ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ HIV

COMPARISON OF MOLECULAR TECHNIQUES USED FOR GENOTYPING OF HIV SAMPLES

Παπαγιάννη Ευαγγελία

Πατρώνυμο: Παπαγιάννης Πέτρος

ΛΑΡΙΣΑ, 2023

Επιβλέπων Καθηγητής: Μπελούκας Απόστολος

Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Τριμελής επιτροπή

Μπελούκας Απόστολος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας στο τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Δημητρίου Τηλέμαχος: Μέλος Ε.ΔΙ.Π. με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Μικροβιολογία» στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βογιατζάκη Χρυσάνθη: Επίκουρη Καθηγήτρια Ανοσολογίας Παρασιτολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIV ανήκει στην οικογένεια των ρετροϊών και εμφανίστηκε στον ανθρώπινο πληθυσμό στις αρχές του 1980. Έκτοτε έχει προσβάλει πολλά εκατομμύρια ανθρώπων προκαλώντας την επιδημία του AIDS. Έως σήμερα, έχουν αναπτυχθεί αρκετά φάρμακα που καταπολεμούν τη δράση των βασικών ενζύμων του ιού σταματώντας έτσι τον πολλαπλασιασμό του, μειώνοντας ,ακόμα και εκμηδενίζοντας εν τέλει το ιικό φορτίο στα άτομα που ζουν με τον ιό. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται ο τρόπος ζωής των ανθρώπων και επεκτείνεται το προσδόκιμο ζωής τους. Ωστόσο, το γονιδίωμα του HIV χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων, και συνεπώς η μακροχρόνια λήψη αντιρετροϊκής θεραπείας συμβάλλει στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών. Για την ανίχνευση των ανθεκτικών στελεχών, απαιτείται αλληλούχηση των ιικών γονιδιακών περιοχών-στόχων των αντιρετροϊκών φαρμάκων για τον εντοπισμό των μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στο στέλεχος. Έπειτα, μεταβάλλεται το σχήμα θεραπευτικής αγωγής. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση ορισμένων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των δειγμάτων HIV για αλληλούχηση.

ABSTRACT

HIV is a retrovirus that first appeared in the human population in the early 1980s and has since infected millions of people. To date, several drugs have been developed that inhibit the action of the main retroviral enzymes, and as a result stop the HIV replication and minimize the viral load in people living with the virus, and in this way, people's lifestyle is improved. However, the viral genome has a high mutation rate, and thus, after long-term use of antiretroviral treatment, the virus mutates to drug-resistant strains. Genotyping is needed for the detection of the mutations that make these strains resistant, so that people with HIV mutations can follow a treatment plan that can inhibit these stains. The purpose of the study is the comparison of the techniques that are followed in order to prepare the HIV samples for sequencing,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Μπελούκα Απόστολο για την καθοδήγηση και την στήριξή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική συνεργάτη κ. Πρόκτερ Κασσάνδρα για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 Εισαγωγή……..1

1.1 AIDS - Ιστορική Αναδρομή……1

1.2 Κύκλος ζωής HIV……3

1.3 Υπότυποι του HIV……...…....4

1.4 Γονιδίωμα HIV……..7

1.4.1 Γονιδιακή περιοχή *pol*……...…8

1.4.1.1Πρωτεάση……9

1.4.1.2Αντίστροφη μεταγραφάση……..9

1.4.1.3Ιντεγκράση……10

1.5 Αντιρετροϊκή θεραπεία……11

1.6 Αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία……..16

1.7 Σκοπός……19

2 Υλικά και Μέθοδοι……20

2.1 Αναλώσιμα – Εξοπλισμός…….……..20

2.2 Δείγματα ατόμων που ζουν με τον HIV…….……20

2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού…….……21

2.3.1 QIAamp Viral RNA Mini Kit ….…….....22

2.3.2 E.Z.N.A. Viral RNA Kit…….…….....23

2.4 Φωλεακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης……24

2.4.1 Ένζυμο Platinum High Fidelity……25

2.4.2 Ένζυμο DreamTaq DNA Polymerase….……26

2.5 Ηλεκτροφόρηση……26

2.6 Καθαρισμός……...……27
2.6.1 PureLink Quick PCR ……28
2.6.2 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up XS ……28
2.7 Φωτομέτρηση……29

3 Αποτελέσματα……...……30

4 Συμπεράσματα…….……35

5 Βιβλιογραφία ……..……38

ΓΛΩΣΣΑΡΙ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Συντομογραφία	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	Ιός ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων
PR	Protease	Πρωτεάση
RT	Reverse Transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφάση
INT	Integrase	Ιντεγκράση
Pbs	Primer Binding Site	Ειδική θέση πρόσδεσης για το tRNA (στην αντίστροφη μεταγραφάση)
PIC	Pre-Integration Complex	Σύμπλοκο που δημιουργείται πριν την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο DNA του κυττάρου ξενιστή
ART	Antiretroviral Treatment	Αντιρετροϊκή θεραπεία
HAART	Highly Active Antiretroviral Treatment	Αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστικότητας
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	Φωλεακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
CRF	Circulated recombinant forms	Κυκλοφορούσες ανασυνδυασμένες μορφές
URF	Unique recombinant forms	Μοναδικές ανασυνδυασμένες μορφές
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	Υποδοχέας χημειοκινών C-C τύπου 5
FDA	Food and Drug Administration (USA)	Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΗΠΑ)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρα ελέγχου και πρόληψης ασθενειών (ΗΠΑ)

Gag	Group specific Antigens	Πολυπρωτεΐνη Gag
Pol	Polymerase	Πολυπρωτεΐνη Pol
Env	Envelope	Πολυπρωτεΐνη Env

1. Εισαγωγή

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 ξεκίνησε η εμφάνιση σοβαρής επίκτητης ανεπάρκεια των Τ-λεμφοκυττάρων σε ομοφυλόφιλους άνδρες, οι οποίοι -χωρίς προηγούμενα προβλήματα υγείας και ενδείξεις ανοσοανεπάρκειας- έπασχαν από έντονες λοιμώξεις όπως καντιντίαση και πνευμονία (Gottlieb 1981). Το φαινόμενο των ακραίων συμπτωμάτων επεκτεινόταν γρήγορα παγκοσμίως, έχοντας αυξημένη θνησιμότητα και προσβάλοντας κυρίως ομοφυλόφιλους άνδρες και χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών ουσιών. Θεωρήθηκε, λοιπόν, πως πρόκειται για νέα ασθένεια, η οποία ονομάστηκε Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS) από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) των ΗΠΑ, και αρχικά συσχετίστηκε με τον τρόπο ζωής των ασθενών (Greene 2007). Έπειτα, το AIDS άρχισε να εμφανίζεται και σε αιμοφιλικά άτομα που υποβάλλονταν σε συχνές μεταγγίσεις αίματος, και ο τρόπος μετάδοσης παρομοιάστηκε με αυτόν της ηπατίτιδας Β, γεγονός που πυροδότησε την έρευνα για κάποιο μολυσματικό παράγοντα που πιθανώς ευθυνόταν για την ασθένεια (Curran 1983).

Έτσι, λίγα χρόνια μετά από την έξαρση του AIDS, ανιχνεύτηκε ένας νέος ρετροϊός που ανήκε στην οικογένεια των ανθρώπινων Τ-λεμφοτροπικών ρετροιών (HTLV), πρώτα σε καλλιέργειες κυττάρων ασθενή με λεμφαδενοπάθεια και έπειτα σε αρκετές ακόμα περιπτώσεις ατόμων με AIDS (F. C.-B.-B. Barré-Sinoussi 1983, Gallo 1983). Ο νέος ρετροϊός ονομάστηκε Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV) από την Παγκόσμια Επιτροπή για τη Ταξινόμηση Ιών (Coffin 1986).

Η ανακάλυψη του HIV άνοιξε το πεδίο έρευνας για τον τρόπο που ο ιός προκαλεί το AIDS, τον τρόπο μετάδοσης και την προέλευση του ιού καθώς και τον τρόπο αντιμετώπισης του μέσω της αντιρετροϊκής θεραπείας (F. R. Barré-Sinoussi 2013). Αρχικά, τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα ταυτοποιήθηκαν ως τα κύρια κύτταρα-στόχοι του HIV, με το βασικό υποδοχέα του ιού να βρίσκεται στην επιφάνειά τους. Τα CD4+ έχουν μεγάλη συγγένεια με την πρωτεΐνη gp120, η οποία εκφράζεται στην εξωτερική επιφάνεια του φακέλου του HIV, γεγονός που

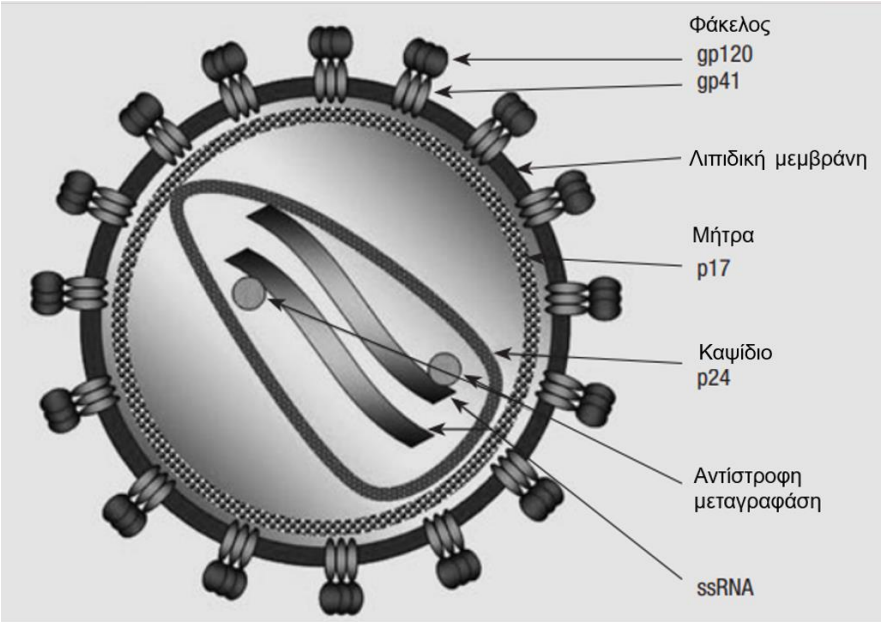
αυξάνει την παθογονικότητα του ιού (Kornfeld 1989). Ο HIV, λοιπόν, προσβάλλει τα CD4+ κύτταρα και τα καταστρέφει, καταστέλλοντας ως επακόλουθο το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών. Για το λόγο αυτό, ο αριθμός των CD4+ λεμφοκυττάρων των ατόμων με HIV είναι ένας από τους σημαντικότερους δείκτες για την πορεία της λοίμωξης (Greene 2007, F. R. Barré-Sinoussi 2013) . Όσον αφορά τον τρόπο μετάδοσης, συμβαίνει μέσω επαφής βλεννογόνων του οργανισμού με τον ιό, ιδιαίτερα μέσω σεξουαλικής επαφής, και επαφής με μολυσμένα παράγωγα του αίματος κατά τραυματισμούς και μεταγγίσεις. Ο HIV στον οργανισμό ανιχνεύεται στο σπέρμα, στα κολπικά υγρά, στο μητρικό γάλα και στο αίμα και τα παράγοντά του (ορό και πλάσμα) (Hladik 2008, Cohen 2011).

Συνεχείς έρευνες για τον HIV έδειξαν πως υπάρχει και ένας παρόμοιος μορφολογικά ιός που προκαλούσε AIDS σε πληθυσμούς της Δυτικής Αφρικής, ο οποίος ονομάστηκε HIV-2, με τον ήδη γνωστό ιό, που ευθύνεται για την πανδημία του AIDS να ονομάζεται HIV-1. Οι δυο ιοί δεν είχαν κοντινή εξελικτική συγγένεια, όμως ο HIV-2 ήταν κοντά με αντίστοιχους ιούς των πρωτευόντων, τους SIV (Simian Immunodeficiency Viruses), οι οποίοι όμως δεν ήταν παθογόνοι για τους ξενιστές τους. (Sharp 2011). Βρέθηκε λοιπόν ότι η προέλευση του HIV οφείλεται σε διαειδική μόλυνση ανθρώπων από τους αντίστοιχους ιούς των πρωτευόντων. Οι ανασυνδυασμοί που συνέβησαν κατά την μετάδοση των SIV στους ανθρώπους δημιούργησαν τους διαφορετικούς υποτύπους του HIV-1 και του HIV-2 (Hemelaar 2012).

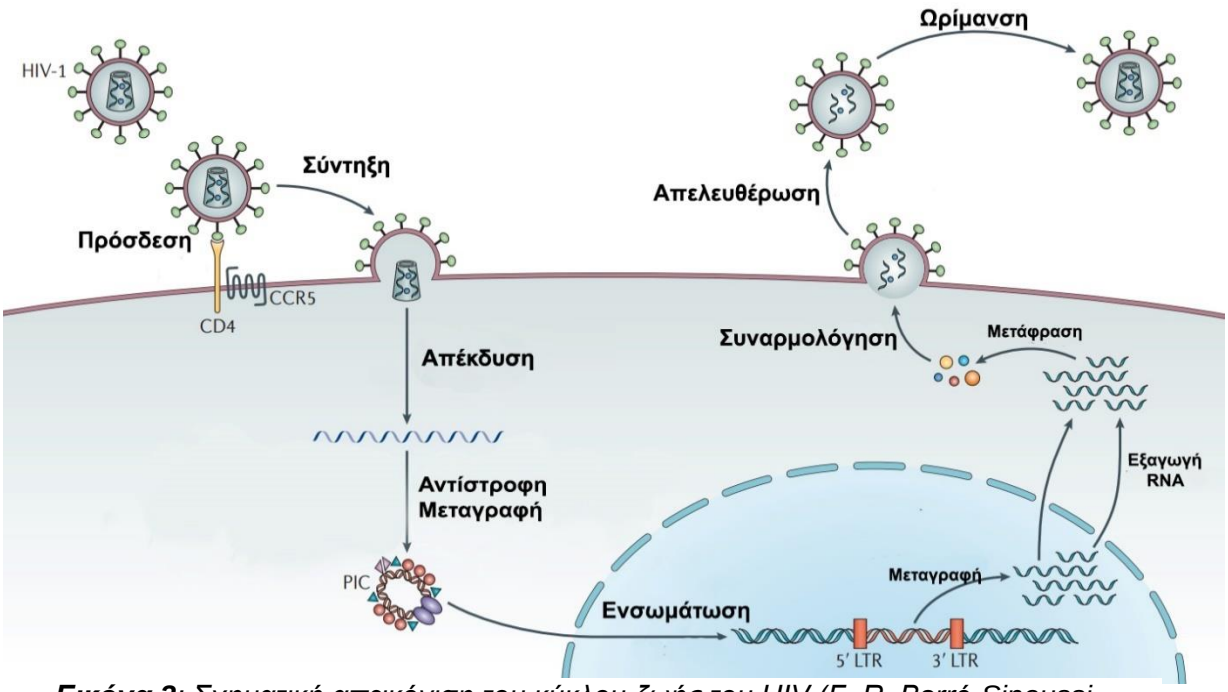
Το σημαντικότερο βήμα για την αντιμετώπιση της ασθένειας του AIDS αποτέλεσε η αποτελεσματική θεραπεία ενάντια στον ιό που ξεκίνησε με τη χρήση ενός αντικαρκινικού φαρμάκου, του AZT, που δρούσε ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1. Το φάρμακο αυτό πολύ σύντομα σταμάτησε να είναι πλήρως αποτελεσματικό καθώς ο HIV-1 εμφανίζει πολύ υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, συνεπώς ανέπτυξε ανθεκτικά στελέχη. Έτσι, στόχος ήταν ο εκ νέου σχεδιασμός αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση του ιού (Greene 2007).

1.2. Κύκλος ζωής του HIV

Η μόλυνση από τον HIV ξεκινά με την αναγνώριση των CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων. Η γλυκοπρωτεΐνη gp120 που βρίσκεται στην επιφάνεια του ιοσώματος, αλληλεπιδρά με τον βασικό υποδοχέα του ιού, τον CD4, και ακολουθεί ταυτόχρονη σύνδεση με έναν συνυποδοχέα στην μεμβράνη των λεμφοκυττάρων, τον CCR5. Οι αντιδράσεις αυτές προκαλούν δομικές αλλαγές που διευκολύνουν τη σύντηξη των μεμβρανών του ιοσώματος και του κυττάρου-ξενιστή (Goodsell 2015). Στη συνέχεια, γίνεται η απέκδυση του ιού, δηλαδή η απελευθέρωση του ιικού RNA από το νουκλεοκαψίδιό του στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, και ξεκινά η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής που μετατρέπει το μονόκλωνο ιικό RNA σε δίκλωνο DNA. Έπειτα, δημιουργείται το PIC (Pre-Integration Complex) το οποίο εκτελεί την εισαγωγή του ιικού DNA στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή, ώστε να γίνει η ενσωμάτωσή του στο γενετικό υλικό του ξενιστή με τη βοήθεια της ιντεγκράσης. Ακολουθεί πολλαπλασιασμός του ιικού DNA και η απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, όπου συντίθενται νέα ιοσώματα. Τέλος, τα νέα ιοσώματα απελευθερώνονται, ωριμάζουν και γίνονται μολυσματικά. (Fanales-Belasio 2010, Ferguson 2002, F. R. Barré-Sinoussi 2013).



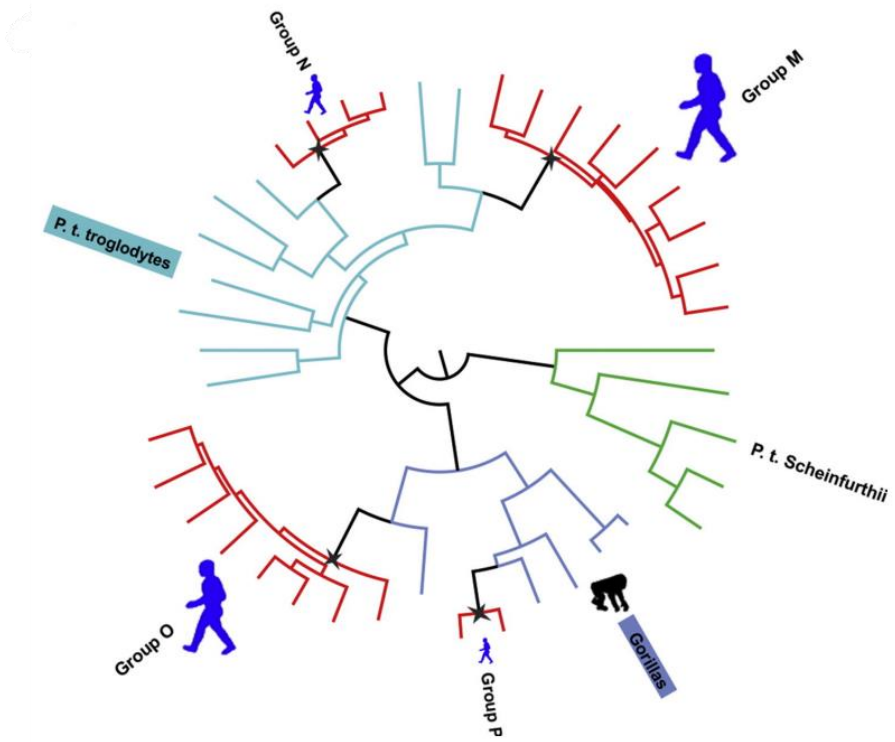
***Εικόνα 1**: Η δομή των ιοσωματίων του HIV (Fanales-Belasio 2010)*



***Εικόνα 2**: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του HIV (F. R. Barré-Sinoussi 2013)*

1.3. Υπότυποι του HIV

Ο ιός HIV χωρίζεται σε δύο κύριους τύπους, τον HIV-1 και τον HIV-2, οι οποίοι εκτός από το ότι έχουν μακρινή εξελικτική συγγένεια, διαφέρουν πολύ και γενετικά με τη διαφορά να ξεπερνά το 55%. Ο HIV-1 είναι ο πιο διαδεδομένος από τους δύο τύπους και εμφανίζει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία λόγω των ανασυνδυασμών και του μεγάλου ρυθμού πολλαπλασιασμού του (Beloukas A. 2016). Οι δύο τύποι κατανέμονται σε ομάδες, η καθεμία εκ των οποίων προέκυψε από διαφορετικό γεγονός διαειδικής μετάδοσης. Οι ομάδες για τον HIV-1 είναι οι ομάδες M, N, O, P, με το M (major) να αποτελεί τη βασική ομάδα που ευθύνεται για την πανδημία του HIV-1. Οι υπόλοιπες ομάδες δεν είναι τόσο διαδεδομένες, καθώς, παρόλο που όλες μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή των CD4+ λεμφοκυττάρων, διαφέρουν πολύ στην κατανομή τους στον ανθρώπινο πληθυσμό. Αντίστοιχα, ο HIV-2 χωρίζεται στις ομάδες A-H, με πιο διαδεδομένα τα A και B, όμως ο συγκεκριμένος τύπος είναι περιορισμένος ενδημικά στη Δυτική Αφρική (Sharp 2011).



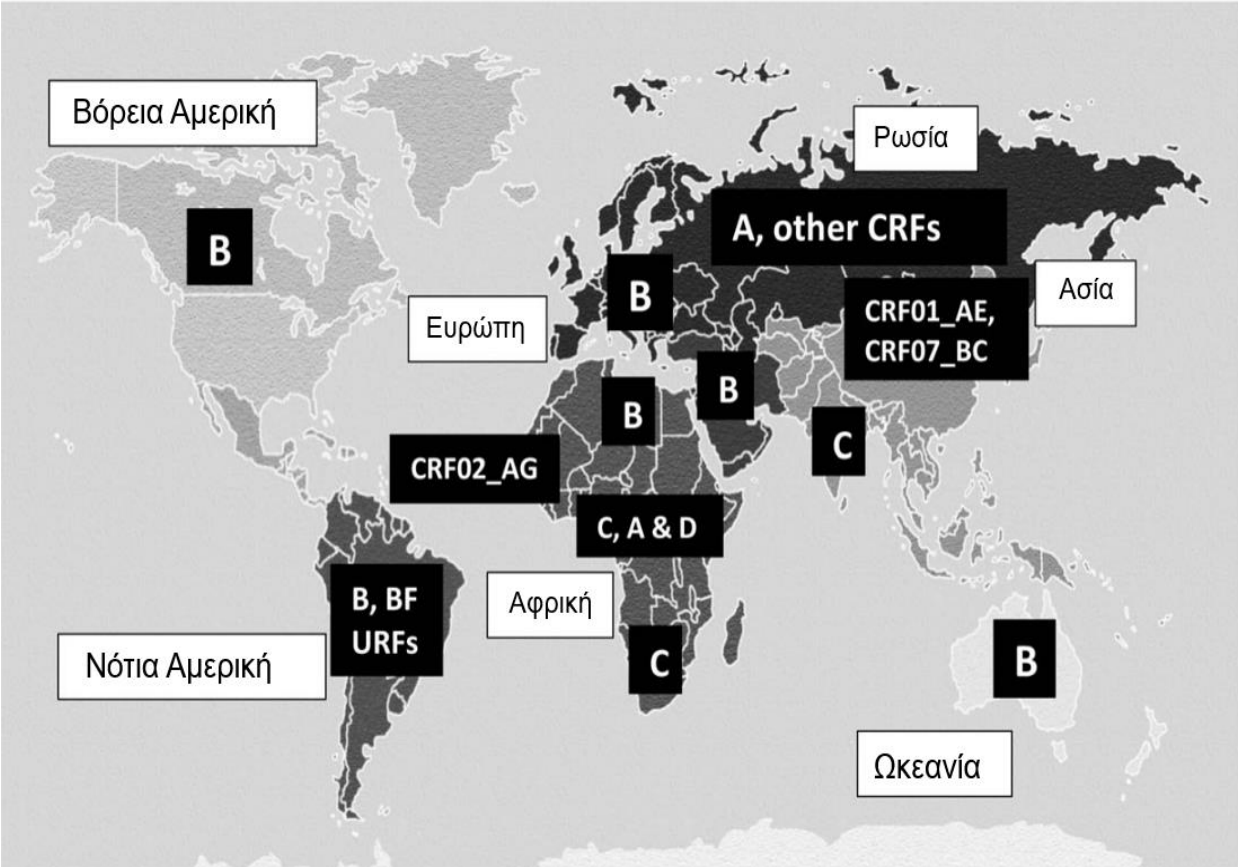
***Εικόνα 3**: Απεικόνιση της εξέλιξης των ομάδων του HIV-1 μέσω της διαειδικής μετάδοσης των SIV (Beloukas A. 2016)*

Η βασική ομάδα που ερευνάται είναι η M του HIV-1 και κατανέμεται στους υπότυπους A, B, C, D, F, G, H, J και K. Επιπλέον, στην ομάδα M συναντώνται και ανασυνδυασμένοι υπότυποι των προαναφερόμενων που ονομάζονται CRFs. Οι CRFs προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό δύο η περισσότερων υποτύπων του ιού σε άτομα με διπλή λοίμωξη (συλλοίμωξη). Συγκεκριμένα, τα άτομα που έχουν μολυνθεί με διαφορετικούς υποτύπους εμφανίζουν μωσαϊκισμό στο ιικό γονιδίωμα, καθώς αυτό έχει συντεθεί από τμήματα των αρχικών υποτύπων. Οι CRFs συναντώνται συχνά σε άτομα που ζούν με τον HIV σε αντίθεση με άλλες μορφές ανασυνδυασμένων υποτύπων, τους URFs που εντοπίζονται σε μεμονομένα άτομα με πολλαπλή HIV λοίμωξη (Bbosa 2019). Οι ανασυνδυασμένοι υπότυποι πλέον ανέρχονται στους 132 και οι πιο κοινοί είναι ο CRF02_AG που πρόκειται για ανασυνδυασμό των υποτύπων A - G εντοπιζόμενος στη Δυτική Αφρική, και ο CRF01_AE που προκύπτει από ανασυνδυασμό μεταξύ των A – E και συναντάται στην Ανατολική Ασία. Τα δεδομένα αυτά προκύπτουν από την βάση δεδομένων του LANL

(http://www.hiv.lanl.gov). Αξίζει να σημειωθεί πως ο υπότυπος Ε που αναφέρεται δεν αποτελεί ξεχωριστό υπότυπο της ομάδας Μ του HIV-1 αλλά εμφανίζεται μόνο ως ανασυνδυασμένος Α-Ε και ονομάστηκε έτσι λόγω των γενετικών διαφορών στο γονίδιο *env* συγκριτικά με τα αντίστοιχα γονίδια των υπόλοιπων υποτύπων (Carr 1996).

Η μεγαλύτερη ετερογένεια εντοπίζεται στην Αφρική με τον υπότυπο C να κυριαρχεί στο νότιο τμήμα της ηπείρου, τον υπότυπο A να είναι ο επικρατέστερος στη Ανατολική Αφρική, και τον υπότυπο B να κυριαρχεί στις χώρες της Βορείου Αφρικής. Στις δυτικές και κεντρικές χώρες συναντώνται κυρίως ανασυνδυασμένοι υπότυποι. Επιπλέον, πολλοί ανασυνδυασμένοι υπότυποι εντοπίζονται και στην Ασία και κυριαρχούν στο μεγαλύτερο τμήμα της, με εξαίρεση την Ινδία όπου κυριαρχεί ο υπότυπος C, την Μεση Ανατολή όπου κυριαρχεί ο υπότυπος B και τη Ρωσία όπου είναι συχνότερος ο υπότυπος A. Στην Ευρώπη, τη Βόρεια και τη Νότια Αμερική και την Αυστραλία ο πιο συνήθης υπότυπος είναι ο B. Στην Νότια Αμερική εμφανίζονται επίσης κάποιοι ανασυνδυασμένοι υπότυποι. (Bbosa 2019).

Για την Ελλάδα, μέχρι πριν κάποια χρόνια ο κύριος υπότυπος ήταν ο B, όπως και στην υπόλοιπη Ευρώπη, και αμέσως επόμενος ο υπότυπος A (Beloukas A. 2016). Νεότερα δεδομένα όμως υποδεικνύουν ότι ο πιο συχνός υπότυπος στην Ελλάδα τα τελευταία έτη είναι ο υπότυπος A (Παπαχρήστου 2022).



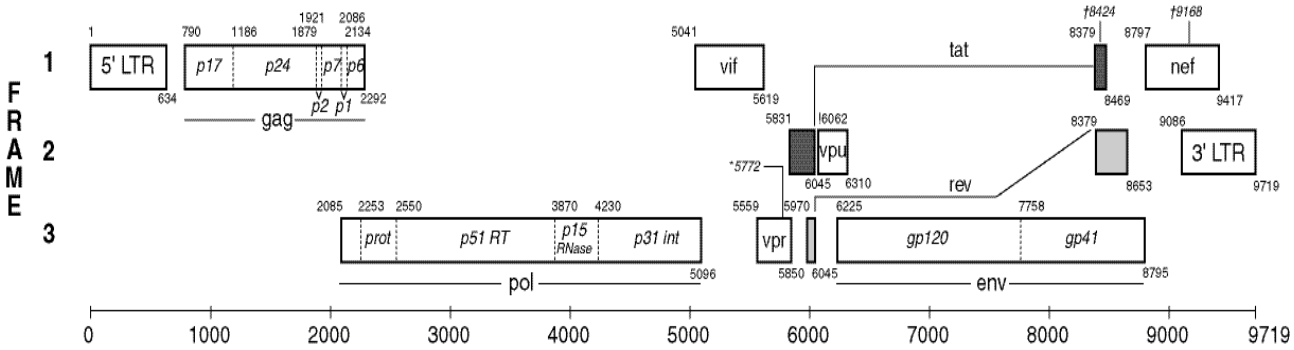
Εικόνα 4: *Απεικόνιση της κατανομής των υποτύπων του HIV-1 παγκοσμίως (Bbosa 2019)*

1.4. Γονιδίωμα του HIV

Το γονιδίωμα του HIV-1 αποτελείται από δυο αντίγραφα ενός μονόκλωνου RNA μήκους περίπου 9 κιλοβάσεων. Σε αυτό υπάρχουν εννέα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, τρία εκ των οποίων αποτελούν οι γονιδιακές περιοχές που κωδικοποιούν τις πολυπρωτεΐνες Env, Gag και Pol, οι οποίες στη συνέχεια υποβάλλονται σε πρωτεόλυση και προκύπτουν οι βασικές πρωτεΐνες και ένζυμα των ρετροϊών (Frankel 1998). Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τις γονιδιακές περιοχές *gag* και *env* είναι δομικές, ενώ αυτές που προκύπτουν από την περιοχή *pol* είναι ένζυμα, απαραίτητα για τα κύρια βήματα του κύκλου ζωής του ιού. (Ferguson 2002).

Πιο συγκεκριμένα, η γονιδιακή περιοχή *gag* κωδικοποιεί τις βασικές δομικές πρωτεΐνες του HIV-1 και είναι κοινή μεταξύ των ρετροίων. Πρωτεολύεται σε τέσσερις πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δόμηση του

ιοσώματος, αφού αποτελούν το καψίδιο και τη μήτρα, και συμμετέχουν στην ωρίμανση του (Bell 2013). Η γονιδιακή περιοχή *env* κωδικοποιεί δυο δομικές πρωτεΐνες που δομούν τον φάκελο του HIV-1. Οι πρωτεΐνες αυτές τροποποιούνται στις γλυκοπρωτεΐνες gp41 και gp120, οι οποίες αποτελούν τις λειτουργικές μονάδες επιφανείας του ιού που προκαλούν τη μόλυνση αλληλοεπιδρώντας με τα κύτταρα του ξενιστή (Murakami 2021).



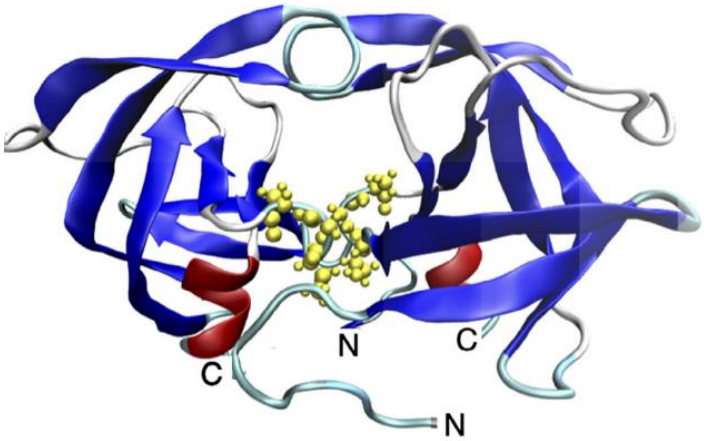
***Εικόνα 5**: Αναπαράσταση του χάρτη του γονιδιώματος του HIV-1. Πηγή:http://www.hiv.lanl.gov*

1.4.1. Γονιδιακή περιοχή *pol*

Η γονιδιακή περιοχή *pol* είναι η πιο συντηρημένη περιοχή και περιλαμβάνει τις τρεις πρωτεΐνες ένζυμα του HIV-1 (Seillier-Moiseiwitsch 1994). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι με τη σειρά, η πρωτεάση, η αντίστροφη μεταγραφάση και η ιντεγκράση, οι οποίες καταλύουν τα σημαντικότερα στάδια παθογένεσης του ιού. Η πρωτεάση είναι το ένζυμο που ευθύνεται για την πρωτεόλυση των πολυπρωτεϊνών. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι υπεύθυνη για την μετατροπή του ιικού RNA σε δίκλωνο DNA. Τέλος, το σημαντικότερο στάδιο της μόλυνσης καταλύεται από την ιντεγκράση, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση του νεοσυντιθέμενου δίκλωνου ιικού DNA στο DNA του ξενιστή (Ferguson 2002). Η δομή και η δράση των ενζύμων της Pol περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

1.4.1.1. Πρωτεάση

Το πρώτο ένζυμο της περιοχής *pol*, είναι η πρωτεάση και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνασών του ασπαρτικού. Συναρμολογείται από συμμετρικά ομοδιμερή ώστε να αποκτήσει την ενεργή μορφή της (Gulnik 2000). Το κάθε μονομερές έχει στο ενεργό κέντρο του τρία κατάλοιπα, που είναι αρκετά συντηρημένα μεταξύ των πρωτεϊνασών του ασπαρτικού: το ασπαρτικό, ένα κατάλοιπο σερίνης ή θρεονίνης και ένα κατάλοιπο γλυκίνης. Το διμερές αναγνωρίζει συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουχίες στα σημεία που πρόκειται να δράσει έτσι ώστε να πρωτεολύσει τις πολυπρωτεΐνες Gag και το Gag-Pol στις λειτουργικές μονάδες τους (Weber 2021). Η δράση της πρωτεάσης κατέχει εξέχοντα ρόλο στην ωρίμανση των πρώιμων ιικών σωματίων και στη μετατροπή τους σε μολυσματικά. Για το λόγο αυτό, στόχος πολλών φαρμάκων της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι η αναστολή της δράσης της πρωτεάσης (Konvalinka 2015).

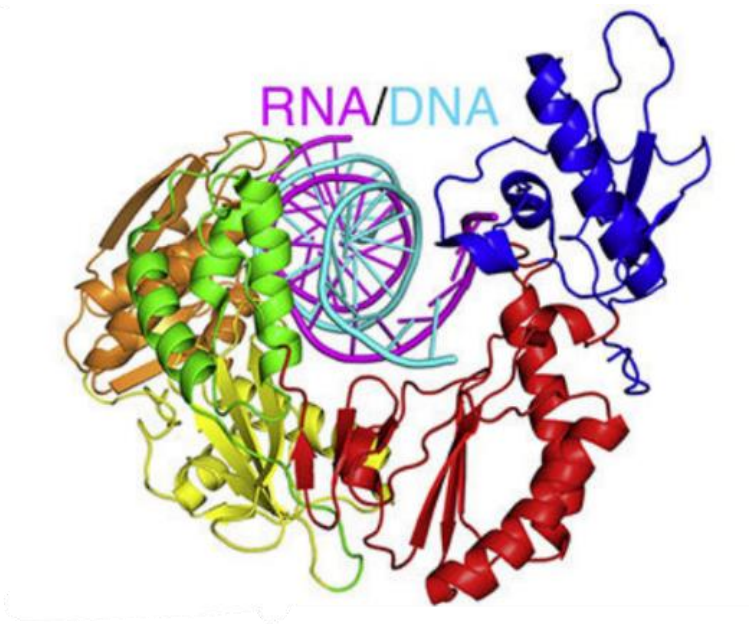


Εικόνα 6*: Η δομή του ομοδιμερούς της πρωτεάσης. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Rösner 2022)*

1.4.1.2. Αντίστροφη Μεταγραφάση

Η αντίστροφη μεταγραφάση (RT) είναι το δεύτερο ένζυμο που προκύπτει από την πολυπρωτεΐνη Pol και δρα στα κύτταρα του ξενιστή αμέσως μετά τη μόλυνση. Η λειτουργική μορφή της είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από

την υπομονάδα p51, η οποία εξασφαλίζει τη δομική σταθερότητα του ενζύμου, και την υπομονάδα p66, που δρα καταλυτικά. Η καταλυτική υπομονάδα έχει διπλή δράση DNA πολυμεράσης, που συνθέτει DNA έχοντας σαν πρόδρομο μόριο RNA ή DNA, και δράση RNAάσης H, που αποικοδομεί το ιικό RNA όταν βρίσκεται σε υβριδική μορφή με το νεοσυντιθέμενο DNA (Hu 2012). Για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής χρειάζεται ένα tRNA του ξενιστή που χρησιμεύει ως εκκινητής. Το tRNA προσδένεται στην ειδική θέση πρόσδεσης (primer binding site ή pbs) στο 5' άκρο του ιικού γονιδιώματος και η RT έχοντας δράση πολυμεράσης συνθέτει το συμπληρωματικό κλώνο DNA με εκμαγείο το RNA του ιού. Ταυτόχρονα, η RNAάση H αποδομεί το RNA ώστε στη συνέχεια, η πολυμεράση να το αντικαταστήσει με DNA για να παραχθεί το δίκλωνο DNA του ιού (Xavier Ruiz 2020, Hu 2012).

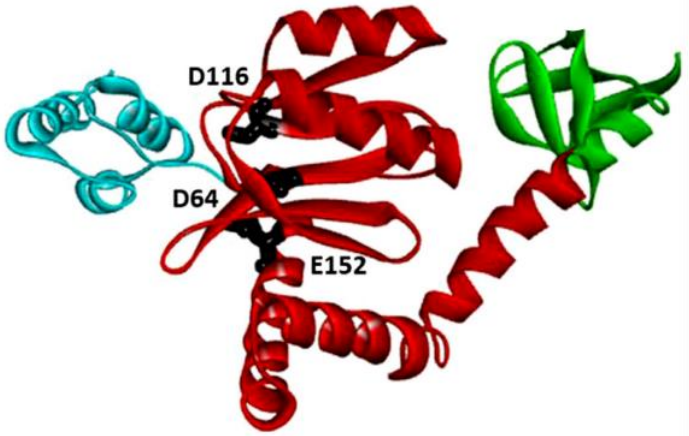


***Εικόνα 7**: Η καταλυτική υπομονάδα της RT με υπόστρωμα RNA-DNA. Με μπλέ, κόκκινο, κίτρινο και πράσινο χρώμα απεικονίζεται το τμήμα της πολυμεράσης και με πορτοκαλί χρώμα το τμήμα της RNAάσης H (Xavier Ruiz 2020)*

1.4.1.3. Ιντεγκράση

Το τρίτο ένζυμο τη γονιδιακής περιοχής *pol* είναι η ιντεγκράση που αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό ένζυμο των ρετροϊών. Η ιντεγκράση ως ένζυμο αποτελείται από τρεις επικράτειες, την αμινοτελική, την καταλυτική και την καρβοξυτελική. Η αμινοτελική επικράτεια συμμετέχει στην δημιουργία πολυμερών του ενζύμου,

η καταλυτική αποτελεί το ενεργό κέντρο και η καρβοξυτελική επικράτεια αλληλεπιδρά με το DNA (Rocchi 2022). Για να επιτευχθεί η δράση του ενζύμου δημιουργείται ένα πολυμερές σύμπλοκο με υψηλή σταθερότητα που ονομάζεται ιντάσωμα (intasome) (Maertens 2022). Ο ρόλος της ιντεγκράσης είναι η εισαγωγή του ιικού DNA στο DNA του ξενιστή που το επιτυγχάνει με την απομάκρυνση δυο νουκλεοτιδίων από τα 3' άκρα του ιικού DNA και την ένωσή του με το DNA του ξενιστή. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από την καταλυτική επικράτεια του ενζύμου (Mbhele 2021). Σε αυτήν υπάρχει ένα σταθερό συντηρημένο μοτίβο τριών αμινοξέων, δύο ασπαρτικών και ενός γλουταμικού, στις θέσεις 64, 116 και 152 αντίστοιχα. Τα αμινοξέα αυτά αλληλεπιδρούν για το σχηματισμό του ενεργού κέντρου και συμβάλλουν στην δέσμευση ενός ζεύγους ιόντων Mg^{2+} που συμμετέχει στην δράση της ιντεγκράσης, διευκολύνοντας τη διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών (Maertens 2022).



Εικόνα 8: *Η δομή της ιντεγκράσης. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η αμινοτελική επικράτεια, με κόκκινο το ενεργό κέντρο και με πράσινο χρώμα η καρβοξυτελική επικράτεια. (Mbhele 2021)*

1.5. Αντιρετροϊκή θεραπεία

Παρόλο που έχουν περάσει περίπου 40 χρόνια από την εμφάνιση του ιού HIV, υπάρχουν ακόμη πολλά εκατομμύρια ανθρώπων που ζουν με τον ιό. Για το λόγο αυτό ο κύριος στόχος της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι ο περιορισμός του πολλαπλασιασμού του HIV, μειώνοντας ως επακόλουθο το ιικό του φορτίο

σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, με σκοπό την αύξηση του προσδόκιμου ζωής και τη βελτίωσή της σε αυτά τα άτομα (Venanzi Rullo 2019). Το πιο σύγχρονο σχήμα θεραπείας που ακολουθείται είναι η υψηλά ενεργή αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART) που και βασίζεται στο συνδυασμό τριών ή τεσσάρων διαφορετικών φαρμάκων για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του HIV. Τα κύρια φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην αντιρετροϊκή αγωγή στοχεύουν τα βασικά ένζυμα του ιού, δηλαδή την πρωτεάση, την αντίστροφη μεταγραφάση και την ιντεγκράση (Iyidogan 2014).

Πιο αναλυτικά, στη HAART ανήκουν τέσσερις κατηγορίες φαρμάκων. Για την αντίστροφη μεταγραφάση υπάρχουν δυο είδη αναστολέων: οι νουκλεοσιδικοί (NRTIs) και οι μη-νουκλεοσιδικοί (NNRTIs). Οι NRTIs δρουν ως ανάλογα των dNTPs που χρησιμοποιούνται κατά το σχηματισμό της αλυσίδας DNA από την πολυμεράση, αναστέλλοντας την δημιουργία του ιικού DNA, και δρώντας ως τερματιστές. Οι NNRTIs προσδένονται σε αλλοστερικές θέσεις σύνδεσης στο ένζυμο, προκαλώντας έτσι διαμορφωτικές αλλαγές στο ενεργό του κέντρο αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσδεση των dNTPs, αναστέλλοντας ως επακόλουθο εξολοκλήρου τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης (Dionne 2019). Οι αναστολείς της RT εμφανίζουν υψηλή απόδοση, ωστόσο, μετά από μακροχρόνια λήψη προκύπτουν αρκετά πολυανθεκτικά στελέχη του ιού, καθιστώντας αναγκαίο το σχεδιασμό νέων αναστολέων. Οι NNRTIs αποτελούν επίκεντρο των ερευνών λόγω της ειδικής δράσης τους και της χαμηλής κυτταροτοξικότητας που προκαλούν (Romeo 2019).

Τα φάρμακα που στοχεύουν την πρωτεάση είναι οι αναστολείς πρωτεάσης (PI), οι οποίοι προσδένονται στο ένζυμο προλαμβάνοντας έτσι την πρωτεόλυση των Gag και Pol και συνεπώς την ωρίμανση των ιοσωμάτων (Dionne 2019). Οι πρώτοι PIs που κατασκευάστηκαν είχαν πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και έντονο πεπτιδικό χαρακτήρα, δημιουργώντας πολλά μεταβολικά προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό. Το γεγονός αυτό, όπως και η συχνή εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του HIV, οδήγησαν στο σχεδιασμό των PIs δεύτερης γενιάς με βελτιωμένη δράση ενάντια στα ανθεκτικά στελέχη και αυξημένο χρόνο ημιζωής (Ghosh 2016).

Οι αναστολείς της ιντεγκράσης λέγονται αναστολείς μεταφοράς κλώνου (INSTIs). Ο τρόπος δράσης τους είναι η παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου μέσω της απενεργοποίησης του ιντασώματος. Με αυτό τον τρόπο, η ιντεγκράση δε μπορεί να δεσμεύσει το DNA του ξενιστή άρα δε μπορεί να ενσωματώσει σε αυτό το ιικό DNA. Όπως και με τους υπόλοιπους αναστολείς, η χρόνια χρήση ευνοεί την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του HIV, κάνοντας αναγκαίο το σχηματισμό νέων φαρμάκων (Mbhele 2021). Μια ακόμη κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων στοχεύει στην παρεμπόδιση της αναγνώρισης και της σύντηξης του ιού με τα CD4+ λεμφοκύτταρα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ένας ανταγωνιστής για τον υποδοχέα CCR5 των λεμφοκυττάρων, ένας ανταγωνιστής για την γλυκοπρωτεΐνη gp41 του ιικού φακέλου, και οι αναστολείς πρόσδεσης του HIV με τα CD4+ (Venanzi Rullo 2019).

Ο εθνικός οργανισμός φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) προτείνει τη λήψη αντιρετροϊκής θεραπείας από όλα τα άτομα που ζουν με τον HIV ξεκινώντας το συντομότερο δυνατό μετά τη διάγνωση της μόλυνσης. Η θεραπεία πρέπει να είναι καθημερινή με λήψη φαρμάκων τουλάχιστον δυο διαφορετικών κατηγοριών (FDA 2022).

Επιπλέον, μελέτες παρουσιάζουν τη χρήση ενέσιμων συνδυασμών των υπάρχοντων αντιρετροϊκών φαρμάκων για μακράς διάρκειας θεραπεία ως ευκολότερη και πιο σύγχρονη λύση για τα άτομα που ζουν με τον ιό. Η ενέσιμη θεραπεία θα επιτρέπει την λήψη ανά εξάμηνο και πρόκειται να διευκολύνει τον τρόπο ζωής των ατόμων που υποβάλλονται σε αυτή. Μεγάλα ποσοστά ατόμων συμφωνούν με την αναβάθμιση της θεραπείας τους σε μακράς διάρκειας(65%-89% στην Ευρώπη και 72% στην Ελλάδα). Παρόλα αυτά είναι ακόμη σε στάδιο δοκιμών (Thornhill 2021, Λουρίδα 2022)

***Πίνακας 1**: Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην αντιρετροϊκή θεραπεία. Πηγή: https://hivinfo.nih.gov*

Κατηγορία φαρμάκου	**Όνομα**
NRTIs	Abacavir (ABC)
	Emtricitabine (FTC)
	Lamivudine (3TC)
	Tenofovir disoproxil fumarate (TDF)
	Zidovudine (AZT/ZDV)
NNRTIs	Doravirine (DOR)
	Efavirenz (EFV)
	Etravirine (ETR)
	Nevirapine (NVP)
	Rilpivirine (RPV)
PIs	Atazanavir (ATV)
	Darunavir (DRV)
	Fosamprenavir (FPV)
	Ritonavir (RTV)
	Tipranavir (TPV)
INSTIs	Cabotegravir (CAB)
	Dolutegravir (DTG)
	Raltegravir (RAL)
Αναστολείς Σύντηξης	Enfuviride (T-20)
Ανταγωνιστής CCR5	Maraviroc (MVC)
Αναστολείς πρόσδεσης	Fostemsavir (FTR)
	ibalizumab-uiyk (TNX-355)
Ενισχυτές φαρμακοκινητικής	Cobicistat (COBI)

***Πίνακας 2**: Η λίστα των σχημάτων συνδυαστικής αγωγής.*
Πηγή:https://hivinfo.nih.gov

Συνδυαστική αντιρετροϊκή θεραπεία
ABC / 3TC
ABC / DTG / 3TC
ABC / 3TC / ZDV
ATV / COBI
BIC / FTC / TAF
CAB / RPV
DRV / COBI
DRV / COBI / FTC / TAF
DTG / 3TC
DTG / RPV
DOR / 3TC / TDF
EFV / FTC / TDF
EFV / 3TC / TDF
EVG / COBI / FTC / TAF
EVG / COBI / FTC / TDF
FTC / RPV / TAF
FTC / RPV / TDF
FTC / TAF
FTC / TDF
3TC / TDF
3TC / ZDV
LPV / RTV

1.6. Αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία

Η συνδυαστική αντιρετροϊκή θεραπεία για τον HIV έχει βελτιώσει την ποιότητα ζωής των ατόμων που ζούν με τον ιό, κάνοντας το ιικό φορτίο μη ανιχνεύσιμο. Πιθανόν όμως μετά από χρόνια θεραπείας τα φάρμακα να αδυνατούν να σταματήσουν πλήρως τον πολλαπλασιασμό του HIV διευκολύνοντας έτσι την δημιουργία στελεχών με μεταλλάξεις που τα καθιστούν ανθεκτικά στην αντιρετροϊκή αγωγή (Van Laethem 2015, Rosemary 2018). Επιπλέον, στελέχη του HIV-1 που φέρουν μεταλλάξεις είναι δυνατό να μεταδοθούν, οπότε τα άτομα που μολύνονται από τα συγκεκριμένα στελέχη εμφανίζουν αντοχή πριν υποβληθούν στην αντιρετροϊκή θεραπεία (Clutter 2016).

Οι μεταλλάξεις συναντώνται κυρίως στα γονίδια της πρωτεάσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης και σε πολύ μικρότερο ποσοστό στο γονίδιο της ιντεγκράσης. Ο έλεγχος για την αντοχή στην αντιρετροϊκή αγωγή γίνεται με αλληλούχηση των γονιδίων που στοχεύουν τα φάρμακα για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων σε αυτά (Pandit 2008). Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται μπορεί να επηρεάζουν σημαντικά τη δράση των φαρμάκων δρώντας αλλόστερικά ή στο ενεργό κέντρο των φαρμάκων.

Για τον έλεγχο των μεταλλάξεων και την εκτίμηση του γονοτύπου χρησιμοποιείται η βάση δεδομένων για την αντοχή φαρμάκων του HIV του Πανεπιστημίου του Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database ή HIVdb - https://hivdb.stanford.edu/). Σε αυτή συγκεντρώνονται δεδομένα από περίπου 200.000 άτομα που ζουν με τον HIV και ακολουθούν αντιρετροϊκή θεραπεία και αποτελεί την πιο διαδεδομένη πηγή για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στην αγωγή (Blassel 2021). Σύμφωνα με την HIVdb τα ποσοστά αντοχής των τελευταίων χρόνων στην Ευρώπη κυμαίνονται περίπου στο 7%.

Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα, για τον πληθυσμό που ζει με τον HIV και δεν έχει υποβληθεί σε αντιρετροϊκή θεραπεία, τα πιο πρόσφατα δεδομένα από μελέτη που διήρκησε από το 2012 έως το 2015 δείχνουν πως τα ποσοστά αντοχής στη θεραπεία είναι 5,3%. Η αντοχή στους NNRTIs ανέρχεται στο 4,4% και η αντοχή στους NRTIs και τους PIs είναι στο 0,9%, χωρίς να υπάρχουν στοιχεία

για την αντοχή στους αναστολείς της ιντεγκράσης. (Kostaki 2018). Ωστόσο, από τα πιο πρόσφατα δεδομένα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος για το έτος 2022, η αντοχή σε νεοδιαγνωσθέντα άτομα είναι σε ποσοστό 12% για τους NNRTIs, ενώ δεν εντοπίζονται μεταλλάξεις που να προσδίδουν αντοχή σε κάποιον άλλο αναστολέα. (Πρόκτερ Κ. 2022)

Επιπλέον, συλλογικά, τόσο για άτομα που έχουν υποβληθεί σε αντιρετροϊκη θεραπεία όσο και για νεοδιαγνωσθέντα άτομα που δεν άρχισαν τη λήψη κάποιας αγωγής, σύμφωνα με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος, οι μεταλλάξεις αντοχής για τους αναστολείς της πρωτεάσης υπολογίζονται στο 4,8%, για τους NRTIs και τους NNRTIs στο 9,7% και 17,7% αντίστοιχα. Επιπλέον, μελετώνται και οι μεταλλάξεις αντοχής στους INSTIs που ανέρχονται στο 7,3% και αφορούν μόνο άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκη αγωγή (Πρόκτερ Κ. 2022).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο τη πρωτεάσης που προσδίδουν αντοχή στους PIs χαρακτηρίζονται σε πρωτεύουσες και δευτερεύουσες. Οι πρωτεύουσες μεταλλάξεις επιφέρουν αμινοξικές αλλαγές στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και κυρίως μεταβάλλουν την άμεση αλληλεπίδραση των PIs με την πρωτεάση. Συγκεκριμένα, μειώνουν τη συγγένεια του ενζύμου με τους αναστολείς και προωθούν τις αλληλεπιδράσεις με το φυσιολογικό υπόστρωμα του, δηλαδή τις πολυπρωτεΐνες του ιού. Οι δευτερεύουσες μεταλλάξεις συμβαίνουν μακριά από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και είναι συμπληρωματικές στη δράση των πρωτευουσών (Ghosh 2016).

Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το πρώτο γονίδιο στο οποίο εντοπίστηκε μετάλλαξη αντοχής. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τους αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης συμβαίνουν κυρίως στη θέση πρόσδεσης των εισερχόμενων νουκλεοτιδίων και επηρεάζουν τη δομή της. Οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν αντοχή τόσο στους NRTIs όσο και στους NNRTIs. Επιπλέον, άλλες μεταλλάξεις της αντίστροφης μεταγραφάσης είναι οι μεταλλάξεις αναλόγων θυμιδίνης (Thymidine Analog Mutations ή TAMs) οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση των αναλόγων των dNTPs των NRTIs και την συνέχιση της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής (Singh 2022).

Στο γονίδιο της ιντεγκράσης οι σημαντικότερες μεταλλάξεις είναι αυτές των κωδικονίων Q148 και N155. Οι αλλαγές των αμινοξέων στα συγκεκριμένα σημεία αποσταθεροποιούν το συντονισμό του ζεύγους ιόντων Mg^{2+} στην καταλυτική επικράτεια του ενζύμου και επηρεάζουν τη συγγένεια του αναστολέα με το ιντάσωμα άρα και την πρόσδεση του (Maertens 2022).

Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες που δείχνουν τις βασικές μεταλλάξεις στο κάθε γονίδιο και τα φάρμακα στα οποία αναπτύσσεται αντοχή εξαιτίας τους. Ο συμβολισμός των μεταλλάξεων γίνεται με βάση τον κώδικα αμινοξέων ενός γράμματος και τη θέση του κωδικονίου. Το πρώτο γράμμα του συμβολισμού αντιστοιχεί στο αγρίου τύπου κατάλοιπο της θέσης ενώ αυτό που ακολουθεί τον αριθμό συμβολίζει το κατάλοιπο που προκύπτει από τις μεταλλάξεις. Όπου σημειώνονται περισσότεροι συμβολισμοί αμινοξέων σημαίνει πως το βασικό αμινοξύ μπορεί να αντικατασταθεί από περισσότερα αμινοξέα και έτσι αναφέρονται όλες οι πιθανές εκδοχές.

***Πίνακας 3**: Κώδικας Αμινοξέων ενός γράμματος*

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

***Πίνακας 4**: Οι θέσεις μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία. Πηγή: https://hivdb.stanford.edu/*

Γονίδιο	***Αναστολέας***	***Μεταλλάξεις***												
PR	**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
RT	**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				
INT	**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			

1.8. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων διεξαγωγής των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των δειγμάτων HIV για αλληλούχηση κατά Sanger, ώστε να διαπιστωθεί ποιες είναι οι βέλτιστες. Από τα δείγματα, απομονώνονται και ενισχύονται τα γονίδια της πρωτεάσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης σε ένα κοινό, δίκλωνο DNA. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει, πρώτα την απομόνωση του ιικού RNA, έπειτα την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) για τη δημιουργία του ιικού DNA, στη συνέχεια την εσωτερική ενίσχυση του τμήματος της PR-RT με φωλεακή PCR (Nested-PCR) και την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης. Τέλος, πραγματοποιείται ο καθαρισμός του προϊόντος και η ποσοτικοποίηση του με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1.Αναλώσιμα- Εξοπλισμός

-Αποστηρωμένα σωληνάρια eppendorf 1,5 mL

-Αποστηρωμένα σωληνάρια για PCR 0,2 mL

-Πιπέτες και ρύγχη με φίλτρο

-Θάλαμος βιοασφάλειας για απομόνωση RNA

-Θάλαμος βιοασφάλειας για προετοιμασία της PCR

-Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)

-Θερμοκυκλοποιητής (Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cycler)

-Ηλεκτροφορητική συσκευή

-Σύστημα φωτογράφησης πηκτώματος (FastGene FAS-DIGI PRO)

-Φυγόκεντρος 12 θέσεων (FastGene High Speed Mini Centrifuge)

-Φασματοφωτόμετρο (Quawell 9000)

-Αιθανόλη

-Εκκινητές PCR (Forward και Reverse)

2.2.Δείγματα

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία είναι δείγματα ατόμων που ζουν με τον ιό HIV, τα οποία εξετάστηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ).Ύστερα από τη διάγνωση τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ποσοτικοποίηση ιικού φορτίου για τον υπολογισμό των ιοσωμάτων στο πλάσμα των ατόμων. Επειδή τα δείγματα προέρχονται και από νεοδιαγνωσθέντα άτομα και από άτομα που βρίσκονται υπό αντιρρετροϊκή, ο λογάριθμος που προκύπτει ποικίλει ανάλογα με την

περίπτωση καθώς και την επιτυχία της αγωγής. Τα δείγματα διακρίνονται με ένα πενταψήφιο κωδικό που δίνεται κατά την εξέταση.

Η συγκριτική μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές μεθόδους για τις ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες:

-Απομόνωση (extraction) νουκλεϊκού οξέος (RNA)

-Φωλεακή Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Nested PCR)

-Καθαρισμός (purification) νουκλεϊκού οξέος (DNA)

2.3. Απομόνωση νουκλεϊκού οξέος

Πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του γενετικού υλικού του ιού.

Στο βήμα αυτό συγκρίθηκαν πέντε δείγματα με μεθόδους απομόνωσης δυο διαφορετικών εταιρειών. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται είναι παρόμοια και στις δύο, με σημαντικές διαφορές στους χρόνους φυγοκέντρησης και επώασης, και στους όγκους των διαλυμάτων που απαιτούνταν στο κάθε βήμα.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο βιοασφάλειας ώστε να διεξαχθεί το πείραμα σε άσηπτες συνθήκες, εξασφαλίζοντας την αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων του δείγματος, και την ασφάλεια του εργαστηριακού προσωπικού και του περιβάλλοντα χώρου.

Οι στήλες καθαρισμού, τα σωληνάρια συλλογής και τα αντιδραστήρια παρέχονται από τον κατασκευαστή.

Το πρώτο και πολύ σημαντικό βήμα που πραγματοποιήθηκε πριν από κάθε μέθοδο, είναι η σημείωση του κωδικού του κάθε δείγματος στα αντίστοιχα σωληνάρια και τις στήλες καθαρισμού που θα χρησιμοποιηθούν για την αποφυγή σφαλμάτων.

2.3.1. QIAamp Viral RNA Mini

Το QIAamp Viral RNA Mini Kit της εταιρείας Qiagen απαιτεί πρώτα την ανάμειξη 140 μL δείγματος με 560 μL διαλύματος λύσης (διάλυμα AVL), στο οποίο έχει προστεθέι Carrier RNA στην κατάλληλη συγκέντρωση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Γίνεται παλμική ανάδευση του Eppendorf με το μίγμα πλάσματος-AVL για 15 sec στο vortex. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και μετά μια πολύ σύντομη φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση πιθανών σταγονιδίων από το καπάκι του Eppendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 560 μL κρύας απόλυτης αιθανόλης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της παλμικής ανάδευσης και της σύντομης φυγοκέντρησης. Έπειτα, ποσότητα 630 μL του μίγματος πλάσμα-AVL-αιθανόλη, τοποθετείται στην αντίστοιχη στήλη καθαρισμού και γίνεται φυγοκέντρηση διαρκείας 1 min στα 6000 x g. Το σωληνάριο συλλογής (collection tube) με το περιεχόμενό του (εκλουόμενο παραπροϊόν) απορρίπτεται και, ώστε να επαναληφθεί η διαδικασία με την υπόλοιπη μισή ποσότητα του μίγματος.

Αφού απορριφθεί και το δεύτερο collection tube και η στήλη επανατοποθετηθεί σε καινούριο, προστίθεται σε αυτή το πρώτο διάλυμα έκπλυσης (wash buffer), AW1, σε όγκο 500 μL και πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση με ταχύτητα 6000 x g για 1 min. Το collection tube που χρησιμοποιήθηκε απορρίπτεται και αντικαθίσταται. Ύστερα προστίθενται 500 μL από το δεύτερο wash buffer, AW2, και εκτελείται φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (14000 x g) για 3 min. Μετά από αυτό το βήμα, και αφού αλλαχθεί ξανά το collection tube, πραγματοποιείται άλλη μια φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα διαρκείας 1 min, με σκοπό να απομακρυνθεί πλήρως η περίσσεια αιθανόλης από τη μεμβράνη της στήλης.

Στο τελευταίο βήμα, η στήλη τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf, στο οποίο θα γίνει η έκλουση του ιικού RNA που έχει δεσμευθεί στη μεμβράνη της στήλης. Προστίθενται, στη στήλη 40 μL από το διάλυμα έκλουσης (elution buffer), AVE, και πραγματοποιείται μια τελευταία φυγοκέντρηση διαρκείας 1 min στα 6000 x g. Τέλος, η στήλη απορρίπτεται και το σωληνάριο με το RNA διατηρείται σε πάγο

2.3.2. E.Z.N.A. Viral RNA Kit

Το extraction με το E.Z.N.A. Viral RNA Kit της εταιρείας Omega Bio-Tek, ξεκινά με την ανάμειξη, σε Eppendorf, του κλινικού δείγματος με το διάλυμα λύσης, QVL, στο οποίο έχει προστεθεί το Carrier RNA. Οι ποσότητες που απαιτούνται σε αυτό το βήμα είναι 150 μL πλάσματος και 500 μL διαλύματος λύσης. Πραγματοποιείται ανάδευση με το vortex για 30 sec και αναμονή 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αναμονή, το διάλυμα φυγοκεντρείται σύντομα για την απομάκρυνση των σταγονιδίων από το καπάκι του σωληναρίου. Ακολουθεί η προσθήκη 350 μL απόλυτης αιθανόλης και μετά ξανά ανάδευση με vortex για 30 sec και πολύ σύντομη φυγοκέντρηση.

Το επόμενο βήμα είναι η μεταφορά 750 μL του διαλύματος στη στήλη, και η φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (14000 x g) για 15 sec. Στο συγκεκριμένο βήμα του πρωτοκόλλου, ο κατασκευαστής προτείνει την απόρριψη μόνο του περιεχομένου του collection tube και την επαναχρησιμοποίησή του, όμως για αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων, απορρίπτεται και το collection tube και αντικαθίσταται από νέο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ώστε να διαπεράσει από τη μεμβράνη της στήλης όλη η ποσότητα του αρχικού διαλύματος.

Έπειτα, αφού η στήλη τοποθετηθεί σε καθαρό σωληνάριο συλλογής προσθέτονται 500 μL από το διάλυμα VHB, που αποτελεί το πρώτο διάλυμα έκπλυσης και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση διαρκείας 15 sec στα 14000 g. Το collection tube απορρίπτεται, αντικαθίσταται και ακολουθεί η προσθήκη 500 μL από το δεύτερο διάλυμα έκπλυσης, Wash Buffer II, και ξανά φυγοκέντρηση στα 14000 x g για 15 sec. Η δεύτερη έκπλυση επαναλαμβάνεται και ύστερα η στήλη φυγοκεντρείται για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα, για να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα αιθανόλης, που περιέχεται στα διαλύματα έκπλυσης, από τη μεμβράνη.

Τέλος, η στήλη τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf, και προστίθενται 40 μL διαλύματος έκλουσης, συγκεκριμένα νερού RNAse free water, Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 14000 x g, συλλέγεται το RNA και η στήλη απορρίπτεται.Το RNA διατηρείται σε πάγο.

***Πίνακας 5**: Οι βασικές διαφορές των extraction kit*

	QIAamp Viral RNA Mini Kit	**E.Z.N.A. Viral RNA Kit**
Όγκος διαλύματος λύσης	560 μL	500 μL
Όγκος αιθανόλης	560 μL	350 μL
Εκπλύσεις	2	3
Όγκος δείγματος	140 μL	150 μL
Ταχύτητα φυγοκεντρήσεων	6000 g	14000 g
Χρόνος φυγοκεντρήσεων	1 min	15 sec
Διάλυμα έκλουσης	Elution Buffer	H_2O (RNAase free)

Το RNA των δειγμάτων που απομονώθηκε, φωτομετρείται σε έτσι ώστε να αξιολογηθεί η καθαρότητα και ποσότητα του απομονωμένου RNA. Ύστερα τα δείγματα αποθηκεύονται σε ψύξη (-80ο C) ή χρησιμοποιούνται άμεσα για την PCR αντίστροφης μεταγραφής.

Η διαδικασία της RT-PCR δεν θα αναφερθεί στην παρούσα εργασία καθώς πραγματοποιήθηκε από τους επιβλέποντες.

2.4. Φωλεακή PCR

Για την περαιτέρω ενίσχυση των γονιδίων της πρωτεάσης (PR) και της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) πραγματοποιείται PCR, στο ήδη ενισχυμένο τμήμα του DNA που προέκυψε από την RT-PCR.

Χρησιμοποιήθηκαν 8 δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν με ενζυμικά αντιδραστήρια πολυμερισμού δύο διαφορετικών κατασκευαστών. Η διαδικασίες πραγματοποιούνται σε θάλαμο βιοασφάλειας για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων.

Τα αντιδραστήρια του πειράματος διατηρούνται σε κατάψυξη στους -20ο C.

Όπως και στο extraction, είναι πολύ σημαντική η σωστή σήμανση των σωληναρίων.

2.4.1. Πολυμεράση του Kit Platinum PCR SuperMix high fidelity

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή η αντίδραση πρέπει να περιέχει τις εξής ποσότητες:

Πίνακας 6*: Οι ποσότητες αντιδραστηρίων για την Nested PCR*

Αντιδραστήριο	**Όγκος ανά δείγμα (μL)**
Primer F	1
Primer R	1
Platinum mastermix	45
Σύνολο	47
Δείγμα	3

Μετά την προετοιμασία της αντίδρασης, τα σωληνάρια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή και οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι της κάθε αντίδρασης ρυθμίζονται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πίνακας 7*: Το πρωτόκολλο για το ένζυμο Platinum PCR SuperMix high fidelity*

Βήμα	**Θερμοκρασία (C^{o})**	**Χρόνος**	**Κύκλοι**
Αρχική αποδιάταξη	94	2 min	1
Αποδιάταξη	94	30sec	35
Υβριδοποίηση	52	30 sec	
Επιμήκυνση	68	2 min	
Διατήρηση	4	Hold(<24 hr)	1

2.4.2 Πολυμεράση DreamTaq DNA Polymerase

***Πίνακας 8**: Τα αντιδραστήρια για τη Nested PCR με DreamTaq Polymerase*

Αντιδραστήριο	**Όγκος ανά δείγμα (μL)**
10x Buffer dNTPs (2mM) Water Primer F Primer R DreamTaq	5 5 32 1 1 1
Σύνολο Δείγμα	45 5

Τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή και ρυθμίζονται οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες για την κάθε αντίδραση της PCR σύμφωνα με τις ανάγκες του ενζύμου.

***Πίνακας 9**: Το πρωτόκολλο για την DreamTaq Polymerase*

Βήμα	**Θερμοκρασία (C^{o})**	**Χρόνος**	**Κύκλοι**
Αρχική αποδιάταξη	95	2 min	1
Αποδιάταξη	95	30 sec	35
Υβριδοποίηση	52	30 sec	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική Επιμήκυνση	72	7 min	1
Διατήρηση	4	Hold(<24 hr)	

Μετά την Nested PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για την εκτίμηση της επιτυχίας ή της αποτυχίας της αντίδρασης.

2.5. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 1%. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι το TBE σε συγκέντρωση 1x. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιείται 1 gr αγαρόζης και 100 mL TBE 1x, τα οποία αναμειγνύονται σε κωνική φιάλη και θερμαίνονται σε φούρνο

μικροκυμάτων για περίπου 2 min έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 μL χρωστικής στο διάλυμα (SYBR Safe DNA gel stain), το οποίο αναδεύεται ήπια για την ενσωμάτωση της χρωστικής. Ακολουθεί απόχυση του υγρού μίγματος αγαρόζης στο δοχείο ηλεκτροφόρησης. Ταυτόχρονα, προετοιμάζεται το δοχείο για την πηκτή με τα κατάλληλα χτένια και εκεί τοποθετείται το διάλυμα μέχρι να στερεοποιηθεί και να δημιουργηθεί η γέλη.

Στο πρώτο πηγάδι που δημιουργείται, τοποθετείται ο μάρτυρας (HyperLadder™ 50bp).Στα επόμενα πηγάδια τοποθετούνται 5 μL από το κάθε δείγμα, τα οποία έχουν αναμειχθεί σε εργαστηριακό φιλμ με 1 μL διαλύματος φόρτωσης (DNA Gel Loading Dye (6X)).

Το πήκτωμα τοποθετείται σε ηλεκτροφορητική συσκευή και συμπληρώνεται σε αυτή διάλυμα TBE συγκέντρωσης 0,5x μέχρι να καλύπτονται τα πηγάδια. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε 120 V για διάρκεια 40 min.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή φωτογράφησης που περιέχει λάμπα UV για την απεικόνιση του αποτελέσματος.

Τα δείγματα που δεν έχουν ενισχυθεί επιτυχώς δεν απεικονίζονται, οπότε δεν χρησιμοποιούνται στο στάδιο του καθαρισμού.

2.6. Καθαρισμός προϊόντος

Ο καθαρισμός του ενισχυμένου προϊόντος DNA είναι απαραίτητος πριν την αποστολή του δείγματος για αλληλούχηση καθώς πιθανόν να εμπεριέχονται παραπροϊόντα όπως περίσσεια ενζύμου, εκκινητών, και λοιπών αντιδραστηρίων που συντέλεσαν το αρχικό μίγμα της PCR.

Τα δείγματα που ενισχύθηκαν από την PCR χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό με δύο διαφορετικές μεθόδους, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κάθε κατασκευαστή.

Τα σωληνάρια σημαίνονται καταλλήλως σε κάθε βήμα της μεθόδου.

2.6.1. PureLink Quick PCR Purification kit

Στη μέθοδο καθαρισμού PureLink Quick PCR της εταιρείας Invitrogen απαιτεί αρχικά την ανάδευση του διαλύματος δέσμευσης, B2, με το προϊόν της PCR (DNA). Οι όγκοι που χρειάζονται είναι σε αναλογία 4:1, άρα χρησιμοποιούνται 20 μL προϊόντος PCR και 80 μL από το διάλυμα B2. Το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρεται σε στήλη καθαρισμού, η οποία είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής, και φυγοκεντρείται για 1 min σε ταχύτητα 10000 x g. Το παραπροϊόν που εκλύεται στο collection tube απορρίπτεται και το σωληνάριο επαναχρησιμοποιείται. Έπειτα, στη στήλη προστίθεται το διάλυμα έκπλυσης, AW1, σε όγκο 650 μL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως στο προηγούμενο βήμα (10000 x g, 1 min), απόρριψη του παραπροϊόντος και επαναχρησιμοποίηση του collection tube. Το διάλυμα AW1 περιέχει αιθανόλη, οπότε η στήλη φυγοκεντρείται ξανά, στη μέγιστη ταχύτητα της φυγοκέντρου (12300 x g) για 3 min, για την απομάκρυνση πιθανών καταλοίπων αιθανόλης από την μεμβράνη. Στη συνέχεια το σωληνάριο συλλογής απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται σε αποστειρωμένο Eppendorf και ύστερα, προστίθενται προσεκτικά στη μεμβράνη 40 μL από το διάλυμα έκλουσης, E1, και η στήλη φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 3 min.

2.6.2. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up XS

Στη μέθοδο καθαρισμού NucleoSpin της εταιρείας Macherey-Nagel η διαδικασία ξεκινά, ομοίως, με την ανάμειξη σε Eppendorf του διαλύματος δέσμευσης, NTI, με το προϊόν της PCR σε αναλογία 2:1. Έτσι, προστίθενται 40 μL NTI και 20 μL από το δείγμα. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται στη στήλη, η οποία φυγοκεντρείται για 30 sec με ταχύτητα 11000 x g. Απορρίπτεται το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής και ξαναχρησιμοποιείται. Ακολουθεί η πλύση με 700 μL από το διάλυμα έκπλυσης, NT3, και η φυγοκέντρηση της στήλης για 30 sec με ταχύτητα 11000 x g. Το παραπροϊόν απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται στο ίδιο σωληνάριο για την φυγοκέντρηση με σκοπό την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης, η οποία γίνεται με ταχύτητα 11000 g για 1 min. Η στήλη καθαρισμού τοποθετείται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf και προστίθενται 40 μL διαλύματος έκλουσης BE. Τελευταίο βήμα είναι η φυγοκέντρηση σε 11000 x g για 1 min.

Μετά τον καθαρισμό ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και φωτομέτρηση των καθαρών προϊόντων για να εκτιμηθεί η απόδοση της διαδικασίας, μέσω υπολογισμού ποσότητας και καθαρότητας του εκλυόμενου προϊόντος..

Ο τρόπος ηλεκτροφόρησης των καθαρισμένων προϊόντων περιγράφεται την ενότητα 2.5.

2.7. Φωτομέτρηση

Η συσκευή, ανάλογα με τη ρύθμιση της, έχει την ικανότητα να φωτομετρεί DNA και RNA, οπότε χρησιμεύει για την εκτίμηση των δειγμάτων μετά το extraction και μετά τον καθαρισμό. Για τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιείται το Quawell 9000 Spectrophotometer, συσκευή που επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας και της ποιότητας του καθαρισμένου προϊόντος. Αρχικά, ρυθμίζεται η συσκευή μέσω των επιλογών που εμφανίζει «nucleic acids» και ύστερα «ds DNA» καθώς θα φωτομετρηθεί νουκλεϊκό οξύ και συγκεκριμένα δίκλωνο DNA. Ως «τυφλό» (“blank”) χρησιμοποιείται ο διαλύτης με τον οποίο εκλύθηκε το προϊόν μας. Για τη φωτομέτρηση, γίνεται μηδενισμός της μέτρησης χρησιμοποιώντας ώς «τυφλό» το διάλυμα έκλουσης της κάθε μεθόδου. Για παράδειγμα, για τη φωτομέτρηση του RNA που προκύπτει από το extraction με το E.Z.N.A. Viral RNA Kit χρησιμοποιείται ως «τυφλό» RNAse free water και για τη φωτομέτρηση του DNA μετά από τον καθαρισμό με το PureLink Quick PCR Purification kit χρησιμοποιείται το διάλυμα E1 (1μl στην εισδοχή του δείγματος και ολοκλήρωση της διαδικασίας με τις επιλογές «blank» και «measure». Στη συνέχεια, προστίθεται 1 μL προϊόντος στην εισδοχή του δείγματος και έπειτα έπειτα η συσκευή εκφράζει την συγκέντρωσή του σε ng/μL και την καθαρότητά του σε λόγο 260/280, δηλαδή στην απορρόφηση νουκλεϊκών οξέων προς την απορρόφηση πρωτεϊνών που πιθανών παραμένουν ακόμη ως παραπροϊόντα.

Είναι απαραίτητος ο καλός καθαρισμός της εισδοχής με ειδικό πανί πριν από κάθε μέτρηση, ώστε να αποφευχθούν λάθη και προσμίξεις.

3. Αποτελέσματα

***Πίνακας 10**: Αποτελέσματα φωτομέτρησης των RNA που απομονώθηκαν από τα δύο extraction kit*

SAMPLE	Omega		Qiagen	
	260/280	**c**	**260/280**	**c**
52847	2,012	27,76	4,3	5,2
53276	2,739	105,52	3,55	15,64
53620	2,832	128,75	3,947	6,85
53623	2,765	117,4	2,776	11,1
53624	2,712	126,55	2,891	22,186

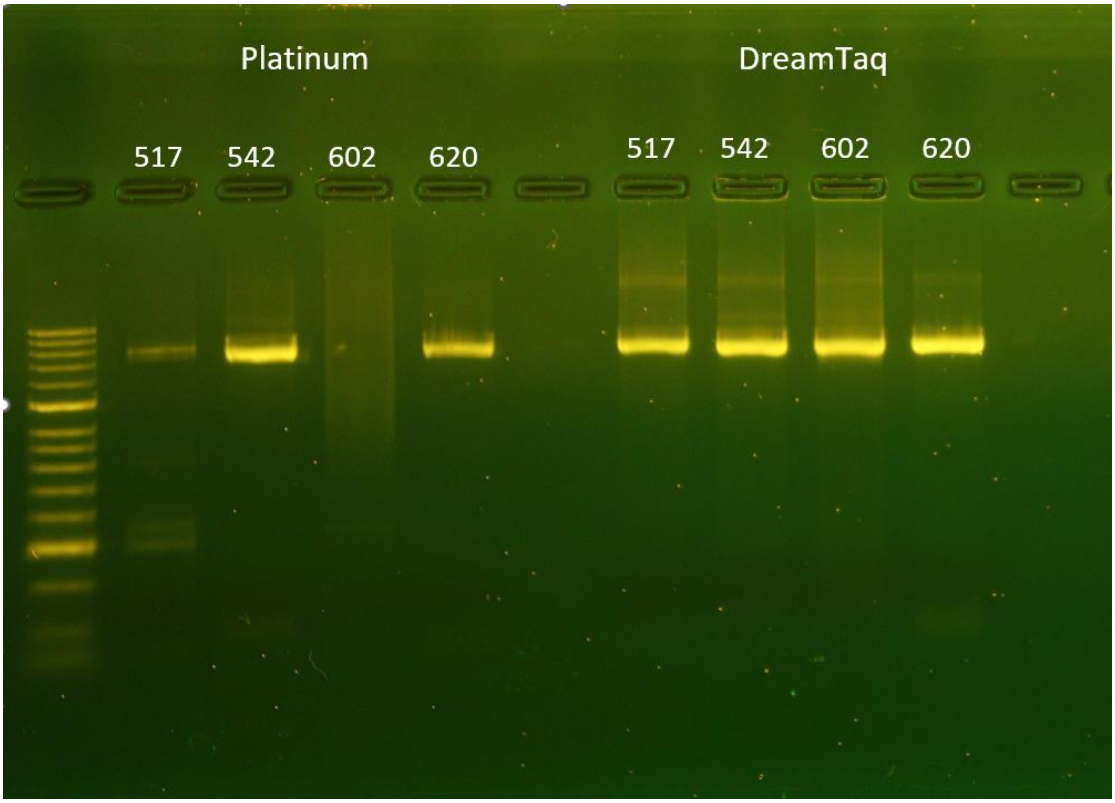
***Πίνακας 11**: Συγκεντρώσεις και καθαρότητες των RNA από τα δύο extraction kit ανά 100μL αρχικού δείγματος*

SAMPLE	Omega		Qiagen	
	260/280	**c/100μL**	**260/280**	**c/100μL**
52847	2,012	18,51	4,3	3,7
53276	2,739	70,34	3,55	11,17
53620	2,832	85,83	3,947	4,89
53623	2,765	78,26	2,776	7,9
53624	2,712	84,36	2,891	15,84

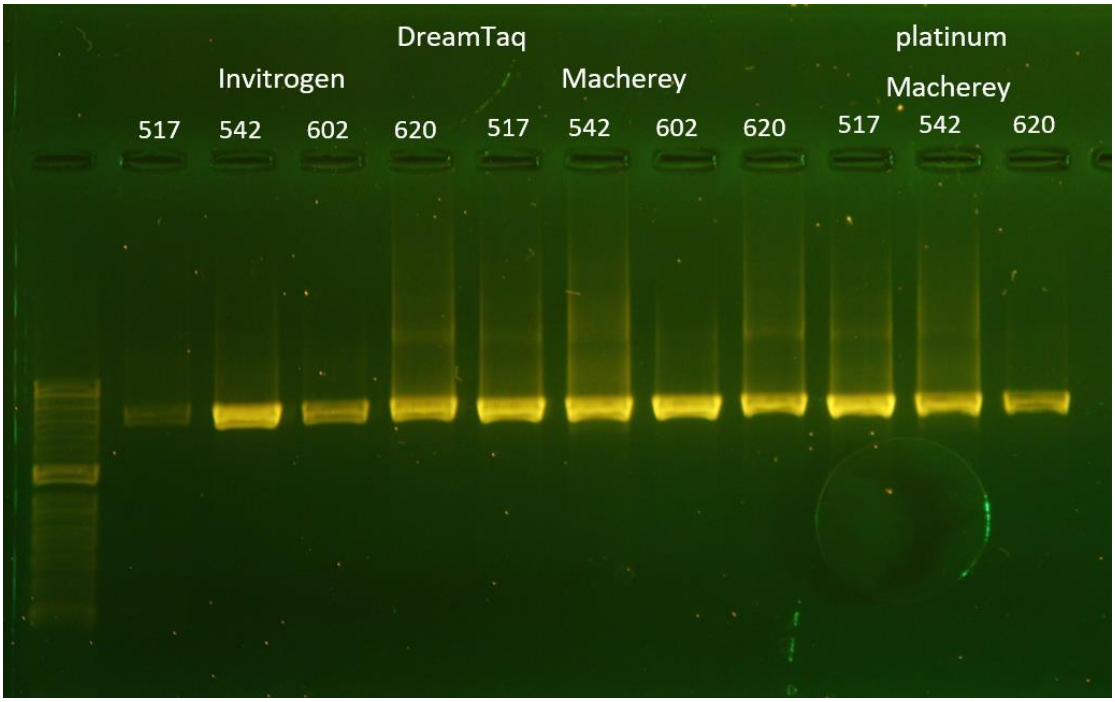
***Πίνακας 12**: Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων μετά τον καθαρισμό*

Sample	Platinum				DreamTaq			
	Invitrogen		Macherey-Nagel		Invitrogen		Macherey-Nagel	
	260/280	C	260/280	C	260/280	C	260/280	C
53517	1,73	71,275	1,63	18,575	1,74	58,675	1,685	97,075
53542	1,682	64,650	1,757	109,150	1,711	86,375	1,67	103,900
53602	1,73	68,900	-	-	1,704	77,450	1,684	126,650
53620	1,67	51,900	1,63	39,850	1,697	30,550	1,602	88,550
53636	1,758	99,475	1,488	50	1,634	40	1,239	40
53653	1,672	32,900	1,303	50	1,79	20	0,896	30
53664	1,623	54,850	1,28	50	1,74	40	0,532	30
53666	1,607	70,125	1,25	40	1,88	30	1,176	50

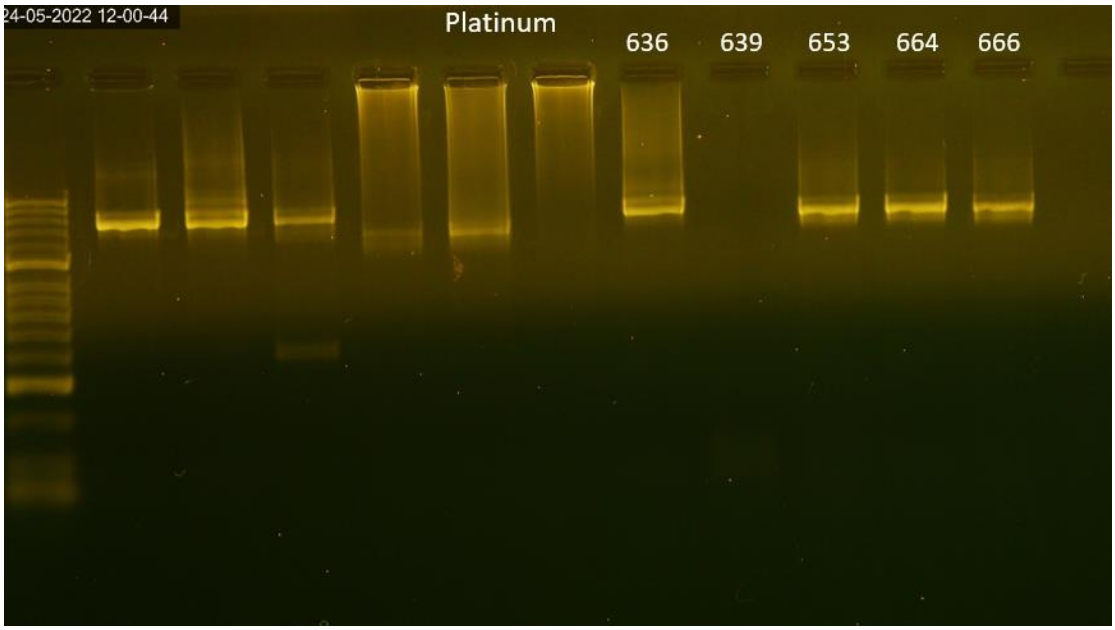
Στις παρακάτω εικόνες τα δείγματα σημειώνονται με τα 3 τελευταία ψηφία του κωδικού τους.



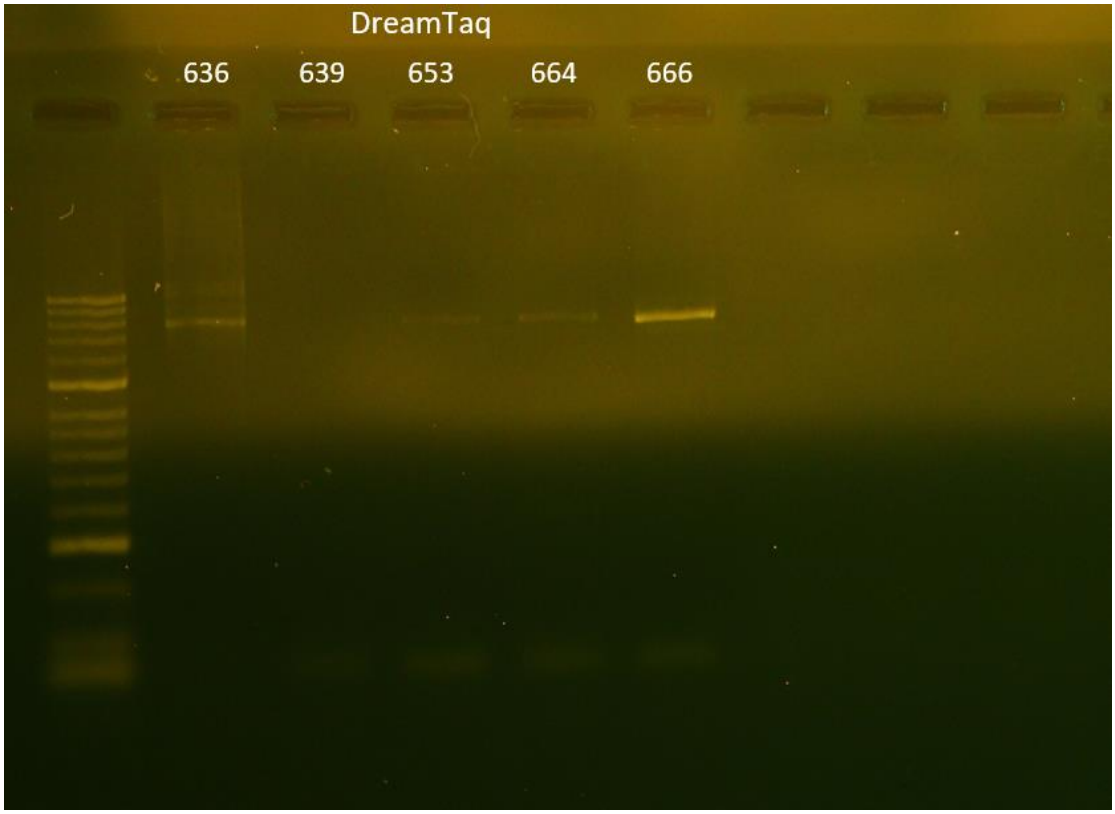
***Εικόνα 9**: Απεικόνιση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με τα δύο διαφορετικά ένζυμα*



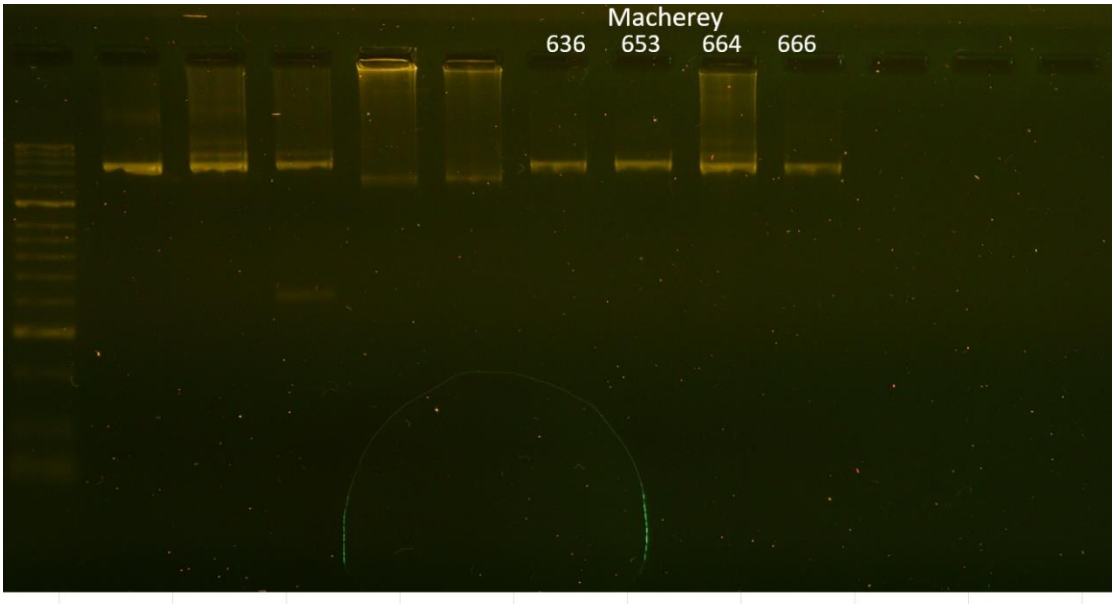
***Εικόνα 10**: Απεικόνιση σε πηκτή αγαρόζης των καθαρών προϊόντων μετά τον καθαρισμό με τα δυο kit*



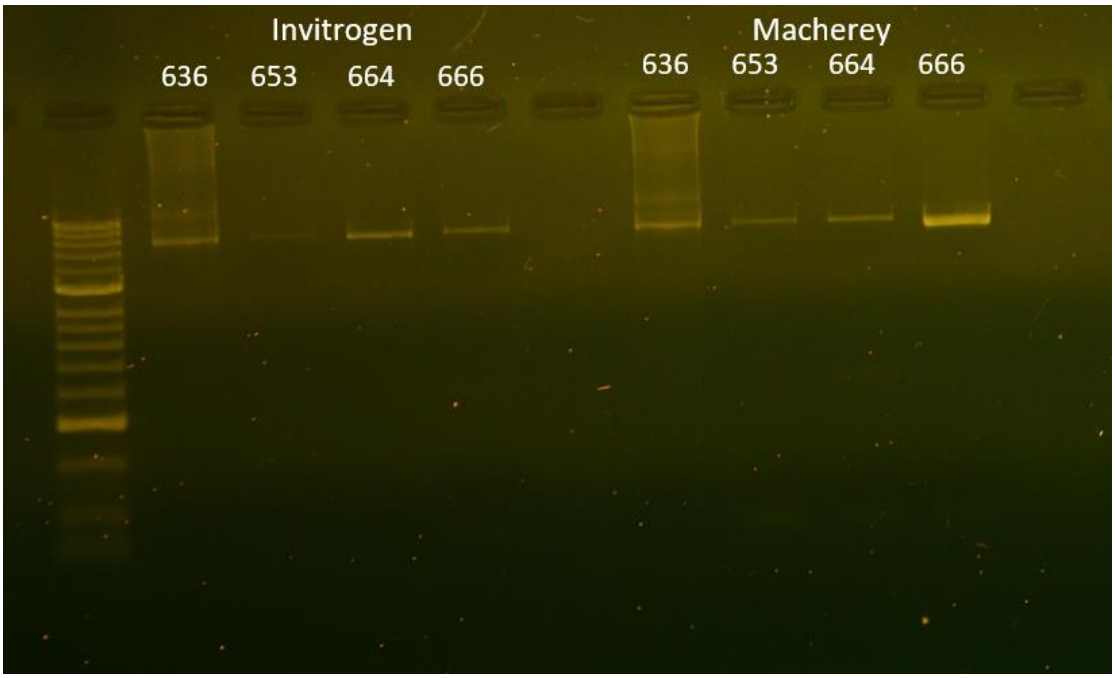
***Εικόνα 11**: Απεικόνιση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με την πολυμεράση του kit Platinum High Fidelity*



***Εικόνα 12**: Απεικόνιση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με την πολυμεράση DreamTaq*



Εικόνα 13*: Απεικόνιση σε πηκτή αγαρόζης των καθαρισμένων με το Kit της Macherey-Nagel.Η PCR έγινε με την πολυμεράση του kit Platinum High Fidelity*



Εικόνα 14*: Απεικόνιση σε πηκτή αγαρόζης των καθαρισμένων και με τα δυο kit καθαρισμού.Η PCR έγινε με την πολυμεράση DreamTaq*

4. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τις πειραματικές διαδικασίες που διενεργήθηκαν στην παρούσα εργασία συνεπάγεται ότι:

- Σε όλα τα στάδια που έγινε σύγκριση δύο διαφορετικών μεθόδων (extraction, Nested PCR και καθαρισμός) απαιτούνταν διαφορετικός τρόπος μεταχείρισης των δειγμάτων όσον αφορά τους χρόνους και τις ταχύτητες που φυγοκεντρούνταν, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του γενετικού υλικού.

- Στην PCR τα δύο ένζυμα έχουν διαφορετική πιστότητα, με το ένζυμο του Kit Platinum PCR SuperMix high fidelity να έχει 6 φορές μικρότερη πιθανότητα λάθους (Fidelity 6x vs Taq σε αντίθεση με την πολυμεράση DreamTaq που είναι στο 1x vs Taq). Συγκεκριμένα η πιθανότητα λαθών για την DreamTaq ανέρχεται στα $2.2x10^{-5}$ λάθη ανά νουκλεοτίδιο ανά κύκλο, όπως η Taq πολυμεράση. Το γεγονός αυτό επηρεάζει την επιλογή του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί όταν το παραγόμενο ενισχυμένο προϊόν πρόκειται να αποσταλεί για αλληλούχηση.

- Επιπλέον στην PCR, το ένζυμο Platinum PCR SuperMix high fidelity αυτό περιέχεται ήδη σε έτοιμο αναμιγμένο αντιδραστήριο (mastermix) με όλα τα απαραίτητα συστατικά για την PCR, και χρειάζεται μόνο την προσθήκη των δύο εκκινητών και του δείγματος. Αντίθετα, το ένζυμο της DreamTaq απαιτεί την δημιουργία του mastermix με τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση. Αυτή η διαφορά είναι σημαντική για τις δύο μεθόδους καθώς είναι πιο πιθανό να προκληθούν επιμολύνσεις κατά την προετοιμασία της PCR με το ένζυμο DreamTaq λόγω των περισσότερων βημάτων που απαιτούνται. Επίσης, η διαδικασία προετοιμασίας της PCR με την πολυμεράση DreamTaq είναι πιο χρονοβόρα.

- Στην αντίδραση της PCR με την πολυμεράση DreamTaq είναι σημαντικό το νερό που χρησιμοποιείται να είναι καθαρό από DNAάσες και RNAάσες, για να μη καταστραφούν τόσο οι εκκινητές όσο και το δείγμα.

- Στον καθαρισμό, οι στήλες που παρείχαν οι δύο εταιρείες έχουν διαφορετική διάμετρο μεμβράνης, με την μεμβράνη της Macherey- Nagel να είναι μικρότερη. Η μικρότερη μεμβράνη είναι ευκολότερο να εμποτιστεί πλήρως από το διάλυμα έκλουσης, άρα και πιθανόν να επιτρέψει την έκλουση μεγαλύτερης συγκέντρωσης του προϊόντος.

- Σε ορισμένα δείγματα ο υπολογισμός της ποσότητας των προϊόντων είναι ανακριβής, λόγω κακής λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου, και η αντίστοιχη συγκέντρωση υπολογίστηκε με βάση τη μπάντα που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται χρησιμοποιώντας το φυλλάδιο του μάρτυρα μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε.

Συνεπώς, τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα της εργασίας είναι τα παρακάτω:

- Η μέθοδος απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος της Qiagen εξάγει προϊόν μεγαλύτερης καθαρότητας σε σύγκριση με τη μέθοδο απομόνωσης της Omega που εξάγει RNA χαμηλότερης καθαρότητας αλλά πολύ υψηλότερης συγκέντρωσης . Η πολύ υψηλή συγκέντρωση πιθανόν να συνεπάγεται την ύπαρξη παραπροϊόντων. Φαίνεται πως η μέθοδος της Qiagen είναι πιο αξιόπιστη.

- Όσον αφορά την PCR, οι εικόνες από τις ηλεκτροφορήσεις δείχνουν ότι η πολυμεράση DreamTaq προσδίδει πιο ξεκάθαρες μπάντες, χωρίς παραπροϊόντα, οι οποίες είναι λιγότερο έντονες , άρα προσφέρουν χαμηλότερη συγκέντρωση προϊόντος. Οι μπάντες με τα αντιδραστήρια της Platinum είναι πιο έντονες άρα έχουν και υψηλότερη συγκέντρωση προιόντος, αλλά δεν είναι ξεκάθαρες πράγμα που συνεπάγεται την πιθανή ύπαρξη παραπροϊόντων. Η υψηλότερη συγκέντρωση προϊόντος σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη κατά 6 φορές πιστότητα της πολυμεράσης DreamTaq, καθιστούν το kit Platinum PCR SuperMix high fidelity καλύτερη επιλογή για την προετοιμασία των δειγμάτων.

- Το δείγμα 639 δεν εμφάνισε μπάντα με κανένα από τα δύο αντιδραστήρια της PCR, οπότε πιθανόν να είχε προηγηθεί κάποιο λάθος στα προηγούμενα βήματα της προετοιμασίας και όχι κατά την Nested PCR.

- Το δείγμα 602 δεν εμφάνισε μπάντα με τη χρήση του αντιδραστηρίου Platinum PCR SuperMix high fidelity, πράγμα που δείχνει πως προηγήθηκε κάποιο λάθος κατά την προετοιμασία της PCR. Αντίθετα εμφανίζεται μπάντα με τη χρήση των αντιδραστηρίων της DreamTaq, οπότε το σφάλμα οφείλεται σε λανθασμένο χειρισμό του δείγματος κατά τη χρήση των αντιδραστηρίων Platinum.

- Στα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον καθαρισμό φαίνεται πως οι δύο μέθοδοι είναι εξίσου αποδοτικές, Κρίνοντας κυρίως από την καθαρότητα των δειγμάτων (260/280), η μέθοδος καθαρισμού της εταιρείας Invitrogen εμφανίζει ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, σκοπός της εργασίας ήταν να βρεθεί ποιες από τις παραπάνω μεθόδους είναι οι πιο αξιόπιστες και αποτελεσματικές για την προετοιμασία των δειγμάτων HIV για αλληλούχηση. Αποδεικνύεται πως, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, ο πιο σωστός συνδυασμός είναι η χρήση του QIAamp Viral RNA Mini για την απομόνωση του RNA, του αντιδραστηρίου Platinum PCR SuperMix high fidelity για την PCR και της μεθόδου PureLink Quick PCR Purification για τον καθαρισμό.

5. Βιβλιογραφία

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., & Montagnier, L. 1983. «Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).» *Science*, May: 868-871. doi:10.1126/science.6189183.

Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L., & Delfraissy, J. F. 2013. «Past, present and future: 30 years of HIV research.» *Nature Reviews Microbiology*, December: 877-883. doi:10.1038/nrmicro3132.

Bbosa, N., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. 2019. "HIV subtype diversity worldwide." *Current Opinion in HIV and AIDS*, May: 153-160. doi: 10.1097/COH.0000000000000534.

Bell, N. M., & Lever, A. M. L. 2013. «HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly.» *Trends in Microbiology*, March: 136-144. doi:10.1016/j.tim.2012.11.006.

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*, December: 180-189. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.033.

Blassel, L., Zhukova, A., Villabona-Arenas, C. J., Atkins, K. E., Hué, S., & Gascuel, O. 2021. «Drug resistance mutations in HIV: new bioinformatics approaches and challenges.» *Current opinion in virology*, 56-64. doi:10.1016/j.coviro.2021.09.009.

Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, A. W., Hegerich, P. A., St Louis, D., Burke, D. S., & McCutchan, F. E. 1996. «Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand.» *Journal of virology*, September: 5935-5943. doi:10.1128/JVI.70.9.5935-5943.1996.

Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., & Shafer, R. W. 2016. «HIV-1 drug resistance and resistance testing.» *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* doi:10.1016/j.meegid.2016.08.031.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., & Vogt, P. 1986. «What to call the AIDS virus?» *Nature*, May: 10. doi:10.1038/321010a0.

Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J., & Haynes, B. F. 2011. «Acute HIV-1 Infection.» *The New England Journal of Medicine*, May: 1943-1954. doi:10.1056/NEJMra1011874.

Curran, W. J. 1983. «AIDS — Two Years Later.» *New England Journal of Medicine*, September: 609-611. doi:10.1056/NEJM198309083091011.

Dionne, B. 2019. "Key Principles of Antiretroviral Pharmacology." *Infectious disease clinics of North America*, 787-805. doi:10.1016/j.idc.2019.05.006.

Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., & Buttò, S. 2010. «HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview.» *Annali dell'Istituto superiore di sanita.* doi:10.4415/ANN_10_01_02.

FDA. 2022. *FDA-Approved HIV Medicines.* https://hivinfo.nih.gov/.

Ferguson, M. R., Rojo, D. R., von Lindern, J. J., & O'Brien, W. A. 2002. «HIV-1 replication cycle.» *Clinics in Laboratory Medicine*, September. doi:10.1016/s0272-2712(02)00015-x.

Frankel, A. D., & Young, J. A. T. 1998. «HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA.» *Annual Review of Biochemistry*, 1-25. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., & Safai, B. 1983. «Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III)

from patients with AIDS and at risk for AIDS.» *Science*, May: 500-503. doi:10.1126/science.6200936.

Ghosh, A. K., Osswald, H. L., & Prato, G. 2016. "Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS." *Journal of medicinal chemistry*, 5172-5208. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01697.

Goodsell, D. S. 2015. «Illustrations of the HIV Life Cycle.» *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 243–252. doi: 10.1007/82_2015_437.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., & Saxon, A. 1981. «Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men — Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency.» *New England Journal of Medicine*, December: 1425-1431. doi:10.1056/NEJM19811210305240.

Greene, W. C. 2007. «A history of AIDS: Looking back to see ahead.» *European Journal of Immunology*, November: 94-102. doi:10.1002/eji.200737441.

Gulnik, S., Erickson, J. W., & Xie, D. 2000. «HIV protease: enzyme function and drug resistance.» *Vitamins and hormones*, 213-256. doi:10.1016/s0083-6729(00)58026-1.

Hemelaar, J. 2012. «The origin and diversity of the HIV-1 pandemic.» *Trends in Molecular Medicine*, March. doi:10.1016/j.molmed.2011.12.001.

Hladik, F., & McElrath, M. J. 2008. «Setting the stage: host invasion by HIV.» *Nature Reviews Immunology*, June: 447-457. doi:10.1038/nri2302.

Hu, W. S., & Hughes, S. H. 2012. «HIV-1 reverse transcription.» *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, October. doi:10.1101/cshperspect.a006882.

Iyidogan, P., & Anderson, K. S. 2014. «Current Perspectives on HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance.» *Viruses*, 4095-4139. doi:10.3390/v6104095.

Konvalinka, J., Kräusslich, H. G., & Müller, B. 2015. «Retroviral proteases and their roles in virion maturation.» *Virology*, May: 403-417. doi:10.1016/j.virol.2015.03.021.

Kornfeld, H. 1989. «CD4 and the immunopathology of AIDS.» *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, November: 349-350. doi:10.1165/ajrcmb/1.5.349.

Kostaki, E. G., Nikolopoulos, G. K., Pavlitina, E., Williams, L., Magiorkinis, G., Schneider, J., Skaathun, B., Morgan, E., Psichogiou, 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.» *The Journal of infectious diseases*, 707-715. doi:10.1093/infdis/jiy239.

Maertens, G. N., Engelman, A. N., & Cherepanov, P. 2022. «Structure and function of retroviral integrase.» *Nature reviews Microbiology*, January: 20-34. doi:10.1038/s41579-021-00586-9.

Mbhele, N., Chimukangara, B., & Gordon, M. 2021. «HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance.» *International journal of antimicrobial agents*, May. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106343.

Murakami, T., & Ono, A. 2021. «HIV-1 entry: Duels between Env and host antiviral transmembrane proteins on the surface of virus particles.» *Current Opinion in Virology*, 59-68. doi:10.1016/j.coviro.2021.07.005.

Pandit, A., Mackay, W. G., Steel, C., van Loon, A. M., & Schuurman, R. 2008. "HIV-1 drug resistance genotyping quality assessment: results of the

ENVA7 Genotyping Proficiency Programme." *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 401-406. doi:10.1016/j.jcv.2008.08.021.

Rocchi, C., Gouet, P., Parissi, V., & Fiorini, F. 2022. «The C-Terminal Domain of HIV-1 Integrase: A Swiss Army Knife for the Virus?.» *Viruses*, June. doi:10.3390/v14071397.

Romeo, R., Iannazzo, D., Veltri, L., Gabriele, B., Macchi, B., Frezza, C., Marino-Merlo, F., & Giofrè, S. V. 2019. "Pyrimidine 2,4-Diones in the Design of New HIV RT Inhibitors." *Molecules.* doi:10.3390/molecules24091718.

Rosemary, A., Chika, O., Jonathan, O., Godwin, I., Georgina, O., Azuka, O., Zaidat, M., Philippe, C., Oliver, E., Oche, A., David, O., Jay, S., Ibrahim, D., Mukhtar, A., Joshua, D., Chunfu, Y., Elliot, R., Beth, C., Phyllis, K., & Emmanuel, I. 2018. «Genotyping performance evaluation of commercially available HIV-1 drug resistance test.» *PloS one.* doi:10.1371/journal.pone.0198246.

Rösner, H. I., Caldarini, M., Potel, G., Malmodin, D., Vanoni, M. A., Aliverti, A., Broglia, R. A., Kragelund, B. B., & Tiana, G. 2022. «The denatured state of HIV-1 protease under native conditions.» *Proteins*, January: 96-109. doi:10.1002/prot.26189.

Seillier-Moiseiwitsch, F., Margolin, B. H., & Swanstrom, R. 1994. «Genetic variability of the human immunodeficiency virus: statistical and biological issues.» *Annual review of genetics*, 559-596. doi:10.1146/annurev.ge.28.120194.003015.

Sharp, P. M., & Hahn, B. H. 2011. «Origins of HIV and the AIDS Pandemic.» *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, September. doi:10.1101/cshperspect.a006841.

Singh, A. K., & Das, K. 2022. «Insights into HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Inhibition and Drug Resistance from Thirty Years of Structural Studies.» *Viruses.* doi:10.3390/v14051027.

Thornhill, J., & Orkin, C. 2021. «Long-acting injectable HIV therapies: the next frontier: Republication.» *Current opinion in HIV and AIDS.* doi:10.1097/COH.0000000000000670.

Van Laethem, K., Theys, K., & Vandamme, A. M. 2015. "HIV-1 genotypic drug resistance testing: digging deep, reaching wide?" *Current opinion in virology*, 16-23. doi:10.1016/j.coviro.2015.06.001.

Venanzi Rullo, E., Ceccarelli, M., Condorelli, F., Facciolà, A., Visalli, G., D'Aleo, F., Paolucci, I., Cacopardo, B., Pinzone, M. R., Di Rosa, M., Nunnari, G., & Pellicanò, G. F. 2019. «Investigational drugs in HIV: Pros and cons of entry and fusion inhibitors (Review).» *Molecular medicine reports*, 1987-1995. doi:10.3892/mmr.2019.9840.

Weber, I. T., Wang, Y. F., & Harrison, R. W. 2021. «HIV Protease: Historical Perspective and Current Research.» *Viruses*, May. doi:10.3390/v13050839.

Xavier Ruiz, F., & Arnold, E. 2020. «Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance.» *Current opinion in structural biology.* doi:10.1016/j.sbi.2019.11.011.

Λουρίδα, Γ., Τότσικας, Χ., Παντικίδη, Ε., Γιαλή, Σ., & Παπασταμόπουλος, Β. 2022. «ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΡΕΧΟΥΣΑ ART ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΨΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΙΜΗ ART ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΖΟΥΝ ΜΕ ΤΟΝ HIV [Ελεύθερη Ανακοίνωση].» *34ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS.* Αθήνα, 25-27 Νοέμβριος.

Παπαχρήστου, Ε., Κωστάκη, Ε.Γ., Βασιλάκης, Α., Σωτηριάδου, Τ., Ηλιόπουλος, Π., Ρόκκα, Χ., Πετρίκκος, Π., Κωστής, Ε., Αδάμης, Γ., Αστρίτη, Μ., Πέρδιος, Ι., Σαμπατάκου, Ε., Χίνη, Μ., Ψυχογυιού, Μ., Κοντός, Α., Κοσμοπούλου, Ο., Αργυράκη, Α., et al. 2022. «Επιπολασμός υποτύπων του HIV με χρήση υπερευαίσθητης μεθόδου αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS). [Ελεύθερη Ανακοίνωση].» *34ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS.* Αθήνα, 25-27 Νοέμβριος.

Πρόκτερ, Κ. , Ρέστα, Π., Κοτσιανοπούλου, Μ., Τζανακάκη, Τ. & Μπελούκας, Α. 2022. «Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά νέων διαγνώσεων και επιτήρηση μεταδιδόμενης αντοχής: Δεδομένα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) για το 2022 [Ελεύθερη Ανακοίνωση].» *34ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS.* Αθήνα, 25-27 Νοέμβριος.

Πρόκτερ, Κ., Ρέστα, Π., Κοτσιανοπούλου, Μ., Τζανακάκη, Τ., & Μπελούκας, Α. 2022. «Εργαστηριακή επιτήρηση του επιπολασμού των μεταλλάξεων αντοχής στην αντιρετροϊκη θεραπεία αε άτομα που ζουν με τον ιο HIV: Δεδομένα από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ). [Ελεύθερη Ανακοίνωση].» *10η Πανελλήνια Συνάντηση AIDS και Ηπατίτιδες.* Αθήνα, 22-24 Σεπτέμβριος.