



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



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάπτυξη *in-house* πειραματικού πρωτοκόλλου για την αλληλούχηση του γονιδίου της Ιντεγκράσης του Ιού HIV-1 και την ανίχνευση πολυμορφισμών που μπορεί να σχετίζονται και με την ανάπτυξη αντοχής σε αντιρετροϊκή θεραπεία

POST GRADUATE THESIS

Development of an *in-house* protocol in order to sequence HIV-1 Integrase Gene and detect polymorphisms which may be associated with the emergence of drug resistance

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗΤΡΙΑΣ/NAME OF STUDENT

**Κασσάνδρα Πρόκτερ
Kassandra Prokter**

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

Development of an in-house protocol in order to sequence HIV-1 Integrase Gene and detect polymorphisms which may be associated with the emergence of drug resistance

KASSANDRA PROKTER

DML20019

kprokter@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

APOSTOLOS BELOUKAS

SECOND SUPERVISOR

KATERINA GIOTI

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 03/10/2022

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Απόστολος Μπελούκας	
2 ^{ος} Εξεταστής	Αικατερίνη Γιώτη	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κασσάνδρα Πρόκτερ του Αντωνίου, με αριθμό μητρώου DML20019 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές 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

Όνομα φοιτήτριας

Κασσάνδρα Πρόκτερ

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας – Ε.Μ.Μ.Α., του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή Απόστολο Μπελούκα για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και κατά το στάδιο συγγραφής της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Με τις συμβουλές του και την υποστήριξή του κατορθώθηκε το άρτιο αυτό αποτέλεσμα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου που σέβεται τη δουλειά μου και τον ελάχιστο ελεύθερο χρόνο που διαθέτω. Δείχνει υπομονή και κατανόηση όταν οι συνθήκες τείνουν να γίνουν πιεστικές ή δεν είναι πάντα ιδανικές.

Αφιέρωσης

Θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία μου στην οικογένειά μου που με στηρίζει σε όλα τα ακαδημαϊκά μου βήματα και αποφάσεις.

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα άτομα που έχουν μολυνθεί με τον ιό HIV έχουν πάψει πλέον να χαρακτηρίζονται ως φορείς ή ασθενείς της HIV λοίμωξης και αποκαλούνται άτομα που ζουν με τον ιό, καθώς η αντιρετροϊκή θεραπεία καταστέλλει πλήρως τον ιικό πολλαπλασιασμό. Η αντιρετροϊκή θεραπεία στοχεύει κατά βάση στην αναστολή της λειτουργίας τριών ιικών γονιδίων, της πρωτεάσης, της αντίστροφης μεταγραφάσης και της ιντεγκράσης. Παρόλα αυτά, ορισμένα στελέχη του ιού HIV φέρουν μεταλλάξεις, οι οποίες προσδίδουν αντοχή έναντι της αντιρετροϊκής θεραπείας, ο επιπολασμός της οποίας έχει εκτιμηθεί σε ποσοστό 7% στην Ευρώπη, 17% στη Βόρεια Αμερική, και 5,3% στην Ελλάδα .

Σκοπός: Αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε ένα *in-house* πειραματικό πρωτόκολλο για την εύρεση μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή έναντι των αντιρετροϊκών φαρμάκων που στοχεύουν το γονίδιο της ιικής ιντεγκράσης.

Μέθοδος: Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει: α) απομόνωση ιικού RNA από ορό δείγματος, β) δημιουργία μονόκλωνου συμπληρωματικού cDNA και στη συνέχεια δίκλωνου DNA με PCR αντίστροφης μεταγραφής ενός βήματος, γ) ενίσχυση με φωλεακή και ειδικότερη PCR ενός μικρότερου τμήματος του γονιδίου της ιντεγκράσης, δ) καθαρισμός του παραγόμενου DNA, ε) προετοιμασία για αλληλούχηση κατά Sanger, στ) ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης με το λογισμικό SeqScape™ Software, και ζ) επεξεργασία σε βάσεις δεδομένων (HIV Drug Resistance Database, REGA HIV Subtyping Tool, Comet HIV-1) για την εύρεση μεταλλάξεων και γονοτύπων.

Αποτελέσματα: Ύστερα από την αλληλούχηση κατά Sanger 40 δειγμάτων ατόμων που ζουν με HIV λοίμωξη, 2 εμφάνισαν μεταλλάξεις αντοχής στο γονίδιο της ιντεγκράσης (5%), οι οποίες προσέδιδαν στην πρώτη περίπτωση υψηλού επιπέδου αντοχή στα αντιρετροϊκά BIC, CAB, DTG, EVG, RAL και στη δεύτερη περίπτωση υψηλού επιπέδου αντοχή στους αναστολείς EVG, RAL και χαμηλού επιπέδου στους BIC, CAB, DTG. Από τα 40 δείγματα, 22 εμφάνισαν μεταλλάξεις πολυμορφισμού (55%), εκ των οποίων 12 έφεραν τη μετάλλαξη M50I (55%), 6 τη μετάλλαξη L74I (27%), 3 τη μετάλλαξη L74M (13%), και 1 έφερε τις μεταλλάξεις L74I και τη V151I (5%). Σχετικά με τη γονοτύπηση των δειγμάτων το 55% είναι γονότυπου G, το 27,5% γονότυπου A, 10% γονότυπου B, και 7,5% είναι ανασυνδυασμένοι γονότυποι (CRFs).

Συμπεράσματα: Το *in-house* πειραματικό πρωτόκολλο, το οποίο αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε, ενδείκνυται για εύρεση μεταλλάξεων αντοχής στο γονίδιο της ιντεγκράσης. Εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων δεν μπορεί να αχθεί συνολικό συμπέρασμα για τον

επιπολασμό των μεταλλάξεων αντοχής στον ελληνικό πληθυσμό. Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες για τις μεταλλάξεις αντοχής στο γονίδιο της ιντεγκράσης σε εγχώρια αλλά και σε παγκόσμια κλίμακα.

Λέξεις κλειδιά: HIV, ιντεγκράση, αντιρετροϊκή θεραπεία, αντοχή, αλληλούχηση

Abstract

Introduction: People who are infected with HIV virus have stopped been characterized as carriers or patients of the HIV infection but they are simply called people living with HIV, since the antiretroviral therapy suppresses completely the viral replication. The antiretroviral therapy targets mainly three viral genes, protease, reverse transcriptase and integrase. However, some of the HIV strains develop resistance mutations against the antiretroviral therapy, which prevalence have been estimated about 7% in Europe, 17% in North America, and 5,3% in Greece.

Purpose: An *in-house* experimental protocol was developed and used in an attempt to find resistance mutations against the antiretroviral drugs which targets the viral integrase gene.

Method: The protocol includes: a) viral RNA extraction from serum sample, b) construction of single stranded complementary cDNA clone and then double stranded DNA using one step reverse transcription PCR, c) amplification of a smaller segment of the integrase gene using specific nested PCR, d) purification of the DNA product, e) sample preparation for Sanger sequencing, f) analysis of the sanger sequencing results using SeqScape™ Software, and g) results processing using online data bases (HIV Drug Resistance Database, REGA HIV Subtyping Tool, Comet HIV-1) in order to detect resistance mutations and estimate the genotypes.

Results: 40 samples of people living with HIV were submitted to Sanger sequencing and, 2 of them showed resistance mutations in the integrase gene (5%), which in the first case were associated with high level resistance to the antiretrovirals BIC, CAB, DTG, EVG, RAL and in the second case, they were associated with high level resistance to the inhibitors EVG and RAL and low level resistance to BIC, CAB, DTG. From 40 samples in total, 22 showed polymorphic mutations (55%) from which 12 was accompanied by the M50I accessory mutation (55%), 6 by the L74I (27%), 3 by the L74M (13%), and 1 brought both L74I and V151I (5%). Regarding the subtyping results, 55% is subtype G, 27,5% is A, 10% is B, and 7,5% belongs to circulating recombinant forms (CRFs).

Discussion: The *in-house* experimental protocol which was developed and used, yielded sufficient results in finding resistance mutations in viral integrase gene. Due to the small number of samples it is impossible to draw overall conclusions about the prevalence of resistance mutations against integrase inhibitors in Greek population. More research needs to be done nationally and globally.

Key words: HIV, integrase, antiretroviral therapy, resistance, sequencing

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	IV
Ευχαριστίες.....	V
Αφιέρωσης.....	VI
Περίληψη.....	VII
Abstract.....	IX
Συνομογραφίες.....	XI
Πρόλογος.....	1
1. Εισαγωγή.....	3
1.1 Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS).....	3
1.2 Υπότυποι του ιού HIV.....	4
1.3 Κύκλος ζωής του HIV.....	6
1.4 Γονιδιακή περιοχή <i>pol</i>	7
1.4.1 Ιντεγκράση.....	8
1.4.2 Πρωτεάση και αντίστροφη μεταγραφάση.....	8
1.5 Αντιρετροϊκή θεραπεία.....	9
1.6 Αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία.....	10
1.6.1 Μηχανισμός δράσης αναστολέων ιντεγκράσης και αντοχή.....	13
1.6.2 Μηχανισμός δράσης αναστολέων πρωτεάσης και αντοχή.....	15
1.6.2 Μηχανισμός δράσης αναστολέων αντίστροφης μεταγραφάσης και αντοχή.....	16
1.7 Πολυμορφικές μεταλλάξεις.....	18
1.8 Σκοπός.....	19
2. Πειραματική διαδικασία.....	19
2.1 Εξοπλισμός - Αναλώσιμα.....	19
2.2 Αντιδράσεις.....	20
2.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού.....	20
2.2.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription, RT-PCR).....	21
2.2.3 Φωλεακή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR).....	21
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση.....	21
2.2.5 Καθαρισμός προϊόντος (PCR purification).....	22
2.2.6 Εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας καθαρισμένου προϊόντος PCR.....	22
2.2.7 Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχηση κατά Sanger.....	23
2.2.8 Γονοτύπηση και πιθανή αντοχή.....	24
3. Αποτελέσματα.....	26
4. Συζήτηση.....	37
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	39

Συνομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (ΣΕΕΑ)
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
PR	Protease	Πρωτεάση
RT	Reverse transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφάση
INT	Integrase	Ιντεγκράση
ART	Anti-retroviral therapy	Αντιρετροϊκή θεραπεία
DRAMs	Drug Resistance Associated Mutations	Μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή σε αντιρετροϊκή θεραπεία
PIs	Protease Inhibitors	Αναστολείς πρωτεάσης
NRTIs	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	Νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης
NNRTIs	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	Μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης
INSTIs	Integrase Strand Transfer Inhibitors	Αναστολείς ιντεγκράσης (μεταφοράς κλώνου)
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Nested-PCR	Nested polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση ένθετης πολυμεράσης (φωλεακή)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
cDNA	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
CRFs	Circulated recombinant forms	Κυκλοφορούσες ανασυνδυασμένες μορφές
ΠΟΥ	WHO, World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
gag	Group specific antigens	Πολυπρωτεΐνη gag
pol	Polymerase	Πολυπρωτεΐνη Pol
env	Envelope	Πολυπρωτεΐνη env
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
CCR5Δ32	Mutation d32 of C-C chemokine receptor type 5	Μετάλλαξη Δ32 στον υποδοχέα χημειοκινών C-C τύπου 5
pbs	primer binding site	Θέση πρόσδεσης εκκινητή
PrEP	Pre-exposure prophylaxis	Προφύλαξη πριν την έκθεση
NNIBP	Non-Nucleoside binding pocket	«Τσέπη» πρόσδεσης μη νουκλεοσιδικού αναστολέα
cART	Combined antiretroviral therapy	Συνδυαστική αντιρετροϊκή θεραπεία
FDA	Food and Drug Administration	Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων
TAMs	Thymidine analogs mutations	Μεταλλάξεις που σχετίζονται με ανάλογα θυμιδίνης
A	Adenine	Αδενίνη
T	Thymine	Θυμίνη
G	Guanosine	Γουανοσίνη
C	Cysteine	Κυτοσίνη

Πρόλογος

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και εφαρμογή ενός *in-house* πειραματικού πρωτοκόλλου για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στο γονίδιο της Ιντεγκράσης του ιού HIV και τη συσχέτισή τους με την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής σε σχήματα αντιρετροϊκής θεραπείας (Antiretroviral Therapy, ART) που περιλαμβάνουν αναστολείς της ιντεγκράση. Παράλληλα με την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων μέσω της αλληλούχησης των γονιδιωμάτων (Drug Resistance Associated Mutations, DRAMs), πραγματοποιήθηκε και η γονοτύπηση των δειγμάτων με τρεις διαφορετικούς αλγορίθμους.

Η ακόλουθη ερευνητική Διπλωματική Εργασία χωρίζεται σε τέσσερα τμήματα στα οποία περιγράφεται ο συλλογισμός, η ανάπτυξη της μεθόδου και οι τεχνικές των πειραμάτων, αποσκοπώντας στην κατανόηση των λογικών αίτιων πίσω από αυτά. Αρχικά, γίνεται μία σύντομη εισαγωγή στον ιό HIV και τον κύκλο ζωής του, τα σημαντικότερα ιικά γονίδια τα οποία στοχεύουν τα αντιρετροϊκά φάρμακα, αναγράφονται οι μορφές αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία και σε ποια αναφέρεται η παρούσα μελέτη καθώς γίνεται και μία εκτενέστερη περιγραφή και απεικόνιση του γονιδίου που μελετάται. Επιπλέον, αναφέρονται οι σημαντικότερες θέσεις μετάλλαξης που προσφέρουν αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα υλικά, οι μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγμάτωση του πειράματος. Για να εντοπιστούν οι μεταλλάξεις απομονώθηκε το γενετικό υλικό του ιού (ικό RNA) από τον ορό ασθενών και ενισχύθηκε το γονίδιο της Ιντεγκράσης (INT). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR αντίστροφης μεταγραφής για τη δημιουργία του συμπληρωματικού cDNA από την οποία παράγεται ένα αντίγραφο μεγέθους ~ 2,1 kb. Έπειτα, ακολούθησε nested PCR για την παραγωγή μικρότερου αμπλικονίου μεγέθους ~ 1,3 kb. Ο οπτικός έλεγχος του προϊόντος της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και τα δείγματα που έδωσαν θετικές για την αντίδραση μπάντες υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καθαρισμό και ποσοτικοποίηση. Τέλος, έλαβε χώρα προετοιμασία των δειγμάτων με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις καθαρισμένων προϊόντων PCR και εκκινήτων για την αλληλούχηση τους χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αλληλούχησης κατά Sanger. Ακολούθησε ανάλυση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (γονοτύπηση και ανθεκτικότητα) χρησιμοποιήθηκαν διαδικτυακές βάσεις δεδομένων όπως η HIV Drug Resistance Database του Stanford University, η REGA HIV Subtyping Tool του KU Leuven University, και η Comet HIV-1 του Luxembourg Institute of Health.

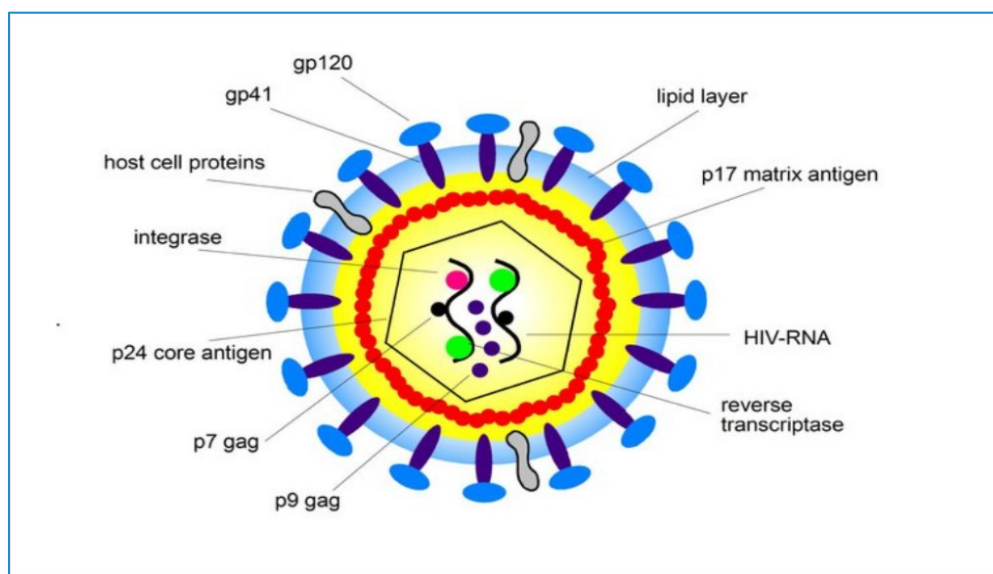
Στις φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης εμφανίζονται και δείγματα χωρίς θετικό αποτέλεσμα. Η μη ύπαρξη μπάντας μπορεί να οφείλεται στον κατακερματισμό του RNA είτε λόγω κακού χειρισμού του δείγματος είτε λόγω της ίδιας τη φύσης του RNA που το καθιστά ένα αρκετά ευαίσθητο υλικό σε αλλαγές θερμοκρασίας καθώς και σε RNAάσες που υπάρχουν παντού πάνω στο ανθρώπινο σώμα.

Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα, σχολιάζονται οι μεταλλάξεις και η βαρύτητά τους ως προς την απόδοση ανθεκτικότητας σε αντιρετροϊκή θεραπεία και παρατίθενται οι στρατηγικές αντιμετώπισης που ακολουθούνται παγκοσμίως σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ).

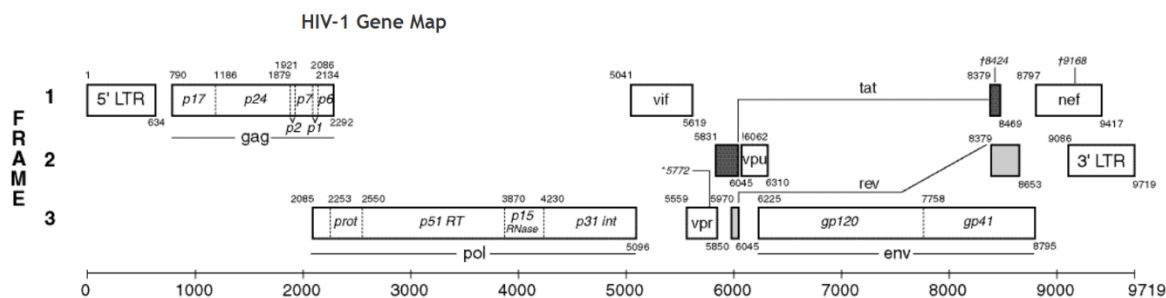
1. Εισαγωγή

1.1 Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)

Το σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας προκαλείται από τον ιό HIV (Human Immunodeficiency Virus) ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των ρετροϊών. Το γενετικό υλικό του ιού αποτελείται από δύο θετικής πολικότητας μονόκλωνες αλυσίδες RNA που περικλείονται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο πολλαπλών αντιγράφων της πρωτεΐνης μήτρας p17 (matrix) και ένα λιπιδικό περίβλημα καλυμμένο με την πρωτεΐνη Env (envelope) του ιικού φακέλου. Σημειώνεται ότι η λιπιδική μεμβράνη του ιού προέρχεται εξ ολοκλήρου από το κύτταρο ξενιστή. Οι υπομονάδες gp120 και gp41 της πρωτεΐνης Env, οι οποίες χαρακτηρίζονται και ως αντιγόνα επιφανείας, εξυπηρετούν στην αναγνώριση των CD4 υποδοχέων των T-λεμφοκυττάρων κατά τη διαδικασία της μόλυνσης (Turner & Summers, 1999). Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από περίπου 9.719 νουκλεοτιδικές βάσεις και περιέχει μεταξύ άλλων, τρεις βασικές γονιδιακές περιοχές: *gag*, *pol*, και *env* (Korber et al., 1998). Στην περιοχή *gag* εδράζονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του καψιδίου, στην περιοχή *pol* βρίσκονται τα γονίδια των δραστικών ενζύμων του ιού, και στην περιοχή *env* συναντώνται τα γονίδια των γλυκοπρωτεϊνών του ιικού φακέλου (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1. 1 Σχηματική Απεικόνιση Δομής του ιού HIV. Πηγή: <https://www.slideshare.net/ArunViswanathan3/the-human-immunodeficiency-virus-hiv-135847857>



Εικόνα 1.2 Χάρτης Γραφικής Αναπαράστασης του Γονιδιώματος του ιού HIV. Χάρτης των γονιδιακών περιοχών του γονιδιώματος του ιού HIV καθώς και των γονιδιακών προϊόντων που προκύπτουν. Πηγή : <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>

Ο ιός HIV βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα, στα κολπικά, σπερματικά και πρωκτικά υγρά, και στο μητρικό γάλα. Η είσοδος του ιού στο σώμα μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με σεξουαλική επαφή, είτε με χρήση μολυσμένων συρίγγων, είτε ακόμη κατά την κυοφορία και το θηλασμό, είτε κατά την άμεση επαφή εκτεθειμένου βλεννογόνου με τα συγκεκριμένα σωματικά υγρά. Τα βασικότερα χαρακτηριστικά του HIV είναι η υψηλή μεταλλαξογένεση του και ο ταχύς ρυθμός πολλαπλασιασμού του που καθιστά δύσκολη την καταπολέμηση της επιδημίας του AIDS. Εφόσον ένα άτομο μολυνθεί με τον ιό και σε περίπτωση μη λήψης αντιρετροϊκής θεραπείας, η εξέλιξη της λοίμωξης διακρίνεται σε 3 στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, ο ιός πολλαπλασιάζεται με γρήγορους ρυθμούς, είναι δυνατή η ανίχνευση του αντιγόνου p24 στο αίμα, και αρχίζουν να εκδηλώνονται τα πρώτα γριπώδη συμπτώματα της νόσου. Στο δεύτερο στάδιο, ο ιός εισέρχεται στο χρόνια-ασυμπτωματικό στάδιο κατά το οποίο ο ανθρώπινος οργανισμός αρχίζει να παράγει αντισώματα έναντι του ιού HIV και το άτομο μπορεί να εκδηλώνει ήπια ή και καθόλου συμπτώματα. Κατά το τρίτο στάδιο, εφόσον το άτομο δεν λαμβάνει κατάλληλη αντιρετροϊκή θεραπεία ή η θεραπεία αποτύχει λόγω μεταλλάξεων ανοχής ο ιός εξακολουθεί να πολλαπλασιάζεται, τα CD4 T λεμφοκύτταρα καταστρέφονται και εξαλείφονται, και το ανοσοποιητικό σύστημα παύει να λειτουργεί αποτελεσματικά (Parekh et al., 2019).

1.2 Υπότυποι του ιού HIV

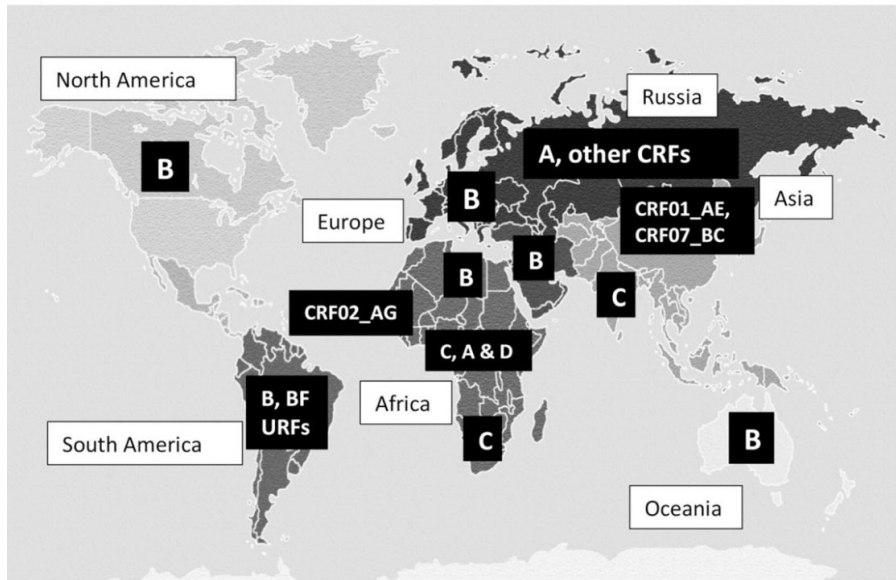
Ο ιός HIV υπολογίζεται ότι εμφανίστηκε στον ανθρώπινο πληθυσμό το χρονικό διάστημα μεταξύ των δεκαετιών του 1920 με του 1940. Παλαιότερα, σύμφωνα με αντίστοιχες έρευνες, ο ιός της ανοσοανεπάρκειας ήταν ικανός να μολύνει πρωτεύοντα θηλαστικά με εξαίρεση τον άνθρωπο έως τη χρονική στιγμή όπου προέκυψε το στέλεχος του ιού HIV-1 ως προϊόν

ανασυνδυασμού του ιού SIV (Simian Immunodeficiency Virus) των χιμπατζήδων και των μαϊμούδων (Schmitt et al., 2020). Άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως η μετάλλαξη CCR5Δ32 του ανθρώπινου γονιδίου CCR5, η οποία συσχετίστηκε με την περίοδο της πανώλης, δραματίζει σημαντικό ρόλο στο μοτίβο εξάπλωσης του ιού HIV (Zajac, 2018). Το σύνδρομο της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας οφείλεται στον ιό HIV τύπου 1 και τύπου 2, δηλαδή HIV-1 και HIV-2 αντίστοιχα, με τον ιό HIV-1 να έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως, ενώ αντίθετα ο ιός HIV-2 να περιορίζεται εξελικτικά και ενδημικά στη Δυτική Αφρική (Nyamweya et al., 2013). Οι υπότυποι και υπο-υπότυποι του ιού HIV-1 εμφανίζουν μεγάλη γενετική ετερογένεια και ο επιπολασμός και η εξάπλωσή τους διαφέρει ανά γεωγραφική περιοχή. Οι τύποι του ιού HIV-1 είναι 4: M (από το major, δηλαδή βασικοί τύποι του ιού HIV-1, από τους οποίους έχει προκληθεί και η πανδημία του AIDS), N (non-major), O (outliers) και P. Οι υπότυποι τις ομάδες M είναι οι A, B, C, D, F, G, H, J, και K (Beloukas et al., 2016).

Επιπλέον, υπάρχουν ανασυνδυασμένοι υπότυποι (CRF) που ενισχύουν την ποικιλομορφία και το μωσαϊκισμό του γονιδιώματος του ιού. Οι ανασυνδυασμένοι υπότυποι είναι προϊόν γενετικού ανασυνδυασμού, γεγονός που υποδηλώνει πως ένα άτομο μπορεί να μολυνθεί με δύο ή και παραπάνω στελέχη του ιού HIV-1. Εφόσον το γενετικό υλικό των διαφορετικών στελεχών συνυπάρξει στον ίδιο ξενιστή, τα γονιδιώματά τους μπορούν να ανταλλάξουν γονιδιακές περιοχές προσδίδοντας γένεση σε έναν νέο υπότυπο με ξεχωριστές λειτουργίες και ιδιότητες, όπως για παράδειγμα αντοχή έναντι κάποιου αναστολέα (Klatt, 2022). Έως το 2016 είχαν καταγραφεί 70 ανασυνδυασμένοι υπότυποι, το 2021 αναγράφονται στη βιβλιογραφία 102 CRFs, και μελέτη του 2022 αναφέρει 118 ανασυνδυασμένους υπότυπους (Cañada et al., 2021; He et al., 2022; Linchangco et al., 2022). Σύμφωνα με την τελευταία ενημέρωση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής βιβλιοθήκης του Εθνικού Εργαστηρίου του Los Alamos (Los Alamos National Laboratory Library, LANL) οι ανασυνδυασμένοι υπότυποι ανέρχονται στους 121 (<http://www.hiv.lanl.gov>). Οι πιο κοινοί αλλά και διαδεδομένοι σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές ανασυνδυασμένοι υπότυποι είναι οι A-G (CRF02_AG) που συναντώνται κυρίως στη Δυτική Αφρική, και οι A-E (CRF01_AE) που εντοπίζονται στην Νότια και Ανατολική Ασία (Hemelaar et al., 2019; Paraskevis et al., 2019). Οι ανασυνδυασμένοι γονότυποι A-B (CRF03_AB) εντοπίζονται στην Ανατολική Ευρώπη και Κεντρική Ασία, ενώ στην Ελλάδα και στην Κύπρο ο πιο συνήθεις ανασυνδυασμένοι υπότυποι είναι οι G-H-K-U-A (CRF04_cpx) (Hemelaar, 2012).

Στην Αμερική, Ευρώπη και Βόρεια Αφρική ο πιο συχνά εμφανιζόμενος υπότυπος είναι ο B. Στην Αφρική όπου συναντάται και η μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια συχνότερος είναι ο υπότυπος A στην Ανατολική Αφρική, ο υπότυπος C στη Νότια Αφρική, ενώ στη

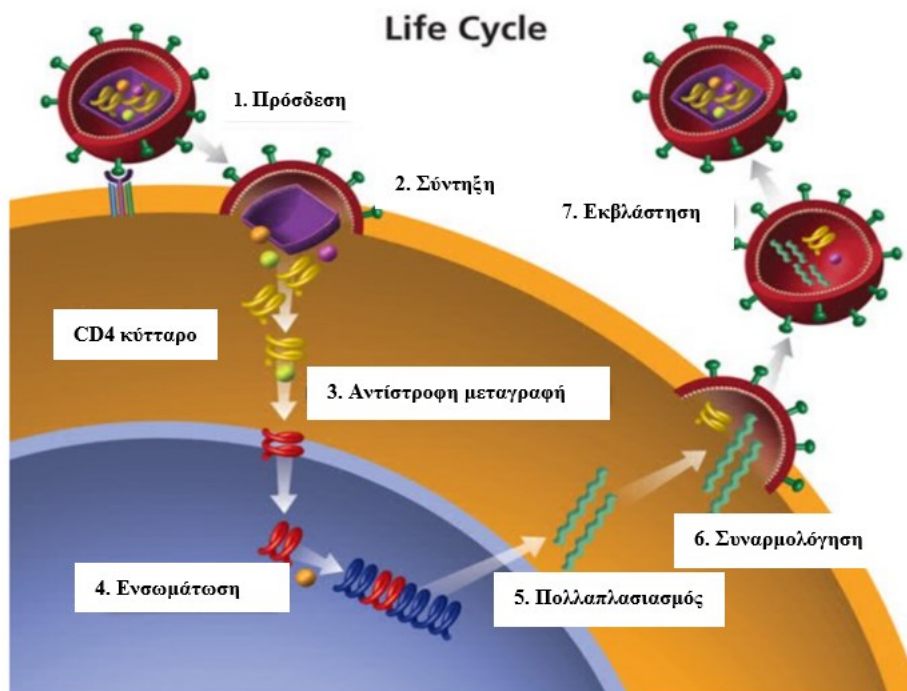
Δυτική και Κεντρική Αφρική υπάρχουν κυρίως ανασυνδυασμένες μορφές του υπότυπου G. Στην Ασία επικρατούν στην πλειοψηφία ανασυνδυασμένοι υπότυποι (Bbosa et al., 2019; Zaki et al., 2020). Παγκοσμίως, το 47% των μολύνσεων με HIV-1 είναι υπότυπου C, το 12% υπότυπου B και το 10% υπότυπου A (Bbosa et al., 2019; Taylor et al., 2008).



Εικόνα 1.3 Παγκόσμια Κατανομή Υπότυπων HIV-1. Πηγή: https://journals.lww.com/co-hivandaids/fulltext/2019/05000/hiv_subtype_diversity_worldwide.3.aspx.

1.3 Κύκλος ζωής του HIV

Ο HIV προσβάλλει τα CD4 T-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για αυτό το λόγο η ασθένεια που προκαλεί ονομάζεται σύνδρομο ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας. Αρχικά ο ιός έρχεται σε επαφή με τα CD4 κύτταρα και η πρωτεΐνη του ιικού φακέλου Env προσδένεται στον CD4 υποδοχέα και σε έναν άλλον συνυποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Αυτή η αλληλεπίδραση πυροδοτεί την άμεση σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου ξενιστή με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό του ιού να εισέρχεται στο CD4 κύτταρο. Ο συνυποδοχέας που αναγνωρίζουν τα ιωσώματα του HIV είναι είτε ο CCR5 (HIV R5), είτε ο CXCR4 (HIV X4), είτε και τους δύο (HIV R5X4) (Wilén et al., 2012). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.3**, το πρώτο βήμα μόλυνσης είναι η επαφή και η σύντηξη. Έπειτα, το μονόκλωνο RNA του ιού μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης και ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή υποβοηθούμενο από τη δράση της ιντεγκράσης. Πολλαπλασιάζεται, μεταγράφεται, και ύστερα κωδικοποιώντας τις πρωτεΐνες του καπιδίου του συσκευάζεται εκ νέου και εγκαταλείπει το κύτταρο ξενιστή (Chen, 2019; Soliman et al., 2017).



Εικόνα 1.3 Κύκλος Ζωής HIV. Συνοπτική περιγραφή της πορείας που ακολουθεί ο ιός εφόσον έρθει σε επαφή με ένα CD4 κύτταρο (CD4 cell) του ανοσοποιητικού συστήματος. Πηγή: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/life-cycle>.

1.4 Γονιδιακή περιοχή *pol*

Στη γονιδιακή περιοχή *pol* εδράζονται οι πρωτεΐνες ένζυμα του ιού. Συγκεκριμένα, βρίσκεται κατά σειρά πρώτα η πρωτεάση (PR), μετά η αντίστροφη μεταγραφάση (RT), και τέλος η ιντεγκράση (INT) (Εικόνα 1.1). Αυτά τα τρία γονίδια διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην παθογένεια του ιού καθώς εκτελούν όλες τις απαραίτητες λειτουργίες. Όπως προαναφέρθηκε, τα γονίδια του ιού εδράζονται σε γονιδιακές περιοχές. Αυτό συνεπάγεται την κοινή μεταγραφή και μετάφρασή τους. Η πρωτεάση υδρολύει τα μη λειτουργικά πολυπρωτεϊνικά πρόδρομα που παράγονται από την κάθε γονιδιακή περιοχή στις δραστικές τους μορφές (Badaya & Sasidhar, 2020). Η αντίστροφη μεταγραφάση μετατρέπει το μονόκλωνο RNA σε δίκλωνο DNA ώστε να είναι εφικτή η ενσωμάτωσή του στο DNA του κυττάρου ξενιστή (Ha et al., 2021). Τέλος, η ιντεγκράση, το γονίδιο που θα απασχολήσει και την παρούσα μελέτη, καταλύει το στάδιο της ενσωμάτωσης του δίκλωνου DNA που έχει παραχθεί από την αντίστροφη μεταγραφάση στο DNA του ξενιστή. Η δομή και ο ρόλος της περιγράφεται πιο αναλυτικά στην παράγραφο 1.4.1.

1.4.1 Ιντεγκράση

Η ιντεγκράση είναι ένα χαρακτηριστικό ένζυμο ρετροϊών που αποτελείται από τρεις επικράτειες. Η αμινοτελική της επικράτεια αναδιπλώνεται σε μορφή δάχτυλου ψευδαργύρου (zinc finger) και περιέχει μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή, απαραίτητη για τη λειτουργία της. Το ενεργό της κέντρο δεσμεύει δισθενή ιόντα μετάλλου και το καρβοξυτελικό άκρο εμπλέκεται στη δέσμευση του DNA (Eilers et al., 2020). Καθώς η αντίστροφη μεταγραφάση έχει δημιουργήσει το δίκλωνο ιικό DNA, η ιντεγκράση αποκόπτει δύο νουκλεοτίδια από το 3' άκρο του κάθε κλώνου. Σημειώνεται πως το ένζυμο της ιντεγκράσης ενεργεί ως πολυμερές σύμπλεγμα. Δεκαέξι πρωτομερή ιντεγκράσης εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία του HIV, και το σύμπλοκο ονομάζεται ιντάσωμα (intasome) (Engelman & Singh, 2018). Έχοντας δημιουργηθεί κατά αυτόν τον τρόπο «κολλώδη» άκρα, το ιικό DNA έχει πλέον τη δυνατότητα να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή. Η ιντεγκράση αναγνωρίζει πέντε νουκλεοτίδια σε κάθε κλώνο του γονιδιώματος του ξενιστή τα οποία σηματοδοτούν τη θέση ενσωμάτωσης και πυροδοτούν την έναρξη της διαδικασίας. Τα δύο νουκλεοτίδια στα 5' άκρα του ιικού DNA που παραμένουν ασύνδετα αναγνωρίζονται από τα επιδιορθωτικά ένζυμα του κυττάρου ξενιστή. Το νουκλεοτιδικό κενό καλύπτεται και οι κλώνοι ενώνονται (Craigie, 2012).

1.4.2 Πρωτεάση και αντίστροφη μεταγραφάση

Όπως προαναφέρθηκε, τα γονίδια του HIV εδράζονται σε γονιδιακές περιοχές, οι οποίες εν συνεχεία εκφράζονται ως πρώιμες πολυπρωτεΐνες. Η πρωτεάση, η οποία ανήκει στην οικογένεια των ασπαρτικών πρωτεασών, αναγνωρίζει τα συντηρημένα κατάλοιπα ασπαραγίνης-θρεονίνης και σερίνης-γλυκίνης, υδρολύει τους πεπτιδικούς δεσμούς, και κόβει τις πολυπρωτεΐνες Gag και GagPol στις λειτουργικές, ώριμες μορφές τους. Η ώριμη μορφή της πρωτεάσης έχει καταλυτική δράση ως διμερές, που κάθε υπομονάδα αποτελείται από 99 αμινοξικά κατάλοιπα (Deshmukh et al., 2017; Weber et al., 2021). Λόγο της δράσης της η οποία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία ολόκληρου του ιοσώματος, το γονίδιο της πρωτεάσης έχει αποτελέσει έναν από τους σημαντικότερους φαρμακευτικούς στόχους στην αντιρετροϊκή θεραπεία (Voshavar, 2019).

Η αντίστροφη μεταγραφάση του HIV εκδηλώνει ενεργότητα RNA και DNA εξαρτώμενης πολυμεράσης, και RNAάσης (ριβονουκλεάσης) H, που κόβει RNA. Δρα ως ετεροδιμερές με τις υπομονάδες p66 και p51 (Xavier RUIZ & Arnold, 2020). Η αντίστροφη μεταγραφάση του RNA σε δίκλωνο DNA ξεκινά να πραγματοποιείται σε κύτταρα που μόλις μόλυνθηκαν. Η περιοχή της RNA εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης αρχίζει να συνθέτει το συμπληρωματικό κλώνο DNA, και η ριβονουκλεάση H αποικοδομεί τον κλώνο RNA στο

μόριο RNA-DNA ώστε να συνεχιστεί η δράσης της πολυμεράσης και να παραχθεί ένα δίκλωνο ιικό DNA. Ως εκκινητή, η μεταγραφάση χρησιμοποιεί tRNA του ξενιστή και η αλληλουχία έναρξης βρίσκεται πάνω στο ιικό, θετικής πολικότητας, γονιδίωμα RNA. Η θέση που αναγνωρίζει το tRNA εκκινητής του ξενιστή πάνω στο ιικό RNA ονομάζεται θέση πρόσδεσης εκκινητή (pbs, primer binding site) (Hu & Hughes, 2012). Έπειτα, η ιντεγκράση καταλύει το τελευταίο στάδιο, όπως προαναφέρθηκε.

1.5 Αντιρετροϊκή θεραπεία

Καθώς οι μηχανισμοί δράσης του ιού HIV γίνονται όλο και πιο κατανοητοί, όλο και πιο αποτελεσματικά φάρμακα αναπτύσσονται. Η αντιρετροϊκή θεραπεία (ART) έχει καταστήσει τη ζωή των ανθρώπων με HIV-1 λοίμωξη εφικτή και έχει αυξήσει το προσδόκιμο ζωής τους (Arts & Hazuda, 2012). Στόχος της θεραπείας είναι η διαρκής καταστολή του πολλαπλασιασμού του ιού, στοχεύοντας στην αδρανοποίηση πρωτεϊνών και ενζύμων που είναι απαραίτητα για την ιική παθογένεια (Pasternak et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν οι νουκλεοσιδικοί/νουκλεοτιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors, NRTIs) που εμποδίζουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, καθώς και οι μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) οι οποίοι παρεμποδίζουν το ίδιο ένζυμο τροποποιώντας τη δομή του. Οι NRTIs δρουν μέσα στο κύτταρο ξενιστή και ανταγωνίζονται τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια που δεσμεύει η ιική RNA μεταγραφάση για τη δημιουργία του δίκλωνου ιικού DNA. Εφόσον ενσωματωθούν τα νουκλεοτίδια αναστολείς στο νεοσυντιθέμενο ιικό DNA αντί των νουκλεοτιδίων του ξενιστή, η μεταγραφάση αναστέλλεται (Holec et al., 2017). Τα φάρμακα αναστολείς της πρωτεάσης του ιού (PIs) αδρανοποιούν το ιικό ένζυμο μέσω της άμεσης πρόσδεσής τους στο ενεργό καταλυτικό κέντρο. Δυστυχώς, η μακροχρόνια χρήση των αναστολέων της πρωτεάσης επιφέρουν παρενέργειες και τοξικότητα (Lv et al., 2015b). Τα φάρμακα που στοχεύουν την ιική ιντεγκράση, οι INSTIs, αναστέλλουν τη μεταφορά του ιικού DNA που καταλύεται από την ιντεγκράση για αυτό το λόγο ονομάζονται και αναστολείς μεταφοράς κλώνου (Integrase Strand Transfer Inhibitors, INSTIs) (Smith et al., 2021). Υπάρχουν επίσης φάρμακα, μικρομοριακοί ανταγωνιστές, που παρεμποδίζουν τη σύντηξη του ιού με το CD4 κύτταρο μέσω της αδρανοποίησης του εξωκυτταρικού υποδοχέα CCR5 του κυττάρου ξενιστή (Mohamed et al., 2022). Συνήθως, εφόσον ένα άτομο διαγνωστεί με HIV-1 ξεκινά άμεσα την αντιρετροϊκή θεραπεία η οποία αποτελείται από ένα συνδυασμό φαρμάκων. Στον **πίνακα 1** αναγράφονται ορισμένα αντιρετροϊκά φάρμακα που χορηγούνται σε φορείς της HIV λοίμωξης.

ίνακας 1. Αντιρετροϊκά Φάρμακα HIV. Πηγή: <https://www.webmd.com/hiv-aids/aids-hiv-medication>

Φάρμακα - Αναστολείς			
NRTIs	NNRTIs	PIs	INSTIs
Abacavir (ABC)	Delavirdine (DLV)	Atazanavir (ATV)	Bictegravir (BIC)
Didanosine (ddl)	Doravirine (DOR)	Darunavir (DRV)	Cabotegravir (CAB)
Emtricitabine (FTC)	Efavirenz (EFV)	Fosamprenavir (FPV)	Dolutegravir (DTG)
Lamivudine (3TC)	Etravirine (ETR)	Indinavir (IDV)	Elvitegravir (EVG)
Tenofovir (TFV)	Nevirapine (NVP)	Lopinavir + ritonavir (LPV/r)	Raltegravir (RAL)
Azidothymidine (AZT)	Rilpivirine (RPV)	Nelfinavir (NFV)	
		Ritonavir (RTV)	
		Saquinavir (SQV)	
		Tipranavir (TPV)	
		Amprenavir (APV)	

Συνδυαστική Αντιρετροϊκή Θεραπεία (cART)			
NRTI-based	NNRTI-based	PI-based	INSTI-based
ABC/3TC	DOR/TDF/3TC	ATV/c	BIC/TAF/FTC
TAF/FTC	EFV/TDF/FTC	DRV/c	DTG/ABC/3TC
ABC/3TC/ZDV	RPV/TAF/FTC	DRV/c/TAF/FTC	DTG/RPV
TDF/FTC	RPV/TDF/FTC		DTG/3TC
TDF/3TC			EVG/c/TAF/FTC
ZDV/3TC			EVG/c/TDF/FTC

1.6 Αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία

Η HIV λοίμωξη έχει πλέον μετατραπεί από θανατηφόρα σε χρόνια μολυσματική νόσο. Παρά την ύπαρξη αποτελεσματικών φαρμάκων, μεταλλάξεις στο ιικό γονιδίωμα προσδίδουν στον ιό τη δυνατότητα ανάπτυξης αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία (Bokharaei-Salim et al., 2020). Κατά κύριο λόγο, οι μεταλλάξεις αντοχής αφορούν στα φάρμακα που στοχεύουν την πρωτεάση και την αντίστροφη μεταγραφάση του ιού, ενώ οι μεταλλάξεις αντοχής έναντι

των αναστολέων της ιντεγκράσης βρίσκονται σε πολύ χαμηλό ποσοστό παγκοσμίως (Anstett et al., 2017; S.-Y. Rhee et al., 2020). Η αντοχή στη θεραπεία μπορεί να υπάρχει πριν την έναρξη της θεραπείας, να αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια της θεραπείας λόγω της εξελικτικής πίεσης που ασκείται στον ιό, ή να αποκτηθεί μέσω ανταλλαγής ιικού φορτίου με κάποιον άλλο φορέα (Biswas et al., 2019; Clutter et al., 2016; Machnowska et al., 2019). Οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται με αλληλούχηση του ιικού γονιδιώματος των ατόμων που ζουν με τον ιό και μπορεί να είναι μείζονας σημαντικότητας για την πορεία τους στο πρόγραμμα θεραπείας ή, μπορεί να βρίσκονται σε νουκλεοτίδια αμινοξέων που δε μεταβάλλουν τη δράση κάποιας ιικής πρωτεΐνης. Το 2019 ο Wensing και οι συνεργάτες του ανανέωσαν το χάρτη μεταλλάξεων του ιικού γονιδιώματος του ιού HIV-1, που σχετίζονται με αντοχή σε αντιρετροϊκή θεραπεία (Wensing, 2019). Παρακάτω εμφανίζονται οι μεταλλάξεις σημαντικότητας που έχουν χαρτογραφηθεί και με βάση αυτών λειτουργούν οι περισσότερες υπολογιστικές βάσεις εύρεσης μεταλλάξεων (πίνακας 2). Οι μεταλλάξεις μπορεί να υπάρχουν σε ένα μόνο κωδικόνιο ή και συνδυαστικά, προσδίδοντας αντοχή σε διαφορετικό φάρμακο αναλόγως το αμινοξύ που μεταβάλλουν.

Σύμφωνα με μελέτες των τελευταίων ετών και τη συγκεντρωτική βάση δεδομένων επιτήρησης του προγράμματος HIVdb του πανεπιστημίου του Στάνφορντ, οι μεταλλάξεις αντοχής στην Ευρώπη την τελευταία δεκαετία κυμαίνονται σε ποσοστό περίπου 7%, με τη Γερμανία να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό 16,5% την περίοδο 2012-2015 και τη Σλοβενία το χαμηλότερο 0,9% το χρονικό διάστημα 2012-2017 (Hanke et al., 2019; Lunar et al., 2018). Αντίστοιχες μελέτες στη Βόρεια Αμερική δηλώνουν πως το ποσοστό αντοχής σε αντιρετροϊκή θεραπεία για την περίοδο 2012-2013 ανερχόταν σε ποσοστό περίπου 17% σύμφωνα με μελέτες του 2016 και 2019 (Panichsillapakit et al., 2016; S. Y. Rhee et al., 2019). Οι μελέτες αφορούν κυρίως τις μεταλλάξεις αντοχής του ιού HIV-1 σε φάρμακα αναστολείς πρωτεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης, καθώς δεν ερευνάται ακόμα συστηματικά η αντοχή σε αναστολείς ιντεγκράσης. Η αντοχή στους αναστολείς του γονιδίου της ιντεγκράσης σύμφωνα με μελέτες μικρότερης κλίμακας ανέρχεται παγκοσμίως σε ποσοστό 0,5% στα μη θεραπευμένα άτομα. Μελέτη που διεξάχθηκε στη Βρετανική Κολούμπια που συμπεριλάμβανε δεδομένα από το 2009 έως το 2016 έδειξε πως τα τελευταία χρόνια ο επιπολασμός της αντοχής για τους αναστολείς ιντεγκράσης από 0,1% έχει αυξηθεί στο 0,7% (Kamelian et al., 2019). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με μελέτη του 2018, το ποσοστό αντοχής σε αντιρετροϊκή θεραπεία ανερχόταν σε ποσοστό 5,3% για τη χρονική περίοδο 2012-2015, με 4,4% αντοχή σε NNRTIs, 0,9% αντοχή σε NRTIs, και 0,9% εξίσου σε PIs (Kostaki et al., 2018). Για την αντοχή σε φάρμακα αναστολείς της ιντεγκράσης δεν υπάρχουν αντίστοιχες

ελληνικές μελέτες. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Νοτίου Ελλάδος ο επιπολασμός μεταλλάξεων αντοχής για τους μήνες Ιανουάριο με Ιούνιο του 2022 εκτιμήθηκε για INSTIs σε ποσοστό 7,3%, ενώ για PIs, NRTIs και NNRTIs η αντοχή υπολογίστηκε σε ποσοστό 4,8%, 9,7%, και 17,7%, αντίστοιχα (Πρόκτερ et al., 2022).

Πίνακας 2. Σημαντικές Θέσεις Μεταλλάξεων Αντοχής σε Αντιρετροϊκή Θεραπεία. Πηγή για NRTIs: <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NRTI/> NNRTIs : <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/> PIs : <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/PI/> INSTIs : <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/>)

Γονίδιο	Αναστολέας	Κωδικόνια Μεταλλάξεων Μείζονας Σημασίας												
<i>RT</i>	NRTIs	M	K	D	T	K	L	Y	Q	M	L	T	K	
		41	65	67	69	70	74	115	151	184	210	215	219	
		L	R	N	D/N/G	E	V/I	F	M	V/I	W	F/Y	Q/E	
	NNRTIs	L	K	K	V	E	Y	Y	G	M				
		100	101	103	106	138	181	188	190	230				
	I	E/P	N/S	A/M	A/G/K/Q	C/I/V	L/C/H	A/S/E	L					
<i>PR</i>	PIs	D	V	L	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L
		30	32	33	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
		N	I	F	I/L	V/A	V/M	L/V	V/T/A/L/M	V	A/F/T/S	V	D/S	M
<i>INT</i>	INSTIs	T	E	G	E	G	Y	S	Q	N	R			
		66	92	118	138	140	143	147	148	155	263			
		A/I/K	Q	R	K/A/T	S/A/C	R/C/H	G	H/R/K	H	K			

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι σημαντικές θέσεις μεταλλάξεων και για τα τρία γονίδια ενώ στον πίνακα 2.1 επεξηγούνται οι συντομογραφίες των αμινοξέων. Το πρώτο κεφαλαίο γράμμα αντιστοιχεί στο αμινοξύ που κωδικοποιείται φυσιολογικά (wild type) από το εκάστοτε γονίδιο, στη μέση με έντονη γραφή φαίνεται το κωδικόνιο στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη, και από κάτω σημειώνεται το αμινοξύ που προκύπτει από τη σημειακή μετάλλαξη. Στις περιπτώσεις όπου πιθανόν η σημειακή μετάλλαξη να καταλήγει σε περισσότερα από ένα αμινοξύ (π.χ., γονίδιο RT, κωδικόνιο 69), αναφέρονται όλες οι πιθανές εκδοχές. Οι μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις τροποποιούν τον τρόπο πρόσδεσης και δράσης των αναστολέων καθώς μεταβάλλουν την τεταρτοταγή δομή της λειτουργικής πρωτεΐνης στόχου με τέτοιο τρόπο ώστε ο φαρμακευτικός παράγοντας να μην μπορεί να προσδεθεί

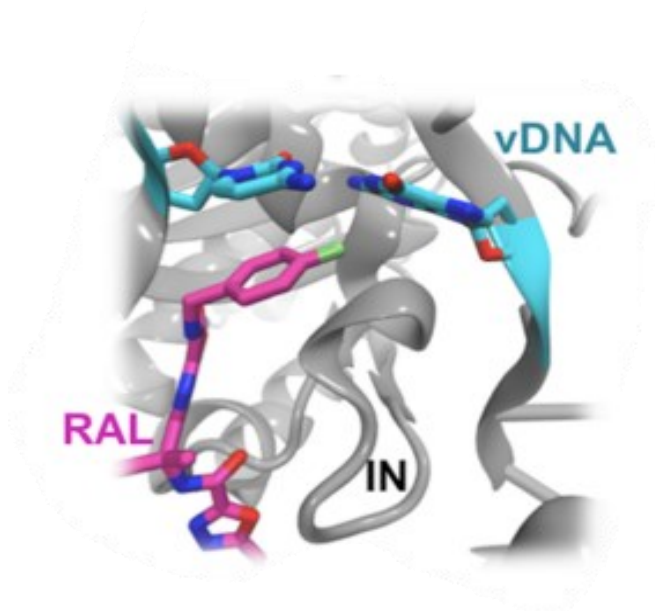
στις θέσεις που είναι σχεδιασμένος να αναγνωρίζει (<https://hivdb.stanford.edu/pages/WHOResistanceList.html>).

Πίνακας 2.1 Κώδικας Αμινοξέων Ενός Γράμματος (One letter code). Πηγή: https://www.genscript.com/Amino_Acid_Code.html

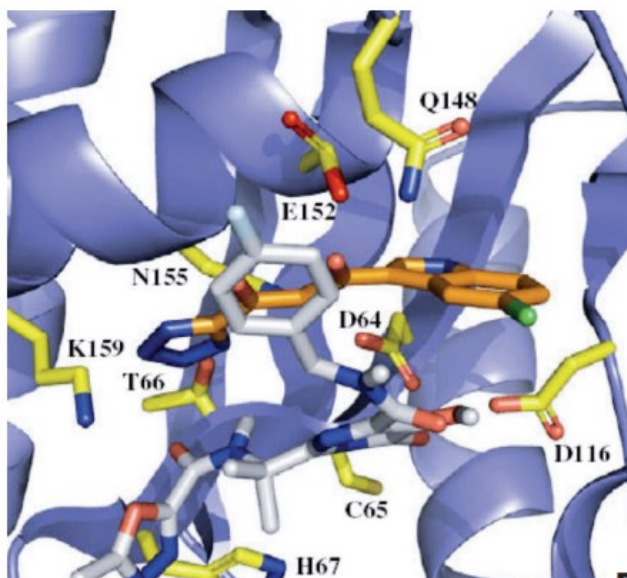
Αμινοξύ	Συμβολισμός
Αλανίνη	A
Αργινίνη	R
Ασπαραγίνη	N
Ασπαρτικό οξύ	D
Κυστεΐνη	C
Γλουταμινικό οξύ	E
Γλουταμίνη	Q
Γλυκίνη	G
Ιστιδίνη	H
Ισολευκίνη	I
Λευκίνη	L
Λυσίνη	K
Μεθιονίνη	M
Φαινυλαλανίνη	F
Προλίνη	P
Σερίνη	S
Θρεονίνη	T
Τρυπτοφάνη	W
Τυροσίνη	Y
Βαλίνη	V

1.6.1 Μηχανισμός δράσης αναστολέων ιντεγκράσης και ανοχή

Οι αναστολείς της ιντεγκράσης (Integrase strand transfer inhibitors, INSTIs) είναι τα νεότερα αντιρετροϊκά φάρμακα που διατέθηκαν στην κυκλοφορία. Οι πρώτοι αναστολείς μεταφοράς κλώνου που εγκρίθηκαν για κυκλοφορία ήταν τα φαρμακευτικά σκευάσματα raltegravir (RAL) και elvitegravir (EVG) το 2007 και 2012 αντίστοιχα (Métifiot et al., 2013). Το RAL δρα μέσω της πρόσδεσής του στο σύμπλοκο ιντεγκράσης-ικού DNA, κοντά στο ενεργό κέντρο της ιντεγκράσης που αποτελείται από την καταλυτική τριάδα D64, D116 και E152 (Εικόνα 1.4). Η πρόσδεση προκαλεί παραμόρφωση και άνοιγμα του ενεργού κέντρου, γεγονός που καθιστά το σύμπλοκο ανίκανο να ενσωματωθεί. Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που προσδίδουν ανοχή στο RAL είναι οι N155H και Q148K/R/H καθώς το RAL συναγωνίζεται το DNA για την πρόσδεση σε αυτά τα κατάλοιπα στο γονίδιο της ιντεγκράσης (Εικόνα 1.5) (Mouscadet & Tchertanov, 2009).



Εικόνα 1.4 Θέση πρόσδεσης RAL στο σύμπλοκο ιντεγκράσης-ικού DNA (vDNA). Πηγή: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02372493>



Εικόνα 1.5 Σημαντικές θέσεις πρόσδεσης RAL. Στην Εικόνα φαίνεται η καταλυτική τριάδα D64, D116 και E152 του ενεργού κέντρου και οι θέσεις N155 και Q148. Πηγή: <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-783X-14-S3-5>

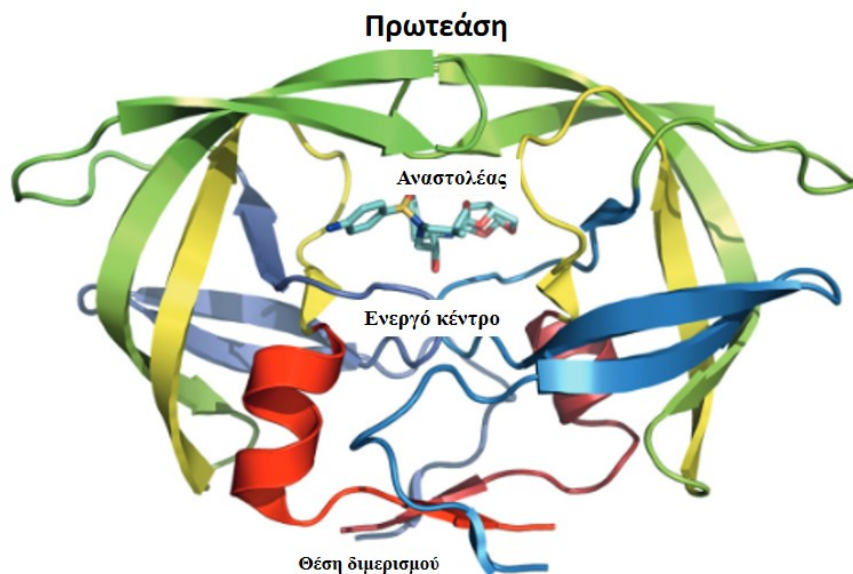
Το EVG δρα με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή παρεμβάλλεται στο σύμπλοκο ιντεγκράσης-ικού DNA κοντά στο ενεργό κέντρο αλλά δεσμεύει με δυνάμεις van der Waals τα δι-νουκλεοτίδια CA του κομμένου κλώνου και την 4η γουανίνη G του 5' άκοπου κλώνου. Οι κυριότερες μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή έναντι του EVG είναι οι T66I και E92Q οι οποίες μειώνουν την ευαισθησία του ιού κατά 10 και 30 φορές αντίστοιχα (Pandey, 2014).

Το DTG, ο επόμενος αναστολέας μεταφοράς κλώνου που εγκρίθηκε από τον FDA, δρα με τον ίδιο τρόπο με τα δύο που προηγήθηκαν, με τις μεταλλάξεις G140S και Q148R/H να μειώνουν τη δραστηριότητά του (Kandel & Walmsley, 2015).

Οι επόμενοι αναστολείς που ακολούθησαν, Bictegravir (BIC) και Cabotegravir (CAB) διαθέτουν μεγαλύτερο γενετικό φραγμό για αυτό και χαρακτηρίζονται ως αναστολείς ιντεγκράσης δευτέρης γενεάς. Το BIC είναι παρόμοιος με το DTG αλλά με μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα στο σύμπλοκο ιντεγκράσης-ικού DNA και επίσης, απαιτείται η παρουσία τουλάχιστον δύο μεταλλάξεων, των R263K/M50I και S153F μαζί με την δευτερεύουσα T66I ώστε να μειωθεί η δραστηριότητά του (Deeks, 2018). Ο αναστολέας CAB είναι άλλο ένα ανάλογο του DTG με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και μπορεί να χορηγηθεί ενέσιμα (Whitfield et al., 2016). Επίσης, ανήκει στα φάρμακα προφύλαξης πριν την έκθεση (PrEP, pre-exposure prophylaxis) καθώς έχει εγκριθεί για προφυλακτική χορήγηση και συστήνεται για άτομα στα οποία ο ιός βρίσκεται σε πολύ χαμηλά, μη ανιχνεύσιμα επίπεδα και είναι σταθερά στη θεραπεία που ακολουθούν χωρίς την εμφάνιση μεταλλάξεων αντοχής (CDC, 2021). Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ευαισθησία του ιού έναντι του CAB είναι οι E138A/K, G140A, Q148R/K, G163R, και S147G (Ndashimye et al., 2021).

1.6.2 Μηχανισμός δράσης αναστολέων πρωτεάσης και αντοχή

Οι αναστολείς πρωτεάσης είναι πρωτεϊνικά ικριώματα που μιμούνται τα πρωτεϊνικά ανάλογα στα οποία στοχεύει και δρα η πρωτεάση, δηλαδή, ανταγωνίζονται για τη θέση του ενεργού κέντρου που φυσιολογικά καταλαμβάνει το πρωτεϊνικό πρόδρομο Gag-GagPol. Η σύνδεση των αναστολέων γίνεται στα συντηρημένα κατάλοιπα που φέρει η πρωτεάση G27, A29, A30, και G48, συνεπώς οι μεταλλάξεις σε αυτές τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές θέσεις εμποδίζουν τη σύνδεση των αναστολέων και προσδίδουν αντοχή στον ιό (de Clercq & Li, 2016). Παρότι οι αναστολείς πρωτεάσης είναι αποτελεσματικοί έναντι της HIV λοίμωξης, η πλειοψηφία των σκευασμάτων ακολουθείται από σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ύστερα από μακροχρόνια χρήση (Lv et al., 2015a). Οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί να προσδίδουν αντοχή σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες φαρμάκων είναι οι D30N, V32I, I47A, I50L/V, I54V/T/A/L/M, L76V, V82A/F/T/S, I84V, N88D/S, και L90M, που το επίπεδο αντοχής που προσφέρουν μεταβάλλεται ανάλογα με το φαρμακευτικό σκεύασμα που χρησιμοποιείται .

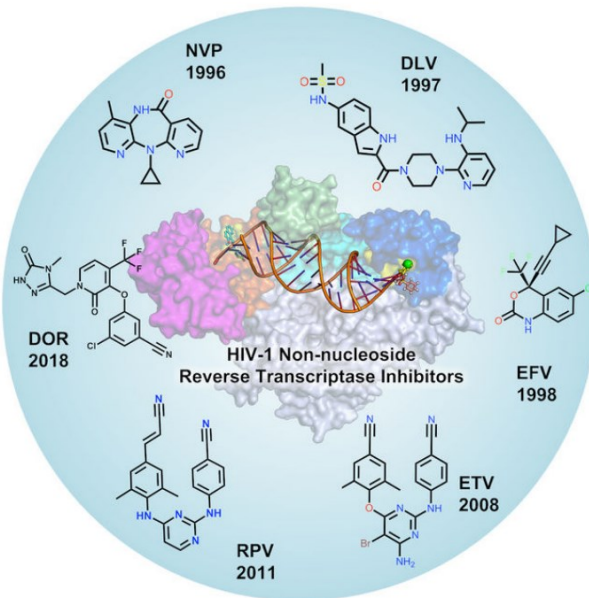


Εικόνα 1.6 Θέση πρόσδεσης αναστολέων πρωτεάσης. Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396582/>

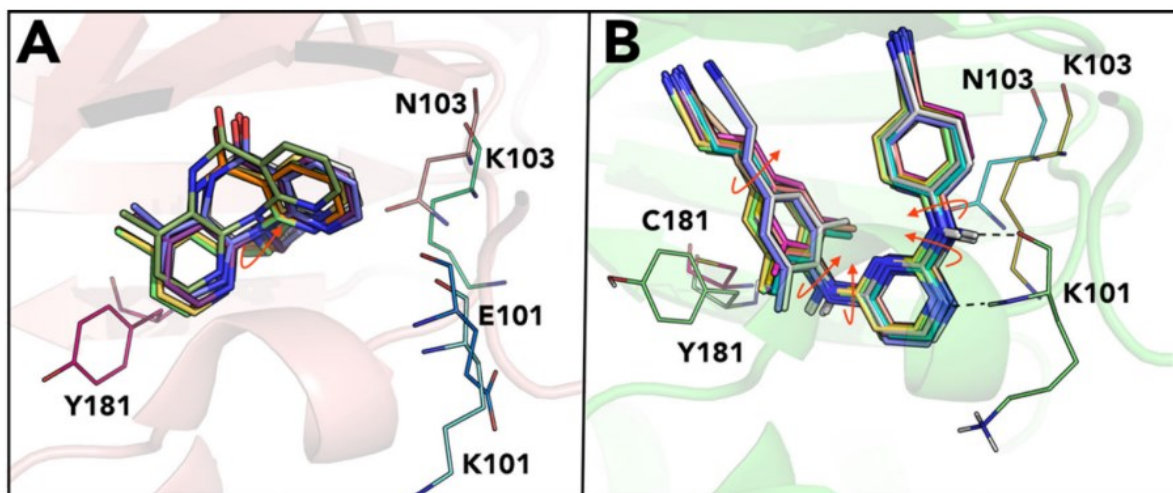
1.6.2 Μηχανισμός δράσης αναστολέων αντίστροφης μεταγραφάσης και αντοχή

Τα αντιρετροϊκά που στοχεύουν το ιικό γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης, όπως προαναφέρθηκε, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, του μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) και τους νουκλεοσιδικούς αναστολείς (Nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs). Υπάρχουν 6 μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς οι RPV, DLV, DOR, EFV, ETR, και NVP. Οι NNRTIs είναι αλλοστερικοί αναστολείς οι οποίοι προσδένονται σε μία υδρόφοβη περιοχή κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου επηρεάζοντας τη γεωμετρία του ενεργού κέντρου και συνεπώς αποτρέπουν τον πολυμερισμό του DNA. Η υδρόφοβη αυτή περιοχή ονομάζεται «τσέπη» πρόσδεσης μη νουκλεοσιδικού αναστολέα (NNIBP) και αποτελείται από τα αμινοξέα L100, V106, T107, V108, V179, Y181, Y188, G190, F227, W229, L234, και Y318 (Namasivayam et al., 2019). Οι θέσεις αυτές αλλοστερικής πρόσδεσης δε συμμετέχουν σημαντικά στον τρόπο δράσης του ενζύμου, γεγονός που κάνει τις σημειακές μεταλλάξεις να ευδοκιμήσουν και ως αποτέλεσμα συναντάται αυξημένη αντοχή στους NNRTIs. Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή είναι οι K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H, και G190A/S/E (Smith, Pauly, et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δράση του κάθε αναστολέα NNRTI είναι οι εξής: α) του RPV είναι οι L100I, K101E/P, E138 A/G/K/Q, Y181C/I/V, Y188L, G190E, M230L, β) του DLV είναι οι L100I, K103N, Y181C, P236L, γ) του DOR είναι οι V106A/M/I, Y188L, G190S/E, M230L, δ) του EFV είναι οι L100I, K101P,

K103N/S, V106M, Y188L/C, G190A/S/E, M230L, ε) του ETR είναι οι L100I, K101P, Y181C/I/V, G190E, M230L, και στ) του NVP είναι οι L100I, K101E/P, K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H, G190A/S/E, και M230L (S.-Y. Rhee et al., 2016).



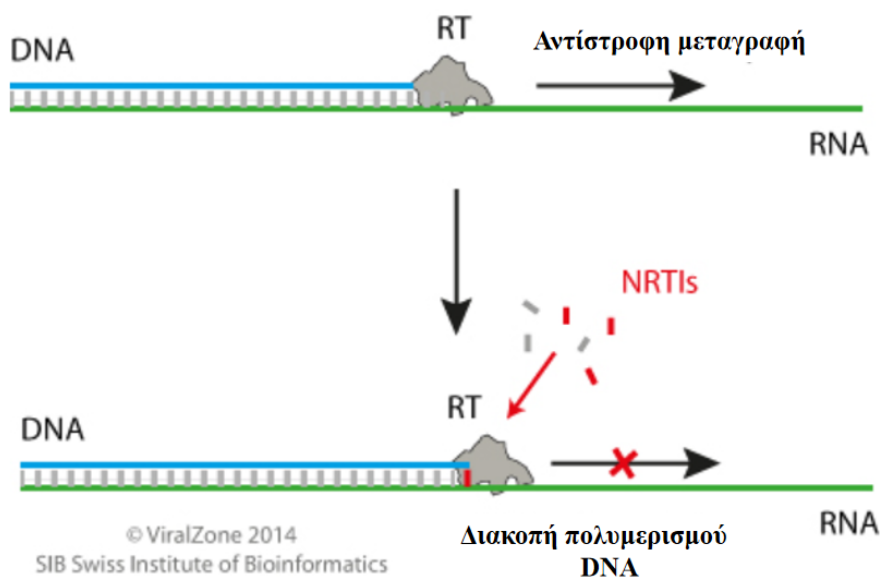
Εικόνα 1.7 Ημερομηνίες Έγκρισης Κυκλοφορίας Μη Νουκλεοσιδικών Αναστολέων Αντίστροφης Μεταγραφάσης του HIV (NNRTIs, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors). Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7049092/>



Εικόνα 1.8 Σχηματισμός και μηχανισμός πρόσδεσης των NVP (A) και RPV (B). Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7049092/pdf/nihms-1067339.pdf>.

Οι νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης κυκλοφορούν με τις ονομασίες ABC, ddI, FTC, 3TC, TFV, και AZT, και επειδή φέρουν χαμηλό γενετικό φραγμό (όπως και οι Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) χορηγούνται σε συνδυαστική αντιρετροϊκή θεραπεία (combined Antiretroviral Therapy, cART). Είναι ανάλογα

των νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται φυσιολογικά από την πολυμεράση για την επιμήκυνση του κλώνου DNA με τη διαφορά ότι στερούνται 3'OH, με αποτέλεσμα η ενσωμάτωσή τους στο νεοσυντιθέμενο ιικό κλώνο DNA να οδηγεί αντίστροφη μεταγραφάση στον τερματισμό της αλυσίδας (Cilento et al., 2021). Οι μεταλλάξεις που γίνονται στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης ονομάζονται μεταλλάξεις που σχετίζονται με ανάλογα θυμιδίνης (TAMs) και προσδίδουν στο ένζυμο τη δυνατότητα να κάνει εκτομή του νουκλεοτιδικού αναλόγου από την αλυσίδα και να συνεχίσει τον πολυμερισμό. Συνεπώς, όσα ένζυμα RT φέρουν TAMs, δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στους NRTIs. Οι κυριότερες μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή είναι: για το α) ABC οι K65R, K70E, L74V/I, Y115F, β) ddI οι K65R, K70E, L74V/I, γ) FTC οι M184V/I, K65R, δ) 3TC οι M184V/I, K65R, ε) TFV οι K65R, K70E, και στ) AZT οι K70R, Q151M και T215Y (Maeda et al., 2019).



Εικόνα 1.8 Μηχανισμός δράσης NRTIs. Πηγή: <https://viralzone.expasy.org/5136>

1.7 Πολυμορφικές μεταλλάξεις

Εκτός των μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στην ART, υπάρχουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τον κάθε υπότυπο. Αυτές οι πολυμορφικές σημειακές μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται ως συναινετικές (συντηρημένες), καθώς συναντώνται στην πλειοψηφία δειγμάτων που ανήκουν στον ίδιο υπότυπο του ιού HIV-1. Ο ρόλος τους είναι είτε να συνεισφέρουν στην αντοχή, εφόσον υπάρχει ήδη κυρίαρχη μετάλλαξη αντοχής, είτε να αποτελούν χαρακτηριστική πληροφορία υποτύπησης κατά τη γονοτύπηση (Sun et al., 2020). Για παράδειγμα, στον υπότυπο G και CRF02_AG κατά την αλληλούχηση του

γονιδίου της πρωτεάσης έχουν παρατηρηθεί οι δευτερεύουσας σημασίας μεταλλάξεις K20I, M36I/L, H69K/R και L89M (Udeze et al., 2020). Στο γονίδιο της ιντεγκράσης, αντίστοιχες μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση της γονιδιακής περιοχής απέδειξαν την ύπαρξη πολυμορφικών μεταλλάξεων και συγκεκριμένα τις μεταλλάξεις κωδικονίων L74M/I, M50I/L/R και P142T (Mabeya et al., 2020; Onoriode Digban et al., 2020). Αντίστοιχα, στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης οι πολυμορφικές μεταλλάξεις που επικρατούν είναι οι E138A, V179D/F/T και Y181C/I/V (Giannini et al., 2019).

1.8 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός in-house πειραματικού πρωτοκόλλου με σκοπό την εύρεση μεταλλάξεων στο γονίδιο της ιντεγκράσης που πιθανόν να προσδίδουν αντοχή σε φάρμακα αναστολείς μεταφοράς κλώνου (NSTIs). Στην πειραματική διαδικασία που αναλύεται παρακάτω εφαρμόζονται οι ακόλουθες τεχνικές: α) απομόνωση του ιικού νουκλεϊκού οξέος (RNA), β) χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και για τη δημιουργία cDNA από το μονόκλωνο RNA του ιού (RT-PCR), γ) χρήση PCR για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος ενδιαφέροντος από το δίκλωνο DNA που δημιουργήθηκε στο προηγούμενο βήμα (Nested-PCR), δ) ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, ε) καθαρισμός προϊόντος, στ) ποσοτικοποίηση καθαρισμένου προϊόντος, ζ) ανάλυση χρωματογραφημάτων από αλληλούχηση κατά Sanger και εύρεση μεταλλάξεων χρησιμοποιώντας αλγόριθμους σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων.

2. Πειραματική διαδικασία

2.1 Εξοπλισμός - Αναλώσιμα

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

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

Σύστημα ηλεκτροφόρησης Gel αγαρόζης (ηλεκτροδοτούμενη δεξαμενή πηκτώματος)

Καταψύκτες (-80°C, -20°C)

Χαρτοπετσέτες

Πιπέτες (P1000, P200, P20, and P10) και tips με φίλτρο

96x well plates

Φίλμ σφραγίσματος για 96 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)

2.2 Αντιδράσεις

2.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Για την απομόνωση του ιικού RNA από δείγματα ορού ασθενών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο QIAamp Viral RNA Mini Kit (250) (αριθμός καταλόγου: 52906). Το RNA του ιού από τα κλινικά δείγματα ασθενών απομονώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας.

Αρχικά, σημειώνονται τα σωληνάκια erpendorf που θα χρησιμοποιηθούν με τον κωδικό του δείγματος. Ύστερα, 560μl διαλύματος AVL (διάλυμα λύσης) που περιέχει Carrier RNA προστίθενται στα erpendorf μαζί με 140 μl δείγματος ορού. Ακολουθεί μικρή ανάδευση με τη συσκευή vortex και αναμονή για 10 min. Με μία σύντομη μικροφυγοκέντρηση δευτερολέπτων απομακρύνονται τα σταγονίδια από το καπάκι και προστίθενται 560 μl κρύας απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί ξανά σύντομη ανάδευση με τη συσκευή vortex και μικροφυγοκέντρηση δευτερολέπτων για να απομακρυνθούν τα σταγονίδια από το καπάκι. Ποσότητα 630 μl μεταφέρεται στην αντίστοιχα σημειωμένη κολώνα καθαρισμού και εκτελείται φυγοκέντρηση στα 6.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το σωληνάκι συλλογής του εκλυόμενου παραπροϊόντος απορρίπτεται και χρησιμοποιείται νέο. Γίνεται επανάληψη του τελευταίου βήματος ώστε να μεταφερθεί και η υπόλοιπη ποσότητα διαλύματος λύσης-ορού-αιθανόλης στην κολώνα απομόνωσης. Στη συνέχεια προστίθενται στην κολώνα 500 μl διαλύματος AW1 (διάλυμα πλύσης 1) 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 AW2 (διάλυμα πλύσης 2) και φυγοκεντρείται στα 20.000 rcf για 3 min στους 25°C. Το σωληνάκι συλλογής του εκλυόμενου παραπροϊόντος αντικαθίσταται με νέο. Επειδή τα διαλύματα πλύσης περιέχουν αιθανόλη η οποία εάν παραμείνει στη μεμβράνη της κολώνας μειώνει την καθαρότητα και σύσταση του απομονώματος RNA, 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

περιεχόμενό του, η κολώνα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο καταλλήλως σημειωμένο σωληνάκι erppendorf, προστίθενται προσεκτικά στο κέντρο της μεμβράνης 40 μl διαλύματος έκλουσης AVE και φυγοκεντρείται 6.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το RNA που εκλύεται χρησιμοποιείται αμέσως για PCR ή αποθηκεύεται στους -80°C.

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

Για την 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). Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρειάστηκαν όπως οι εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα, και τα ιόντα μαγνησίου και χλωρίου προστέθηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και ποσότητες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το προστιθέμενο RNA κυμαινόταν από 10 έως 20 μl ανάλογα με την αρχική του συγκέντρωση και καθαρότητα.

Τα δείγματα που δε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για την φωλεακή (Nested) PCR αποθηκεύτηκαν στη συντήρηση στους -20°C (έως 2 εβδομάδες).

2.2.3 Φωλεακή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR)

Για την Nested PCR χρησιμοποιήθηκε το κιτ της Invitrogen Platinum PCR SuperMix high fidelity (αριθμός καταλόγου: 12532-016). Οι εκκινητές προστέθηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και ποσότητες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το προστιθέμενο DNA ανερχόταν στα 3μl.

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 1% σε κωνική φιάλη αναμειγνύονται 1 gr αγαρόζη με 100ml 1x TBE. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος στα μικροκύματα με σταδιακή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη στο ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα, απομακρύνεται η κωνική φιάλη από το φούρνο μικροκυμάτων και αφού μειωθεί η θερμοκρασία του μίγματος προστίθεται 1:10000 v/v χρωστική SYBR® Safe DNA Gel Stain της εταιρίας Invitrogen™ (αριθμός καταλόγου: S33102). Γίνεται ήπια ανάδευση της φιάλης ώστε να ενσωματωθεί η χρωστική στο μίγμα, εναποτίθενται τα χτένια στο δοχείο πηκτώματος, τοποθετείται το διάλυμα αγαρόζης ώστε να στερεοποιηθεί και εν συνεχεία το δοχείο με την πηκτική αγαρόζη εισέρχεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Συμπληρώνεται στη συσκευή 0.5X TBE μέχρι να καλύπτονται τα πηγαδάκια με τα δείγματα.

Στο πρώτο πηγάδι ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται 4 μL μάρτυρα ο HyperLadder™ 50bp της εταιρίας Meridian© (αριθμός καταλόγου: BIO-33054). Στις επόμενες θέσεις τοποθετούνται διαδοχικά τα προϊόντα PCR αναμιγμένα με διάλυμα φόρτωσης DNA Gel Loading Dye (6X) της εταιρείας Thermo Scientific™ (αριθμός καταλόγου: FERR0611) σε ποσότητες 5 μL και 1 μL αντίστοιχα. Για την έναρξη της ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται τάση 120V για 40 min. Έπειτα, το δοχείο με την αγαρόζη μεταφέρεται στη συσκευή UV ώστε να εμφανιστεί η εικόνα των αποτελεσμάτων.

2.2.5 Καθαρισμός προϊόντος (PCR purification)

Για τον καθαρισμό του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο της Invitrogen PureLink Quick PCR Purification kit (REF: K310001). Τα DNA προϊόντα της Nested PCR καθαρίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αρχικά, σε σωληνάρια erppendorf γίνεται ανάδευση διαλύματος B2 με το προϊόν PCR που επρόκειτο να καθαριστεί. Ο όγκος του B2 (διάλυμα δέσμευσης DNA) υπολογίζεται 4 φορές επί τον όγκο του PCR προϊόντος. Για παράδειγμα, σε προϊόν PCR 45 μl , αντιστοιχούν 180 μl διαλύματος B2. Η ποσότητα από το μίγμα B2-προϊόν PCR μεταφέρεται στην κολώνα καθαρισμού και φυγοκεντρείται σε 10.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το παραπροϊόν στο σωληνάκι συλλογής απορρίπτεται. Έπειτα, προστίθενται στην κολώνα 650 μl διαλύματος W1 (διάλυμα πλύσης) και φυγοκεντρείται σε 10.000 rcf για 1 min στους 25°C. Το παραπροϊόν στο σωληνάκι συλλογής απορρίπτεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 3 min στους 25°C με σκοπό να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα αιθανόλης που περιέχει το διάλυμα W1. Η κολώνα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erppendorf και παραμένει για λίγα λεπτά με το καπάκι ανοικτό ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης. Τέλος, προστίθενται 40 μl από το διάλυμα έκλουσης E1 και η κολώνα φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 3 min στους 25°C. Το εκλυόμενο προϊόν ηλεκτροφορείται ξανά σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να ελεγχθεί η ακεραιότητα του δείγματος και οδηγείται για ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο σύμφωνα με τις οδηγίες της παραγράφου 2.2.6.

2.2.6 Εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας καθαρισμένου προϊόντος PCR

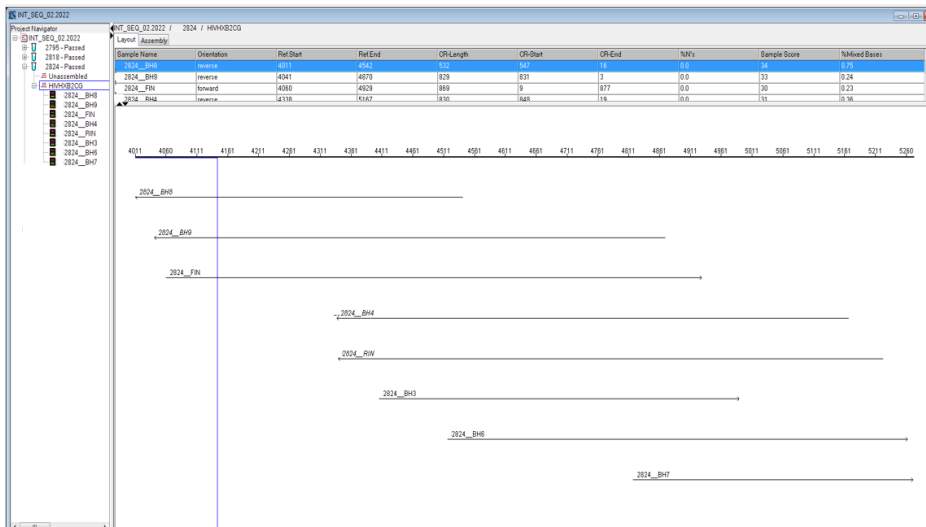
Για τον υπολογισμό της ποσότητας και ποιότητας του καθαρισμένου προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Quawell 9000 Spectrophotometer. Για τη φωτομέτρηση αρχικά καθαρίζεται με ειδικό πανί η βάση υποδοχής του δείγματος. Έπειτα, γίνεται η επιλογή «nucleic acids» και ύστερα «ds DNA» καθώς θα φωτομετρηθεί νουκλεϊκό οξύ και συγκεκριμένα δίκλωνο DNA. Με την πιπέτα τοποθετείται 1 μl δείγματος στην εισδοχή και επιλέγεται το

πλήκτρο «measure». Η καθαρότητα εμφανίζεται ως ο λόγος 260/280 που αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του DNA προς την απορρόφηση των πρωτεϊνών που πιθανόν να υπάρχουν ακόμα στο καθαρισμένο προϊόν, και η συγκέντρωση εκφράζεται σε ng/ul. Οι τιμές καταγράφονται, η εισδοχή καθαρίζεται με το ειδικό πανί και ακολουθεί η φωτομέτρηση των επόμενων δειγμάτων.

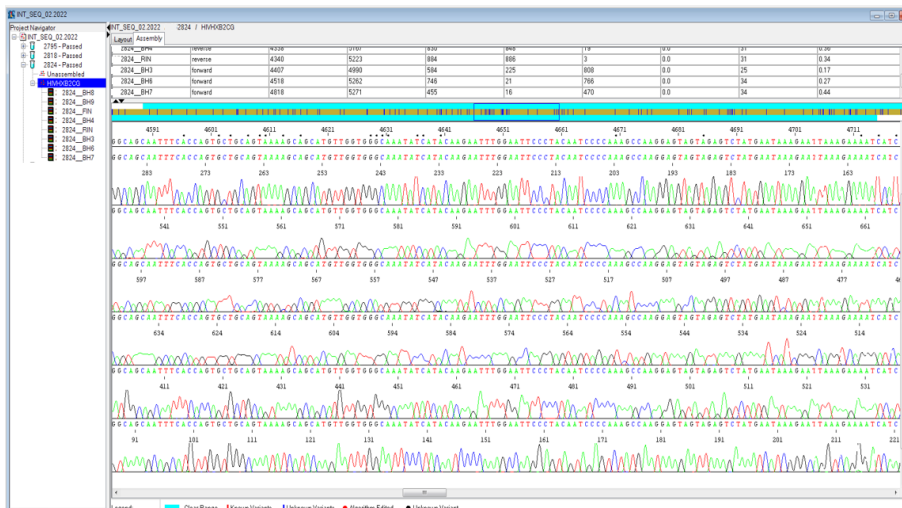
2.2.7 Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση κατά Sanger πραγματοποιήθηκε σε εξωτερική εταιρία συνεργασίας. Για την προετοιμασία των δειγμάτων προηγήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις των ποσοτικοποιημένων προϊόντων με στόχο σε κάθε πηγάδι του 96x plate να υπάρχουν 3μl εκκινητή τελικής συγκέντρωσης 1pm/μl και 12 μl δείγματος τελικής συγκέντρωσης 8ng/μl. Συνολικά προετοιμάστηκαν και αλληλουχήθηκαν 40 δείγματα με 8 εκκινητές το κάθε ένα.

Τα αποτελέσματα τα οποία στάλθηκαν από την εταιρία συνεργασίας επεξεργάστηκαν με το λογισμικό SeqScape™ Software v2.7 της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Το λογισμικό προσδίδει τη δυνατότητα ανακατασκευής και συναρμολόγησης των «διαβασμάτων» από τους 8 εκκινητές που αποστέλλονται από την εταιρία αλληλούχησης μέσω της στοίχισής τους με μία αλληλουχία πρότυπο (Εικόνα 2.1). Λόγω της ιδιαιτερότητας του δείγματος χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος των χρωματογραφημάτων που παράγονται, συνεπώς ελέγχονται χειροκίνητα τα αποτελέσματα που εξάγει το λογισμικό. Ο χρωματικός κώδικας διαβάζεται ως εξής: κόκκινο για θυμίνη (T), πράσινο για αδενίνη (A), μπλε για κυτοσίνη (C), και μαύρο για γουανοσίνη (G). Σε αυτό το σημείο δεν είναι δυνατή η εύρεση μεταλλάξεων αλλά γίνεται μία πρώτη εκτίμηση του γονότυπου καθώς το λογισμικό έχει αποθηκευμένη ως πρότυπο μία αλληλουχία γονότυπου B (γαλάζιο χρώμα) με την οποία εφόσον στοιχίσει τις εισαγόμενες αλληλουχίες ενδιαφέροντος (κίτρινο χρώμα) εμφανίζει με κάθετες μπλε γραμμές τα νουκλεοτίδια που διαφέρουν (Εικόνα 2.2). Εφόσον γίνει η επεξεργασία, η αλληλουχία του δείγματος αποθηκεύεται σε αρχείο Fasta ώστε να ακολουθήσει η τελική ανάλυση για γονοτύπηση και αντοχή με τις βάσεις δεδομένων που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.



Εικόνα 2.1 Στοιχισή Αλληλουχιών από τα «Διαβάσματα» των Εκκινητών. Πηγή: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401740.pdf>

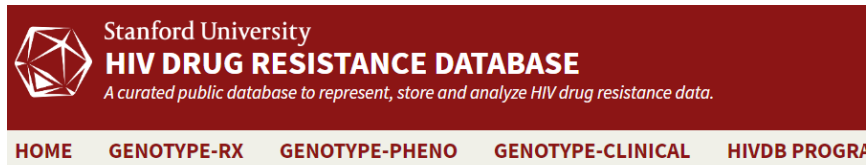


Εικόνα 2.2 Χρωματογράφημα Αλληλουχίας. Πηγή: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401740.pdf>

2.2.8 Γονοτύπηση και πιθανή ανοχή

Για τη γονοτύπηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι διαδικτυακές βάσεις δεδομένων HIV Drug Resistance Database του Stanford University, η REGA HIV Subtyping Tool του KU Leuven University, και η Comet HIV-1 του Luxembourg Institute of Health. Η HIV Drug Resistance Database εντοπίζει και τις μεταλλάξεις που πιθανόν να υπάρχουν στην αλληλουχία κάθε δείγματος και τις συσχετίζει με την εκδήλωση ανοχής σε αντιρετροϊκή θεραπεία. Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν οι βάσεις δεδομένων είναι μέσω σύγκρισης-στοίχησης της αλληλουχίας που εισάγεται με πρότυπες αλληλουχίες που υπάρχουν στο λογισμικό του προγράμματος. Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων και του γονότυπου δίνεται με βάση την αλληλουχία με την οποία το δείγμα ενδιαφέροντος φέρει τη μικρότερη απόκλιση

και εμφανίζεται με τη μορφή ποσοστού. Στην **Εικόνα 2.3** παρουσιάζεται ο τρόπος εμφάνισης των αποτελεσμάτων από τη βάση δεδομένων HIVdb. Στην **Εικόνα 2.4** παρουσιάζεται ο τρόπος εμφάνισης των γονοτύπων από τη REGA HIV Subtyping Tool και στην **Εικόνα 2.5** τα αποτελέσματα γονοτύπησης της Comet HIV-1.



1. Consensus for segment HIVHXB2CG for specimen

Sequence summary

Sequence includes IN:

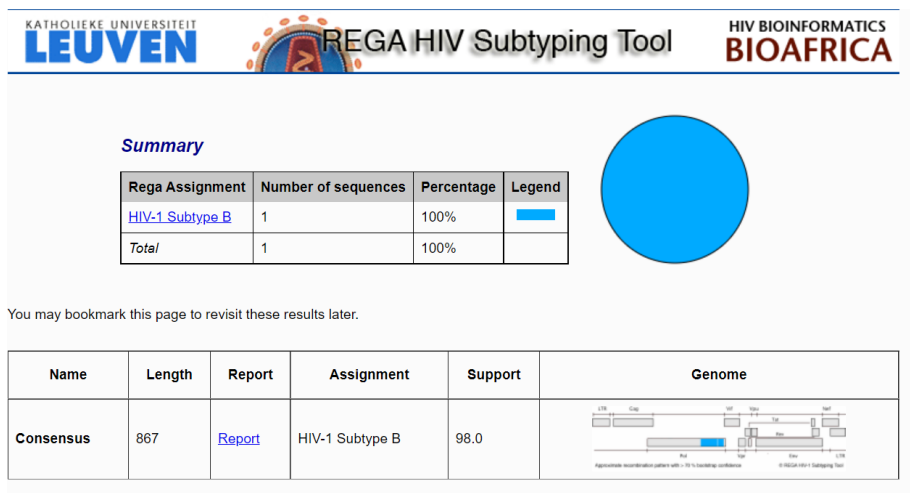
Subtype:

codons 1 - 288

B (3.82%)

- [KJ704787](#): United States (1983); B (3.82%); best match
- [L31963](#): France (1983); B (4.28%)
- [FJ647145](#): South Africa (1985); B (4.51%)
- [AY173951](#): Thailand (1990); B (4.97%)
- [D10112](#): United Kingdom (1983); B (4.97%)
- [HQ026550](#): Korea, Republic of (1992); B (4.97%)
- [U34603](#): Netherlands (1986); B (4.97%)
- [AF042100](#): Australia (1986); B (5.09%)
- [AY037268](#): Argentina (1998); B (5.09%)
- [AY682547](#): Russian Federation (2004); B (5.09%)

Εικόνα 2.3 Αποτελέσματα γονοτύπησης της βάσης δεδομένων HIVdb. Πηγή: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>.



Εικόνα 2.4 Αποτελέσματα γονοτύπησης της βάσης δεδομένων REGA HIV Subtyping Tool. Πηγή: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>.

COMET HIV-1

(Context-based Modeling for Expeditious Typing)



LUXEMBOURG
INSTITUTE
OF HEALTH

[COMET HIV-1](#) <> [COMET HIV-2](#) <> [COMET HCV](#)

The COMET tool rapidly classifies HIV-1 nucleotide sequences into subtypes. You can submit your sequences either by pasting them in the form (b) or uploading them (a).

Version	Changes	Date
2.4	Additional support up to 118_BC, addition of subtypes not present before for HIV-1	2022-07-04
2.3	Additional support for CRF 79_0107 - 96_cpx for HIV-1	2018-08-23
2.2	Additional support for CRF 50_A1D - 78_cpx for HIV-1	2016-12-01
2.1	Added bootstrap support levels (100 samples per sequence).	2016-09-22
2.0	Rewritten COMET in GO (Uses much less memory, faster; improved accuracy slightly).	2016-09-18
1.0	Smaller HIV-1 recombination detection window (should detect more URF), CRF additions to the training set	2014-03-26
0.5	new HIV-1 thresholds, should slightly improve the results	2012-06-11
0.3	Additional support for CRF 44_BF - 49_cpx for HIV-1	2011-12-20
0.1	Initial version	2010-03-27

[Back to the submission form](#)

1 sequence(s) analyzed

[Download the results in CSV format \(tab separated, available for 3 days\)](#)

1 out of 1 results are shown (all the results can be downloaded when the complete analysis is finished).

name	virus	subtype	support (1)
ConsensusforsegmentHIVHXB2CGforspecimen	HIV-1	B	93.0

(1) 100 bootstrap samples per sequence, values shown in percentage

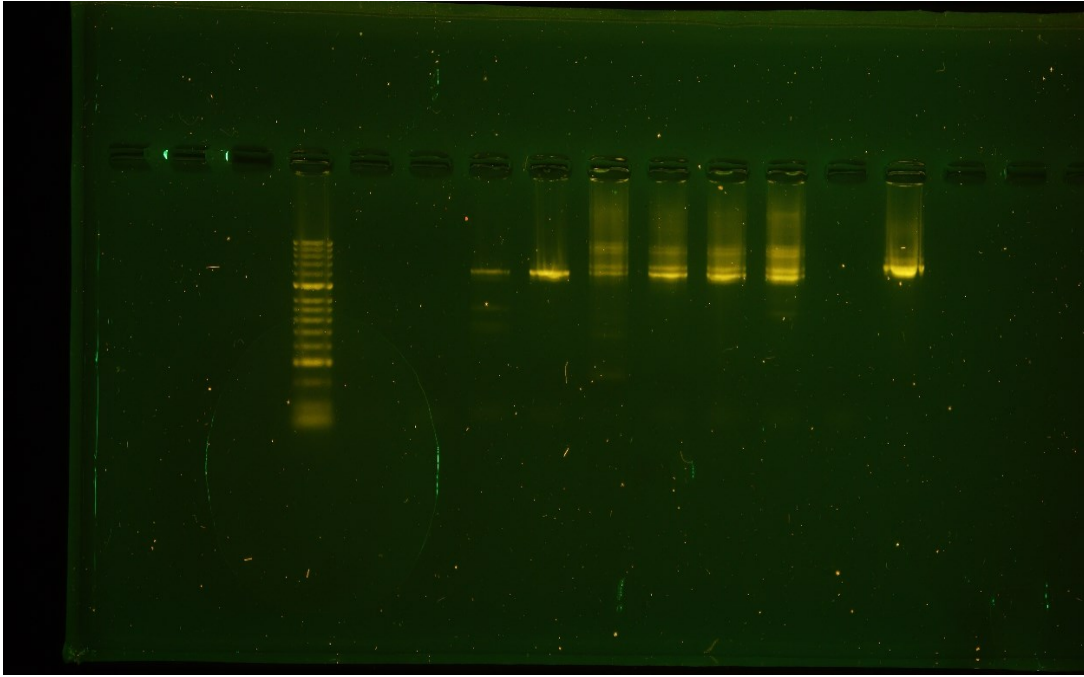
Εικόνα 2.5 Αποτελέσματα γονοτύπησης της βάσης δεδομένων Comet HIV-1. Πηγή: <https://comet.lih.lu/index.php?job=6b46471b512c219b63b801411854e77e&cat=hiv1>.

3. Αποτελέσματα

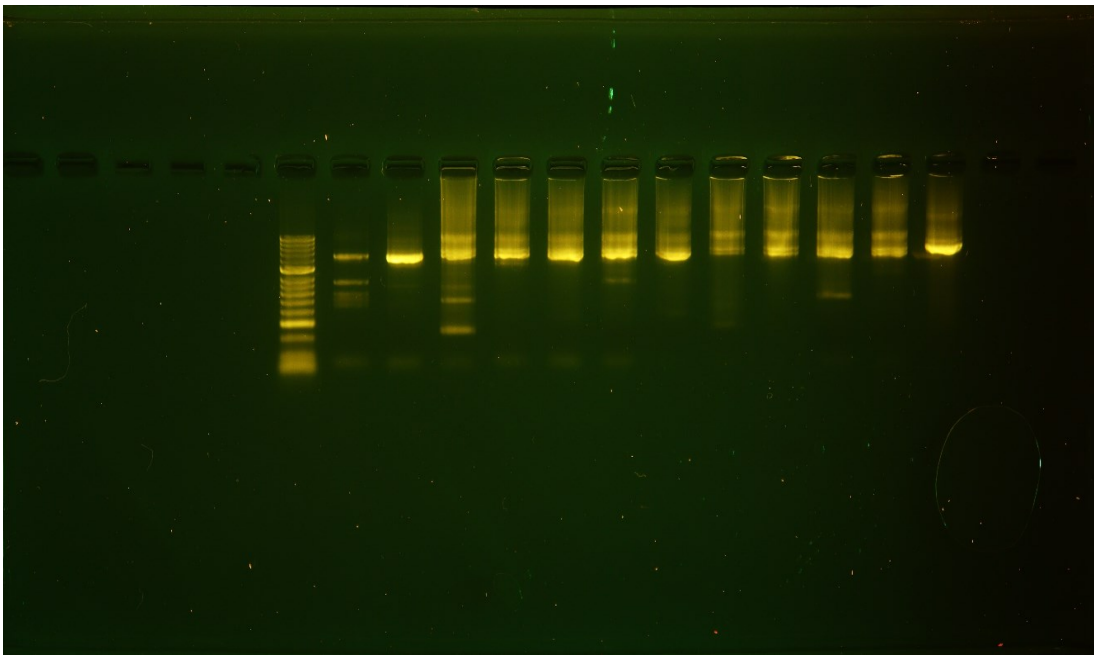
Από τα 61 δείγματα που δοκιμαστήκαν, τα 40 (65,5%) κρίθηκαν κατάλληλα για καθαρισμό και αποστολή για αλληλούχηση (πίνακας 3). Η εκτίμηση της επιτυχίας ή αποτυχίας της πειραματικής διαδικασίας έγινε με την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος αγαρόζης. Η ύπαρξη μάντας κατά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αντανακλά το θετικό αποτέλεσμα ενώ η απουσία μάντας το αρνητικό (αποτυχία διαδικασίας). Όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες, δεν εμφανίστηκε μάντα για όλα τα δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν με PCR. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες όπως καταστροφή του δείγματος από RNAάσες, καταστροφή λόγω παρατεταμένης παραμονής εκτός ψύξης, ή σε κακό χειρισμό του δείγματος σε κάποιο βήμα της συνολικής πειραματικής διαδικασίας. Οι διπλές μάντες οφείλονται στην αστάθεια του RNA και την ευαισθησία του στους παράγοντες που προαναφέρθηκαν, οι οποίοι ως αποτέλεσμα έχουν κόψει το μόριο RNA σε περισσότερα τμήματα.

Πίνακας 3. Δείγματα HIV

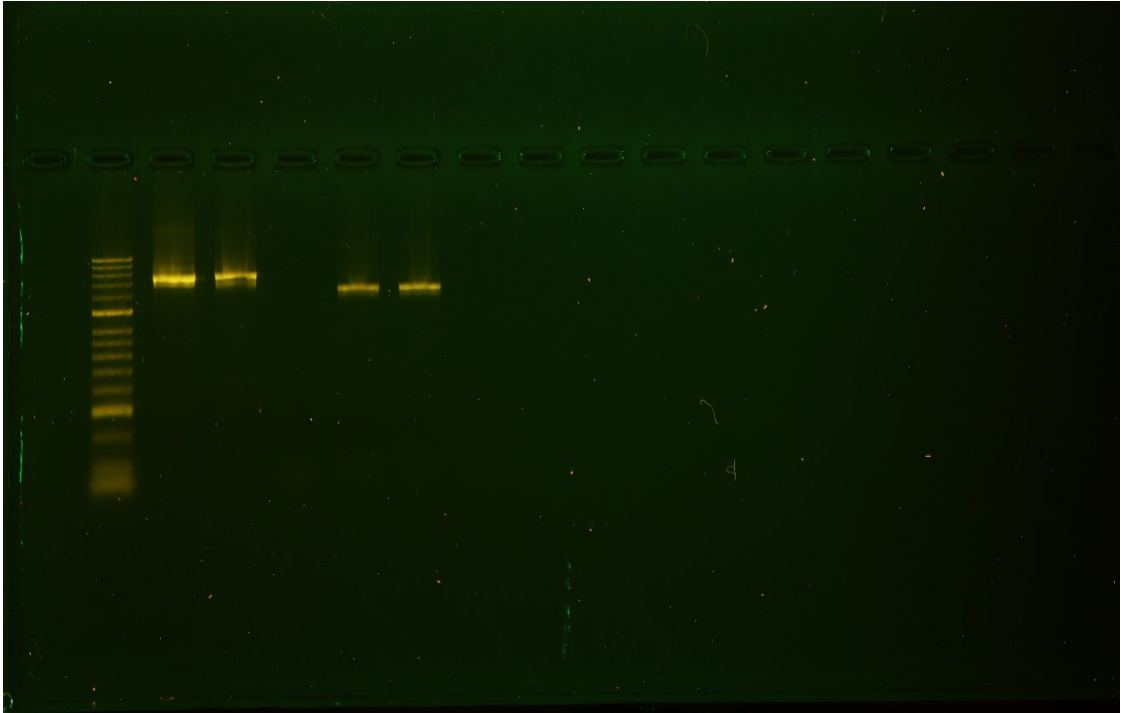
	Θετικά	Αρνητικά	
	2795	2966	
	2824	2982	
	3427	3592	
	3523	4045	
	4861	4232	
	4977	4394	
	847	3302	
	864	2801	
	915	2810	
	2826	2920	
	3846	3043	
	5035	3124	
	5059	3255	
	5098	3256	
	5340	3300	
	5359	3318	
	5410	3336	
	5476	3526	
	5540	3859	
	940	5478	
	040	5722	
	2818		
	3053		
	3883		
	3902		
	3968		
	4002		
	4279		
	5773		
	061		
	081		
	3291		
	3292		
	3293		
	3294		
	3295		
	3298		
	4500		
	4518		
	4548		
Σύνολο	40 (65,5%)	21 (35,5%)	61 (100%)



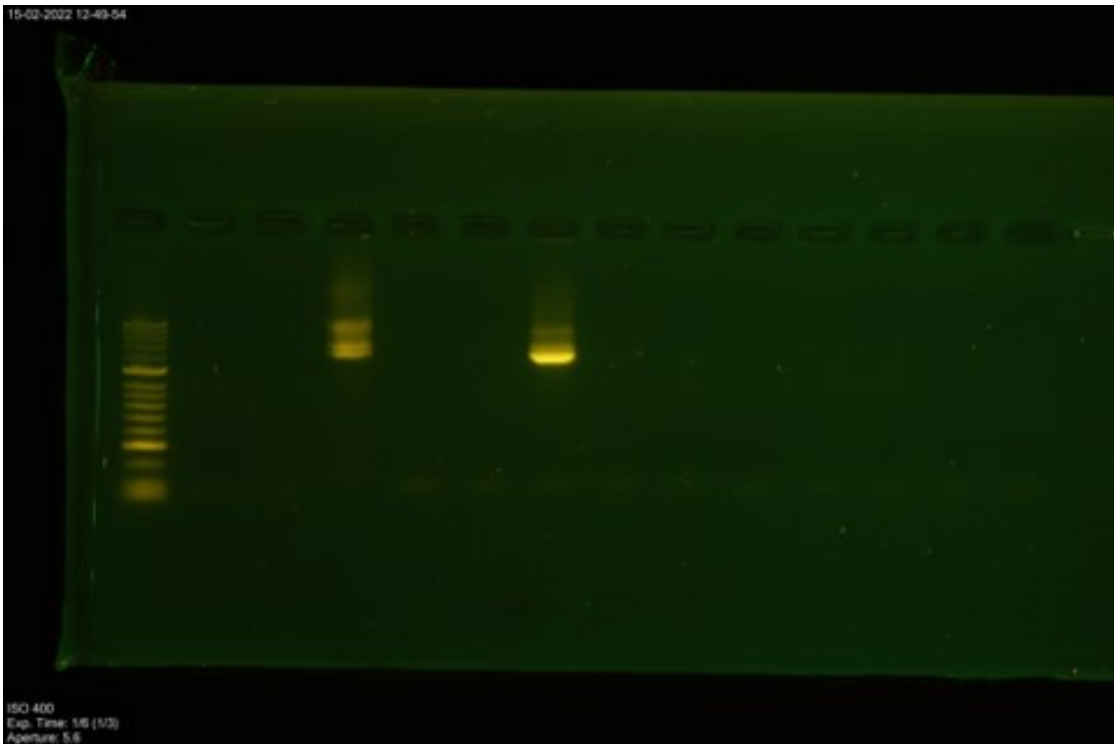
Εικόνα 3. 1 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 14/01/2022



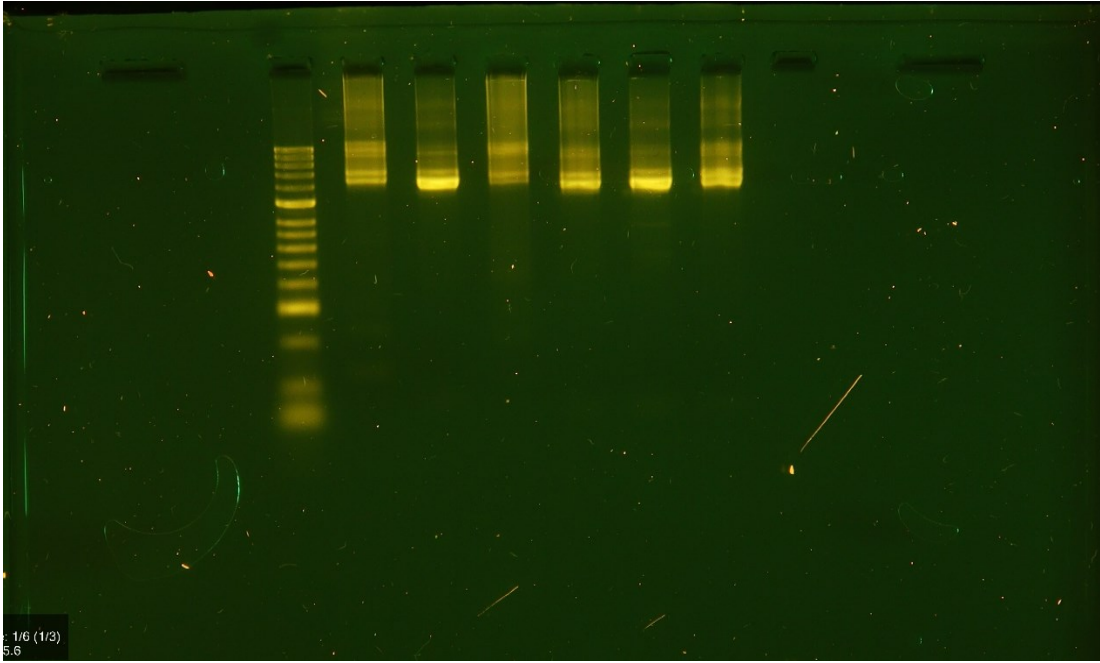
Εικόνα 3. 2 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 31/01/2022



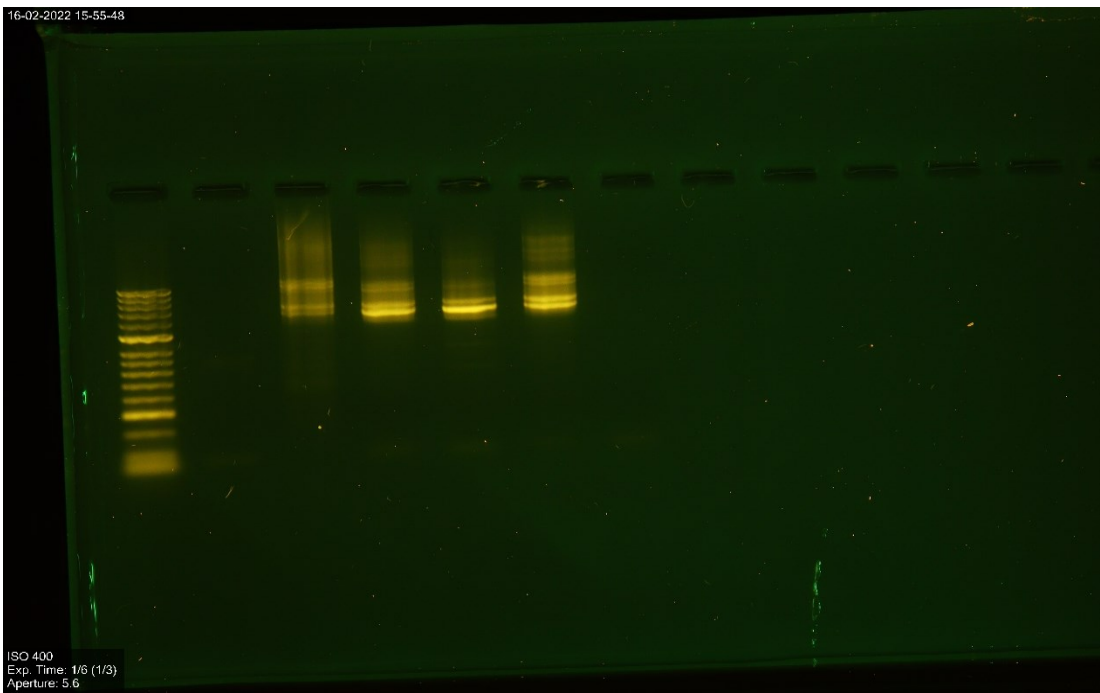
Εικόνα 3. 3 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 07/02/2022



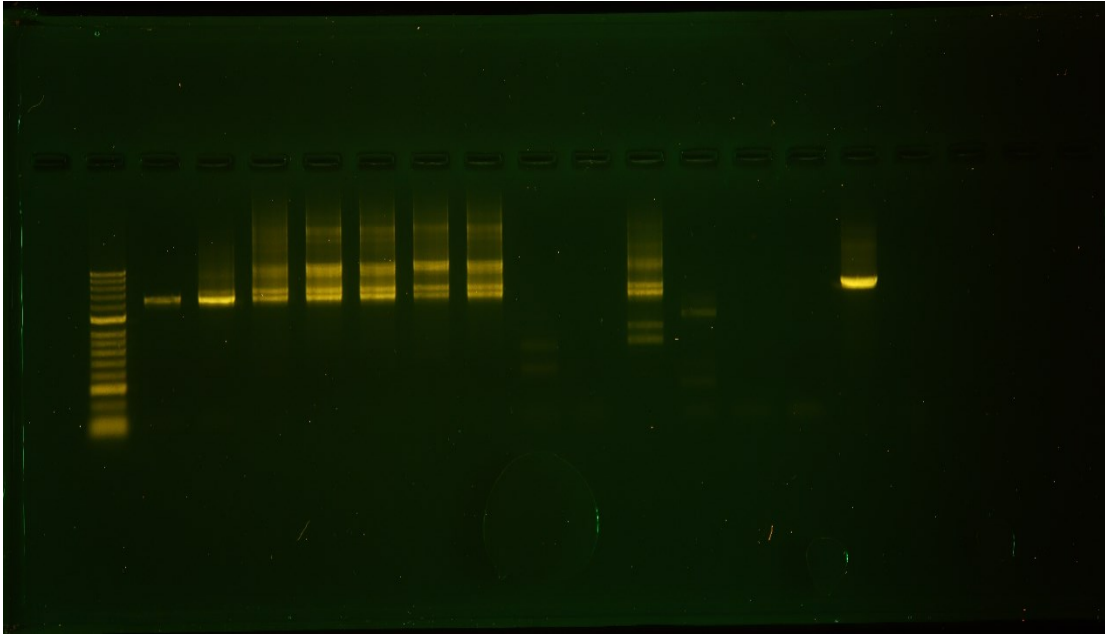
Εικόνα 3. 4 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 10/02/2022.



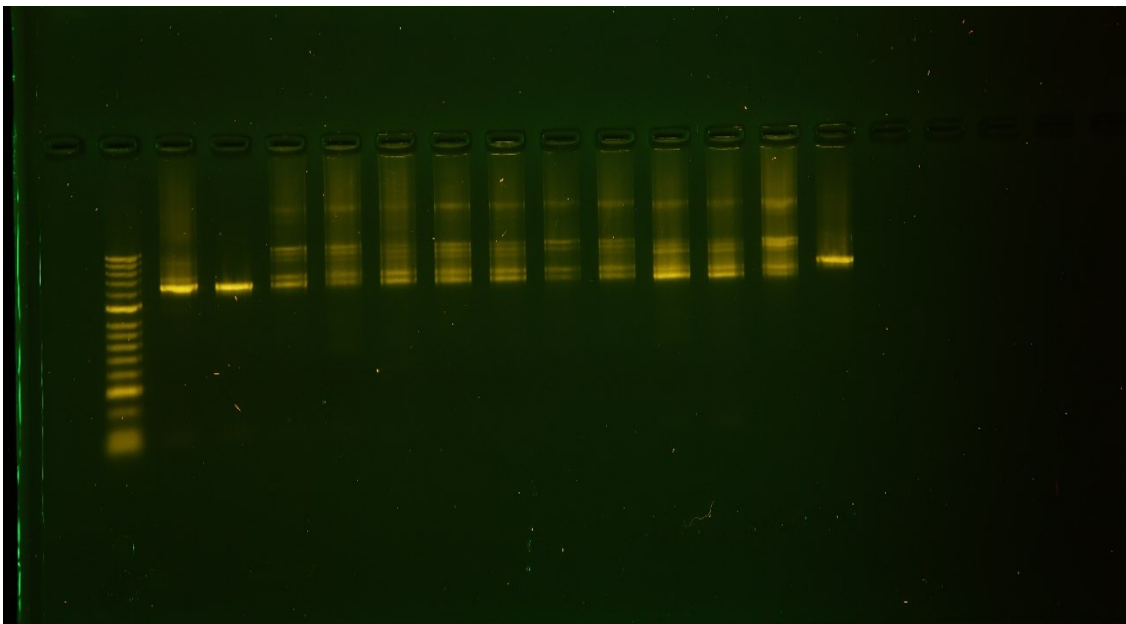
Εικόνα 3. 5 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 14/02/2022



Εικόνα 3. 6 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 20/02/2022



Εικόνα 3. 7 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 03/03/2022



Εικόνα 3. 8 Μπάντες σε Πήκτωμα Αγαρόζης 17/03/2022

Είναι εμφανές πως οι μονές μπάντες αφορούν δείγματα τα οποία έχουν επεξεργαστεί υπό βέλτιστες συνθήκες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των δειγμάτων που παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**, δύο από τα σαράντα δείγματα φορέων του HIV-1 που αναλύθηκαν

βρέθηκαν να εκδηλώνουν αντοχή στην αντίστοιχη θεραπεία. Το δείγμα 847 εμφανίζει μεταλλάξεις στα κωδικόνια 140, 148, και 155. Όλες οι μεταλλάξεις είναι αντικατάστασης βάσης. Στο κωδικόνιο 140 έχει κωδικοποιηθεί το αμινοξύ σερίνη αντί της γλυκίνης, στο κωδικόνιο 148 το αμινοξύ ιστιδίνη αντί της γλουταμίνης, και στο κωδικόνιο 155 εμφανίζεται πάλι ιστιδίνη αντί της αναμενόμενης ασπαραγίνης. Αυτές οι μεταλλάξεις προσδίδουν στον ιό αντοχή σε όλα τα φάρμακα INSTIs (BIC, CAB, DTG, EVG, RAL). Το δεύτερο δείγμα, το 2826, εμφανίζει μετάλλαξη σε ένα μόνο κωδικόνιο. Συγκεκριμένα, έχει αντικατασταθεί η ασπαραγίνη του κωδικονίου 155 από ιστιδίνη. Αυτή η μετάλλαξη προσδίδει στον ιό υψηλή αντοχή στα φάρμακα Elvitegravir (EVG) και Raltegravir (RAL) και χαμηλή αντοχή στα Cabotegravir (CAB), Bictegravir (BIC), και Dolutegravir (DTG).

Πίνακας 4. Αποτελέσματα Αλληλούχησης

Δείγμα	Γονότυπος			Μεταλλάξεις	Αντοχή
	HIV db	Rega	Comet		
2795	A	A1	A1		
2824	G	G	G		
3427	G	G	G		
3523	G	G	unassigned_1, G-A1		
4861	G	G (14_BG)	G (check for 14_BG)		
4977	G	G	G (check for 02_AG)		
847	B	B	B	G140S, N155H	Q148H, BIC, CAB, DTG, EVG, RAL
864	G	G	G		
915	B	B	B		
2826	B	B	B	N155H	EVG, RAL (LR ¹ : BIC, CAB, DTG)
3846	G	G,A1	unassigned_1, G-A2		
5035	G	G	G		
5059	B	B	B		
5098	G	G	unassigned_1, G-A1		
5340	G	G	G		
5359	G	G (14_BG)	G		
5410	G	G	G		
5476	G	G	G (check for 02_AG)		
5540	G	G (14_BG)	G		
940	A	A1	A1		
040	G	G	G		
2818	A	A1	A1		
3053	A	A1	A1		
3883	G	G,A1	G		
3902	CRF35_AD	A (35_AD)	A1 (check for 35_AD)		
3968	G	G	G (check for 14_BG)		
4002	G	G	G (check for 14_BG)		
4279	G	G	G		
5773	G	G (14_BG)	G (check for 14_BG)		
061	CRF02_AG	G	G (check for 02_AG)		
081	A	A(A1-like)	A1		
3291	A	A1	A1		
3292	A	A1	A1		
3293	A	A1	A1		
3294	A	A1	A1		
3295	A	A1	A1		
3298	A	A1	A1		
4500	CRF35_AD	A1	A1 (check for 35_AD)		
4518	G	G	G		
4548	G	G	G		

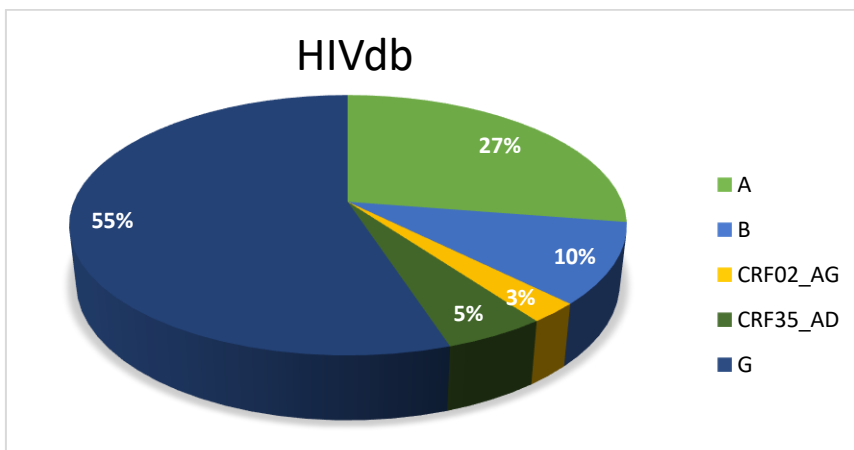
¹ LR (Low Resistance)= Χαμηλή Αντοχή

Πέρα από τις μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή στη θεραπεία, ανιχνεύτηκαν και μεταλλάξεις πολυμορφισμού. Συγκεκριμένα, σε 22 δείγματα από τα 40 (55%) εντοπίστηκαν πολυμορφικές μεταλλάξεις εκ των οποίων 12 αφορούσαν τη μετάλλαξη M50I (55%), 6 τη μετάλλαξη L74I (27%), 3 τη μετάλλαξη L74M (13%), και 1 άτομο έφερε δύο μεταλλάξεις πολυμορφισμού, την L74I και τη V151I (5%). Τα δείγματα που εμφάνισαν μεταλλάξεις πολυμορφισμού παρουσιάζονται **στον πίνακα 5**.

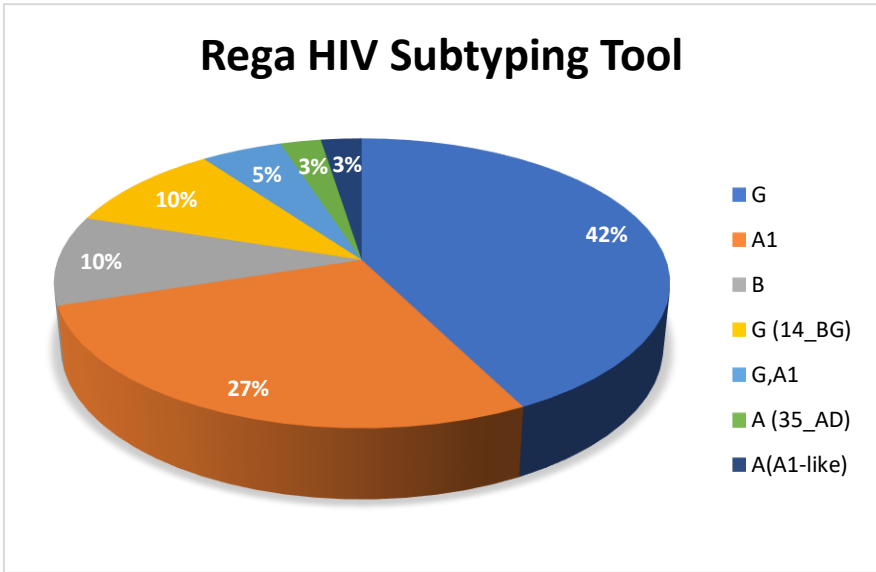
Πίνακας 5. Πολυμορφικές μεταλλάξεις

Δείγματα	Πολυμορφικές Μεταλλάξεις
2824	M50I
847	L74I, V151I
864	M50I
915	M50I
3427	M50I
5035	M50I
5340	M50I
5410	M50I
5476	M50I
2818	L74I
3040	M50I
3053	L74M
3902	L74M
4002	M50I
4279	M50I
4500	L74M
4518	M50I
3292	L74I
3293	L74I
3294	L74I
3295	L74I
3298	L74I

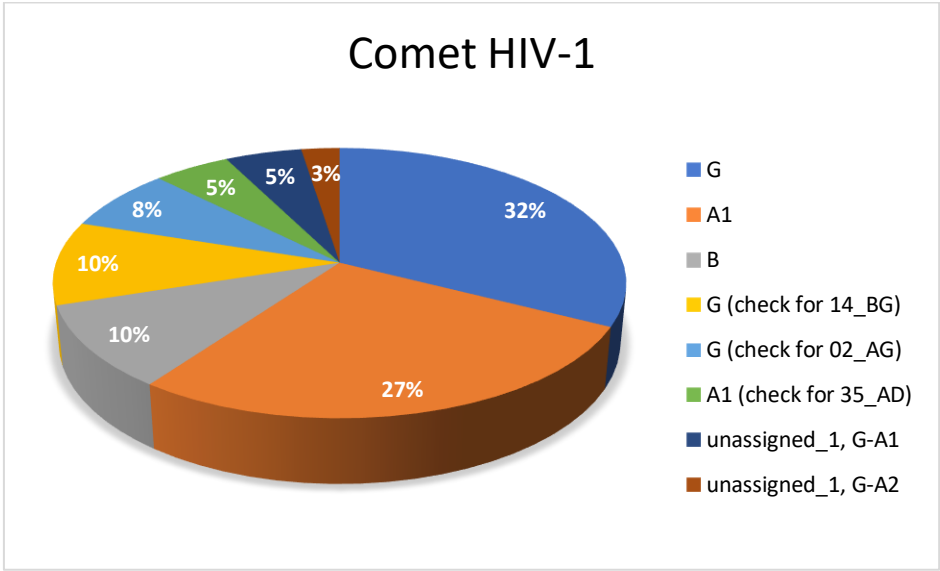
Όσον αφορά τους γονότυπους των δειγμάτων, σύμφωνα με τα αποτελέσματα γονοτύπησης του HIVdb, 22 από τα 40 δείγματα είναι γονότυπου G (55%), 11 ανήκουν στον γονότυπο A (27,5%), 4 είναι γονότυπου B (10%), και τα υπόλοιπα 3 δείγματα είναι ανασυνδυασμένες μορφές CRF02_AG (1/40; 2,5%) και CRF35_AD (2/40; 5%) (Γράφημα 1). Χρησιμοποιήθηκαν και άλλες 2 βάσεις δεδομένων. Τα αποτελέσματα της REGA HIV Subtyping Tool έδειξαν πως 17 άτομα έφεραν τον υπότυπο G (42,5%), 11 άτομα τον υπότυπο A1 (27,5%), 4 άτομα τον υπότυπο B (10%), ενώ οι υπόλοιποι 8 (20%) έφεραν ανασυνδυασμένους υποτύπους, συγκεκριμένα 4 (10%) τον υπότυπο G (14_BG), 2 (5%) τον υπότυπο G_A1, 1 (2,5%) τον υπότυπο A (35_AD), και 1 (2,5%) τον υπότυπο A(A1-like). Η Comet HIV-1 έδωσε ως αποτέλεσμα 13 (32,5%) υπότυπου G, 11 (27,5%) υπότυπου A1, 4 (10%) υπότυπου B, και τα υπόλοιπα 12 (30%) δείγματα αφορούσαν ανασυνδυασμένες μορφές υποτύπων εκ των οποίων, 4 (10%) ανήκαν στον υπότυπο G (check for 14_BG), 3 (7,5%) ανήκαν στον υπότυπο G (check for 02_AG), 2 (5%) στον υπότυπο A1 (check for 35_AD), 2 (5%) ήταν απροσδιόριστης μορφής G-A1, και 1 (2,5%) απροσδιόριστης μορφής G-A2.



Γράφημα 1. Αποτελέσματα Γονοτύπησης HIVdb (Σύνολο 40 δείγματα)



Γράφημα 2. Αποτελέσματα Γονοτύπησης Rega HIV Subtyping Tool (Σύνολο 40 δείγματα)



Γράφημα 3. Αποτελέσματα Γονοτύπησης Comet HIV-1 (Σύνολο 40 δείγματα)

4. Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας το *in-house* πειραματικό πρωτόκολλο κρίνεται λειτουργικό για την εύρεση μεταλλάξεων αντοχής έναντι φαρμάκων αναστολείς ιντεγκράσης σε δείγματα φορέων του ιού HIV-1. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger ήταν ευανάγνωστα και επαρκή για την εύρεση μεταλλάξεων και υποτύπων. Σε μελλοντικές εφαρμογές του παραπάνω πρωτοκόλλου θα μπορούσαν να γίνουν αλλαγές στα ένζυμα, στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων, καθώς και αλλαγές στις μεθόδους απομόνωσης και καθαρισμού των νουκλεϊκών οξέων, RNA και DNA, οι οποίες ίσως αποδώσουν καλύτερα αποτελέσματα και λύση για τα δείγματα που δεν εμφάνισαν μπάντα στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Επιπρόσθετα, η αλλαγή της μεθόδου αλληλούχησης (π.χ., NGS) μπορεί να αποδώσει περισσότερα στοιχεία και μεταλλάξεις στο γονίδιο που ίσως να χάνονται με την αλληλούχηση κατά Sanger.

Ο αριθμός των δειγμάτων που εμφάνισαν μεταλλάξεις αντοχής ήταν μικρός (2/40) αλλά ποσοστιαία ανέρχεται στο 5%, ποσοστό σχετικά μεγάλο και αντικρουόμενο με το συνολικό ποσοστό αντοχής σε αναστολείς ιντεγκράσης παγκοσμίως. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα δύο δείγματα ήταν οι G140S, Q148H, N155H στο δείγμα 847 και η N155H στο δείγμα 2826. Η μετάλλαξη G140S συνήθως συνοδεύει την Q148H, οι οποίες μεταλλάξεις προκύπτουν σε άτομα που λαμβάνουν RAL και EVG. Προσδίδουν αντοχή έναντι του αντιρετροϊκού φαρμάκου RAL, και μειώνουν την ευαισθησία έναντι του DTG (Smith, Zhao, et al., 2020; Zhang & Duan, 2021). Η μετάλλαξη N155H συναντάται επίσης σε άτομα υπό αντιρετροϊκή θεραπεία και ευθύνεται για την αποτυχία της θεραπείας με RAL και EVG, η οποία σε συνδυασμό με δευτερεύουσες μεταλλάξεις, κυρίως την Q148H, οδηγεί σε αποτυχία του DTG (Malet et al., 2018).

Οι πολυμορφικές μεταλλάξεις ήταν σε ποσοστό 55% M50I, 27% L74I, 13% L74M, και 5% L74I και V151I μαζί. Η μετάλλαξη M50I σε συνδυασμό με την V151I εξασθενούν τον ιό και οδηγούν σε ελαττωματική ωρίμανση της πολυπρωτεΐνης GagPol. Η βλάβη αντικαθίσταται εάν υπάρχουν οι επιπρόσθετες μεταλλάξεις N79S ή S17N (Yang et al., 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η αντίθεση πως η μετάλλαξη M50I σε συνδυασμό με την R263K προσδίδουν αντοχή στον ιό έναντι των αντιρετροϊκών DTG και BIC αλλά, ο φραγμός που εμφανίζεται κατά την ωρίμανση της πολυπρωτεΐνης GagPol δρα ως εξελικτικό και προσαρμοστικό εμπόδιο για τον HIV (Wares et al., 2014). Η μετάλλαξη L74I συναντάται σε νεοδιαγνωσθέντα άτομα σε ποσοστό 3% έως 30% (αναλόγως τον υπότυπο του ιού), καθώς μεταδίδεται και συντηρείται μεταξύ φορέων. Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί να συνεισφέρει στην αντοχή του ιού έναντι των αναστολέων της ιντεγκράσης (el Bouzidi et al., 2020; Mikasi

et al., 2021). Εξίσου, η L74M συναντάται σε ποσοστό 0.5% έως 5% (αναλόγως τον υπότυπο) σε νεοδιαγνωσθέντα άτομα χωρίς να επηρεάζει την ευαισθησία του ιού (Kirichenko et al., 2020).

Σχετικά με τη γονοτύπηση, χρησιμοποιήθηκαν 3 βάσεις δεδομένων οι οποίες συμφωνούν πως ο γονότυπος G συναντάται στην πλειοψηφία. Πιο αναλυτικά, η HIVdb απέδωσε το 55% των δειγμάτων στο γονότυπο G, η REGA HIV Subtyping Tool βρήκε το γονότυπο G σε ποσοστό 42,5%, και η Comet HIV-1 σε ποσοστό 32,5%. Σε αμέσως επόμενο ποσοστό ανέρχεται ο γονότυπος A που και οι τρεις βάσεις δεδομένων HIVdb, REGA, και Comet έδωσαν ποσοστιαίο αποτέλεσμα 27,5%. Έπειτα, ο υπότυπος B βρέθηκε σε χαμηλότερο αριθμό δειγμάτων, 10% σε όλες τις βάσεις δεδομένων. Τέλος, σχετικά με τις ανασυνδυασμένες μορφές γονοτύπων το ποσοστό ανέρχεται σε 7,5%, 20%, και 30% στην κάθε βάση δεδομένων αντίστοιχα. Η μεταξύ τους απόκλιση σχετίζεται με τον τρόπο που λειτουργούν και την ικανότητα της κάθε βάσης να αναγνωρίσει ανασυνδυασμένα τμήματα πάνω στο γονίδιο. Πιθανόν, ο λόγος εύρεσης μεγάλης ποικιλίας γονοτύπων, ιδιαίτερα ανασυνδυασμένων, σχετίζεται με την τοποθεσία της Ελλάδας. Λόγω της γεωγραφικής της θέσης αποτελεί σταυροδρόμι τριών ηπείρων όπου η εισροή ατόμων ποικίλων γονοτύπων ευνοείται και αυξάνεται η ποικιλότητα των στελεχών που εντοπίζονται κατά τη γονοτύπηση.

Εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν δεν μπορεί να αχθεί κάποιο συμπέρασμα για τον εγχώριο επιπολασμό των μεταλλάξεων αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα έναντι του γονιδίου της ιντεγκράσης αλλά, επισημάνει τη σημαντικότητα της παρακολούθησης μεταλλάξεων έναντι των INSTIs ώστε να υπάρχει άμεση εναλλακτική φαρμακευτική απόκριση σε περίπτωση αύξησης του επιπολασμού. Η έλλειψη δεδομένων μελετών, κυρίως ελληνικών, διεγείρει την ανάγκη για διεξαγωγή λεπτομερών, περιεκτικών, και πλήρη ερευνών.

Συνολικά, παρά το γεγονός πως η HIV-1 λοίμωξη αντιμετωπίζεται πλέον ως χρόνιο νόσημα και τα άτομα που ζουν με τον ιό έχουν βελτιώσει σε μεγάλο ποσοστό την ποιότητα αλλά και το προσδόκιμο ζωής τους, η επιστημονική κοινότητα πρέπει να βρίσκεται σε εγρήγορση και να εξακολουθεί να ψάχνει τρόπους θεραπευτικής προσέγγισης για τα άτομα που εμφανίζουν μεταλλάξεις αντοχής κατά την αρχική διάγνωσή τους αλλά και κατά τη διάρκεια της αντιρετροϊκής θεραπείας τους.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Anstett, K., Brenner, B., Mesplede, T., & Wainberg, M. A. (2017). HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. In *Retrovirology* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0360-7>
- Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
- Badaya, A., & Sasidhar, Y. U. (2020). Inhibition of the activity of HIV-1 protease through antibody binding and mutations probed by molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62423-y>
- Bbosa, N., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 14, Issue 3, pp. 153–160). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/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. *Infection, Genetics and Evolution*, 46(January 2019), 180–189. <https://doi.org/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*. <https://doi.org/10.7554/eLife.50524.001>
- 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 naïve HIV-infected individuals. *PLoS ONE*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229275>
- Cañada, J. E., Delgado, E., Gil, H., Sánchez, M., Benito, S., García-Bodas, E., Gómez-González, C., Canut-Blasco, A., Portu-Zapirain, J., de Adana, E. S., de la Peña, M., Ibarra, S., Cilla, G., Irribarren, J. A., Martínez-Sapiña, A., & Thomson, M. M. (2021). Identification of a new hiv-1 bc intersubtype circulating recombinant form (Crf108_bc) in Spain. *Viruses*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/v13010093>
- CDC. (2021). *US Public Health Service: PREEXPOSURE PROPHYLAXIS FOR THE PREVENTION OF HIV INFECTION IN THE UNITED STATES – 2021 UPDATE, A CLINICAL PRACTICE GUIDELINE*.
- Chen, B. (2019). Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. In *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Issue 10, pp. 878–891). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.002>
- Cilento, M. E., Kirby, K. A., & Sarafianos, S. G. (2021). Avoiding Drug Resistance in HIV Reverse Transcriptase Graphical Abstract HHS Public Access. *Chem Rev*, 121(6), 3271–3296. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00967>
- Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., & Shafer, R. W. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 46, pp. 292–307). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>

- Craigie, R. (2012). The molecular biology of HIV integrase. In *Future Virology* (Vol. 7, Issue 7, pp. 679–686). <https://doi.org/10.2217/fvl.12.56>
- de Clercq, E., & Li, G. (2016). *Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
- Deeks, E. D. (2018). Bictegravir/emtricitabine/tenofovir alafenamide: A review in HIV-1 infection. In *Drugs* (Vol. 78, Issue 17, pp. 1817–1828). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1010-7>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(46), E9855–E9862. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716098114>
- Eilers, G., Gupta, K., Allen, A., Zhou, J., Hwang, Y., Cory, M. B., Bushman, F. D., & van Duyn, G. (2020). Influence of the amino-terminal sequence on the structure and function of HIV integrase. *Retrovirology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00537-x>
- el Bouzidi, K., Kemp, S. A., Datir, R. P., Murtala-Ibrahim, F., Aliyu, A., Kwaghe, V., Frampton, D., Roy, S., Breuer, J., Sabin, C. A., Ogbanufe, O., Charurat, M. E., Bonsall, D., Golubchik, T., Fraser, C., Dakum, P., Ndembu, N., & Gupta, R. K. (2020). High prevalence of integrase mutation L74I in West African HIV-1 subtypes prior to integrase inhibitor treatment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(6), 1575–1579. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa033>
- Engelman, A. N., & Singh, P. K. (2018). Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 75, Issue 14, pp. 2491–2507). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2772-5>
- Giannini, A., Vicenti, I., Materazzi, A., Boccuto, A., Dragoni, F., Zazzi, M., & Saladini, F. (2019). The HIV-1 reverse transcriptase E138A natural polymorphism decreases the genetic barrier to resistance to etravirine in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(3), 607–613. <https://doi.org/10.1093/jac/dky479>
- Ha, B., Larsen, K. P., Zhang, J., Fu, Z., Montabana, E., Jackson, L. N., Chen, D. H., & Puglisi, E. V. (2021). High-resolution view of HIV-1 reverse transcriptase initiation complexes and inhibition by NNRTI drugs. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22628-9>
- Hanke, K., Faria, N. R., Kühnert, D., Yousef, K. P., Hauser, A., Meixenberger, K., Hofmann, A., Bremer, V., Bartmeyer, B., Pybus, O., Kücherer, C., von Kleist, M., & Bannert, N. (2019). Reconstruction of the Genetic History and the Current Spread of HIV-1 Subtype A in Germany. *Journal of Virology*, 93(12). <https://doi.org/10.1128/jvi.02238-18>
- He, S., Song, W., Guo, G., Li, Q., An, M., Zhao, B., Gao, Y., Tian, W., Wang, L., Shang, H., & Han, X. (2022). Multiple CRF01_AE/CRF07_BC Recombinants Enhanced the HIV-1 Epidemic

- Complexity Among MSM in Shenyang City, Northeast China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855049>
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 182–192. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2011.12.001>
- Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., Ghys, P. D., Abimiku, A. G., Agwale, S., Archibald, C., Avidor, B., Barbás, M. G., Barre-Sinoussi, F., Barugahare, B., Belabbes, E. H., Bertagnolio, S., Birx, D., ... Zhang, R. (2019). Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(2), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30647-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30647-9)
- Holec, A. D., Mandal, S., Prathipati, P. K., & Destache, C. J. (2017). Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors: A Thorough Review, Present Status and Future Perspective as HIV Therapeutics. *Current HIV Research*, 15(6). <https://doi.org/10.2174/1570162x15666171120110145>
- Hu, W. S., & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
- Kamelian, K., Lepik, K. J., Chau, W., Yip, B., Zhang, W. W., Lima, V. D., Robbins, M. A., Woods, C., Olmstead, A., Joy, J. B., Barrios, R., & Richard Harrigan, P. (2019). Prevalence of human immunodeficiency virus-1 integrase strand transfer inhibitor resistance in British Columbia, Canada between 2009 and 2016: A longitudinal analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(3). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz060>
- Kandel, C. E., & Walmsley, S. L. (2015). Dolutegravir – A review of the pharmacology, efficacy, and safety in the treatment of HIV. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 9, pp. 3547–3555). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S84850>
- Kirichenko, A., Lapovok, I., Baryshev, P., van de Vijver, D. A. M. C., van Kampen, J. J. A., Boucher, C. A. B., Paraskevis, D., & Kireev, D. (2020). Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to instis. *Viruses*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/v12080838>
- Klatt, E. C. (2022). *PATHOLOGY OF HIV/AIDS 33 rd Edition*.
- Korber, B. T., Foley, B. T., Kuiken, C. L., Pillai, S. K., & Sodroski, J. G. (1998). Numbering positions in HIV relative to HXB2CG. *Human Retroviruses and AIDS*, 3.
- Kostaki, E. G., Nikolopoulos, G. K., Pavlitina, E., Williams, L., Magiorkinis, G., Schneider, J., Skaathun, B., Morgan, E., Psychogiou, M., Daikos, G. L., Sypsa, V., Smyrnov, P., Korobchuk, A., Malliori, M., Hatzakis, A., Friedman, S. R., & Paraskevis, D. (2018). Molecular analysis of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1)-infected individuals in a network-based intervention (Transmission Reduction Intervention Project): Phylogenetics identify HIV-1-infected individuals with social links. *Journal of Infectious Diseases*, 218(5), 707–715. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy239>

- Linchangco, G. v., Foley, B., & Leitner, T. (2022). Updated HIV-1 Consensus Sequences Change but Stay Within Similar Distance From Worldwide Samples. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.828765>
- Lunar, M. M., Lepej, S. Ž., Tomažič, J., Vovko, T. D., Pečavar, B., Turel, G., Maver, M., & Poljak, M. (2018). HIV-1 transmitted drug resistance in Slovenia and its impact on predicted treatment effectiveness: 2011–2016 update. *PLoS ONE*, *13*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196670>
- Lv, Z., Chu, Y., & Wang, Y. (2015a). *HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity*. <https://doi.org/10.2147/HIV.S79956>
- Lv, Z., Chu, Y., & Wang, Y. (2015b). HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, *7*, 95–104. <https://doi.org/10.2147/HIV.S79956>
- Mabeya, S., Nyamache, A., Ngugi, C., Nyerere, A., & Lihana, R. (2020). Characterization of HIV-1 Integrase Gene and Resistance Associated Mutations Prior to Roll out of Integrase Inhibitors by Kenyan National HIV-Treatment Program in Kenya. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, *30*(1), 37–44. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v30i1.6>
- Machnowska, P., Meixenberger, K., Schmidt, D., Jessen, H., Hillenbrand, H., Gunsenheimer-Bartmeyer, B., Hamouda, O., Kücherer, C., & Bannert, N. (2019). Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort. *PLoS ONE*, *14*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209605>
- Maeda, K., Das, D., Kobayakawa, T., Tamamura, H., & Takeuchi, H. (2019). *Current Topics in Medicinal Chemistry The international journal for in-depth reviews on Current Topics in Medicinal Chemistry SCIENCE BENTHAM*. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190712204603>
- Malet, I., Ambrosio, F. A., Subra, F., Herrmann, B., Leh, H., Bouger, M. C., Artese, A., Katlama, C., Talarico, C., Romeo, I., Alcaro, S., Costa, G., Deprez, E., Calvez, V., Marcelin, A. G., & Delelis, O. (2018). Pathway involving the N155H mutation in HIV-1 integrase leads to dolutegravir resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(5), 1158–1166. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx529>
- Métifiot, M., Marchand, C., & Pommier, Y. (2013). HIV integrase inhibitors. 20-year landmark and challenges. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 67, pp. 75–105). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00003-2>
- Mikasi, S. G., Isaacs, D., Chitongo, R., Ikomey, G. M., Jacobs, G. B., & Cloete, R. (2021). Interaction analysis of statistically enriched mutations identified in Cameroon recombinant subtype CRF02_AG that can influence the development of Dolutegravir drug resistance mutations. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06059-x>

- Mohamed, H., Gurrola, T., Berman, R., Collins, M., Sariyer, I. K., Nonnemacher, M. R., & Wigdahl, B. (2022). Targeting CCR5 as a Component of an HIV-1 Therapeutic Strategy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.816515>
- Mouscadet, J.-F., & Tchertanov, L. (2009). RALTEGRAVIR: MOLECULAR BASIS OF ITS MECHANISM OF ACTION. *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH*, 14, 5–16.
- Namasivayam, V., Vanangamudi, M., Kramer, V. G., Kurup, S., Zhan, P., Liu, X., Kongsted, J., Byrareddy, S. N., & Denmark, O. M. (2019). The journey of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) from lab to clinic HHS Public Access. *J Med Chem*, 62(10), 4851–4883. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00843>
- Ndashimye, E., Li, Y., Reyes, P. S., Avino, M., Olabode, A. S., Kityo, C. M., Kyeyune, F., Nankya, I., Quiñones-Mateu, M. E., Barr, S. D., & Arts, E. J. (n.d.). High-level resistance to bictegravir and cabotegravir in subtype A-and D-infected HIV-1 patients failing raltegravir with multiple resistance mutations. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab276>
- 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. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 221–240). <https://doi.org/10.1002/rmv.1739>
- Onoriode Digban, T., Chucks Iweriebor, B., Chikwelu Obi, L., Nwodo, U., & Ifeanyi Okoh, A. (2020). Analyses of HIV-1 integrase gene sequences among treatment-naïve patients in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Medical Virology*, 92(8), 1165–1172. <https://doi.org/10.1002/jmv.25661>
- Pandey, K. K. (2014). Critical appraisal of elvitegravir in the treatment of HIV-1/AIDS. In *HIV/AIDS - Research and Palliative Care* (Vol. 6, pp. 81–90). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/HIV.S39178>
- Panichsillapakit, T., Smith, D. M., Wertheim, J. O., Richman, D. D., Little, S. J., & Mehta, S. R. (2016). Prevalence of Transmitted HIV Drug Resistance among Recently Infected Persons in San Diego, CA 1996-2013. In *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (Vol. 71, Issue 2, pp. 228–236). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000831>
- Paraskevis, D., Beloukas, A., Stasinou, K., Pantazis, N., de Mendoza, C., Bannert, N., Meyer, L., Zangerle, R., Gill, J., Prins, M., D'Arminio Montforte, A., Kran, A. M. B., Porter, K., & Touloumi, G. (2019). HIV-1 molecular transmission clusters in nine European countries and Canada: Association with demographic and clinical factors. *BMC Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1241-1>
- Parekh, B. S., Ou, C. Y., Fonjungo, P. N., Kalou, M. B., Rottinghaus, E., Puren, A., Alexander, H., Cox, M. H., & Nkengasong, J. N. (2019). Diagnosis of human immunodeficiency virus infection. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 1). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-18>

- Pasternak, A. O., Grijsen, M. L., Wit, F. W., Bakker, M., Jurriaans, S., Prins, J. M., & Berkhout, B. (2020). Cell-associated HIV-1 RNA predicts viral rebound and disease progression after discontinuation of temporary early ART. *JCI Insight*, 5(6). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134196>
- Rhee, S. Y., Grant, P. M., Tzou, P. L., Barrow, G., Harrigan, P. R., Ioannidis, J. P. A., & Shafer, R. W. (2019). A systematic review of the genetic mechanisms of dolutegravir resistance. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 74, Issue 11, pp. 3135–3149). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz256>
- Rhee, S.-Y., Kassaye, S. G., Barrow, G., Sundaramurthi, J. C., Jordan, M. R., & Shafer, R. W. (2020). *HIV-1 transmitted drug resistance surveillance: shifting trends in study design and prevalence estimates*. <https://doi.org/10.1002/jia2.25611/full>
- Rhee, S.-Y., Sankaran, K., Varghese, V., Winters, M. A., Hurt, C. B., Eron, J. J., Parkin, N., Holmes, S. P., Holodniy, M., & Shafer, R. W. (2016). *HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation*. <https://doi.org/10.1128/JVI.00495-16>
- Schmitt, K., Curlin, J., Remling-Mulder, L., Moriarty, R., Goff, K., O'Connor, S., Stenglein, M., Marx, P., & Akkina, R. (2020). Mimicking SIV chimpanzee viral evolution toward HIV-1 during cross-species transmission. *Journal of Medical Primatology*, 49(5), 284–287. <https://doi.org/10.1111/jmp.12485>
- Smith, S. J., Pauly, G. T., Hewlett, K., Schneider, J. P., & Hughes, S. H. (2020). *Structure-based non-nucleoside inhibitor design: Developing inhibitors that are effective against resistant mutants*. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13766>
- Smith, S. J., Zhao, X. Z., Passos, D. O., Lyumkis, D., Burke, T. R., & Hughes, S. H. (2020). HIV-1 integrase inhibitors that are active against drug-resistant integrase mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00611-20>
- Smith, S. J., Zhao, X. Z., Passos, D. O., Lyumkis, D., Burke, T. R., & Hughes, S. H. (2021). Integrase strand transfer inhibitors are effective anti-hiv drugs. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v13020205>
- Soliman, M., Srikrishna, G., & Balagopal, A. (2017). Mechanisms of HIV-1 Control. In *Current HIV/AIDS Reports* (Vol. 14, Issue 3, pp. 101–109). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11904-017-0357-9>
- Sun, Z., Ouyang, J., Zhao, B., An, M., Wang, L., Ding, H., & Han, X. (2020). Natural polymorphisms in HIV-1 CRF01_AE strain and profile of acquired drug resistance mutations in a long-term combination treatment cohort in northeastern China. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4808-3>
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *New England Journal of Medicine*, 358(15), 1590–1602. <https://doi.org/10.1056/nejmra0706737>

- Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.*, 1–32. <http://www.idealibrary.com>
- Udeze, A. O., Olaleye, D. O., & Odaibo, G. N. (2020). Polymorphisms and drug resistance analysis of HIV-1 isolates from patients on first line antiretroviral therapy (ART) in South-eastern Nigeria. *PLoS ONE*, *15*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231031>
- Wares, M., Mesplède, T., Quashie, P. K., Osman, N., Han, Y., & Wainberg, M. A. (2014). *The M50I polymorphic substitution in association with the R263K mutation in HIV-1 subtype B integrase increases drug resistance but does not restore viral replicative fitness*. <http://www.retrovirology.com/content/11/1/7>
- Weber, I. T., Wang, Y. F., & Harrison, R. W. (2021). Hiv protease: Historical perspective and current research. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v13050839>
- Wensing, A. M., C. V., C.-S. F., C. C., G. H. F., P. R., S. R. W., & R. D. D. (2019). 2019 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in Antiviral Medicine*, *27*(3).
- Whitfield, T., Torkington, A., & van Halsema, C. (2016). *Profile of cabotegravir and its potential in the treatment and prevention of HIV-1 infection: evidence to date*. <https://doi.org/10.2147/HIV.S97920>
- Wilens, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
- Xavier RUIZ, F., & Arnold, E. (2020). Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 61, pp. 113–123). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.11.011>
- Yang, J., Hao, M., Khan, M. A., Rehman, M. T., Highbarger, H. C., Chen, Q., Goswami, S., Sherman, B. T., Rehm, C. A., Dewar, R. L., Chang, W., & Imamichi, T. (2021). A combination of m50i and v151i polymorphic mutations in hiv-1 subtype b integrase results in defects in autoprocessing. *Viruses*, *13*(11). <https://doi.org/10.3390/v13112331>
- Zajac, V. (2018). Evolutionary view of the AIDS process. In *Journal of International Medical Research* (Vol. 46, Issue 10, pp. 4032–4038). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0300060518786919>
- Zaki, E. A., El-Daly, M. M., Abdulhaq, A., Al-Subhi, T. L., Hassan, A. M., El-Kafrawy, S. A., Alhazmi, M. M., Darraj, M. A., & Azhar, E. I. (2020). Genotyping and antiretroviral drug resistance of human immunodeficiency Virus-1 in Jazan, Saudi Arabia. *Medicine*, *99*(49), e23274. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023274>
- Zhang, D., & Duan, R. (2021). Understanding the basis of G140S-Q148H double mutation induced drug resistance in HIV-1 integrase using molecular dynamics simulation. *Chemical Physics Letters*, *777*. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.138751>
- Πρόκτερ, Κ., Ρέστα, Π., Κοτσανοπούλου, Μ., Τζανακάκη, Τ., & Μπελούκας, Α. (2022). ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ

ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΪΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΖΟΥΝ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ HIV: ΔΕΔΟ-
ΜΕΝΑ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ AIDS ΝΟΤΙΟΥ ΕΛΛΑΔΟΣ (ΕΚΑΑΝΕ).

10η Πανελλήνια Συνάντηση Aids, Ηπατίτιδες & Αναδύομενα Νοσήματα.