωτεάση, εμποδίζοντας τον διμερισμό της. Το mAB αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά με έξι κατάλοιπα του ενζύμου, δημιουργώντας μια σταθερή σύμπλοκη ένωση (Gurta, Balasubramanian, & Senapati, 2021).

Οι αναστολείς πρωτεάσης που χρησιμοποιούνται συνήθως στα θεραπευτικά σχήματα είναι πεπτιδομιμητικές ενώσεις που ανταγωνίζονται το πρόδρομο μόριο της πολυπρωτεΐνης Gag-GaPoi για τη θέση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Η δράση τους βασίζεται στη χημική συγγένεια που παρουσιάζουν με το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου (Gurta et al., 2021). Για τη πρόσδεση των αναστολέων στο ενεργό κέντρο συμμετέχουν τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα, δύο κατάλοιπα αλανίνης και δύο κατάλοιπα γλυκίνης που φέρει η πρωτεάση στις θέσεις A29, A30 και G27,G48 (De Clercq & Li, 2016).

1.6 Αντοχή στην Αντιρετροϊκή Θεραπεία

Η σύγχρονη πρόκληση όσον αφορά τον ιό HIV-1 βρίσκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του ιού που μειώνουν την ευαισθησία στα διαθέσιμα φάρμακα-αναστολείς, γνωστή ως αντοχή. Η HIV αντοχή χωρίζεται σε δύο τύπους. Ο πρώτος είναι η προϋπάρχουσα αντοχή ή μεταδιδόμενη αντοχή (HIV-PDR ή HIV-TDR), αφορά άτομα που δεν έχουν λάβει ποτέ στο παρελθόν αντιρετροϊκή θεραπεία και μολύνθηκαν με εκ φύσεως ανθεκτικό στέλεχος του ιού. Κατηγοριοποιούνται ως μεταδιδόμενης αντοχής, τα περιστατικά μετάδοσης μέσω ανταλλαγής ιικού φορτίου με άλλον φορέα. Ο δεύτερος τύπος καλείται επίκτητη αντοχή (HIV-ADR) και αναφέρεται σε ανθεκτικά στελέχη που αναπτύχθηκαν, λόγω εξελικτικής πίεσης, κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Στους αιτιολογικούς παράγοντες εμφάνισης ADR συγκαταλέγονται η λανθασμένη δοσολογία φαρμάκων, η ασυνέπεια στην τήρηση της θεραπείας από πλευράς του θεραπευόμενου ή η αποτυχία χορήγησης κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος για το εκάστοτε περιστατικό (Biswas, Haldane, Arnold, & Levy, 2019; Clutter et al., 2016; Machnowska et al., 2019).

Η αντοχή οφείλεται στην εμφάνιση σημειακών μεταλλάξεων, κατά πλειοψηφία αντικαταστάσεων νουκλεοτιδικής βάσης, σε επίπεδο γονιδιώματος με πιο σημαντικές τις αλλαγές στα γονίδια της ιικής ροι περιοχής (Ng et al., 2014). Οι ιικές μεταλλάξεις πηγάζουν από συχνά λάθη της αντίστροφης μεταγραφάσης σε συνδυασμό με την έλλειψη κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών του συγκεκριμένου ενζύμου. Σε συνέπεια των συχνών μεταλλαγών, η θεραπεία του ατόμου γίνεται λιγότερο αποτελεσματική με ένα ποσοστό των PLWH να καταλήγουν (Bokharaei-Salim et al., 2020). Η ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων πραγματοποιείται με αλληλούχηση του ιικού γονιδιώματος των ατόμων που ζουν με τον ιό. Διακρίνονται σε μεταλλάξεις μείζονος σημασίας, οι οποίες εντοπίζονται σε νουκλεοτίδια αμινοξέων που μεταβάλλουν τη δράση των ιικών ενζύμων και δευτερεύουσες ή βοηθητικές μεταλλάξεις, που δεν επηρεάζουν τη δράση κάποιας ιικής πρωτεΐνης. Η πρώτη κατηγορία συντελεί καθοριστικά στην ανάπτυξη αντοχής σε συγκεκριμένα φάρμακα και σχετίζεται με το αμινοξύ που μεταβάλλεται από την εμφάνιση της εκάστοτε μετάλλαξης.

1.7 Η Επιδημιολογία της HIV-λοίμωξης

Τα στελέχη HIV-1 και HIV-2 είναι εξίσου ικανά να μολύνουν τον ανθρώπινο πληθυσμό, ωστόσο, σε σύγκριση με τον HIV-2 που περιορίζεται ενδημικά στη Δυτική Αφρική, ο HIV-1 έχει εξαπλωθεί σε παγκόσμια κλίμακα διότι είναι ταχύτερα εξελισσόμενος και παράλληλα θεωρείται περισσότερο παθογόνος (Nyamweya et al., 2013).

Η εκτεταμένη γενετική ετερογένεια του HIV-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξελικτική του δριμύτητα και την έντονη παθογονικότητα του (Tee et al., 2022). Το συγκεκριμένο ιικό στέλεχος διαιρείται σε τέσσερις τύπους: τον M από το major, N από το non-major, O (outliers) και P. Οι δύο πρώτοι τύποι, HIV-1 M και HIV-1 N, μεταδόθηκαν στον άνθρωπο από τους χιμπατζήδες, οι HIV-1 P και HIV-1 O από τους γορίλλες, ενώ ο τύπος HIV-2 προήλθε από τους μαγκάμπι (D'Arc et al., 2015; Mourez, Simon, & Plantier, 2013). Η ομάδα M κρύβεται πίσω από το μεγαλύτερο ποσοστό των HIV-1 λοιμώξεων οδηγώντας στη συνυφασμένη με τον ιό πανδημία του AIDS. Απο φυλογενετικές αναλύσεις έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη εννέα υποομάδων της κύριας ομάδας M, οι A-D, F-H, J και K, ενώ στην ίδια ομάδα ταξινομούνται μέχρι σήμερα επιπλέον 118

φυλογενετικές ομάδες ανασυνδιασμένων υποτύπων. Οι ανασυνδιασμένοι υπότυποι προκύπτουν από ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου ιού, γεγονός που οδηγεί στη γέννηση νέων ιικών ομάδων με ξεχωριστές ιδιότητες. Οι προαναφερόμενες ομάδες κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε κυκλοφορούντες ανασυνδιασμένους υπότυπους (circulating recombinant, CRFs) και μοναδικά ανασυνδιασμένους υπότυπους (unique recombinant forms, URFs). Προκειμένου να χαρακτηριστούν ως κυκλοφορούντες ανασυνδιασμένοι υπότυποι (CRFs), είναι απαραίτητη η εμφάνιση του ίδιου υποτύπου σε περισσότερα από τρία άτομα, τα οποία δε διαθέτουν καμία επιδημιολογική σύνδεση μεταξύ τους (Paraskevis & Hatzakis, 2019; Rolland, 2019).

Σύμφωνα με μελέτες του 2019, οι πιο κοινοί ανασυνδιασμένοι υπότυποι που εντοπίζονται στη Δυτική Αφρική είναι οι A-G (CRF02_AG) και στη Νότια και Ανατολική Ασία, οι A-E (CRF01_AE) (Hemelaar et al., 2019; Paraskevis & Hatzakis, 2019). Οι πιο συνηθισμένοι ανασυνδιασμοί για την Ανατολική Ευρώπη και Κεντρική Ασία βρέθηκαν να είναι οι A-B (CRF03_AB), ενώ οι G-H-K-U-A (CRF04_crx) αποτελούν τους επικρατέστερους ανασυνδιασμούς που εντοπίζονται στην Ελλάδα και στην Κύπρο (Beloukas et al., 2016; Hemelaar, 2012). Αμερική και Ευρώπη μοιράζονται τον B ως κυρίαρχο υπότυπο, ενώ στην Ασία επικρατούν, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ανασυνδιασμένοι υπότυποι (Bbosa, Kaleebu, & Ssemwanga, 2019; Zaki et al., 2020). Η Αφρική παρουσιάζει τη μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια με τον υπότυπο A να επικρατεί στην Ανατολή, τον B στον Βορρά, τον C στη Νότια Αφρική και ανασυνδιασμένες μορφές του υπότυπου G να συναντώνται στα δυτικά και κεντρικά της ηπείρου. Σε παγκόσμια κλίμακα, σχεδόν το 50% των HIV-1 μολύνσεων προκλήθηκε από τον υπότυπο C, το 12% είναι υπότυπου B και μόνο ένα ποσοστό 10% αντιστοιχεί σε υπότυπο A (Bbosa et al., 2019; Taylor & Hammer, 2008).

Κεφάλαιο 2. Πειραματικές Μέθοδοι-Τεχνικές

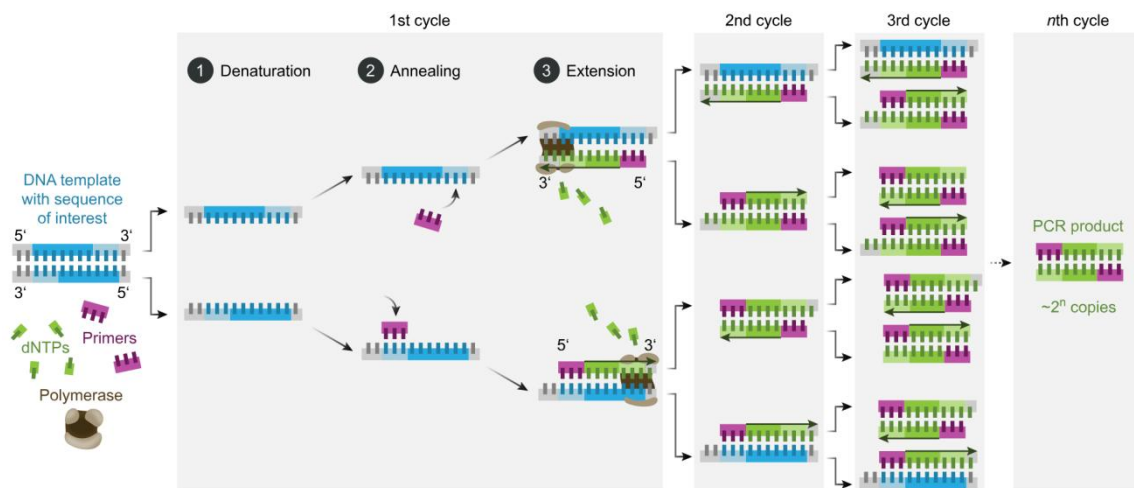
2.1 Ενδεικτική Πειραματική Διαδικασία

Μια τυπική πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε έξι εργαστηριακά μέρη. Αρχικά, από δείγματα ορού θετικών ατόμων απομονώνεται το ιϊκό RNA που μεταγράφεται σε cDNA και ενισχύεται μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (rt-PCR). Η rt-PCR ακολουθείται από Ένθετη Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης (Nested PCR), ώστε να ληφθεί ένα ειδικότερο μικρότερου μήκους μεταγράφημα. Στη συνέχεια, τα ενισχυμένα προϊόντα χαρακτηρίζονται ποιοτικά μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και ποσοτικά με χρήση του φασματοφωτόμετρου Quawell 9000, αφού προηγουμένως καθαριστούν. Ύστερα, τα πλήρως χαρακτηρισμένα δείγματα υπόκεινται σε αλληλούχηση κατά Sanger και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του λογισμικού SeqScape. Τα αρχεία των χρωματογραφημάτων που εξάγονται από το λογισμικό εισάγονται στη διαδικτυακή βάση δεδομένων του πανεπιστημίου Stanford (HIVDB Program), όπου αναγνωρίζονται τόσο η πιθανή προέλευση του στελέχους και ο υπότυπος, όσο και οι σημαντικές μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή σε συγκεκριμένα φάρμακα. Τέλος, μελετάται η επιδημιολογία των DRAMs (Drug Resistance Associated Mutations), διερευνώντας τη σύνδεση του φύλου, της ηλικιακής ομάδας και του σεξουαλικού προσανατολισμού του φορέα καθώς και της χρήσης ή μη ναρκωτικών ουσιών με την εμφάνιση αντοχής στη θεραπεία.

2.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription, RT-PCR)

Η RT-PCR αποτελεί μία *in vitro* μοριακή τεχνική βασισμένη στη δράση του ενζύμου που καλείται Αντίστροφη Μεταγραφάση. Χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων γονιδίων ή γονιδιακών περιοχών εφόσον είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτών και εκτελείται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές. Ένας κύκλος πολλαπλασιασμού μιας τέτοιας αντίδρασης περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια που πραγματοποιούνται σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Στο πρώτο στάδιο τελείται η αποδιάταξη του DNA (denaturation), όπου περιλαμβάνεται επώαση του δείγματος DNA συνήθως στους 95°C. Ακολουθεί το στάδιο του υβριδισμού των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing). Ως εκκινητές χαρακτηρίζονται τα συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια τα οποία είναι συμπληρωματικά

με μία από τις δυο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-στόχου, οι θέσεις ενσωμάτωσης των εκκινητών καθορίζουν τη γονιδιακή περιοχή που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί από το ένζυμο. Στο τρίτο στάδιο, γίνεται η επιμήκυνση των εκκινητών (extension) με τη βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης και ο κύκλος πολλαπλασιασμού επαναλαμβάνεται. Οι θερμοκρασίες στο δεύτερο και τρίτο στάδιο επιλέγονται με βάση το είδος των PCR εκκινητών και του ενζύμου που χρησιμοποιούνται για το εκάστοτε πείραμα. Τόσο οι θερμοκρασίες για κάθε στάδιο όσο και ο αριθμός των κύκλων επανάληψης ρυθμίζονται στο θερμοκυκλοποιητή. Η διάκριση της RT-PCR από την απλή PCR έγκειται στην ύπαρξη ενός επιπλέον σταδίου στην έναρξη της διαδικασίας, κατά το οποίο RNA γενετικό υλικό χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, μεταγράφεται πρώτα σε συμπληρωματικό cDNA και ύστερα σε δίκλωνο DNA. Στη συνέχεια, το παραγόμενο DNA χρησιμοποιείται για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (εικόνα 8). Η σύνθεση του cDNA και ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου στόχου μπορούν να πραγματοποιηθούν σε διαφορετικά ή σε ένα μοναδικό στάδιο και η τεχνική ονομάζεται two steps RT-PCR ή one step RT-PCR αντίστοιχα. (Bachman, 2013).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση ενός πλήρη κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, PCR. Όπου: Denaturation= αποδιάταξη, Annealing= υβριδισμός, Extension= επιμήκυνση, Primers=εκκινητές, Polymerase= Πολυμεράση, DNA template= DNA δείγμα με την επιθυμητή αλληλουχία και dNTPs= δεοξυριβονουκλεοτίδια (Bachman, 2013).

2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Το φαινόμενο κατά το οποίο ένα φορτισμένο μόριο μετακινείται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Η κατεύθυνση της κίνησης των μορίων, προς τον θετικό ή τον αρνητικό πόλο, εξαρτάται από το καθαρό φορτίο που φέρει το μόριο, στην περίπτωση μας η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια απλή εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για το διαχωρισμό θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων, με βάση το φορτίο, το μοριακό βάρος και το σχήμα τους. Η χρήση αγαρόζης προτείνεται για μόρια με μοριακό βάρος που κυμαίνεται εντός του εύρους 100bp μέχρι 25kb, ενώ συνίσταται διαχωρισμός με πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ή πήκτωμα παλμικού πεδίου για μόρια μεγέθους μικρότερου από 100bp και μεγαλύτερου από 25kb, αντίστοιχα. Το πήκτωμα αγαρόζης σχηματίζεται με πρώτη ύλη έναν πολυσακχαρίτη το λεγόμενο άγαρ που απομονώνεται από θαλάσσια φύκη του γένους *Gelidium* και *Gracilaria* και είναι προϊόν συμπολιμερισμού δύο υπομονάδων της αγαροβιόζης, την L- και D-γαλακτόζη. Με θέρμανση και επακόλουθη ψύξη πυροδοτείται η έναρξη του πολυμερισμού της αγαρόζης και ως τελικό προϊόν πολυμερισμού δημιουργείται η γέλη αγαρόζης. Στη γέλη σχηματίζεται ένα δίκτυο οπών που δεν διακρίνονται με γυμνό μάτι, το μέγεθος και η πυκνότητα των οποίων καθορίζεται από την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος σε αγαρόζη. Υψηλή συγκέντρωση αγαρόζης οδηγεί σε υψηλό βαθμό πολυμερισμού και μικρότερο μέγεθος στις οπές. Με συνέπεια τα μικρότερου μεγέθους θραύσματα να μεταφέρονται διαμέσου των οπών με μεγαλύτερη ευκολία σε σύγκριση με τα πιο ογκώδη. Με άλλα λόγια, η γέλη έχει ρόλο μοριακού κόσκινου (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης απαρτίζεται από τρία στάδια: α) την προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης, β) Ηλεκτροφόρηση DNA, και γ) οπτικοποίηση των θραυσμάτων του ηλεκτροφορήματος με UV ακτινοβολία. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι συνδεδεμένη με τροφοδοτικό ρεύματος μέσω ηλεκτροδίων που αναπαριστούν τον θετικό και τον αρνητικό πόλο. Ηλεκτρικό ρεύμα ρέει από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο συμπαρασύροντας τα θραύσματα του DNA, τα οποία φέρουν αρνητικό φορτίο λόγω της φωσφωρικής ομάδας στη ραχοκοκαλιά του νουκλεϊκού οξέος.

Εφόσον ο παράγοντας του ηλεκτρικού φορτίου δεν επηρεάζει τη διαδικασία καθώς όλα τα προς διαχωρισμό θραύσματα φέρουν ίδιο πρόσημο φορτίου, το μοριακό βάρος είναι ο μοναδικός παράγοντας που ξεχωρίζει το ένα θραύσμα DNA από το άλλο κατά την ηλεκτροφόρηση (Voytas, 2001).

Απαραίτητα για την ολοκλήρωση της διαδικασίας είναι τα ρυθμιστικά διαλύματα όπως είναι τα TAE (Tris-acetate-EDTA) και TBE (Tris-borate-EDTA), που χρησιμοποιούνται συνήθως στις ηλεκτροφορήσεις. Ο ρόλος του ρυθμιστικού διαλύματος είναι διττός, είναι απαραίτητο τόσο για τη ρύθμιση του pH όσο και τη παροχή των απαραίτητων ιόντων για την αγωγή του ηλεκτρικού ρεύματος. Εξίσου σημαντικές είναι οι χρωστικές ουσίες που φθορίζουν όταν εκτίθενται σε UV ακτινοβολία οι οποίες χρησιμοποιούνται για την οπτικοποίηση των ηλεκτροφορητικών ζωνών. Το μέγεθος των διαχωρισμένων μορίων προσδιορίζεται βάσει της απόστασης που έχουν διανύσει στο πήκτωμα και τη χρήση ενός πρότυπου DNA. Το πρότυπο DNA περιέχει ένα μείγμα θραυσμάτων DNA προκαθορισμένων μεγεθών τα οποία μπορούν να συγκριθούν με τα άγνωστα θραύσματα (Smith, 1993).

2.4 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η τεχνική της αλληλούχησης αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα χέρια της επιστημονικής κοινότητας για τη συσχέτιση των αλληλουχιών ενός γονότυπου με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που προκύπτουν. Υπάρχουν τρεις γενιές αλληλούχησης. Η πρώτη εμπεριέχει τις τεχνικές αλληλούχησης που τελούνται μέσω σύνθεσης ή διάσπασης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της μέσω σύνθεσης αλληλούχησης αποτελεί η αλληλούχηση κατά Sanger, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως θεμέλιο για τις επόμενες γενιές αλληλούχησης. Η δεύτερη γενιά αλληλούχησης που δημιουργήθηκε είναι γνωστή ως “Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς” (Next-generation sequencing, NGS) και ταξινομείται περαιτέρω στις πιο πρόσφατες τεχνολογίες, δεύτερης και τρίτης γενιάς NGS (Verma, Kulshrestha, & Puri, 2017).

Ωστόσο, σε σύγκριση με τη νέα γενιά τεχνικών, η κατά Sanger αλληλούχηση διατηρεί ορισμένα πλεονεκτήματα όσον αφορά το μήκος ανάγνωσης αλληλούχησης και την ακρίβεια του αποτελέσματος (Verma et al., 2017). Η συγκεκριμένη τεχνική

αναπτύχθηκε από τον Fredric Sanger το 1975 και εφαρμόζεται σε ευρεία γκάμα γονιδιωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου DNA, για τη παροχή δεδομένων γενετικής ακολουθίας (Crossley et al., 2020). Λειτουργεί βασιζόμενη στην αντικατάσταση των δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) με σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) κατά τη διάρκεια της *in vitro* σύνθεσης του DNA. Η απουσία της υδροξυλομάδας από τον άνθρακα στη θέση 3 της νουκλεοτιδικής ομάδας πεντόζης οδηγεί στο σχηματισμό διδεόξυ νουκλεοτιδίων, τα οποία δεν επιτρέπουν τη σύνδεση του επόμενου νουκλεοτιδίου από την DNA πολυμεράση με συνέπεια να τερματίζεται ο πολυμερισμός του DNA. Για αυτό το λόγο η αλληλούχηση αυτού του τύπου ονομάζεται διαφορετικά και αλληλούχηση τερματισμού αλυσίδας. Σημειώνεται ότι ο πολυμερισμός είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται με σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ της 3'-υδροξυλομάδας του πρώτου νουκλεοτιδίου και ενός ατόμου φωσφόρου της φωσφορικής ομάδας του επόμενου νουκλεοτιδίου (Slatko, Albright, Tabor, & Ju, 2001).

Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια. Αρχικά χρησιμοποιούνται κατάλληλα σχεδιασμένοι εκκινητές (primers), δηλαδή ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς το DNA-στόχο. Οι εκκινητές προσδένονται στο μονόκλωνο DNA και στη συνέχεια αναγνωρίζονται από το ένζυμο της πολυμεράσης (DNA polymerase) ως σημείο έναρξης του πολυμερισμού. Ακολουθεί η επιμήκυνση των εκκινητών από την DNA πολυμεράση. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται τυχαία ενσωμάτωση των διδεόξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA με αποτέλεσμα τον τερματισμό του πολυμερισμού και τη δημιουργία επισημασμένων DNA-θραυσμάτων σε διάφορα μεγέθη. Έπειτα, το δείγμα υπόκειται σε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση όπου κάθε θραύσμα διαχωρίζεται κατά αυξανόμενο μέγεθος. Με σειρά τα θραύσματα εκτίθενται σε πηγή φωτός και ανιχνεύεται το εκπεμπόμενο σήμα φθορισμού. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που εκπέμπεται επιτρέπει την αναγνώριση της εκάστοτε βάσης αδενίνης (A), θυμίνης (T), κυτοσίνης (C) ή γουανίνης (G). Τέλος, με χρήση κατάλληλου λογισμικού προγράμματος ανασκευάζεται ολόκληρη η αλληλουχία του DNA-στόχου από τις περιοχές που έχουν αλληλουχηθεί από τον κάθε εκκινητή (Shendure et al., 2011).

Κεφάλαιο 3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός-Αναλώσιμα

1,5mL αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρησης Eppendorf (RNAase / DNAase free)

0,2 mL αποστειρωμένα σωληνάρια PCR λεπτών τοιχωμάτων (RNAase / DNAase free)

Σύστημα ηλεκτροφόρησης Gel αγαρόζης (ηλεκτροδοτούμενη δεξαμενή πηκτώματος)

Καταψύκτες (-80°C, -20°C)

Πιπέτες (P1000, P200, P20, και P10)

Ρύγγη χωρίς φίλτρο και με φίλτρο φραγμού αερολύματος

96x well plates

Φιλμ σφραγίσματος για 96x well plates

Σύστημα φωτογράφισης πηκτώματος (FastGene FAS-DIGI PRO)

Συσκευή ανάδευσης (Vortex)

Φυγόκεντρος 12 θέσεων (FastGene High Speed Mini Centrifuge)

Ψυχόμενη φυγόκεντρος 24 θέσεων (Hettich Universal 32R)

Φασματοφωτόμετρο (Quawell 9000)

Θάλαμος βιοασφάλειας BSL-2 (απομόνωση RNA)

Θάλαμος βιοασφάλειας για παραγωγή αντιδραστηρίων PCR

Θερμοκυκλοποιητής (Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cycler)

Ξηρός θερμικός επωαστήρας (Genius Dry Bath Incubator, MD series, MD-02N)

Ξηρός θερμικός επωαστήρας (FastGene Mini Dry Bath Advance)

Κωνικές φιάλες απο βοριοπυριτικό γυαλί 50ml, 100ml και 200ml (στενόλαιμες)

Ογκομετρικοί κύλινδροι απο βοριοπυριτικό γυαλί 50ml, 100ml και 1000ml

3.2 Πειραματικό Πρωτόκολλο

3.2.1 Απομόνωση RNA γενετικού υλικού

Ολικό ιικό RNA απομονώθηκε απο δείγματα ορού με τη χρήση του αντιδραστηρίου QIAamp Viral RNA Mini Kit (250) (αριθμός καταλόγου: 52906) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Ολόκληρη η διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο βιοασφάλειας BSL-2.

Αρχικά, σημειώνονται οι κωδικοί των δειγμάτων στα προς χρήση σωληνάρια Eppendorf και προστίθενται 560μl διαλύματος λύσης (AVL) μαζί με 140μl απο κάθε δείγμα ορού στο αντίστοιχο σωληνάριο. Ακολούθως, τα δείγματα υπόκεινται σε μικρή ανάδευση με τη συσκευή vortex και αναμονή για 10 λεπτά, ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων και να απελευθερωθεί το RNA γενετικό υλικό στο διάλυμα. Με το πέρας των 10 λεπτών, προστίθενται 560 μl κρύας απόλυτης αιθανόλης. Η αλκοόλη προστίθενται κρύα διότι η διαλυτότητα των αλάτων στα υγρά μειώνεται με την πτώση της θερμοκρασίας, γεγονός που εξασφαλίζει την απομάκρυνση του επιθυμητού RNA απο άλατα του διαλύματος. Έπειτα, με σύντομη ανάδευση στη συσκευή vortex και μικροφυγοκέντρηση δευτερολέπτων απομακρύνονται τα σταγονίδια απο το καπάκι. Ύστερα, ποσότητα 630 μl μεταφέρεται στην αντίστοιχα σημειωμένη κολώνα καθαρισμού και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το σωληνάκι συλλογής του εκλυόμενου παραπροϊόντος απορρίπτεται και χρησιμοποιείται καινούργιο. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται ώστε να μεταφερθεί και η υπόλοιπη ποσότητα διαλύματος λύσης-ορού-αιθανόλης στην κολώνα απομόνωσης. Στη συνέχεια προστίθενται στην κολώνα 500 μl διαλύματος πλύσης 1 (AW1) και φυγοκεντρείται στα 6.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το σωληνάκι συλλογής του εκλυόμενου παραπροϊόντος απορρίπτεται και χρησιμοποιείται νέο. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος διάλυμα πλύσης 2 (AW2) και φυγοκεντρείται στα 20.000 rcf για 3 min στους 25°C. Το σωληνάκι συλλογής του εκλυόμενου παραπροϊόντος αντικαθίσταται με νέο. Σημειώνεται πως τα διαλύματα πλύσης περιέχουν αιθανόλη η οποία εάν παραμείνει στη μεμβράνη της κολώνας μειώνει την καθαρότητα και σύσταση του απομονωμένου RNA, συνεπώς, προτείνεται άλλη μία φυγοκέντρηση στα 20.000 rcf για 1 min στους 25°C, πάλι με νέο καθαρό σωληνάκι συλλογής. Τέλος, το σωληνάκι συλλογής απορρίπτεται με το περιεχόμενο του, η κολώνα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάκι Eppendorf, προστίθενται προσεκτικά στο κέντρο της μεμβράνης 40 μl διαλύματος έκλουσης (AVE) και γίνεται φυγοκέντρηση στα 6.000 rcf για 1min στους 25°C. Το τελικό προϊόν έκλουσης (RNA) χρησιμοποιείται αμέσως για RT-PCR είτε εναλλακτικά, αποθηκεύεται στους -80°C.

3.2.2 RT-PCR

Για το βήμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε το κιτ της Invitrogen Superscript III One-Step RT-PCR system με Platinum Taq High Fidelity DNA πολυμεράση (αριθμός καταλόγου: 12574-035). Για την προετοιμασία των μιγμάτων της αντίδρασης ακολουθήθηκαν ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα, οι οδηγίες των οποίων αναφέρονται στα άρθρα (Rodger et al., 2016; Villa et al., 2018). Έπειτα, τα σωληνάρια PCR τοποθετήθηκαν στον Θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cycler) και ρυθμίστηκαν οι χρόνοι, οι θερμοκρασίες και ο αριθμός των κύκλων για το κάθε βήμα της RT-PCR. Απο το συγκεκριμένο βήμα προκύπτει ως προϊόν δίκλωνο DNA, το οποίο είτε χρησιμοποιείται απευθείας για την επόμενη φωλεακή (Nested) PCR είτε αποθηκεύεται στο ψυγείο στους μείον 20°C για χρονικό διάστημα μέχρι και δύο εβδομάδων.

3.2.3 Nested PCR

Η Ένθετη Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης (Nested PCR) πραγματοποιήθηκε σε συνέχεια της πρώτης για την ενίσχυση μικρότερου μήκους γονιδίωμα που εντοπίζεται εσωτερικά στο προϊόν της πρώτης RT-PCR. Για το συγκεκριμένο βήμα χρησιμοποιήθηκε κιτ της Invitrogen Platinum PCR SuperMix high-fidelity (αριθμός καταλόγου: 12532-016). Η προετοιμασία των δειγμάτων PCR και οι απαιτούμενες ρυθμίσεις του Θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cycler) έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου (Rodger et al., 2016; Villa et al., 2018). Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα αγαρόζης με περιεκτικότητα 1% w/v. Συγκεκριμένα, σε κωνική φιάλη 200ml τοποθετείται 1 gr αγαρόζης σε μορφή σκόνης, αφού πρώτα ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας, μαζί με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE. Ακολουθεί ολιγόλεπτη θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού και ελαφριά ανάδευση ώστε να διασφαλιστεί η

πλήρης διάλυση της αγαρόζης και η δημιουργία ομοιογενούς διαλύματος. Αφού μειωθεί λίγο η θερμοκρασία του διαλύματος, προστίθεται χρωστική SYBR® Safe DNA Gel Stain της εταιρείας Invitrogen™ (αριθμός καταλόγου: S33102) σε συγκέντρωση 1:10000 v/v και ακολουθεί ήπια ανάδευση προκειμένου να γίνει ομοιόμορφη ενσωμάτωση της χρωστικής στο διάλυμα.

Έπειτα, τοποθετούνται τα χτένια στο δοχείο πηκτώματος, το διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται από την κωνική φιάλη στο δοχείο και αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα με τη ψύξη του, ξεκινάει η διαδικασία πολυμερισμού της αγαρόζης για τη δημιουργία συμπαγούς πηκτώματος. Μόλις στερεοποιηθεί το πήκτωμα, τα χτένια αφαιρούνται και στα πηγάδια ηλεκτροφόρησης που δημιουργούνται φορτώνονται τα προϊόντα της PCR. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται ανάμειξη 5μl από κάθε δείγμα με 1μl διαλύματος φόρτωσης DNA Gel Loading Dye (6X) της εταιρείας Thermo Scientific™ (αριθμός καταλόγου: FERR0611) και ύστερα τοποθετούνται στα πηγάδια του πηκτώματος αγαρόζης. Εκτός από τα δείγματα, επιπλέον τοποθετείται ποσότητα 4 μl από μάρτυρα HyperLadder™ 50bp της εταιρείας Meridian© (αριθμός καταλόγου: BIO-33054) στο πρώτο πηγάδι του πηκτώματος για τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων. Τέλος, το δοχείο πηκτώματος μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5xTBE και ρυθμίζεται η τάση, η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος και η διάρκεια σε 120V, 120mA και 40 min αντίστοιχα. Με το πέρας της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας το δοχείο πηκτώματος απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή UV για την οπτικοποίηση των ζωνών ηλεκτροφόρησης. Με βάση την εικόνα που λαμβάνεται σε αυτό το στάδιο κρίνεται η επιτυχία ή αποτυχία του πειράματος.

3.2.5 Καθαρισμός προϊόντος (PCR purification)

Για τον καθαρισμό του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε το kit της Invitrogen PureLink Quick PCR Purification kit (REF: K310001). Τα DNA προϊόντα της Nested PCR καθαρίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά σημειώνονται οι κωδικοί των δειγμάτων στα προς χρήση σωληνάρια Eppendorf. Ύστερα, αναμειγνύονται με αναλογία

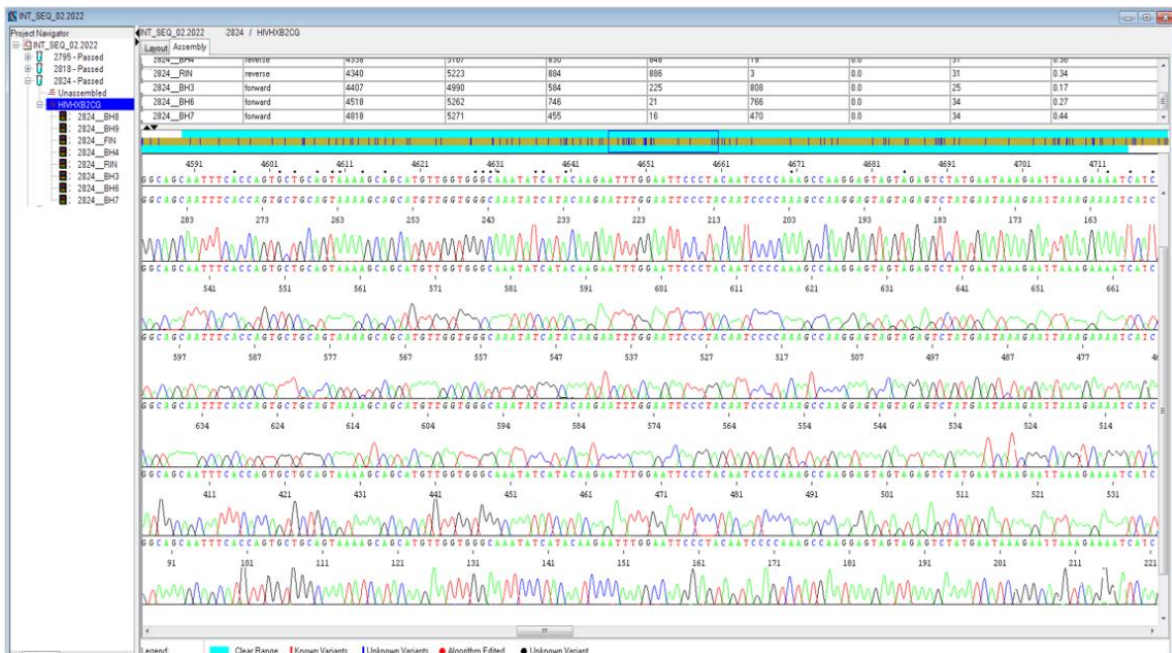
όγκων 1:4 τα PCR προϊόντα με το διάλυμα δέσμευσης DNA, B2. Το μίγμα PCR προϊόντος-B2 που δημιουργείται μεταφέρεται σε κολώνα καθαρισμού και υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση με την φυγόκεντρο FastGene High Speed Mini Centrifuge σε 10.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το παραπροϊόν που εμφανίζεται στο σωλήνα συλλογής απορρίπτεται και ο σωλήνα συλλογής επανατοποθετείται στη κολώνα καθαρισμού. Στη συνέχεια, προστίθενται 650 μl διαλύματος πλύσης, W1 σε κάθε κολώνα και τα δείγματα φυγοκεντρώνται ξανά σε 10.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το παραπροϊόν που εμφανίζεται στο σωλήνα συλλογής απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση αυτή τη φορά σε μέγιστη ταχύτητα rcf για 3 min. Έπειτα, η κολώνα μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf και αφήνεται για λίγα λεπτά μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος, προστίθενται 40 μl από το διάλυμα έκλουσης E1 και η κολώνα φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 3 min στους 25°C. Το καθαρισμένο προϊόν υποβάλλεται σε δεύτερη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να ελεγχθεί η ακεραιότητα του δείγματος.

3.2.6 Αλληλούχηση κατά Sanger

Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR από το προηγούμενο βήμα προσδιορίζονται ποσοτικά και ποιοτικά μέσω φωτομέτρησης στο φασματοφωτόμετρο (Quawell 9000). Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ο λόγος της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm προς την απορρόφηση στα 280 nm. Τα 260 nm είναι το μήκος κύματος όπου παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση φωτός από το DNA, ενώ τα 280 nm αποτελούν το μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν μέγιστα οι πρωτεΐνες. Η καθαρότητα του δείγματος καθορίζεται από τη τιμή του συγκεκριμένου λόγου, όσο μεγαλύτερη η τιμή τόσο καθαρότερο, απαλλαγμένο από πρωτεΐνες κρίνεται το δείγμα. Ταυτόχρονα υπολογίζεται και η συγκέντρωση του δείγματος, η οποία εκφράζεται σε ng/ul.

Με βάση τις μετρήσεις της συγκέντρωσης από το φασματοφωτόμετρο και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, γίνονται κατάλληλες αραιώσεις στα δείγματα με στόχο σε κάθε πηγάδι του 96x plate αλληλούχησης να υπάρχουν 3μl εκκινητή τελικής συγκέντρωσης 1pm/μl και 12 μl δείγματος τελικής συγκέντρωσης 8ng/μl. Ένα 96x plate αλληλούχησης διαθέτει 8 οριζόντιες στήλες και 12 κατακόρυφες. Σε κάθε ένα από τα 8

πηγάδια της κατακόρυφης στήλης τοποθετείται το ίδιο δείγμα PCR και σε κάθε οριζόντια σειρά ο ίδιος εκκινητής. Τελικά σε κάθε θέση της κατακόρυφης στήλης εντοπίζεται το δείγμα με έναν απο τους 8 διαφορετικούς εκκινητές. Το plate σφραγίζεται και αποστέλλεται για αλληλούχηση κατα Sanger σε συνεργαζόμενη εξωτερική εταιρεία. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επεξεργάζονται με το λογισμικό SeqScape™ Software v2.7 της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Με τη χρήση του συγκεκριμένου λογισμικού δίνεται η δυνατότητα ανακατασκευής και συνδιασμού των «διαβασμάτων» από τους 8 εκκινητές μέσω της στοίχισης και σύγκρισής τους με μία αλληλουχία πρότυπο γονότυπου B. Λόγω της ιδιαιτερότητας του δείγματος χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος των χρωματογραφήματων που παράγονται, συνεπώς ελέγχονται χειροκίνητα τα αποτελέσματα που εξάγει το λογισμικό. Εφόσον γίνει η επεξεργασία, η αλληλουχία του δείγματος αποθηκεύεται ως αρχείο Fasta ώστε να ακολουθήσει η τελική ανάλυση των μεταλλάξεων ανοχής στη διαδικτυακή βάση δεδομένων του πανεπιστημίου του Stanford, HIV Drug Resistance Database.



Εικόνα 9: Χρωματογράφημα απο το λογισμικό SeqScape™ Software v2.7. Χρωματικός κώδικας: κόκκινες καμπύλες για θυμίνη (T), πράσινες για αδενίνη (A), μπλε για κυτοσίνη (C), και μαύρες για γουανίνη (G). Επίσης, διακρίνεται η αλληλουχία πρότυπο γονότυπου B με ανοιχτό κυανό χρώμα, με κίτρινο οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος και οι μπλε κάθετες γραμμές στο κίτρινο φόντο αντιπροσωπεύουν τις νουκλεοτιδικές βάσεις των εισαγόμενων αλληλουχιών που διαφέρουν απο το πρότυπο. Πηγή: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401740.pdf>

3.2.7 Ανάλυση Αποτελεσμάτων στη διαδικτυακή βάση HIVdb

Η διαδικτυακή βάση δεδομένων του πανεπιστημίου του Stanford, HIV Drug Resistance Database (έκδοση 9.4, διαθέσιμη στη διεύθυνση <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>) χρησιμοποιήθηκε για την ερμηνεία της αντοχής, την αξιολόγηση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στην αντιρετροϊκή θεραπεία και την ανάθεση υποτύπων. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων βασίζεται σε πρότυπες αλληλουχίες που είναι αποθηκευμένες στο λογισμικό του προγράμματος, με τις οποίες συστοιχίζεται και συγκρίνεται η αλληλουχία ενδιαφέροντος που εισάγεται από τον χρήστη. Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων και του γονοτύπου δίνεται με βάση την αλληλουχία με την οποία το δείγμα ενδιαφέροντος φέρει τη μικρότερη απόκλιση και εμφανίζεται με τη μορφή ποσοστού.

1. Consensus for segment HIVHXB2CG for specimen 53061

Sequence summary

Sequence includes IN: subtype: codons 1 - 288

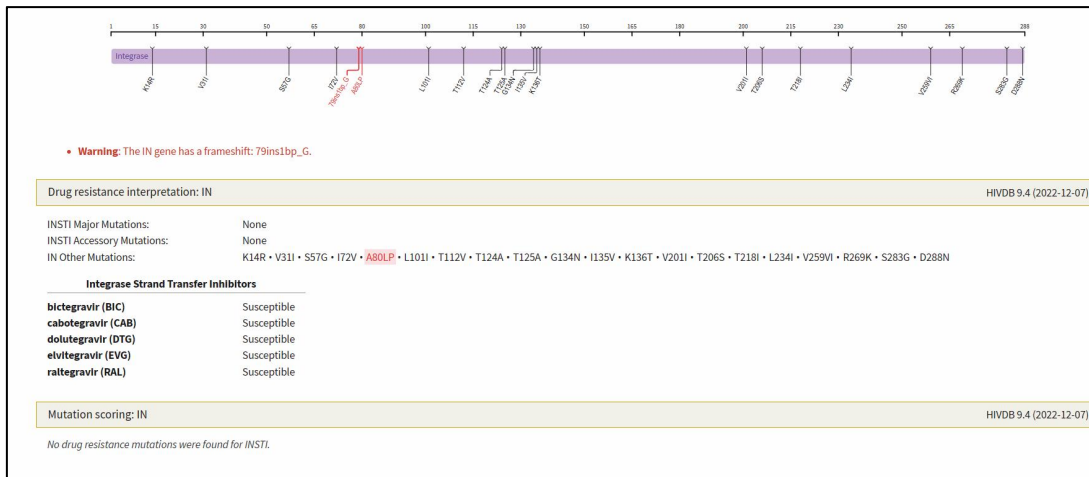
- CRF02_AG (2.31%)
- [FJ388896](#): Cyprus (2005); CRF02_AG (2.31%); best match
- [AY151001](#): Ecuador (2000); CRF02_AG (2.89%)
- [KX228823](#): Cameroon (2008); CRF02_AG (3.01%)
- [AF063224](#): France (1991); CRF02_AG (3.13%)
- [AF377954](#): Cameroon (1997); CRF02_AG (3.13%)
- [FJ694791](#): Guinea-Bissau (2004); CRF02_AG (3.13%)
- [KT223759](#): Senegal (2013); CRF02_AG (3.24%)
- [AB286856](#): Ghana (2003); CRF02_AG (3.47%)
- [AJ286133](#): Cameroon (1997); CRF02_AG (3.47%)
- [AY444811](#): United States (2000); CRF02_AG (3.47%)

IN SDRMs: None

Sequence quality assessment

Εικόνα 10: Αποτελέσματα γονοτύπησης της διαδικτυακής βάσης δεδομένων HIVdb για το δείγμα με αριθμό 53601. Διακρίνεται ο γονότυπος που αποδίδεται στο συγκεκριμένο δείγμα ύστερα από σύγκριση με τους αποθηκευμένους στο λογισμικό του προγράμματος υποτύπους. Πηγή: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>.

Εικόνα 10: Αποτελέσματα γονοτύπησης της διαδικτυακής βάσης δεδομένων HIVdb για το δείγμα με αριθμό 53601. Διακρίνεται ο γονότυπος που αποδίδεται στο συγκεκριμένο δείγμα ύστερα από σύγκριση με τους αποθηκευμένους στο λογισμικό του προγράμματος υποτύπους. Πηγή: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>.

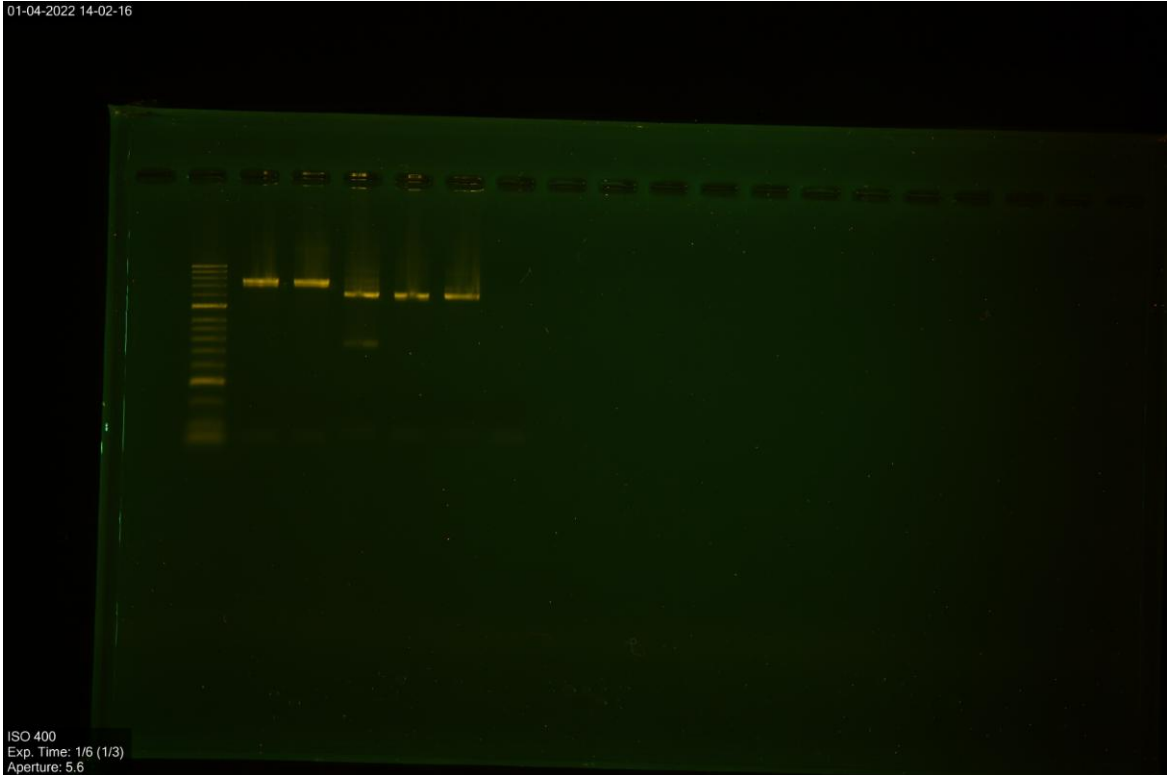


Εικόνα 11: Αποτελέσματα της διαδικτυακής βάσης δεδομένων HIVdb για το δείγμα με αριθμό 53601. Διακρίνονται τρία είδη μεταλλάξεων, οι μείζονες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας, οι βοηθητικές μεταλλάξεις που εν δυνάμει θα προσδώσουν αντοχή και οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο δείγμα ωστόσο δεν επιφέρουν αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία. Επίσης, αναγράφεται η ανθεκτικότητα σε φάρμακα αναστολείς για το γονίδιο που μελετάται. Πηγή: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>.

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

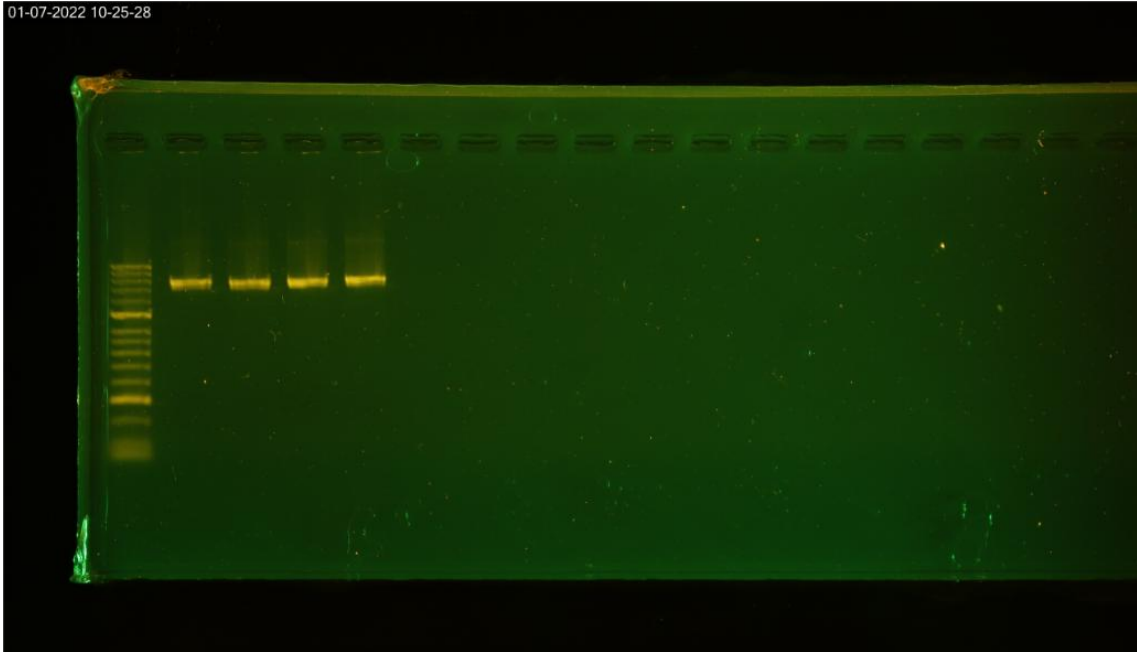
4.1 Πηκτώματα Ηλεκτροφόρησης

Τα 61 δείγματα εξετάστηκαν για τη πιθανή εμφάνιση αντοχής και για τα τρία κύρια γονίδια του ιού HIV-1, πρωτεάση, αντίστροφη μεταγραφάση (PR_RT) και ιντεγκράση (INT). Απο τα 61 που δοκιμάστηκαν, τα 37 (60,6%) κρίθηκαν κατάλληλα για καθαρισμό και αποστολή για αλληλούχηση για το γονίδιο της ιντεγκράσης, ενώ όλα τα 61, (100%) κρίθηκαν κατάλληλα για το γονίδιο πρωτεάσης-αντίστροφής μεταγραφάσης. Η εμφάνιση ζώνης ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα αγαρόζης αποτέλεσε τον παράγοντα εκτίμησης της επιτυχίας ή αποτυχίας των πειραμάτων, καθώς και της ποιότητας του αποτελέσματος. Παρακάτω δίνονται ορισμένες εικόνες των πηκτωμάτων με επιτυχή και μη έκβαση της πειραματικής διαδικασίας προς σχολιασμό.

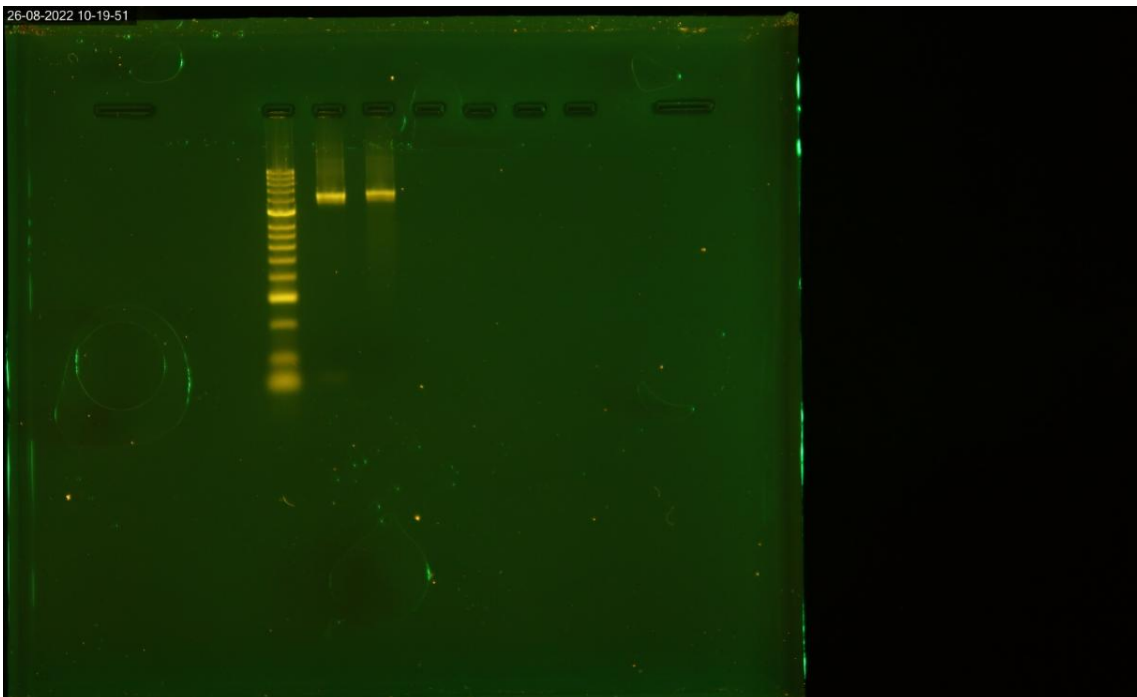


Εικόνα 12: Μπάντες σε πήκτωμα αγαρόζης 01/04/2022.

Η ύπαρξη μονής μπάντας στο πήκτωμα της Εικόνας 12 για τις θέσεις 1,2,4 και 5 δεξιά του ladder δηλώνει την επιτυχία της πειραματικής διαδικασίας. Αντίθετα, η διπλή μπάντα της θέσης 3 πιθανόν οφείλεται σε επιμόλυνση του δείγματος ή καταστροφή του αρχικού RNA. Οι μπάντες που εντοπίζονται υψηλότερα αντιστοιχούν σε δείγματα PR_RT, διότι στο PR_RT προϊόν εμπεριέχονται τα δύο γονίδια πρωτεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης μαζί, με συνέπεια το μέγεθος να είναι μεγαλύτερο (1.485 kb) σε σχέση με το μέγεθος για το γονίδιο της ιντεγκράσης που αναμένεται στα 1.252 kb.



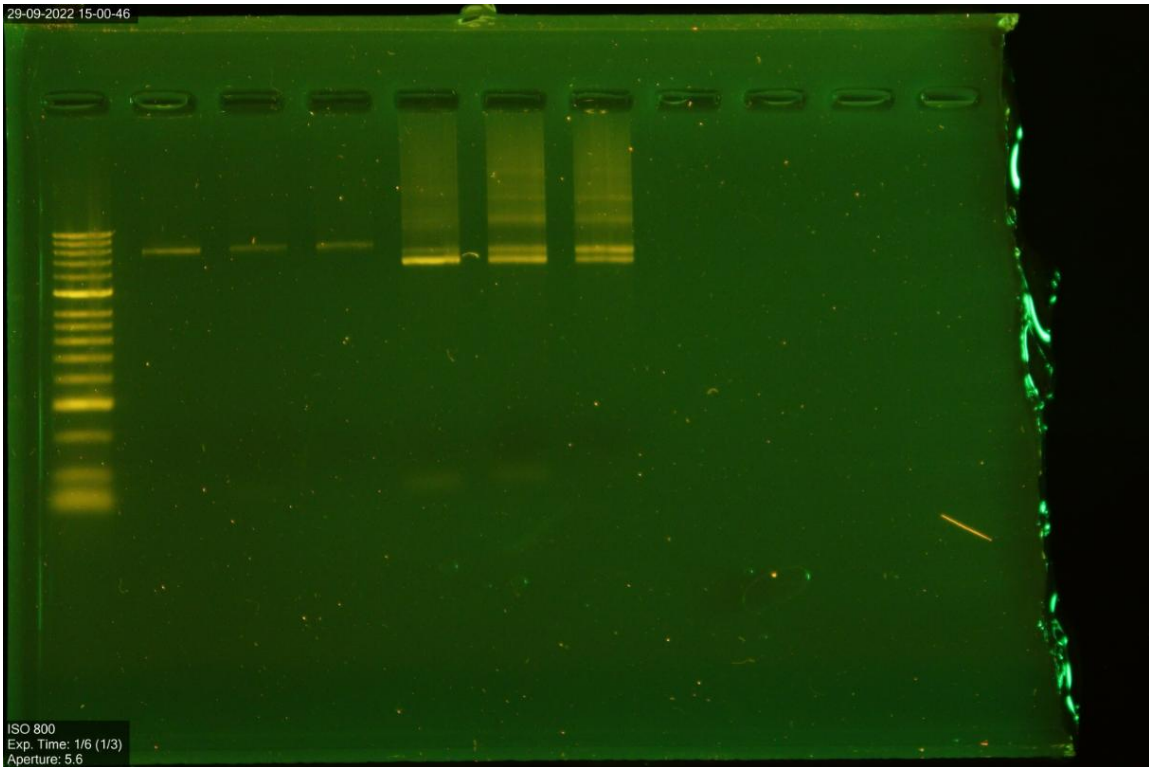
Εικόνα 13: Μπάντες σε πήκτωμα αγαρόζης 01/07/2022.



Εικόνα 14: Μπάντες σε πήκτωμα αγαρόζης 26/08/2022.

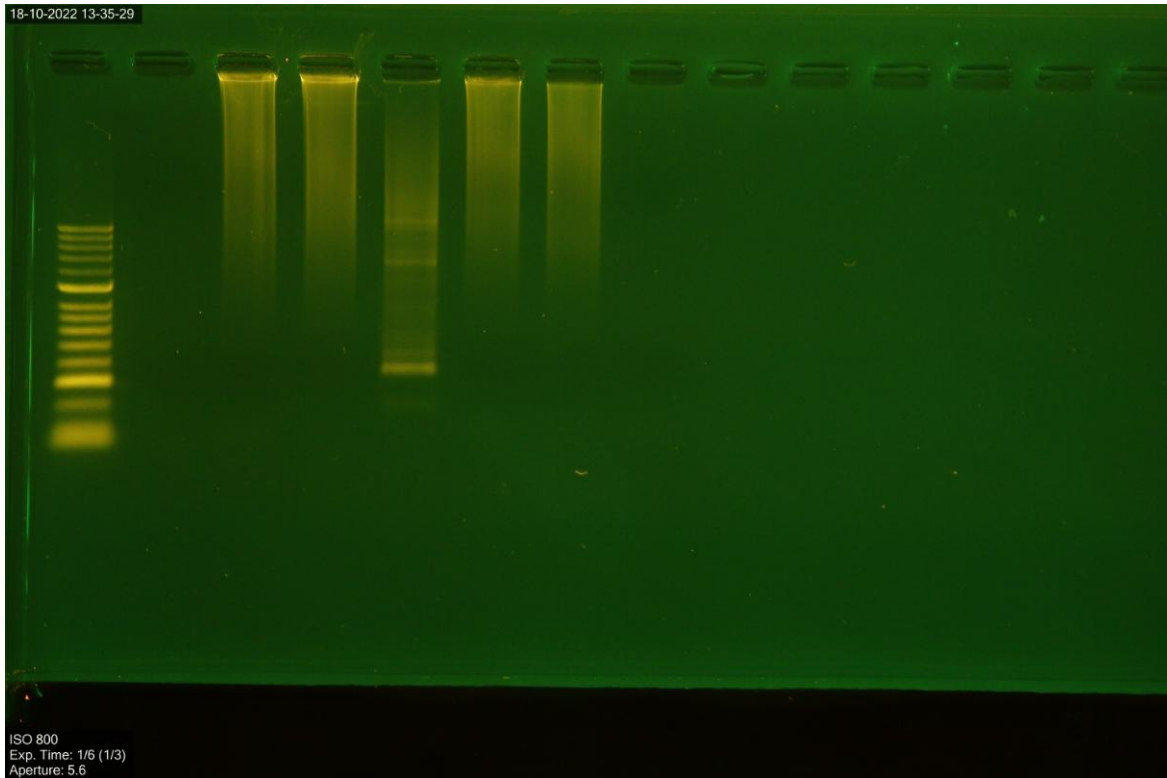
Για τις Εικόνες 13 και 14, οι μονές μπάντες που εμφανίζονται αντιστοιχούν σε δείγματα PR_RT και με την εμφάνισή τους υπογραμμίζεται η επιτυχία της διαδικασίας. Για το πήκτωμα της Εικόνα 14 τοποθετήθηκαν εκτός από τα δείγματα PR_RT και οι ίδιοι κωδικοί δειγμάτων για το γονίδιο της INT, για το τελευταίο γονίδιο όμως δεν εμφανίστηκαν μπάντες. Η απουσία ζωνών ηλεκτροφόρησης μπορεί να οφείλεται σε

ποικιλία παραγόντων εξαιτίας της ευαίσθητης φύσης του RNA ως αρχικού υλικού. Πιο συχνή αιτία αποτελεί η καταστροφή του δείγματος RNA λόγω RNAασών. Επιπροσθέτως, η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος λόγω παρατεταμένης παραμονής εκτός ψύξης ή ο κακός χειρισμός σε κάποιο από τα βήματα της απομόνωσης του γενετικού υλικού ή της προετοιμασίας για την αντίδραση της RT-PCR μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή του δείγματος και απουσία μπάντας.



Εικόνα 15: Μπάντες σε πήκτωμα αγαρόζης 29/09/2022.

Στο πήκτωμα της παραπάνω εικόνας εντοπίζονται τρία δείγματα πρωτεάσης-αντίστροφης μεταγραφάσης που ακολουθούνται από τρεις ιντεγκράσες. Η ανάλυση της εικόνας είναι ίδια με την Εικόνα 12.



Εικόνα 16: Μπάντες σε πήκτωμα αγαρόζης 18/10/2022.

Η Εικόνα 16 είναι ένα ενδεικτικό πήκτωμα για δείγματα που απέτυχαν. Όλα τα παραπάνω δείγματα αφορούν ιντεγκράσες.

4.2 Επιδημιολογική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στα πλαίσια της παρούσας επιδημιολογικής επιτήρησης αναλύθηκαν συνολικά 61 κλινικά δείγματα νεοδιαγνωσθέντων ατόμων που ζουν με τον ιό HIV-1. Τα συγκεκριμένα δείγματα βρέθηκαν θετικά στον ιό HIV-1 ύστερα απο διαγνωστικούς ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν απο το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς του AIDS Νοτίου Ελλάδος, ΕΚΑΑΝΕ για τη χρονική περίοδο δειγματοληψίας Ιανουαρίου-Δεκεμβρίου 2022. Όσα άτομα συμπεριλαμβάνονται στη παρούσα ερευνητική μελέτη δεν είχαν λάβει ποτέ στο παρελθόν αντιρετροϊκή θεραπεία (naïve PLWH). Απο το σύνολο των 61 δειγμάτων, τα 51 (83,6%) αντιστοιχούν σε άνδρες με διάμεση ηλικία τα 39 έτη (διάμεση ηλικία 39 έτη; IQR:21-69), τα 9 (14,7%) σε γυναίκες με διάμεση ηλικία τα 43 έτη (διάμεση ηλικία 43 έτη; IQR:26-69) και ένα δείγμα αντιστοιχεί σε διαφυλική γυναίκα 21 ετών. Στην πλειοψηφία τα άτομα που συμπεριλήφθησαν διαθέτουν ελληνική εθνικότητα καταλαμβάνοντας το 91,8% (n=56) και το υπολειπόμενο 8,2% αφορά δείγματα απο Αίγυπτο (1/61; 1,64%),

Αλβανία (1/61; 1,64%), Κούβα (1/61; 1,64%), Σιέρα Λεόνε (1/61; 1,64%) και Ρωσία (1/61; 1,64%) (γράφημα 2).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων στη βάση HIVdb, ο επικρατέστερος γονότυπος για την Ελλάδα βρέθηκε να είναι ο A που εντοπίζεται σε ποσοστό 41,0% (n=25) και ακολουθείται από τους γονότυπους B και G που εμφανίζονται με το ίδιο ποσοστό, της τάξεως του 16,4% (n=10). Ένα άτομο έφερε συνδυασμό γονότυπου B με CRF02_AG (1/61; 1,6%) και το υπόλοιπο 25,6% των δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν αποδόθηκαν σε ανασυνδυασμένες μορφές (CRFs). Συγκεκριμένα βρέθηκαν οι εξής: CRF02_AG (6/61; 10,0%), CRF35_AD (5/61; 8,2%), CRF20_BG (1/61; 1,6%), CRF01_AE (1/61; 1,6%), CRF73_BG (1/61; 1,6%) και CRF18_cpx (1/61; 1,6%) (γράφημα 3).

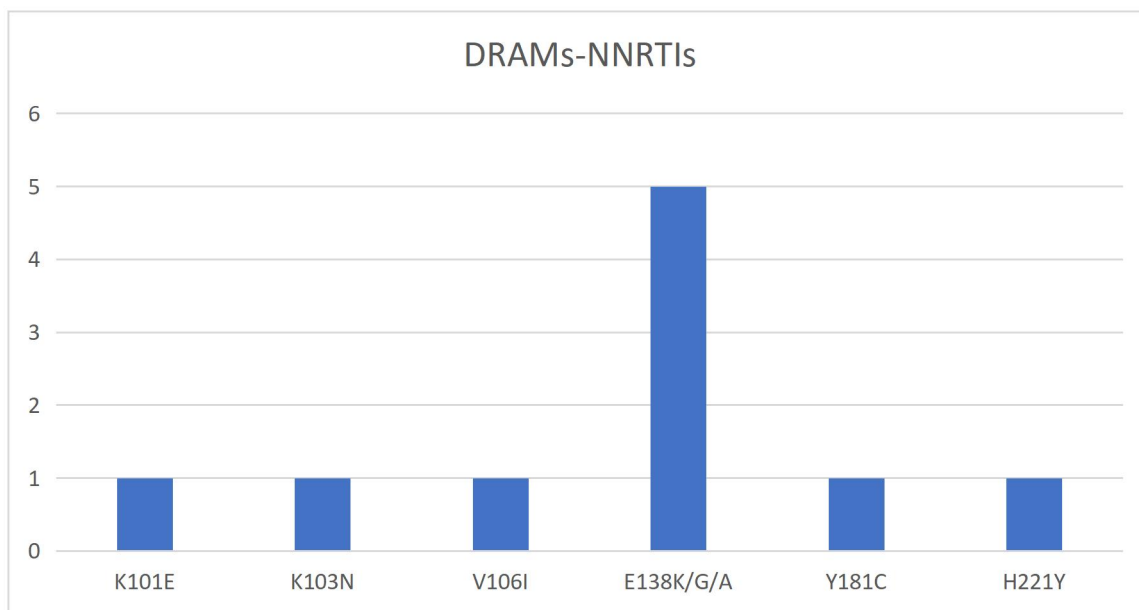
Όσον αφορά τα ποσοστά εμφάνισης αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία, οκτώ δείγματα (8/61; 13,0%) βρέθηκαν με κάποια μετάλλαξη ανθεκτικότητας, εκ των οποίων τα επτά εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία σε μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs) [7/61; 11,5%] και ένα σε νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs) [1/61; 1,6%]. Το τελευταίο έφερε τη μετάλλαξη M184V, η οποία προκαλεί υψηλού επιπέδου *in vitro* αντοχή στα φάρμακα 3TC και FTC μαζί με ενδιάμεση αντοχή στο ABC. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως η ίδια μετάλλαξη προκαλεί αύξηση της ευαισθησίας άλλων νουκλεοσιδικών αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης, όπως είναι το AZT και το TDF. Από τα επτά δείγματα που εμφάνισαν αντοχή στα φάρμακα NNRTIs, τα πέντε έφεραν μετάλλαξη στο γλουταμινικό οξύ της θέσης 138 (E138K/G/A) που αντιστοιχεί σε ποσοστό (5/7; 71,4%) για την αντοχή στα φάρμακα NNRTIs, 62,5% για το σύνολο των 8 μεταλλάξεων αντοχής που ανιχνεύθηκαν και (5/61; 8,2%) για το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Βρέθηκαν επιπλέον μεταλλάξεις ανθεκτικότητας όπως οι: K101E, K103N, V106I, Y181C και H221Y, όλες σε ποσοστά (1/7; 14,3%) για τα φάρμακα NNRTIs, (1/8; 12,5%) για το σύνολο των δειγμάτων που εμφάνισαν μεταλλάξεις αντοχής και (1/61; 1,6%) για το σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν (γράφημα 1). Στον πίνακα 2 συγκεντρώνονται τα οκτώ δείγματα που βρέθηκαν με μεταλλάξεις ανθεκτικότητας, παρουσιάζονται οι θέσεις και οι αλλαγές στις κωδικοποιήσεις των αμινοξέων που προκαλούν αντοχή υψηλού, ενδιάμεσου ή χαμηλού επιπέδου στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Για παράδειγμα, για το

δείγμα με κωδικό ##210 η αντικατάσταση της λυσίνης απο το γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο της θέσης 101 σε συνδυασμό με την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος απο τη λυσίνη στη θέση 138 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλού επιπέδου αντοχής στο φάρμακο rilpivirine (RPV) και χαμηλής έντασης αντοχής στα φάρμακα etravirine (ETR), efavirenz (EFV) και doravirine (DOR).

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας των επιπέδων αντοχής συναρτήσει των μεταλλάξεων ανθεκτικότητας για το εκάστοτε δείγμα. Διακρίνονται με μπλέ χρώμα τα δείγματα που εμφάνισαν αντοχή σε φάρμακα NNRTIs και με κίτρινο σε φάρμακα NRTIs. Στην αριστερή στήλη φαίνονται οι κωδικοί των δειγμάτων, στις τρεις ενδιάμεσες στήλες τα επίπεδα αντοχής για τα φάρμακα που αναγράφονται και στην τελευταία στήλη παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις.

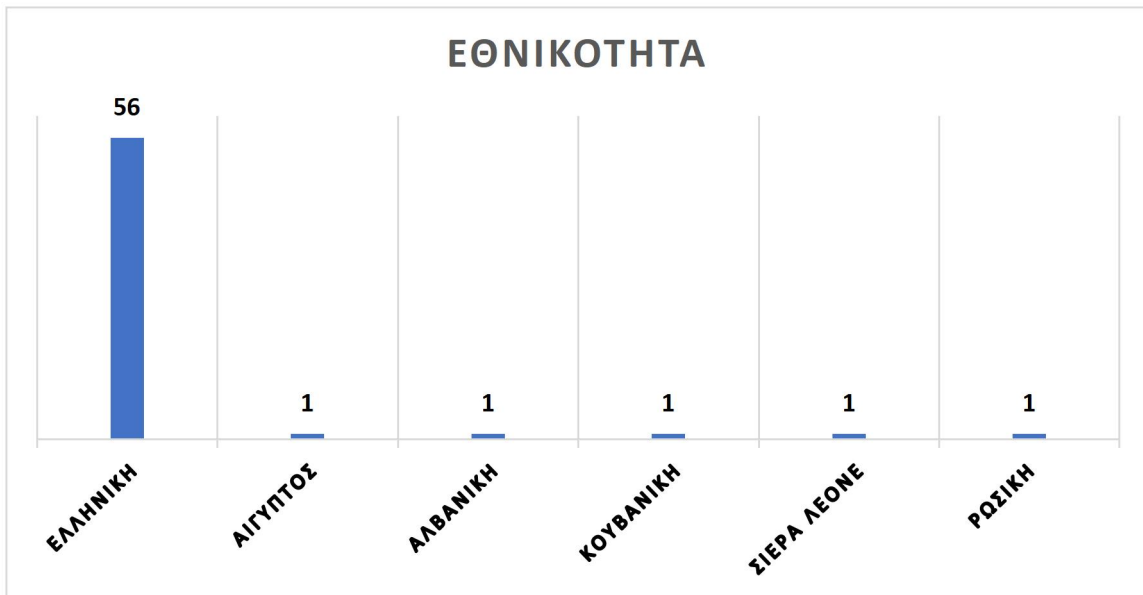
Δείγμα	Αντοχή σε Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης			Μεταλλάξεις
	Υψηλό Επίπεδο	Χαμηλό Επίπεδο	Ενδιάμεσο Επίπεδο	
210	RPV	ETR, EFV, DOR		E138K,K101E
275		RPV		E138A
339		RPV		E138G
474	EFV, NVP			K103N,V106I
529		RPV		E138A
549			RPV	E138K
939	NVP, RPV	DOR, ETR		Y181C,H221Y
601	FTC,3TC	ABC		M184V

Συντομογραφίες: DOR=doravirine, ETR=etravirine, NVP=nevirapine, EFV=efavirenz, RPV=rilpivirine, 3TC=lamivudine, FTC=emtricitabine και ABC=abacavir.

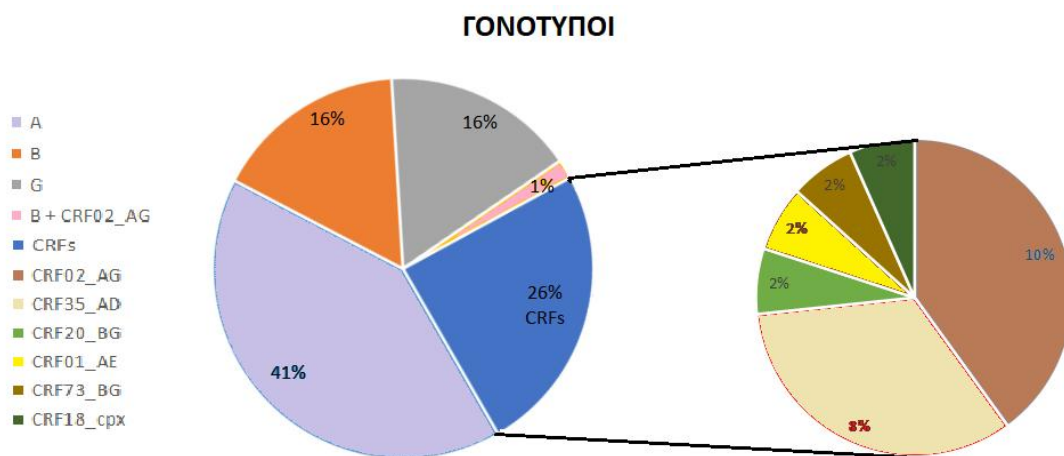


Γράφημα 1: Διάγραμμα στήλων στο οποίο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν για τα δείγματα που εμφάνισαν αντοχή σε μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs). Στον άξονα x, αναγράφονται οι μεταλλάξεις και στον άξονα y, η συχνότητα εμφάνισης της εκάστοτε μετάλλαξης.

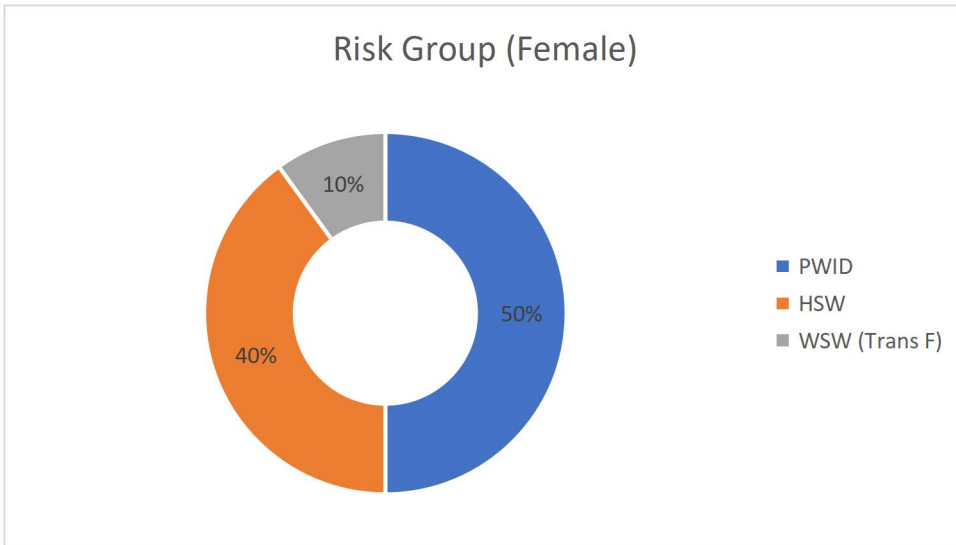
Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί πως το ένα δείγμα από τα οκτώ που εμφάνισαν μεταλλάξεις αντοχής βρέθηκε να είναι γυναίκα που έχει απροφύλακτες ετεροφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (heterosexual woman, HSW) (1/61; 1,6%) ενώ τα υπόλοιπα επτά αφορούν άνδρες. Οι τρεις εκ των ανδρών βρέθηκαν να είναι ομοφυλόφιλοι που έχουν απροφύλακτες σεξουαλικές επαφές με άλλους άνδρες (men who have sex with men, MSM) [3/61; 4,9%], τρεις είναι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (people who inject drugs, PWID) [3/61; 4,9%] και ένας από τους επτά έχει απροφύλακτες ετεροφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (men who have sex with women, MSW) [1/61; 1,6%]. Όσον αφορά τις ομάδες κινδύνου για το σύνολο των 61 δειγμάτων βρέθηκαν α) χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (22/61; 36,1%), β) άτομα που έχουν απροφύλακτες σεξουαλικές επαφές με το αντίθετο φύλο (8/61; 13,1%), γ) άτομα που έχουν απροφύλακτες σεξουαλικές επαφές με το ίδιο φύλο (24/61; 39,3%) και δ) άτομα που προέρχονται από χώρες υψηλού επιπολασμού (2/61; 3,3%), ενώ για ένα ποσοστό της τάξεως του 8,2% (n=5) δεν διατίθενται επιδημιολογικά δεδομένα. Στα γραφήματα 4 και 5 παρουσιάζονται οι ομάδες κινδύνου συναρτήσει του φύλου των ατόμων εκφρασμένα σε ποσοστά επί τοις εκατό.



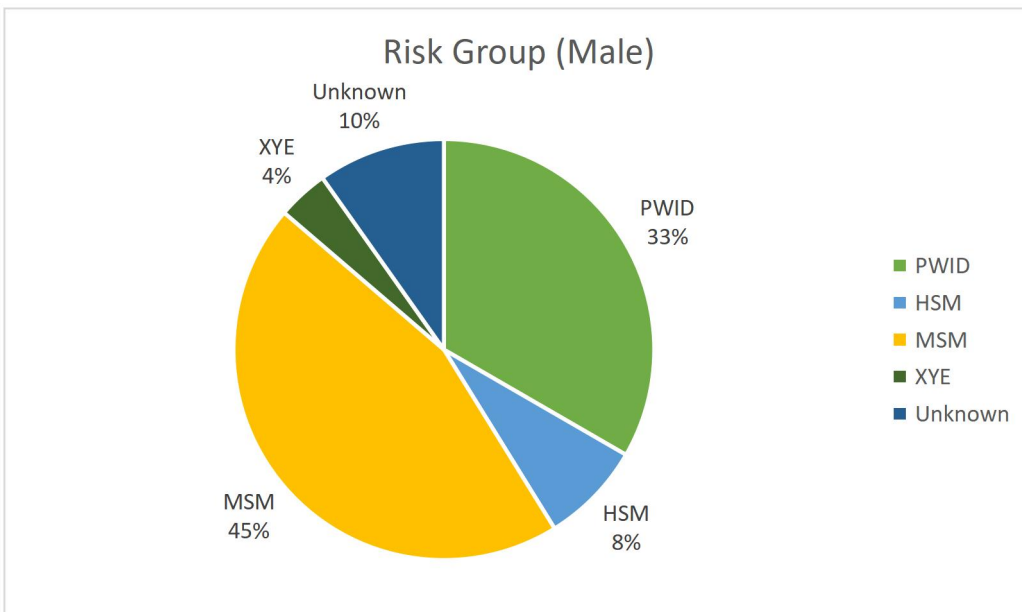
Γράφημα 2: Διαγραμματική απεικόνιση σε μορφή στηλών για τις εθνικές προελεύσεις των δειγμάτων. Διακρίνονται αριθμοί στο πάνω μέρος κάθε στήλη που δηλώνουν το πλήθος των ατόμων που διαθέτουν την ίδια εθνικότητα ανάμεσα στα 61 δείγματα που αναλύθηκαν.



Γράφημα 3: Αποτελέσματα γονοτύπησης της διαδικτυακής βάσης δεδομένων HIVdb. Τα ποσοστά αφορούν το σύνολο των 61 δειγμάτων που μελετήθηκαν.



Γράφημα 4: Παρουσιάζονται επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τα γυναικεία δείγματα κατηγοριοποιημένα σε ομάδες κινδύνου. Χρωματικός κώδικας: χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (μπλέ), γυναίκες με απροφύλακτες ετεροφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (πορτοκαλί) και trans γυναίκα με απροφύλακτες ομοφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (γκρί). Τα ποσοστά αφορούν το σύνολο των γυναικείων δειγμάτων με ή χωρίς μεταλλάξεις αντοχής.

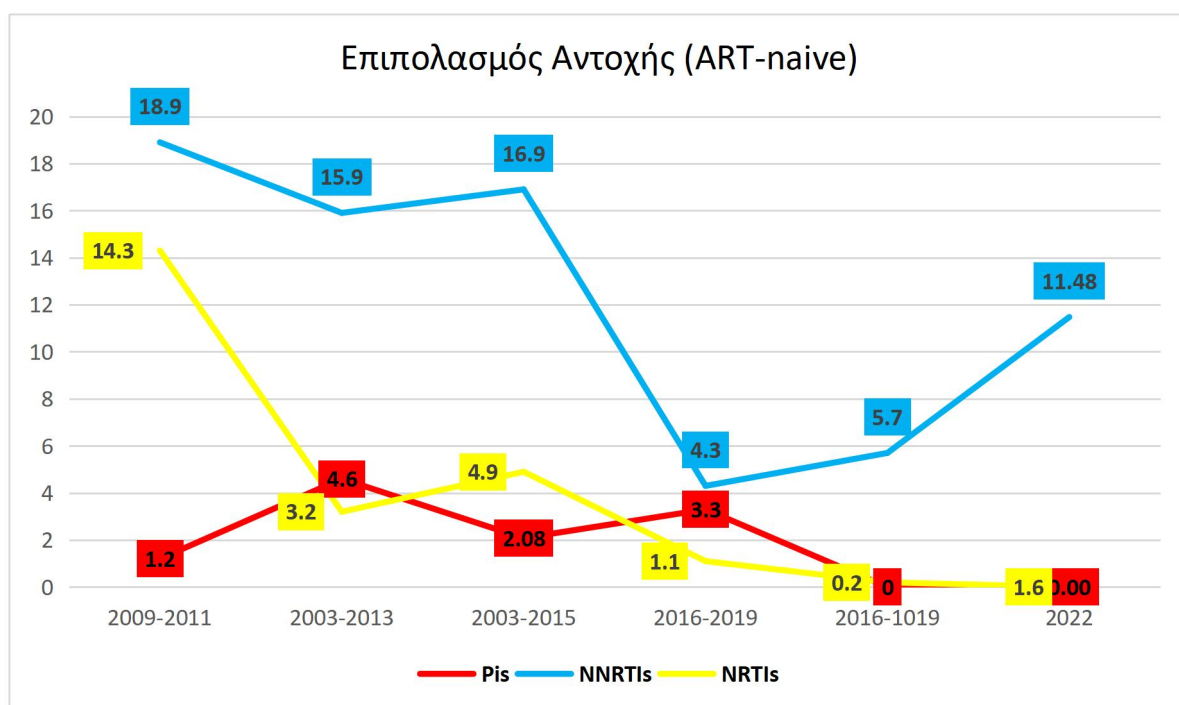


Γράφημα 5: Παρουσιάζονται επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τα ανδρικά δείγματα κατηγοριοποιημένα σε ομάδες κινδύνου. Χρωματικός κώδικας: χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (πράσινο), άνδρες που έχουν απροφύλακτες ετεροφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (κυανό), άνδρες με απροφύλακτες ομοφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (κίτρινο), χώρα υψηλού επιπολασμού (σκούρο πράσινο) και άγνωστης ομάδας κινδύνου (σκούρο μπλέ). Τα ποσοστά αφορούν το σύνολο των ανδρικών δειγμάτων με ή χωρίς μεταλλάξεις αντοχής.

Όσον αφορά τον επιπολασμό της μεταδιδόμενης αντοχής για την Ελλάδα δημιουργήθηκε το διάγραμμα 1 από τα δεδομένα του πίνακα 3, όπως παρουσιάστηκαν στο 34^ο Πανελλήνιο Συνέδριο του AIDS από την ομάδα (Beloukas et al.)

Πίνακα 3: Συγκεντρωτικός πίνακας όπου συνοψίζονται τα δεδομένα που αφορούν τον επιπολασμό της μεταδιδόμενης αντοχής για ναίνα άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 στην Ελλάδα συναρτήσει των διαφορετικών χρονικών περιόδων. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε μορφή ποσοστών για τους αναστολείς της πρωτεάσης (2^η στήλη), τους μη-νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (3^η στήλη) και τους νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (4^η στήλη).

Χρονική Περίοδος	PIs (%)	NNRTIs (%)	NRTIs (%)
2009-2011	1,2	18,9	14,3
2003-2013	4,6	15,9	3,2
2003-2015	2,08	16,9	4,9
2016-2019	3,3	4,3	1,1
2016-2019	-	5,7	0,2
2022	-	11,48	1,6



Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων επιπολασμού μεταδιδόμενης αντοχής για ναίνα άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 στην Ελλάδα.

4.3 Συζήτηση των Αποτελεσμάτων

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για τα 61 δείγματα του 2022 με αποτελέσματα μελέτης του 2021 για 438 δείγματα της χρονικής περιόδου 2016-2019 προκύπτουν τα εξής:

Αρχικά σημειώνεται ότι και οι δύο μελέτες εξετάζουν την εμφάνιση αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία για άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 στην Ελλάδα και δεν είχαν στο παρελθόν εκτεθεί σε αντιρετροϊκά φάρμακα. Σύμφωνα με τη μελέτη του 2021, τα 34 δείγματα εμφάνισαν αντοχή (34/438; 7,8%) με πιο συχνές θέσεις αντοχής τις E138A (9,6%), K103N (6,4%) και K101E (2,1%). Στη παρούσα μελέτη, τα 8 δείγματα βρέθηκαν με μεταλλάξεις αντοχής (8/61; 13,0%) και η E138A/G/K φαίνεται να είναι η πιο συχνή μετάλλαξη αντοχής (5/61; 8,2%), γεγονός που συμφωνεί με τη μελέτη του 2021. Επιπλέον σημείο συμφωνίας αποτελεί ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων είναι άνδρες, με την ελληνική εθνικότητα να υπερिशύχει έναντι των μη-ελληνικών εθνικοτήτων. Ακόμη, ο επιπολασμός της μεταδιδόμενη αντοχής για τα φάρμακα NNRTIs υπερिशύχει έναντι των NRTIs και PIs με ποσοστά 4,4% , 0,9% και 0,9% αντίστοιχα για την μελέτη του 2021, ενώ τα ίδια ποσοστά στη δική μας μελέτη βρέθηκαν 11,8%, 1,6% και 0% αντίστοιχα. Όσον αφορά την ανάλυση των γονοτύπων, η πλειονότητα των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν για τη μελέτη του 2021 περιορίστηκε στον υπότυπο A (52,6%), ακολουθούμενη από τον B (19,6%). Αντιθέτως, στη παρούσα εργασία, ο υπότυπος A κυριαρχεί (41,0%) ακολουθούμενος από ανασυνδυασμένες μορφές υποτύπων (CRFs) σε ποσοστό 26,0% ενώ ο υπότυπος B μαζί με τον υπότυπο G βρέθηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό (16,0%). Πιθανόν, ο λόγος αύξησης των ανασυνδυασμένων μορφών τα τελευταία δύο χρόνια να σχετίζεται με τη γεωγραφική θέση της Ελλάδας που τη καθιστά πόλο έλξης ατόμων από τρεις διαφορετικές ηπείρους. Η εισροή νέων γονοτύπων ευνοείται από την αύξηση της μετανάστευσης με συνέπεια την εμφάνιση ποικίλων στελεχών του ιού. (Kantzanou et al., 2021)

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας δε βρέθηκαν μεταλλάξεις αντοχής για αναστολείς της ιντεγκράσης πιθανόν λόγω του μικρού πλήθους δειγμάτων και του χαμηλού επιπολασμού μεταδιδόμενη αντοχής για τη συγκεκριμένη κατηγορία αναστολέων. Ένας ακόμη πιθανός αιτιολογικός παράγοντας είναι η πλειοψηφία του αντρικού φύλου στα δείγματα μας, δεδομένου ότι μεταλλάξεις αντοχής για αναστολείς

της ιντεγκράσης εμφανίζονται πιο συχνά σε γυναίκες (0,85% σε γυναίκες έναντι 0,20% για άντρες). (de Salazar et al., 2022) Ωστόσο, σύμφωνα με δεδομένα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Νοτίου Ελλάδος, ο επιπολασμός μεταλλάξεων αντοχής για τους μήνες Ιανουάριο με Ιούνιο κατά το έτος 2022 εκτιμήθηκε για τους αναστολείς της ιντεγκράσης σε ποσοστό 7,3%, ενώ για PIs, NRTIs και NNRTIs η αντοχή υπολογίστηκε σε ποσοστά 4,8%, 9,7% και 17,7% αντίστοιχα. (Prokter et al., 2022)

Επιπροσθέτως, σε μελέτη του 2022 των Adolfo de Salazar et al. αναφέρεται ο επιπολασμός της αντοχής στα φάρμακα INSTIs να ανέρχεται σε 0,30% (de Salazar et al., 2022). Σύμφωνα με τα δεδομένα που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη μελέτη, η μετάλλαξη M184V/I εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα που μολύνθηκαν με ιικό υπότυπο διαφορετικό του B (1,27%) και αποτελεί την επικρατέστερη μετάλλαξη ανθεκτικότητας για νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, με διάμεση ποσοστιαία τιμή εμφάνισης 0,99% κατά τα έτη 2018-2021. Στη παρούσα μελέτη το δεδομένο αυτό συνάδει με το δείγμα ##601 (υπότυπου A) που βρέθηκε με τη μετάλλαξη M184V, η οποία πρόσδιδε στο δείγμα αντοχή στα φάρμακα NRTIs [1/61; 1,6%]. Ακόμη, ύστερα από σύγκριση των δύο μελετών, φαίνεται πως τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων που ζουν με τον ιό HIV-1 είναι σε μεγάλο ποσοστό ίδια. Τα αποτελέσματα των μελετών παρουσιάζονται στο πίνακα 4 για σύγκριση.

Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων επιδημιολογίας της μελέτης των Adolfo de Salazar et al (2018-2021) σε σχέση με τα επιδημιολογικά δεδομένα της παρούσας διπλωματικής μελέτης απο τον ΕΚΑΑΝΕ για το 2022. (de Salazar et al., 2022)

Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά		2018-2021	ΕΚΑΑΝΕ 2022
Φύλο	A	1952/2705 (72,2%)	51/61 (83,6%)
	Θ	473/2705 (17,5%)	9/61 (14,7%)
	Trans	13/2705 (0,5%)	1/61 (1,6%)
	Άγνωστα	267/2705 (9,9%)	—
Ηλικία	<30	571/2705 (21,1%)	14/61 (22,9%)
	30-50	1225/2705 (45,3%)	39/61 (63,9%)
	>50	633/2705 (23,4%)	8/61 (13,1%)
	Άγνωστα	276/2705 (10,2%)	—
Οδός Μετάδοσης	PWID	35/2705 (1,3%)	22/61 (36,1%)
	MSM	1163/2705 (43,0%)	24/61 (39,3%)
	HSM	741/2705 (27,4%)	8/61 (13,1%)
	Άλλο	766/2705 (28,3%)	7/61 (11,5%)
Υπότυποι	B	1523/2705 (56,3%)	10/61 (16,4%)
	CRF02_AG	441/2705 (16,3%)	7/61 (11,5%)
	A	160/2705 (5,9%)	25/61 (41,0%)

Τα υπογραμμισμένα με κίτρινο χρώμα σημεία του πίνακα 4 είναι οι ομοιότητες που εντοπίζονται ανάμεσα στις δύο μελέτες σε σχέση με τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων που ζουν με τον ιό HIV. Με κόκκινο χρώμα τονίζονται οι διαφορές. Όσον αφορά την οδό μετάδοσης, οι δύο μελέτες συμφωνούν πως η πλειοψηφία είναι άνδρες που έχουν απροφύλακτες ομοφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές (MSM), αλλά αποκλίνουν στα ποσοστά μετάδοσης ανάμεσα σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (PWID). Το συγκεκριμένο ποσοστό είναι περίπου 36 φορές μεγαλύτερο για τη παρούσα διπλωματική εργασία σε σύγκριση με των Adolfo de Salazar et al. Γεγονός που πιθανόν οφείλεται σε προηγούμενη έξαρση HIV στις κοινότητες χρηστών ενδοφλέβιων

ναρκωτικών ουσιών που εντοπίστηκε σε Ελλάδα και Ρουμανία αρχές του 2017 (Nikolopoulos, Kostaki, & Paraskevis, 2016). Τα 2705 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από διαφορετικές χώρες όπως Ιταλία, Γαλλία, Ελλάδα, Πορτογαλία και Ισπανία. Στη ποικιλία προελεύσεων οφείλονται και οι σημαντικές διαφορές στους αποτελεσμάτων για τους υπότυπους των δύο μελετών. Όπως παρουσιάζεται στο Πίνακα 4, για τη παρούσα μελέτη ο υπότυπος με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ήταν ο A ενώ στην άλλη μελέτη υπερισχύει ο B με τον A να βρίσκεται σε αρκετά χαμηλό ποσοστό (5,9%).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας φαίνεται να συμφωνούν με τις τελευταίες δημοσιευμένες μελέτες που πραγματοποιούνται σε μεγαλύτερη κλίμακα για την Ελλάδα και την Ευρώπη. Επιπλέον παρατηρείται πως στο μεγαλύτερο ποσοστό των δημοσιευμένων μελετών, δε συμπεριλαμβάνονται ακόμα οι μεταλλάξεις αντοχής σε φάρμακα αναστολείς ιντεγκράσης καθώς δεν ερευνώνται συστηματικά, τα αποτελέσματα όμως επιδεικνύουν τη σημασία επιτήρησης της αντοχής σε INSTIs. Συμπερασματικά, ο επιδημιολογικός έλεγχος των μεταλλάξεων αντοχής, τόσο σε εγχώριο όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο κρίνεται αναγκαίος. Μέσω των αναλύσεων επιδημιολογικών χαρακτηριστικών άγονται συμπεράσματα για την οδό μετάδοσης της νόσου με τα οποία καθίσταται δυνατή η βελτίωση τόσο της πρόληψης όσο και της θεραπευτικής αντιμετώπισης για τα άτομα που ζουν με τον ιό HIV, προσφέροντας ποιότητα στη ζωή τους.

Βιβλιογραφία

- Agarwal-Jans, S. (2020). Timeline: HIV. *Cell*, 183(2), 550. doi:10.1016/j.cell.2020.09.004
- Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4), a007161. doi:10.1101/cshperspect.a007161
- Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol*, 530, 67-74. doi:10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871. doi:10.1126/science.6189183
- Bbosa, N., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*, 14(3), 153-160. doi:10.1097/COH.0000000000000534
- Beloukas, A., Psarris, A., Giannelou, P., Kostaki, E., Hatzakis, A., & Paraskevis, D. (2016). Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect Genet Evol*, 46, 180-189. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.033
- Biswas, A., Haldane, A., Arnold, E., & Levy, R. M. (2019). Epistasis and entrenchment of drug resistance in HIV-1 subtype B. *Elife*, 8. doi:10.7554/eLife.50524
- Bokharaei-Salim, F., Esghaei, M., Khanaliha, K., Kalantari, S., Marjani, A., Fakhim, A., & Keyvani, H. (2020). HIV-1 reverse transcriptase and protease mutations for drug-resistance detection among treatment-experienced and naive HIV-infected individuals. *PLoS One*, 15(3), e0229275. doi:10.1371/journal.pone.0229275
- Boswell, M. T. (2019). *Impact of host restriction factors and capsid evolution on HIV disease progression*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/346564107_Impact_of_host_restriction_factors_and_capsid_evolution_on_HIV_disease_progression
- Carabineiro, S. A. C. (2017). Applications of Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Recent Advances in Vaccines. *Molecules*, 22(5). doi:10.3390/molecules22050857
- Chahine, E. B., & Durham, S. H. (2021). Ibalizumab: The First Monoclonal Antibody for the Treatment of HIV-1 Infection. *Ann Pharmacother*, 55(2), 230-239. doi:10.1177/1060028020942218
- Chen, B. (2019). Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol*, 27(10), 878-891. doi:10.1016/j.tim.2019.06.002
- Clinicalinfo. (2022). *HIV.gov*. Retrieved from <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/hiv-progression>
- Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., & Shafer, R. W. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol*, 46, 292-307. doi:10.1016/j.meegid.2016.08.031
- Cook, N. J., Li, W., Berta, D., Badaoui, M., Ballandras-Colas, A., Nans, A., . . . Cherepanov, P. (2020). Structural basis of second-generation HIV integrase inhibitor action and viral resistance. *Science*, 367(6479), 806-810. doi:10.1126/science.aay4919
- Craigie, R., & Bushman, F. D. (2012). HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006890. doi:10.1101/cshperspect.a006890
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., . . . Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest*, 32(6), 767-775. doi:10.1177/1040638720905833

- D'Arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boue, V., Liegeois, F., . . . Peeters, M. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(11), E1343-1352. doi:10.1073/pnas.1502022112
- D'Cruz, O. J., & Uckun, F. M. (2006). Dawn of non-nucleoside inhibitor-based anti-HIV microbicides. *J Antimicrob Chemother*, *57*(3), 411-423. doi:10.1093/jac/dki464
- De Clercq, E., & Li, G. (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev*, *29*(3), 695-747. doi:10.1128/CMR.00102-15
- de Salazar, A., Vinuela, L., Fuentes, A., Teyssou, E., Charpentier, C., Lambert-Niclot, S., . . . Garcia, F. (2022). Transmitted drug resistance to integrase based first-line HIV antiretroviral regimens in the Mediterranean Europe. *Clin Infect Dis*. doi:10.1093/cid/ciac972
- Deshmukh, L., Tugarinov, V., Louis, J. M., & Clore, G. M. (2017). Binding kinetics and substrate selectivity in HIV-1 protease-Gag interactions probed at atomic resolution by chemical exchange NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(46), E9855-E9862. doi:10.1073/pnas.1716098114
- DrugBank. (2022a). Ibalizumab. <https://go.drugbank.com/drugs/DB12698>
- DrugBank. (2022b). Maraviroc. <https://go.drugbank.com/drugs/DB04835>
- Duffy, S., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*, *9*(4), 267-276. doi:10.1038/nrg2323
- Elliot, E., Chirwa, M., & Boffito, M. (2017). How recent findings on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of integrase inhibitors can inform clinical use. *Curr Opin Infect Dis*, *30*(1), 58-73. doi:10.1097/QCO.0000000000000327
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, *10*(4), 279-290. doi:10.1038/nrmicro2747
- Gallo, R. C., & Montagnier, L. (2003). The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med*, *349*(24), 2283-2285. doi:10.1056/NEJMp038194
- Gulnik, S., Erickson, J. W., & Xie, D. (2000). HIV protease: enzyme function and drug resistance. *Vitam Horm*, *58*, 213-256. doi:10.1016/s0083-6729(00)58026-1
- Gupta, S., Balasubramanian, S., & Senapati, S. (2021). Understanding the mechanism of HIV-1 protease inhibition by monoclonal antibodies. *J Mol Graph Model*, *103*, 107826. doi:10.1016/j.jmgm.2020.107826
- Hazuda, D. J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J. A., . . . Miller, M. D. (2000). Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*, *287*(5453), 646-650. doi:10.1126/science.287.5453.646
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*, *18*(3), 182-192. doi:10.1016/j.molmed.2011.12.001
- Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., . . . Characterisation, W.-U. N. f. H. I. (2019). Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect Dis*, *19*(2), 143-155. doi:10.1016/S1473-3099(18)30647-9
- Kantzanou, M., Karalexi, M. A., Papachristou, H., Vasilakis, A., Rokka, C., & Katsoulidou, A. (2021). Transmitted drug resistance among HIV-1 drug-naive patients in Greece. *Int J Infect Dis*, *105*, 42-48. doi:10.1016/j.ijid.2021.02.043
- Khan, N., & Geiger, J. D. (2021). Role of Viral Protein U (Vpu) in HIV-1 Infection and Pathogenesis. *Viruses*, *13*(8). doi:10.3390/v13081466

- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, *393*(6686), 648-659. doi:10.1038/31405
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*(62). doi:10.3791/3923
- Li, G., Piampongsant, S., Faria, N. R., Voet, A., Pineda-Pena, A. C., Khouri, R., . . . Theys, K. (2015). An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology*, *12*, 18. doi:10.1186/s12977-015-0148-6
- Machnowska, P., Meixenberger, K., Schmidt, D., Jessen, H., Hillenbrand, H., Gunsenheimer-Bartmeyer, B., . . . German, H. I. V. S. S. G. (2019). Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort. *PLoS One*, *14*(1), e0209605. doi:10.1371/journal.pone.0209605
- Mbhele, N., Chimukangara, B., & Gordon, M. (2021). HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*, *57*(5), 106343. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106343
- Mild, M., Kvist, A., Esbjornsson, J., Karlsson, I., Fenyo, E. M., & Medstrand, P. (2010). Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infect Genet Evol*, *10*(3), 356-364. doi:10.1016/j.meegid.2009.05.003
- Miyasaka, T., Tanaka, H., Baba, M., Hayakawa, H., Walker, R. T., Balzarini, J., & De Clercq, E. (1989). A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine. *J Med Chem*, *32*(12), 2507-2509. doi:10.1021/jm00132a002
- Montessori, V., Press, N., Harris, M., Akagi, L., & Montaner, J. S. (2004). Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ*, *170*(2), 229-238.
- Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J. C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev*, *26*(3), 448-461. doi:10.1128/CMR.00012-13
- Muller, B., & Heilemann, M. (2013). Shedding new light on viruses: super-resolution microscopy for studying human immunodeficiency virus. *Trends Microbiol*, *21*(10), 522-533. doi:10.1016/j.tim.2013.06.010
- Ng, O. T., Laeyendecker, O., Redd, A. D., Munshaw, S., Grabowski, M. K., Paquet, A. C., . . . Quinn, T. C. (2014). HIV type 1 polymerase gene polymorphisms are associated with phenotypic differences in replication capacity and disease progression. *J Infect Dis*, *209*(1), 66-73. doi:10.1093/infdis/jit425
- Nikolopoulos, G. K., Kostaki, E. G., & Paraskevis, D. (2016). Overview of HIV molecular epidemiology among people who inject drugs in Europe and Asia. *Infect Genet Evol*, *46*, 256-268. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.017
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., & Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol*, *23*(4), 221-240. doi:10.1002/rmv.1739
- Pandey, K. K. (2014). Critical appraisal of elvitegravir in the treatment of HIV-1/AIDS. *HIV/AIDS (Auckl)*, *6*, 81-90. doi:10.2147/HIV.S39178

- Paraskevis, D., & Hatzakis, A. (2019). Global molecular epidemiology of HIV-1: the chameleon challenge. *Lancet Infect Dis*, *19*(2), 114-115. doi:10.1016/S1473-3099(18)30687-X
- Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M. J., Breslin, H. J., . . . et al. (1990). Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature*, *343*(6257), 470-474. doi:10.1038/343470a0
- Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Degen, O., . . . Group, P. S. (2019). Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet*, *393*(10189), 2428-2438. doi:10.1016/S0140-6736(19)30418-0
- Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., van Lunzen, J., . . . Group, P. S. (2016). Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA*, *316*(2), 171-181. doi:10.1001/jama.2016.5148
- Rolland, M. (2019). Editorial: HIV-1 transmission and phylogenetics. *Curr Opin HIV AIDS*, *14*(3), 151-152. doi:10.1097/COH.0000000000000546
- Schmitt, K., Curlin, J., Remling-Mulder, L., Moriarty, R., Goff, K., O'Connor, S., . . . Akkina, R. (2020). Mimicking SIV chimpanzee viral evolution toward HIV-1 during cross-species transmission. *J Med Primatol*, *49*(5), 284-287. doi:10.1111/jmp.12485
- Shaik, M. M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., & Chen, B. (2019). Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. *Nature*, *565*(7739), 318-323. doi:10.1038/s41586-018-0804-9
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2010). The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *365*(1552), 2487-2494. doi:10.1098/rstb.2010.0031
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Shendure, J. A., Porreca, G. J., Church, G. M., Gardner, A. F., Hendrickson, C. L., Kieleczawa, J., & Slatko, B. E. (2011). Overview of DNA sequencing strategies. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 7, Unit7 1. doi:10.1002/0471142727.mb0701s96
- Slatko, B. E., Albright, L. M., Tabor, S., & Ju, J. (2001). DNA sequencing by the dideoxy method. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 7, Unit7 4A. doi:10.1002/0471142727.mb0704as47
- Smith, L. M. (1993). DNA electrophoresis. *Curr Opin Biotechnol*, *4*(1), 37-40. doi:10.1016/0958-1669(93)90029-v
- Song, R., Franco, D., Kao, C. Y., Yu, F., Huang, Y., & Ho, D. D. (2010). Epitope mapping of ibalizumab, a humanized anti-CD4 monoclonal antibody with anti-HIV-1 activity in infected patients. *J Virol*, *84*(14), 6935-6942. doi:10.1128/JVI.00453-10
- Tan, Q., Zhu, Y., Li, J., Chen, Z., Han, G. W., Kufareva, I., . . . Wu, B. (2013). Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*, *341*(6152), 1387-1390. doi:10.1126/science.1241475
- Taylor, B. S., & Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*, *359*(18), 1965-1966. doi:10.1056/NEJMc086373
- Tee, K. K., Thomson, M. M., & Hemelaar, J. (2022). Editorial: HIV-1 genetic diversity, volume II. *Front Microbiol*, *13*, 1007037. doi:10.3389/fmicb.2022.1007037
- Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, *285*(1), 1-32. doi:10.1006/jmbi.1998.2354

- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*, 1525, 3-33. doi:10.1007/978-1-4939-6622-6_1
- Villa, G., Phillips, R. O., Smith, C., Stockdale, A. J., Ruggiero, A., Beloukas, A., . . . Geretti, A. M. (2018). Drug resistance outcomes of long-term ART with tenofovir disoproxil fumarate in the absence of virological monitoring. *J Antimicrob Chemother*, 73(11), 3148-3157. doi:10.1093/jac/dky281
- Voytas, D. (2001). Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol, Chapter 10*, Unit 10 14. doi:10.1002/0471142735.im1004s02
- Weber, I. T., Wang, Y. F., & Harrison, R. W. (2021). HIV Protease: Historical Perspective and Current Research. *Viruses*, 13(5). doi:10.3390/v13050839
- Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-Silberstein, F., Charpentier, C., Gunthard, H. F., Paredes, R., . . . Richman, D. D. (2019). 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*, 27(3), 111-121.
- Xavier Ruiz, F., & Arnold, E. (2020). Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance. *Curr Opin Struct Biol*, 61, 113-123. doi:10.1016/j.sbi.2019.11.011
- Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors. 13(5), 735.
- Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors. *Viruses*, 13(5). doi:10.3390/v13050735
- Zajac, V. (2018). Evolutionary view of the AIDS process. *J Int Med Res*, 46(10), 4032-4038. doi:10.1177/0300060518786919
- Zaki, E. A., El-Daly, M. M., Abdulhaq, A., Al-Subhi, T. L., Hassan, A. M., El-Kafrawy, S. A., . . . Azhar, E. I. (2020). Genotyping and antiretroviral drug resistance of human immunodeficiency Virus-1 in Jazan, Saudi Arabia. *Medicine (Baltimore)*, 99(49), e23274. doi:10.1097/MD.00000000000023274
- Zhang, C., Zhu, R., Cao, Q., Yang, X., Huang, Z., & An, J. (2020). Discoveries and developments of CXCR4-targeted HIV-1 entry inhibitors. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245(5), 477-485. doi:10.1177/1535370220901498
- Zhao, L., Wang, S., Xu, M., He, Y., Zhang, X., Xiong, Y., . . . Liang, G. (2021). Vpr counteracts the restriction of LPTM5 to promote HIV-1 infection in macrophages. *Nat Commun*, 12(1), 3691. doi:10.1038/s41467-021-24087-8