



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την ταχεία ανίχνευση  
της μετάλλαξης M184V του ιού HIV-1**

Όνοματεπώνυμο Φοιτητή (Α.Μ.)

**Μαρία Μαρίνου (19678169)**

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα

**Δρ. Άννα Κολλιοπούλου**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
MEDICAL LABORATORIES



DISSERTATION

**Development of a protocol for the rapid detection  
of the M184V mutation of HIV-1**

Student Name (R.N.)

**Maria Marinou (19678169)**

Name of Supervisor

**Dr. Anna Kolliopoulou**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ****Άννα Κολλιοπούλου**

Ακαδημαϊκή Υπότροφος – Μεταδιδακτορική  
Ερευνήτρια,  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών  
Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

**Απόστολος Μπελούκας**

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας  
και Ιολογίας, Αντιπρόεδρος Τμήματος Βιοϊατρικών  
Επιστημών, Διευθυντής Εργαστηρίου Μοριακής  
Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας,  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών  
Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

**Δημήτριος Χανιώτης**

Καθηγητής και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοϊατρικών  
Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας &  
Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

**EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP****Anna Kolliopoulou**

Academic Fellow – Postdoctoral Researcher,  
Department of Biomedical Sciences, Department of  
Medical Laboratories, University of West Attica

**Apostolos Beloukas**

Associate Professor of Molecular Microbiology and  
Virology, Vice President of the Department of  
Biomedical Sciences, Director of the Laboratory of  
Molecular Microbiology and Immunology,  
Department of Medical Laboratories, University of  
West Attica

**Dimitrios Chaniotis**

Professor and President of the Department of  
Biomedical Sciences of the School of Health &  
Welfare Sciences of the University of West Attica

**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μαρία Μαρίνου του Νικολάου με αριθμό μητρώου 19678169 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής 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 ΔΗΛΟΥΣΑ

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αναπληρωτή καθηγητή κύριο Απόστολο Μπελούκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την συγκεκριμένη εργασία και δίνοντάς μου την ευκαιρία να κάνω τα πρώτα μου βήματα στον κόσμο της έρευνας. Οι εύστοχες παρατηρήσεις του, η εποικοδομητική κριτική του και η ενθάρρυνσή του, υπήρξαν ανεκτίμητα στοιχεία στη διαμόρφωση του τελικού αποτελέσματος.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Πρόεδρο του Τμήματος, Δημήτριο Χανιώτη, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή της πτυχιακής μου εργασίας. Η παρουσία και η εποπτεία του συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της ακαδημαϊκής διαδικασίας, και εκτιμώ το χρόνο και την προσοχή που αφιέρωσε για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κασσάνδρα Πρόκτερ, την οποία είχα την τύχη και την τιμή να γνωρίσω και να συνεργαστώ μαζί της. Μέσα από ατελείωτα πειράματα, τζελάκια και PCR (και την πόρτα!) με έκανε να αγαπήσω περισσότερο τον τομέα της Μοριακής Βιολογίας και της Ιολογίας αλλά και την εργαστηριακή καθημερινότητα.

Ακόμη, θα ήταν τεράστια παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Δρ. Άννα Κολλιοπούλου η οποία με την αισιοδοξία της, την υπομονή της, την καθοδήγηση, ενθάρρυνσή της συνέβαλε στο μέγιστο για να προκύψει αυτό το αποτέλεσμα. Την ευχαριστώ θερμά για όλες τις ώρες που αφιέρωσε για αυτήν την εργασία και είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την προθυμία της να μοιραστεί τις γνώσεις, τις συμβουλές και τις κατευθύνσεις της οι οποίες συνέβαλαν σημαντικά στην ακαδημαϊκή μου εξέλιξη αλλά και στο πιθανό ερευνητικό μου μέλλον.

Εννοείται οφείλω να ευχαριστήσω και τα κορίτσια του εργαστηρίου, Παναγιώτα Αρετή Γιγουρτσή και Χριστίνα Μαγκαφά για την ευχάριστη ατμόσφαιρα που δημιουργούσε η παρουσία τους στο εργαστήριο, με τα εύστοχα σχόλιά τους, το χιούμορ τους και την καλή τους διάθεση έκαναν όλους τους ατελείωτους χρόνους επώασης να περνάνε ανώδυνα!

Κλείνοντας, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου και να μην πω στην μαμά μου ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υποστήριξη, την αγάπη και που στο τέλος της ημέρας ήταν εκεί για να ακούσει προσεκτικά όλες τις εργαστηριακές μου περιπέτειες.

Σας ευχαριστώ όλους,

Μαρίνου Μαρία

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**



<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	8
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	17
ABSTRACT .....	18
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	19
1.1 Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας - Human Immunodeficiency Virus .....	20
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή - Προέλευση HIV .....	20
1.1.2 Κατάταξη και Ταξινόμηση του HIV .....	21
1.1.3 Δομή και Γονίδια του HIV .....	22
1.1.4 Κύκλος ζωής του HIV .....	24
1.1.5 Τρόποι μετάδοσης HIV .....	26
1.1.6 Τρόποι πρόληψης HIV .....	27
1.2 Αντιρετροϊκή Θεραπεία .....	27
1.2.1 Γενικά για την Αντιρετροϊκή Θεραπεία .....	27
1.2.2 Αντοχή στην Αντιρετροϊκή Θεραπεία .....	31
1.3 Μεταλλάξεις HIV .....	31
1.4 Μετάλλαξη M184V .....	32
1.5 Μετάλλαξη M184I .....	34
1.6 Επιδημιολογία .....	34
1.6.1 Επιδημιολογία HIV-1 .....	34
1.6.2 Επιδημιολογία M184V .....	35
1.6.3 Επιδημιολογία M184I.....	35
1.6 Μέθοδοι Ανίχνευσης Μεταλλάξεων .....	36
1.6.1 Γενικά.....	36
1.6.2 Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction fragment length polymorphism (RFLPs) .....	37
1.6.2.1 Περιοριστικά Ένζυμα .....	37
1.6.2.2 Restriction Fragment Length Polymorfism - RFLPs.....	37
1.6.2.3 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα τεχνικής.....	38
1.6.3 Ανάλυση Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis (HRMA) .....	39
1.6.3.1 Εισαγωγή.....	39

	10
1.6.3.2 Ανίχνευση της μετάλλαξης M184V με τη χρήση HRMA.....	40
1.6.3.3 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα HRMA .....	40
ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
2.1 Υλικά .....	45
2.1.1 Βιολογικά Υλικά .....	45
2.1.2 Εργαστηριακός Εξοπλισμός - Αναλώσιμα .....	45
2.2 Μέθοδοι.....	46
2.2.1 Γενικές Μέθοδοι.....	46
2.2.1.1 Αντίστροφη Μεταγραφή RNA .....	46
2.2.1.3 Nested PCR .....	47
2.2.1.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	49
2.2.1.5 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	51
2.2.1.6 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων .....	52
2.2.1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση ηλεκτροφόρησης .....	52
2.2.2 Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs).....	52
2.2.2.1 Μονές πέψεις .....	53
2.2.2.1.1 Ένζυμο Α.....	53
2.2.2.1.2 Ένζυμο Β.....	54
2.2.2.1.3 Ένζυμο Γ .....	55
2.2.2.1.4 Ένζυμο Δ.....	56
2.2.2.2 Διπλές πέψεις .....	57
2.2.2.2.1 Ένζυμο Α – Ένζυμο Δ.....	57
2.2.2.2.2 Ένζυμο Β – Ένζυμο Δ.....	58
2.2.2.3 Ηλεκτροφόρηση .....	59
2.2.3 Ανάλυση Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis (HRMA) .....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	61
3.1 Γενικά .....	62
3.1.1 Nested PCR .....	62

3.1.1.1	Πρώτη PCR.....	62
3.1.1.1.1	Ζεύγη Εκκινητών .....	63
3.1.1.1.2	Θερμοκρασία Υβριδισμού .....	64
3.1.1.1.3	Χρόνος Υβριδισμού.....	64
3.1.1.1.4	Αριθμός κύκλων .....	64
3.1.1.1.5	Εικόνες Ηλεκτροφόρησης.....	64
3.1.1.2	Δεύτερη PCR .....	66
3.1.1.2.1	Ζεύγη Εκκινητών .....	66
3.1.1.2.2	Θερμοκρασία Υβριδισμού .....	67
3.1.1.2.3	Χρόνος Υβριδισμού.....	68
3.1.1.2.4	Αριθμός κύκλων .....	68
3.1.1.2.5	Εικόνες Ηλεκτροφόρησης.....	68
3.1.2	Απομόνωση προϊόντος PCR από πηκτή αγαρόζης (Gel Extraction).....	70
3.1.2.1	Εικόνες Ηλεκτροφόρησης .....	70
3.2	Μέθοδος RFLPs.....	72
3.2.1	Συγκέντρωση Ενζύμου .....	72
3.2.2	Ποσότητα Δείγματος.....	72
3.2.3	Εικόνες Ηλεκτροφόρησης .....	73
3.2	Μέθοδος HRMA.....	74
3.2.1	Συγκεντρώσεις δειγμάτων .....	75
3.2.2	Συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών .....	75
3.2.3	Κύκλοι.....	75
3.2.4	Θερμοκρασία Υβριδισμού.....	75
3.2.5	Χρόνοι Υβριδισμού.....	75
3.2.6	Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας και συλλογή δεδομένων .....	75
3.2.7	Αποτελέσματα Ανάλυσης HRMA .....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	86
4.1	Κοινά βήματα πρωτοκόλλου για τις διαδικασίες RFLP και HRMA .....	87
4.1.1	Αντίστροφη μεταγραφή .....	87
4.1.2	Nested PCR .....	87
4.2	Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) .....	89

4.3 Ανάλυση τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis (HRMA)...	91
4.4 Το πρόβλημα της ύπαρξης υποπληθυσμών της αλληλουχίας-στόχου .....	93
4.5 Καινοτομία της παρούσας εργασίας και μελλοντικές προσεγγίσεις.....	95
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	97
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

<b>Συντομογραφία</b>	<b>Αγγλικά</b>	<b>Ελληνικά</b>
3TC	Lamivudine	Λαμβουδίνη
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic subunit 3G	Ένζυμο επεξεργασίας mRNA απολιποπρωτεΐνης Β, καταλυτική υπομονάδα 3G
ART	Antiretroviral Therapy	Αντιρετροϊκή Θεραπεία
AS-PCR	Allele-Specific PCR	PCR Ειδική ως προς τα Αλληλόμορφα
ATV	Atazanavir	Αταζαναβίρη
AZT	Azidothymidine	Αζιδοθυμιδίνη
BIC	Bictegravir	Μπικτεγκραβίρη
CA	Capsid	Καψίδιο
cART	Combination Antiretroviral Therapy	Συνδυαστική Αντιρετροϊκή Θεραπεία
CD4	Cluster Of Differentiation 4	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 4
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	Υποδοχέας C-C Χημειοκίνης Τύπου 5
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	Υποδοχέας C-X-C Χημειοκίνης Τύπου 4
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
DTG	Dolutegravir	Ντολουτεγκραβίρη
EFV	Efavirenz	Εφαβιρένζη
gp120	Glycoprotein 120	Γλυκοπρωτεΐνη 120
gp160	Glycoprotein 160	Γλυκοπρωτεΐνη 160
gp41	Glycoprotein 41	Γλυκοπρωτεΐνη 41
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy	Αντιρετροϊκή Θεραπεία Υψηλής Δραστηρότητας
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
HIV 2	Human Immunodeficiency Virus 2	Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας 2
HRMA	High-Resolution Melting Analysis	Ανάλυση Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας
HTLV-III	Human T-lymphotropic virus type III	Ανθρώπινος Τ-λεμφοτροπικός ιός τύπου III
IN	Integrase	Ιντεγκράση
INSTIs	Integrase Strand Transfer Inhibitors	Αναστολείς Ιντεγκράσης

LAV	Lymphadenopathy Associated Virus	Ιός που σχετίζεται με λεμφαδενοπάθεια
LPV	Lopinavir	Λοπιναβίρη
M	Major	
M	Methionine	Μεθειονίνη
MA	Matrix	Μήτρα
MHC	Major Histocompatibility Complex	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
MVC	Maraviroc	
mRNA	Messenger RNA	Αγγελιοφόρο RNA
NC	Nucleocapsid	Νουκλεοκαψίδιο
NGS	Next-Generation Sequencing	Αλληλούχιση Νέας Γενιάς
NNRTIs	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	Αναστολείς Μη Νουκλεοσιδικής Αντίστροφης Μεταγραφάσης
NRTIs	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	Αναστολείς Νουκλεοσιδικής Αντίστροφης Μεταγραφάσης
NVP	Nevirapine	Νεβιραπίνη
O	Outlier	
p17	Protein 17	Πρωτεΐνη 17
p24	Protein 24	Πρωτεΐνη 24
p6	Protein 6	Πρωτεΐνη 6
p66	Protein 66	Πρωτεΐνη 66
p7	Protein 7	Πρωτεΐνη 7
PCP	Pneumocystis carinii pneumonia	Πνευμονία από <i>Pneumocystis carinii</i>
PEP	Post-Exposure Prophylaxis	Προφύλαξη Μετά από την Έκθεση
PI	Protease Inhibitors	Αναστολείς Πρωτεάσης
PR	Protease	Πρωτεάση
PrEP	Pre-Exposure Prophylaxis	Προφύλαξη Πριν από την Έκθεση
RAL	Raltegravir	Ραλτεγκραβίρη
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphisms	Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού
RPV	Rilpivirine	Ριλπιβιρίνη
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό Οξύ
RT	Reverse Transcriptase	Αντίστροφη Μεταγραφάση
RTV	Ritonavir	Ριτοναβίρη
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	Ιός της Ανοσοανεπάρκειας των Πιθήκων
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms	Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί
STR	Single-Tablet Regimen	Σχήμα Μονοθεραπείας

ΣΜΝ	Sexually Transmitted Diseases	Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα
T-20	Enfuvirtide	Ενφουβιρτίδη
TAMs	Thymidine Analog Mutations	Μεταλλάξεις Θυμιδινικού Αναλόγου
TasP	Treatment as Prevention	Θεραπεία ως Πρόληψη
TDF	Tenofovir	Τενοφοβίρη
Tm	Melting Temperature	Θερμοκρασία Τήξης
U=U	Undetectable = Untransmittable	Μη Ανιχνεύσιμο = Μη Μεταδόσιμο
V	Valine	Βαλίνη



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λοίμωξη με τον ιό HIV απουσία θεραπείας μπορεί να εξελιχθεί στο Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Αν και η αντιρετροϊκή θεραπεία (ART) καθιστά τη λοίμωξη HIV μια χρόνια διαχειρίσιμη κατάσταση, η εκτεταμένη μεταλλακτικότητα του HIV εμποδίζει την αποτελεσματικότητα της ART, καθιστώντας τα άτομα ευάλωτα σε ευκαιριακές λοιμώξεις και σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η μετάλλαξη M184V ανιχνεύεται στο κωδικόνιο 184 (αντιστοιχεί στην αντίστροφη μεταγραφάση -RT- του ιού), ευθύνεται για τη μετατροπή μιας μεθειονίνης (ATG) σε βαλίνη (GTG), και εμφανίζεται σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπευτικά σχήματα με NRTIs προκαλώντας υψηλού επιπέδου αντοχή στους αναστολείς RT λαμιβουδίνη και εμτρισιταβίνη.

Στην παρούσα εργασία RNA το οποίο είχε απομονωθεί από δείγματα ατόμων θετικών στον ιό HIV υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή, και το cDNA που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για 2 διαδοχικές αντιδράσεις nested PCR (τελικό προϊόν 485bp). Ακολούθως, εφαρμόστηκαν 2 παράλληλες στρατηγικές για την ταχεία ανίχνευση της M184V:

α) Με χρήση της τεχνικής των RFLPs (Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction Fragment Length Polymorphisms), επιλέχθηκαν περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν και κόβουν επιλεκτικά μόνο τη μεταλλαγμένη ή την αγρίου τύπου αλληλουχία. Μετά από πέψη για κάθε δείγμα σε ξεχωριστές αντιδράσεις και με τις 2 κατηγορίες ενζύμων, τα θραύσματα DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και σύμφωνα με το πρότυπο ζώνωσης που προέκυψε, ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης

β) Με χρήση της τεχνικής HRMA (Ανάλυση Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis), σε ασύμμετρη qPCR χρησιμοποιήθηκαν, πέραν του ειδικά σχεδιασμένου ζεύγους εκκινητών F και R (προϊόν 81bp), εναλλακτικά για κάθε δείγμα σε ξεχωριστές αντιδράσεις 3'-φωσφορυλιωμένοι ανιχνευτές που λειτουργούν επίσης ως εκκινητές R, οι οποίοι προσδένονται στη μεταλλαγμένη ή την αγρίου τύπου αλληλουχία (προϊόν 42bp). Τα 2 προϊόντα που προκύπτουν έχουν διαφορετικές  $T_m$ , που παρατηρούνται στις καμπύλες αποδιάταξης στο τέλος κάθε αντίδρασης. Η ύπαρξη ή όχι κορυφής στη συγκεκριμένη  $T_m$  υποδηλώνει την ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης.

## ABSTRACT

HIV infection, in the absence of treatment, can lead to Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Although antiretroviral therapy (ART) makes HIV infection a manageable chronic condition, the extensive mutagenicity of HIV inhibits the effectiveness of ART, leaving individuals vulnerable to opportunistic infections and various cancer types. The M184V mutation is detected in codon 184 (belongs to the reverse transcriptase -RT- of the virus), is responsible for the conversion of methionine (ATG) to valine (GTG), and occurs in patients receiving treatment with NRTIs, causing high resistance to the RT inhibitors lamivudine and emtricitabine.

In the present work, RNA isolated from HIV-positive samples was subjected to reverse transcription, and the resulting cDNA was then used as template for 2 consecutive nested PCR reactions (final product size 485bp). Subsequently, 2 parallel strategies were applied for the rapid detection of M184V:

a) By use of the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique, restriction enzymes were selected that recognize and selectively cut only the mutant or wild-type sequence. After digestion of each sample in separate reactions with both the 2 classes of enzymes, the DNA fragments were subjected to agarose gel electrophoresis and, according to the resulting banding pattern, the presence or absence of the mutation was identified.

b) By use of the High-Resolution Melting Analysis (HRMA) technique, in asymmetric qPCR, in addition to specially designed primer pair F and R (product size 81bp), 3'-phosphorylated probes that also function as R primers were used alternatively for each sample in separate reactions, which bind to the mutant or wild-type sequence (product size 42bp). The 2 resulting products have different  $T_m$ s, which can be observed in the dissociation curves at the end of each reaction. The presence or absence of a peak at the particular  $T_m$  indicates the presence or absence of the mutation.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας - Human Immunodeficiency Virus

### 1.1.1 Ιστορική Αναδρομή - Προέλευση HIV

Τόσο η ιστορία όσο η προέλευση του Ιού της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus – HIV) αποτελεί ένα σύνθετο και πολυδιάστατο ζήτημα που εμπλέκει τις Επιστήμες της Ιολογίας, της Επιδημιολογίας και της Κοινωνιολογίας συνδυάζοντάς τις με την παγκόσμια υγεία. Ο HIV έχει γίνει γνωστός στο ευρύ κοινό ως ο ιός που ευθύνεται για την πρόκληση του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acute Immunodeficiency Syndrome – AIDS), δηλαδή μιας κατάστασης που στοχεύει στο ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητά του να καταπολεμά λοιμώξεις και ασθένειες.

Η ιστορία του HIV ξεκίνησε στις αρχές του 20ού αιώνα, με τις ρίζες του να εντοπίζονται στην Αφρικανική Ήπειρο, ενώ υπάρχουν αρκετές θεωρίες και υποθέσεις που σχετίζονται με την προέλευση του συγκεκριμένου ιού. Η πιο αποδεκτή αλλά και επικρατέστερη θεωρία περιλαμβάνει τη διασταυρούμενη μετάδοσή του μεταξύ ειδών (cross-species transmission) από τα άλλα θηλαστικά στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, ο ιός της ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (Simian Immunodeficiency Virus – SIV) πιστεύεται ότι αποτελεί τον πρόγονο του HIV και ότι η μετάδοσή του στο ανθρώπινο είδος συνέβη όταν οι άνθρωποι κυνηγούσαν θηλαστικά για κρέας και αναπόφευκτα έρχονταν σε επαφή με το αίμα και άλλα σωματικά τους υγρά (1).

Παρόλο που τα πρώτα αναγνωρισμένα και επιβεβαιωμένα κρούσματα του HIV εμφανίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1980, υπάρχουν μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι ο HIV προϋπήρχε σε ανθρώπινους πληθυσμούς για δεκαετίες πριν γίνει η αναγνώριση και ταυτοποίησή του. Το 1959, δείγμα αίματος που λήφθηκε από άνδρα με καταγωγή από την Κινσάσα, την πρωτεύουσα της Λαϊκής Δημοκρατίας του Κονγκό, αποτέλεσε την πρώτη γνωστή περίπτωση του HIV, ενώ οι μοριακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταγενέστερα στο συγκεκριμένο δείγμα παρείχαν κρίσιμες πληροφορίες για το χρονοδιάγραμμα της εξάπλωσης του HIV μεταξύ των ανθρώπων. Πιθανολογείται ότι η μετάδοση του HIV-1 μεταξύ των ειδών συνέβη στις αρχές του 20ού αιώνα μεταξύ 1900 και 1930. Η πόλη της Κινσάσα διαδραμάτισε κρίσιμο ρόλο στην αρχική εξάπλωση του ιού αφού αποτέλεσε ένα πολυσύχναστο αστικό κέντρο με μεγάλη κινητικότητα αλλά και κοινωνική ανάπτυξη, δημιουργώντας έτσι ένα περιβάλλον που ευνοούσε την εξάπλωση του ιού. Παράγοντες όπως οι μη αποστειρωμένες βελόνες σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης και η ανάπτυξη του σεξουαλικού εμπορίου πιστεύεται ότι διευκόλυναν την πρόωμη μετάδοση του ιού (2).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 άρχισαν να εμφανίζονται κρούσματα ασυνήθιστων λοιμώξεων και ασθενειών με επίκεντρο τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ελκύνοντας την προσοχή στα συμπτώματα της νόσου που αργότερα θα αναγνωριζόταν ως AIDS. Το 1981, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) ανέφεραν περιστατικά που αφορούσαν μια σπάνια μορφή πνευμονίας, που ονομάστηκε *Pneumocystis carinii pneumonia* (PCP), και το σάρκωμα Kaposi, έναν σπάνιο καρκίνο, μεταξύ ομοφυλόφιλων ανδρών. Οι αναφορές αυτές σηματοδότησαν την έναρξη της ευαισθητοποίησης του κοινού και της επιστημονικής έρευνας σχετικά με τη νόσο (2,3).

Παρόλο που στην αρχή η αιτία του AIDS ήταν άγνωστη, το 1983, μια ομάδα επιστημόνων με επικεφαλής τον Luc Montagnier στο Ινστιτούτο Παστέρ της Γαλλίας εντόπισε έναν ιό που ονόμασαν ιό που σχετίζεται με λεμφαδενοπάθεια (Lymphadenopathy Associated Virus - LAV), ο οποίος αργότερα επιβεβαιώθηκε ότι ήταν η αιτία του AIDS. Σχεδόν ταυτόχρονα, ο Robert Gallo και η ομάδα του στο Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες εντόπισαν έναν παρόμοιο ιό που ονόμασαν ανθρώπινο T-λεμφοτροπικό ιό τύπου III (human T-lymphotropic virus type III - HTLV-III). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι ο LAV και ο HTLV-III ήταν ο ίδιος ιός, γνωστός σήμερα ως HIV (4,5).

Η επιδημία του AIDS επεκτάθηκε ραγδαία, επηρεάζοντας ποικίλους πληθυσμούς σε όλο τον κόσμο, ενώ μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980, είχε μετατραπεί σε παγκόσμια κρίση δημόσιας υγείας. Σε αυτή την κρίση φρένο έβαλε η ανάπτυξη της αντιρετροϊκής θεραπείας στα μέσα της δεκαετίας του 1990 η οποία οδήγησε καταστολή του HIV, μειώνοντας τον κίνδυνο μετάδοσής του και μετατρέποντας το AIDS σε μια χρόνια διαχειρίσιμη νόσο (6).

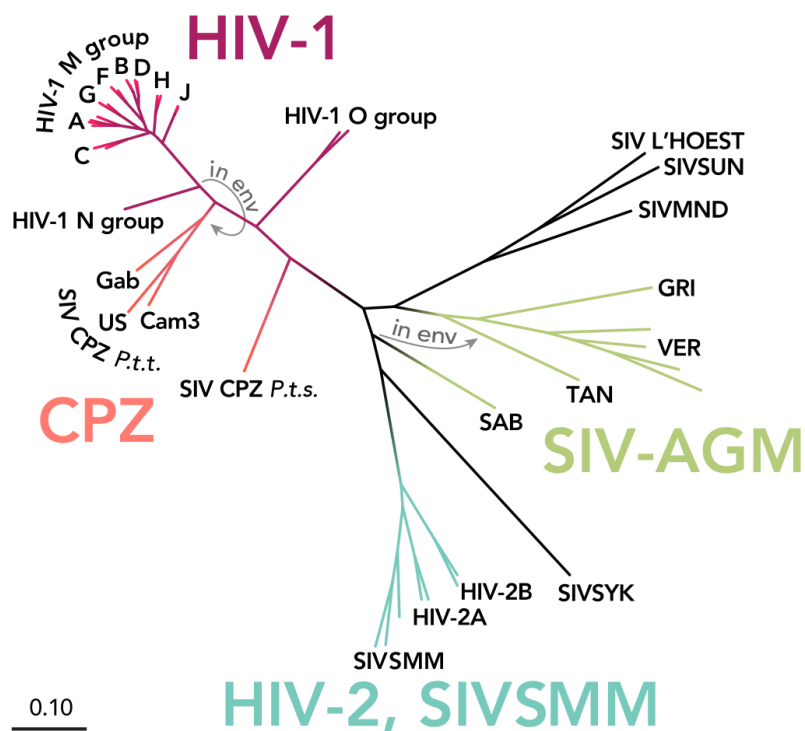
### 1.1.2 Κατάταξη και Ταξινόμηση του HIV

Ο HIV κατατάσσεται στην οικογένεια Retroviridae και στο γένος *Lentivirus*. Οι ιοί της οικογένειας αυτής ονομάζονται ρετροϊοί και το γονιδιώμα τους είναι της μορφής RNA. Παρόλο που υπάρχουν δύο κύριοι τύποι του HIV, ο HIV-1 και ο HIV-2, ο πρώτος είναι ο πιο γνωστός, ο πιο μολυσματικός και ο πιο διαδεδομένος τύπος και σχετίζεται στενά με τον SIVcrz, έναν ιό που συναντάται στους χιμπατζήδες. Από την άλλη πλευρά, ο HIV-2 είναι λιγότερο μεταδοτικός και απαντάται κυρίως στη Δυτική Αφρική, ενώ συγγενεύει στενά με τον SIVsmm από τους πιθήκους sooty mangabey. Καθένας από τους δύο τύπους έχει ξεχωριστά γενετικά, επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, τα οποία επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τόσο τον ίδιο τον ιό όσο και τον άνθρωπο που προσβάλλουν (1).

Ο HIV-1 (**Εικόνα 1**), υποδιαιρείται σε τέσσερις ομάδες: M (Major), O (Outlier), N (Non-M, Non-O) και P (Pending), με την ομάδα M να αποτελεί πάνω από το 90% των παγκόσμιων λοιμώξεων από τον HIV-1 και να διαιρείται περαιτέρω σε διάφορους υποτύπους, με τις ονομασίες A έως K, μεταξύ των οποίων οι υπότυποι A, B, C και D είναι οι πιο κοινοί. Ο υπότυπος B επικρατεί στην Αμερική και την Ευρώπη, ενώ ο υπότυπος C είναι ο πιο διαδεδομένος στην υποσαχάρια Αφρική και την Ινδία. Κάθε υπότυπος έχει μοναδικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και αποκρίνεται με διαφορετικό τρόπο στις αντιρετροϊκές θεραπείες (1).

Ο HIV-2, ενώ είναι επίσης παθογόνος, είναι λιγότερο μεταδοτικός και η εξέλιξη του σε σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας είναι πιο αργή συγκριτικά με τον HIV-1. Ενώ περιορίζεται κυρίως στη Δυτική Αφρική, έχουν αναφερθεί κρούσματα στην Ευρώπη, την Ινδία και άλλες περιοχές. Ο συγκεκριμένος ιός χωρίζεται σε οκτώ ομάδες, από την A έως την H, αλλά πιο μολυσματικές είναι οι ομάδες A και B, με την ομάδα A να είναι η πιο διαδεδομένη. Η χαμηλή μεταδοτικότητα και η πιο αργή εξέλιξη της νόσου που οφείλεται στον HIV-2 οφείλονται σε διαφορές στον τρόπο αναπαραγωγής του ιού αλλά και στον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με το ανοσοποιητικό σύστημα των κυττάρων του ξενιστή. Το γονιδιώμα

του ενώ είναι παρόμοιο σε οργάνωση με εκείνο του HIV-1, έχει ορισμένες αξιοσημείωτες διαφορές στην αλληλουχία και τη λειτουργία των γονιδίων του (7,8).



**Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο των ιών SIV και HIV.** Παρουσιάζεται ένα φυλογενετικό δέντρο των ιών SIV και HIV, το οποίο περιλαμβάνει τους διάφορους τύπους και υποτύπους των ιών [Προσαρμογή από (119)].

### 1.1.3 Δομή και Γονίδια του HIV

Ο HIV-1, έχει μια σύνθετη γενετική δομή αφού διαθέτει αρκετές περιοχές που είναι κρίσιμες για τον κύκλο ζωής και την παθογένειά του (**Εικόνα 2**). Τα κύρια δομικά και λειτουργικά συστατικά κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gag*, *pol* και *env*, το καθένα εκ των οποίων παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή, τη συναρμολόγηση και τη μόλυνση του ιού.

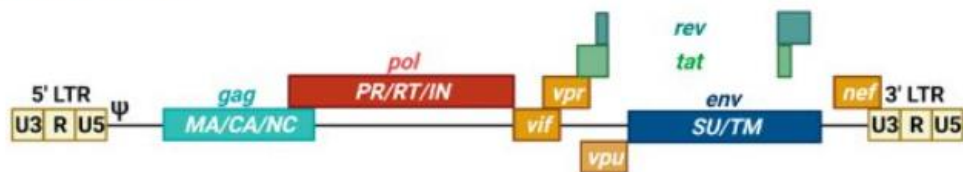
Το γονίδιο *gag*, που βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδιώματος, κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη που διασπάται από την κική πρωτεάση σε τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες: μήτρα (matrix – MA), p17, καψίδιο (capsid – CA), p24, νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid – NC), p7 και p6. Η MA σχηματίζει το εξωτερικό περίβλημα του ιικού πυρήνα. Η CA αποτελεί τον πυρήνα του ιού, περιβάλλοντας το ικό RNA. Η NC δεσμεύει και σταθεροποιεί το ικό RNA, ενώ η p6 συμμετέχει στα τελικά στάδια εκβλάστησης του ιικού σωματιδίου από το κύτταρο ξενιστή (9).

Το γονίδιο *pol* κωδικοποιεί τρία κρίσιμα ένζυμα: την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase - RT), την ιντεγκράση (integrase - IN) και την πρωτεάση (protease -

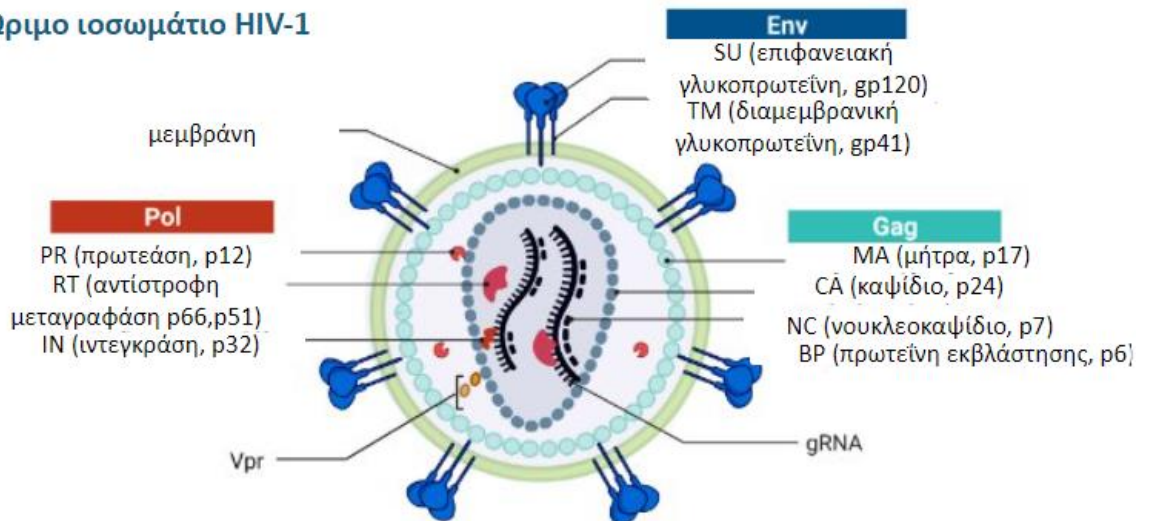
PR). Η RT μετατρέπει το μονόκλωνο ιικό RNA σε δίκλωνο DNA, με τον υψηλό ρυθμό πρόκλησης λαθών εκ μέρους του ενζύμου να συμβάλλει στη γενετική ποικιλομορφία του HIV. Η IN ενσωματώνει το ιικό DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή και η PR διασπά τις πολυπρωτεΐνες Gag και Gag-Pol μετατρέποντάς τις σε λειτουργικά μακρομόρια (9–11).

Το γονίδιο *env* κωδικοποιεί τις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου gp120 και gp41, οι οποίες είναι απαραίτητες για την είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Αρχικά συντίθενται ως gp160, η οποία διασπάται σε gp120 και gp41. Η gp120 προσκολλάται στον υποδοχέα CD4 στα κύτταρα ξενιστές, κυρίως στα CD4+ T λεμφοκύτταρα, και δεσμεύεται σε έναν συν-υποδοχέα CCR5 ή CXCR4. Η gp41 διευκολύνει τη σύντηξη του ιικού φακέλου με τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή (12).

### Γονιδίωμα HIV-1



### Όριμο ιοσωμάτιο HIV-1



**Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής και των γονιδίων του HIV-1.** Το διάγραμμα που παρουσιάζεται στο πάνω μέρος της εικόνας δείχνει τη γραμμική οργάνωση του γονιδιώματος του HIV-1, επισημαίνοντας τα κύρια γονίδια και τις αντίστοιχες κωδικοποιητικές τους περιοχές. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται μια δομική απεικόνιση του ώριμου ιού HIV-1, η οποία δείχνει πώς τοποθετούνται στον ίδιο τον ιό οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια [Προσαρμογή από (14)].

Επιπλέον, το γονιδίωμα του HIV-1 περιλαμβάνει ρυθμιστικά και βοηθητικά γονίδια όπως τα *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, και *vpu*. Το γονίδιο *tat* ενισχύει τη μεταγραφή του ιικού RNA, το *rev* ρυθμίζει την εξαγωγή του ιικού mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, και το *nef*



μειώνει την έκφραση των CD4 και MHC τάξης I για να αποφευχθεί η ανίχνευση του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα. Το *vif* βοηθάει τον HIV να επιβιώσει εμποδίζοντας την αμυντική πρωτεΐνη APOBEC3G του ξενιστή που κανονικά θα κατέστρεφε το γενετικό υλικό του ιού, το *vpr* προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 και τέλος το γονίδιο *vpr* διασπά μια πρωτεΐνη που ονομάζεται τεθερίνη (tetherin) για να διευκολύνει την απελευθέρωση του ιού (13). Η αλληλεπίδραση αυτών των γονιδίων και των πρωτεϊνών τους είναι κρίσιμη για την αναπαραγωγή του HIV-1, καθιστώντας τα στόχους για αποτελεσματική θεραπεία. Εμπόδιο στις προσπάθειες αυτές αποτελεί η παρουσία μεταλλάξεων στα διάφορα γονίδια προαναφέρθηκαν.

#### 1.1.4 Κύκλος ζωής του HIV

Ο κύκλος ζωής και ο πολλαπλασιασμός του HIV-1 περιλαμβάνουν πολύπλοκες διαδικασίες που επιτρέπουν στον ιό να εισβάλλει στα κύτταρα ξενιστών, να αναπαράγει το γενετικό του υλικό και να παράγει νέα μολυσματικά ισομάτια. Όταν ο ιός συναντήσει ένα κύτταρο ξενιστή, κυρίως CD4+ T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα σηματοδοτείται και η αρχή του κύκλου ζωής του (Εικόνα 3). Τότε η γλυκοπρωτεΐνη gp120 του ικού φακέλου προσδέεται στον υποδοχέα CD4 στην επιφάνεια των κυττάρων. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης της gp120, επιτρέποντάς της να αλληλεπιδράσει με έναν συνυποδοχέα, συνήθως τον CCR5 ή τον CXCR4. Μετά τη δέσμευση αυτή, η γλυκοπρωτεΐνη gp41 διευκολύνει την ένωση του ικού περιβλήματος με τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ικού πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή (12,15).

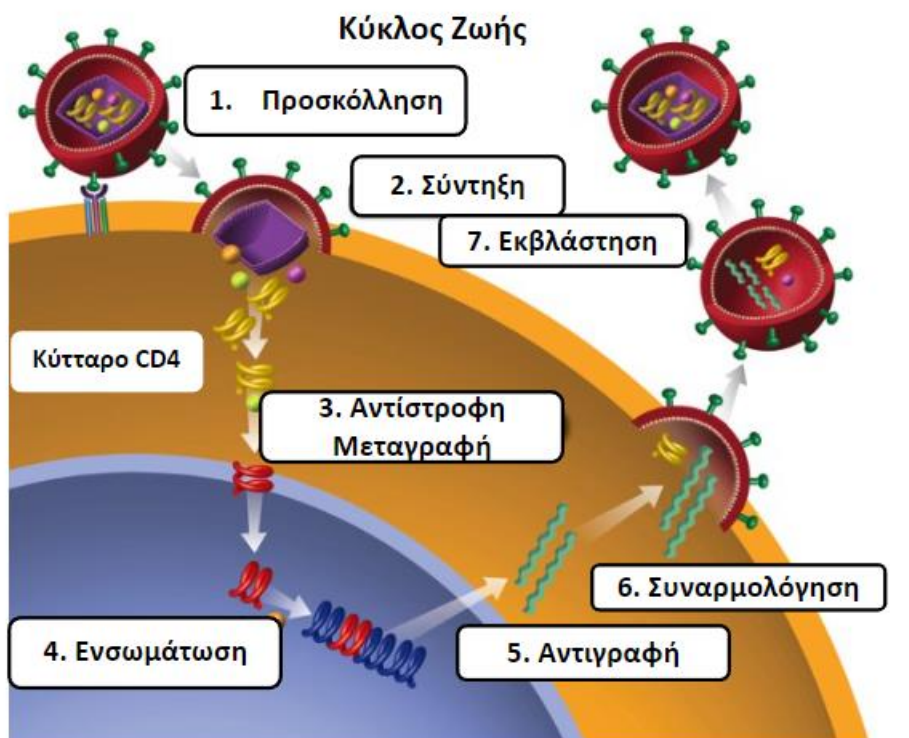
Όταν το ικό γονιδίωμα RNA βρεθεί εντός του κυττάρου ξενιστή, μεταγράφεται αντίστροφα σε δίκλωνο DNA από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο συσκευάζεται εντός του ικού πυρήνα. Αυτή η διαδικασία είναι επιρρεπής σε σφάλματα και αποτελεί το σημείο στον κύκλο αντιγραφής κατά το οποίο δημιουργούνται περισσότερες μεταλλάξεις (11,16). Το νεοσυντιθέμενο ικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή όπου το ένζυμο ιντεγκράση καταλύει την ενσωμάτωση του ικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή προκαλώντας τομές στο DNA του ξενιστή και διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την εισαγωγή του ικού DNA (17). Αυτή η ενσωματωμένη μορφή του ικού γονιδιώματος είναι γνωστή ως προϊός, ο οποίος μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II του κυττάρου-ξενιστή, διαδικασία η οποία ρυθμίζεται είτε από παράγοντες του ίδιου του ιού είτε του ξενιστή.

Το ικό RNA που προκύπτει μπορεί να εξυπηρετήσει πολλαπλούς σκοπούς: μπορεί να ενωθεί με διάφορα mRNA που κωδικοποιούν ικές πρωτεΐνες, να παραμείνει ελεύθερο με σκοπό να ενωθεί με νέα ισομάτια ή να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την αντίστροφη μεταγραφή (18,19). Το ικό RNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου μεταφράζεται από τα ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα το γονίδιο *gag* μεταφράζεται στην πολυπρωτεΐνη Gag, το γονίδιο *pol* μεταφράζεται στην πολυπρωτεΐνη Gag-Pol, και το γονίδιο *env* μεταφράζεται στην πρόδρομη πρωτεΐνη gp160 (20,21). Προκειμένου να παραχθούν νέα ισομάτια συσσωρεύονται οι πολυπρωτεΐνες Gag και Gag-Pol, το ικό RNA, καθώς και άλλα συστατικά του ιού και του ξενιστή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.



Η πολυπρωτεΐνη Gag διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, καθώς η περιοχή MA της στοχεύει τη μεμβράνη, η περιοχή CA οδηγεί στο σχηματισμό του καψιδίου και η περιοχή NC δεσμεύει και συσκευάζει το RNA του ιού. Παράλληλα η πολυπρωτεΐνη Gag προσλαμβάνει το ιικό γονιδίωμα, μαζί με τις συνδεδεμένες πρωτεΐνες NC, και διευκολύνει την ενσωμάτωση της πολυπρωτεΐνης Gag-Pol, διασφαλίζοντας ότι τα ιικά ένζυμα θα περιλαμβάνονται στα νέα ισσωμάτια (20,22,23). Με την ολοκλήρωση της συναρμολόγησης των νέων ισσωματίων, η πρωτεάση διασπά τις πολυπρωτεΐνες Gag και Gag-Pol στα λειτουργικά τους συστατικά, πυροδοτώντας έτσι μια σημαντική δομική αναδιοργάνωση του ιού, μετατρέποντάς το ανώριμο ισσωμάτιο σε έναν ώριμο, μολυσματικό ιό.

Η πρωτεΐνη MA σχηματίζει ένα στρώμα κάτω από τον ιικό φάκελο παραμένοντας συνδεδεμένη με το εσωτερικό τοίχωμα του ιικού περιβλήματος, η CA σχηματίζει τον κωνικό πυρήνα που περικλείει και προστατεύει το ιικό RNA και οι πρωτεΐνες του NC σταθεροποιούν το γονιδίωμα εντός του πυρήνα. Τα ιικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της αντίστροφης μεταγραφάσης, της ιντεγκράσης και της πρωτεάσης, είναι τώρα τοποθετημένα εντός του ιού, προκειμένου να ξεκινήσουν έναν νέο κύκλο μόλυνσης (20,21,24).



**Εικόνα 3: Κύκλος ζωής του HIV-1.** Απεικονίζεται ο κύκλος ζωής του HIV, επισημαίνοντας τα βασικά στάδια μέσω των οποίων ο ιός μολύνει ένα κύτταρο-ξενιστή και πολλαπλασιάζεται. Η διαδικασία ξεκινά με την προσκόλληση του ιού σε ένα κύτταρο CD4, ενώ στην συνέχεια ακολουθεί η σύντηξη, όπου ο ιικός φάκελος ενώνεται με την κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας στο ιικό RNA και τα ένζυμα να εισέλθουν στο κύτταρο. Μόλις εισέλθουν, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και ακολουθεί η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος σε αυτό του ξενιστή. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αντιγραφή η οποία είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση νέων ισσωματίων HIV. Τέλος, στο στάδιο της

εκβλάστησης, τα νέα ιοσωμάτια αποσπώνται από τη μεμβράνη του κυττάρου [Προσαρμογή από (25)].

#### 1.1.5 Τρόποι μετάδοσης HIV

Παρόλο που ο HIV-1 είναι ανιχνεύσιμος σε διάφορα σωματικά υγρά των μολυσμένων ατόμων, δεν είναι όλα εξίσου μολυσματικά. Τα υγρά στα οποία εντοπίζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις του ιού, και συνεπώς εμφανίζουν υψηλότερη δυνατότητα μετάδοσης, αντιστοιχούν στο αίμα, το σπέρμα, τα κολπικά υγρά, τα πρωκτικά υγρά και το μητρικό γάλα. Το αίμα περιέχει την υψηλότερη συγκέντρωση του ιού, καθιστώντας την επαφή αίματος με αίμα ιδιαίτερα επικίνδυνη αλλά και αποτελεσματική για τη μετάδοση. Το σπέρμα και τα κολπικά υγρά είναι οι κύριοι φορείς για τη σεξουαλική μετάδοση, ενώ τα πρωκτικά υγρά είναι σημαντικά στην πρωκτική επαφή, ιδίως επειδή ο βλεννογόνος του ορθού είναι επιρρεπής σε σχισμές, διευκολύνοντας την είσοδο του ιού. Άλλα σωματικά υγρά, όπως το σάλιο, τα δάκρυα, ο ιδρώτας και τα ούρα, περιέχουν πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις του HIV-1 και δεν αποτελούν σημαντικές οδούς μετάδοσης. Το σάλιο, για παράδειγμα, περιέχει ένζυμα που διασπούν τον ιό, ενώ το ιικό φορτίο στα δάκρυα, τον ιδρώτα και τα ούρα είναι πολύ χαμηλό για να προκαλέσει μόλυνση. Η περιστασιακή επαφή, όπως οι αγκαλιές, τα φιλιά ή η κοινή χρήση σκευών, δεν ενέχει κίνδυνο μετάδοσης του HIV-1 (26,27). Η μετάδοση του HIV-1 γίνεται μέσω της ανταλλαγής συγκεκριμένων σωματικών υγρών, με τους κυριότερους τρόπους για τη μετάδοση να περιλαμβάνουν τη σεξουαλική επαφή, την έκθεση σε μολυσμένο αίμα, καθώς και μέσω της μητέρας στο παιδί κατά τη διάρκεια του τοκετού ή του θηλασμού (27).

Η σεξουαλική μετάδοση είναι ο πρώτος και πιο συχνός τρόπος μετάδοσης, που συμβαίνει μέσω κολπικού, πρωκτικού ή, σπανιότερα, στοματικού σεξ. Ο ιός εισέρχεται στους ιστούς του οργανισμού μέσω των βλεννογόνων των γεννητικών οργάνων, του ορθού και μερικές φορές του στόματος. Το σεξ χωρίς προφυλάξεις αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο μετάδοσης, ειδικά όταν υπάρχουν και άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (ΣΜΝ), καθώς μπορεί να προκαλέσουν πληγές ή ακόμη και φλεγμονή, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την είσοδο του ιού (28,29).

Ο δεύτερος τρόπος μετάδοσης μέσω μολυσμένου αίματος μπορεί να συμβεί μέσω της κοινής χρήσης βελονών ή συριγγών, αποτελώντας σημαντικό κίνδυνο για τα άτομα που κάνουν ενέσιμη χρήση ναρκωτικών. Η χρήση μολυσμένου εξοπλισμού ενέσεων εισάγει τον ιό απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (30). Αν και εξαιρετικά σπάνιο πλέον φαινόμενο λόγω του αυστηρού ελέγχου που πραγματοποιείται στις αιμοδοσίες, οι μεταγγίσεις με μολυσμένα προϊόντα αίματος μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε μετάδοση (31).

Τέλος, οι εργαζόμενοι στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης ενδέχεται να εκτεθούν στον HIV-1 μέσω τραυματισμών με βελόνες, αν και αυτό είναι ασυνήθιστο και συνήθως μπορεί να αποφευχθεί με τα κατάλληλα πρωτόκολλα ασφαλείας (32).

Η μετάδοση από μητέρα σε παιδί, γνωστή και ως κάθετη μετάδοση, μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, του τοκετού ή και του θηλασμού. Χωρίς παρέμβαση, το ποσοστό μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί κυμαίνεται από 15% έως 45%. Ωστόσο αξίζει να

σημειωθεί ότι η αντιρετροϊκή θεραπεία που χορηγείται στη μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αλλά και στο βρέφος μετά τη γέννηση μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο αυτό σε λιγότερο από 5%. Συνιστάται στις οροθετικές μητέρες να αποφεύγουν το θηλασμό, εάν υπάρχουν ασφαλείς εναλλακτικές λύσεις, καθώς ο ιός μπορεί να εντοπίζεται και στο μητρικό γάλα (33,34).

### 1.1.6 Τρόποι πρόληψης HIV

Η κατανόηση των διαφόρων τρόπων μετάδοσης του HIV-1 που προαναφέρθηκαν είναι απαραίτητη για την εφαρμογή αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης, καθώς κάθε οδός απαιτεί προσαρμοσμένες μεθόδους πρόληψης. Για τη μείωση του κινδύνου ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους πρόληψης της σεξουαλικής μετάδοσης είναι η σωστή και συνεπής χρήση προφυλακτικών, τα οποία χρησιμεύουν ως φραγμός, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο μετάδοσης του ιού (27). Μια άλλη εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος είναι η προφύλαξη πριν από την έκθεση (Pre Exposure Prophylaxis - PrEP), η οποία πρόκειται για μια καθημερινή φαρμακευτική αγωγή για τα HIV αρνητικά άτομα που ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου. Η προφύλαξη μετά την έκθεση (Post Exposure Prophylaxis - PEP) είναι επίσης ζωτικής σημασίας και περιλαμβάνει αντιρετροϊκά φάρμακα που λαμβάνονται εντός 72 ωρών μετά την πιθανή έκθεση, όπως το σεξ χωρίς προφυλάξεις ή η κοινή χρήση βελονών, όταν λαμβάνεται για 28 ημέρες, μπορεί να μειώσει σημαντικά την πιθανότητα μόλυνσης (35,36). Ακόμη, οι τακτικές εξετάσεις συμβάλλουν στην έγκαιρη ανίχνευση και άμεση έναρξη αντιρετροϊκής θεραπείας, η οποία μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα που αφορούν την υγεία των ατόμων και να μειώσει το ιικό φορτίο σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, εξαλείφοντας ουσιαστικά τον κίνδυνο μετάδοσης. Η προσέγγιση αυτή είναι γνωστή και ως «θεραπεία ως πρόληψη» (Treatment as Prevention - TasP) (37,38).

Ανεξάρτητα από τις παραπάνω προσεγγίσεις, είναι κατανοητό πως η αντιμετώπιση παραγόντων όπως το στίγμα, οι διακρίσεις και η κοινωνική ανισότητα είναι ουσιαστικής σημασίας, αφού μπορούν να εμποδίσουν την πρόσβαση σε υπηρεσίες πρόληψης, εξέτασης και θεραπείας, οδηγώντας σε αύξηση των ατόμων θετικών στον HIV-1.

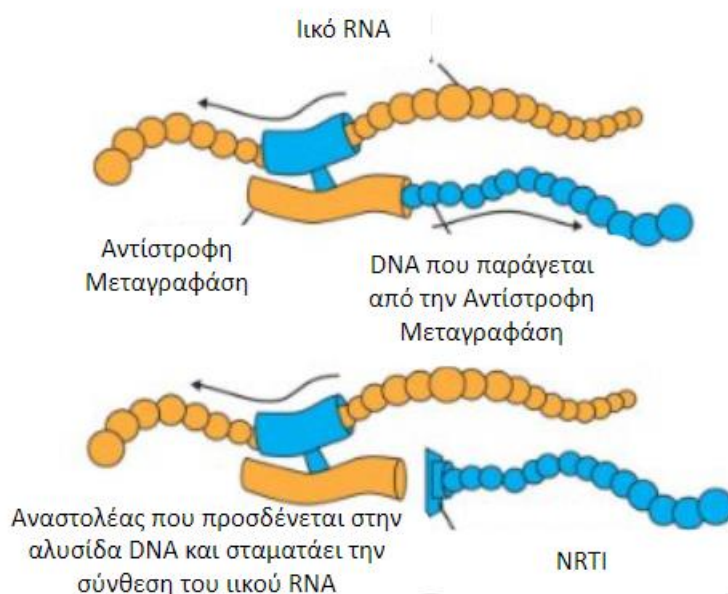
## 1.2 Αντιρετροϊκή Θεραπεία

### 1.2.1 Γενικά για την Αντιρετροϊκή Θεραπεία

Η αντιρετροϊκή θεραπεία (Antiretroviral Therapy – ART) είναι το πιο σημαντικό εργαλείο που διαθέτει το σύστημα υγείας για τη διαχείριση και ειδικότερα τη θεραπεία της λοίμωξης από τον ιό HIV. Πρωταρχικός της στόχος είναι η καταστολή του ιικού φορτίου σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, αποτρέποντας την εξέλιξη του ιού σε AIDS και μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τον κίνδυνο μετάδοσης του HIV στον υγιή πληθυσμό. Στην αντιρετροϊκή θεραπεία περιλαμβάνεται η χρήση συνδυασμού αντιρετροϊκών φαρμάκων, τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής του ιού. Η υψηλή αποτελεσματικότητα της ART έχει μετατρέψει τον HIV από μια θανατηφόρα ασθένεια σε μια διαχειρίσιμη χρόνια νόσο. Οι διάφοροι τύποι αντιρετροϊκών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ART περιλαμβάνουν νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse

Transcriptase Inhibitors – NRTIs), μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors – NNRTIs), αναστολείς της πρωτεάσης (Protease Inhibitors – PIs), αναστολείς της μεταφοράς του σκέλους της ιντεγκράσης (Integrase Strand Transfer Inhibitors – INSTIs), αναστολείς εισόδου και φαρμακοκινητικούς ενισχυτές. Κάθε μια από τις παραπάνω κατηγορίες φαρμάκων δρα είτε αναστέλλοντας ένα ένζυμο του ιού, πρωτεάση, ιντεγκράση είτε αναστέλλοντας διαδικασίες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του HIV, εμποδίζοντας έτσι τον ιό να πολλαπλασιαστεί και να εξαπλωθεί σε νέα κύτταρα (39,40).

Η πρώτη κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων που αναπτύχθηκε ήταν τα φάρμακα NRTIs, τα οποία ενσωματώνονται στο ιικό DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, προκαλώντας πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης της νουκλεοτιδικής αλυσίδας, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τον ιό να αντιγράψει επιτυχώς το γονιδίωμά του (**Εικόνα 4**). Στους NRTIs που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνονται η ζιδοβουδίνη ή αζιδοθυμιδίνη (azidothymidine - AZT), η λαμβουδίνη (lamivudine - 3TC) και η τενοφοβίρη (tenofovir - TDF). Η AZT, ο πρώτος εγκεκριμένος NRTI, μείωσε σημαντικά τη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα μεταξύ των ασθενών με HIV όταν χορηγήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Παρά τις αρχικές ανησυχίες της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με την ανθεκτικότητα και τις παρενέργειες, η ανάπτυξη νεότερων NRTIs με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και περισσότερη ασφάλεια έχει ενισχύσει το ρόλο τους στην αντιρετροϊκή θεραπεία (41).



**Εικόνα 4: Τρόπος δράσης των NRTIs.** Απουσία των συγκεκριμένων φαρμάκων παράγεται αλυσίδα DNA από την αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ παρουσία αυτών αναστέλλεται η σύνθεσή της [Προσαρμογή από (42)].

Οι NNRTIs είναι αναστολείς που στοχεύουν και αυτοί στο ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, αλλά μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού. Συνδέονται απευθείας με το

ένζυμο, προκαλώντας μια αλλαγή στην διαμόρφωσή του και αναστέλλοντας τη δράση του, εμποδίζοντας έτσι τη μετατροπή του ιικού RNA σε DNA. Η εφαβιρένζη (efavirenz – EFV), η νεβιραπίνη (nevirapine – NVP) και η ριλπιβιρίνη (rilpivirine – RPV) είναι γνωστά φάρμακα τύπου NNRTI. Η εφαβιρένζη εισήχθη στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και ήταν ένας από τους πρώτους μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς με σημαντική αποτελεσματικότητα στη μείωση του ιικού φορτίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντοχή στους συγκεκριμένους αναστολείς μπορεί να αναπτυχθεί γρήγορα εάν δεν υπάρχει συμμόρφωση στη φαρμακευτική αγωγή από το άτομο με HIV, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη χρήση αυτών των φαρμάκων σε συνδυασμό με άλλα αντιρετροϊκά (43,44).

Οι αναστολείς πρωτεάσης, όπως αναφέρεται και από το όνομά τους αναστέλλουν το ένζυμο πρωτεάση, το οποίο είναι απαραίτητο για τη διάσπαση των ιικών πολυπρωτεϊνών σε λειτουργικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση του ιού. Με την παρεμπόδιση αυτής της διαδικασίας, εμποδίζεται η αναπαραγωγή των ιοσωματίων, καθιστώντας τα μη μολυσματικά. Η ριτοναβίρη (ritonavir – RTV), η λοπιναβίρη (lopinavir – LPV) και η αταζαναβίρη (atazanavir – ATV) είναι ορισμένα παραδείγματα PIs. Η εισαγωγή των PIs στα μέσα της δεκαετίας του 1990, κυρίως σε συνδυαστικά σχήματα, σηματοδότησε νέα μονοπάτια στη θεραπεία του HIV και ενέταξε την έννοια της υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκής θεραπείας (Highly Active Antiretroviral Therapy HAART) η οποία θα αναλυθεί στην συνέχεια. Η ριτοναβίρη χρησιμοποιείται συχνά σε χαμηλές δόσεις για την ενίσχυση των επιπέδων άλλων PIs αναστέλλοντας τον μεταβολισμό τους και ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους (43–45).

Οι αναστολείς μεταφοράς αλυσίδας ιντεγκράσης αποτελούν μία από τις πιο πρόσφατα αναπτυσσόμενες κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων και εμποδίζουν το ένζυμο ιντεγκράση, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Η ραλτεγκραβίρη (raltegravir - RAL), η ντολουτεγκραβίρη (dolutegravir - DTG) και η μπικτεγκραβίρη (bictegravir - BIC) είναι ορισμένα παραδείγματα INSTIs. Η ραλτεγκραβίρη, ήταν το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας που εγκρίθηκε το 2007, έδειξε ταχεία και ισχυρή καταστολή του ιικού φορτίου ενώ παράλληλα ήταν ασφαλές χωρίς παρενέργειες. Μεταγενέστεροι αναστολείς τύπου INSTI, όπως η ντολουτεγκραβίρη, έχουν καταστεί προτιμώμενες επιλογές στα σχήματα πρώτης γραμμής της ART λόγω του υψηλού φραγμού τους στην αντοχή και της δοσολογίας τους μία φορά την ημέρα (46–48).

Οι αναστολείς εισόδου είναι μια διαφορετική ομάδα αντιρετροϊκών φαρμάκων που εμποδίζουν τον HIV να εισέλθει στα κύτταρα του ξενιστή, με τη χρήση αναστολέων σύντηξης, όπως η ενφουβιρίτιδη (T-20), και ανταγωνιστών του CCR5, όπως η μαραβιρόκη (maraviroc - MVC). Η ενφουβιρίτιδη συνδέεται με την πρωτεΐνη gp41 στο φάκελο του HIV, εμποδίζοντας τη σύντηξη της ιικής και της κυτταρικής μεμβράνης. Η μαραβιρόκη, από την άλλη πλευρά, μπλοκάρει τον συνυποδοχέα CCR5 στην επιφάνεια των CD4+ κυττάρων, εμποδίζοντας τον ιό να συνδεθεί και να εισέλθει στο κύτταρο. Τα φάρμακα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε περιπτώσεις που εντοπίζονται πολυανθεκτικά στελέχη HIV (49–51).



Οι φαρμακοκινητικοί ενισχυτές, χρησιμοποιούνται για την αύξηση της αποτελεσματικότητας άλλων αντιρετροϊκών φαρμάκων με τη ριτοναβίρη (ritonavir) και την κομπικιστάτη (cobicistat) να αποτελούν κύρια φάρμακα αυτής της κατηγορίας. Αναστέλλουν ένα ένζυμο το οποίο μεταβολίζει πολλά αντιρετροϊκά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι τις συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα. Η ενίσχυση αυτή μπορεί να βελτιώσει τη θεραπεία ενώ παράλληλα μειώνει την ποσότητα των λαμβανόμενων χαπιών. Η κομπικιστάτη, σε αντίθεση με τη ριτοναβίρη, δεν έχει δική της αντιρετροϊκή δράση, καθιστώντας την πιο ειδική ενισχυτική ουσία (52–54).

Η συνδυασμένη αντιρετροϊκή θεραπεία - combination Antiretroviral Therapy - cART, που συχνά αναφέρεται ως HAART, περιλαμβάνει τη χρήση τριών ή περισσότερων αντιρετροϊκών φαρμάκων από διαφορετικές κατηγορίες. Η προσέγγιση αυτή έχει σχεδιαστεί για τη μεγιστοποίηση της ιικής καταστολής και την ελαχιστοποίηση του κινδύνου ανάπτυξης αντοχής. Τα αρχικά σχήματα ART περιλαμβάνουν συνήθως δύο NRTIs σε συνδυασμό είτε με ένα NNRTI, ένα PI ενισχυμένο με ριτοναβίρη ή κομπικιστάτη, ή ένα INSTI. Η επιλογή του σχήματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του ιικού φορτίου του ασθενούς, του αριθμού CD4, των πιθανών αλληλεπιδράσεων που μπορεί να έχουν τα διάφορα φάρμακα, των παρενεργειών αλλά και της εμφάνισης αντοχής σε κάποιο φάρμακο. Τα σύγχρονα σχήματα έχουν εξελιχθεί ώστε να είναι πιο αποτελεσματικά, καλύτερα ανεκτά και ευκολότερα στη συμμόρφωση, ενώ πολλά από αυτά είναι διαθέσιμα ως σχήματα με μία μόνο ταμπλέτα (Single Tablet Treatment - STR) που λαμβάνονται μία φορά την ημέρα (55,56).

## ANTIPETPOΪKA ΦAPMAKA

### NRTI

Abacavir, ABC ([Ziagen](#)®)  
 Didanosine, ddi ([Videx](#)®, [Videx EC](#)®)  
 Emtricitabine, FTC ([Emtriva](#)®)  
 Lamivudine, 3TC ([Epivir](#)®)  
 Stavudine, d4T ([Zerit](#)®)  
 Tenofovir alafenamide, TAF\*  
 Tenofovir disoproxil fumarate, TDF ([Viread](#)®)  
 Zidovudine, AZT/ZDV ([Retrovir](#)®)

### NNRTI

Delavirdine, DLV ([Rescriptor](#)®)  
 Efavirenz, EFV ([Sustiva](#)®)  
 Etravirine, ETR ([Intelence](#)®)  
 Nevirapine, NVP ([Viramune](#)®, [Viramune XR](#)®)  
 Rilpivirine, RPV ([Edurant](#)®)  
 Doravirine, DOR ([Pifeltro](#)®)

### PIs

Atazanavir, ATV ([Reyataz](#)®)  
 Darunavir, DRV ([Prezista](#)®)  
 Fosamprenavir, FPV ([Lexiva](#)®)  
 Indinavir, IDV ([Crixivan](#)®)  
 Nelfinavir, NFV ([Viracept](#)®)  
 Ritonavir, RTV/r\*\* ([Norvir](#)®)  
 Saquinavir, SQV ([Invirase](#)®)  
 Tipranavir, TPV ([Aptivus](#)®)

### INSTIs

Bictegravir, BIC ([Bictarvy](#)®)  
 Dolutegravir, DTG ([Tivicay](#)®)  
 Elvitegravir, EVG ([Vitekta](#)®)  
 Raltegravir, RAL ([Isentress](#)™)

### Fusion Inhibitor

Enfuvirtide, ENF/T-20 ([Fuzeon](#)®)

### Entry Inhibitor

Maraviroc, MVC ([Selzentry](#)®)  
 Ibalizumab ([Trogarzo](#)®)

### PK Enhancer

Cobicistat, COBI/c ([Tybost](#)®)  
 Ritonavir, RTV/r ([Norvir](#)®)

**Εικόνα 5: Αντιρετροϊκά φάρμακα.** Παρουσιάζονται ορισμένα από τα πιο γνωστά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην αντιρετροϊκή θεραπεία μαζί με τις συντομογραφίες τους [Προσαρμογή από (120)].

Γίνεται λοιπόν προφανές ότι η τήρηση της ART είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη και τη διατήρηση της καταστολής του ιού, ενώ η ανεπαρκής συμμόρφωση μπορεί να

οδηγήσει σε ιολογική αποτυχία, ανάπτυξη στελεχών HIV ανθεκτικών στα φάρμακα και εξέλιξη της νόσου (**Εικόνα 5**). Η αποτελεσματική ART μειώνει το ιικό φορτίο στα άτομα σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, γεγονός που αποτρέπει τη σεξουαλική μετάδοση του HIV, μια έννοια γνωστή ως «μη ανιχνεύσιμο άρα μη μεταδιδόμενο» (Undetectable = Untransmittable, U=U) ενώ παράλληλα βελτιώνει την υγεία και τη μακροζωία των ατόμων που ζουν με τον HIV, αλλά διαδραματίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη της μετάδοσης του ιού, συμβάλλοντας έτσι στον ευρύτερο στόχο του τερματισμού της επιδημίας του HIV (57).

### 1.2.2 Αντοχή στην Αντιρετροϊκή Θεραπεία

Η πρόκληση που αντιμετωπίζει η αντιρετροϊκή θεραπεία προκύπτει όταν ο ιός μεταλλάσσεται και συνεπώς μειώνεται η αποτελεσματικότητα των αντιρετροϊκών φαρμάκων. Η ανθεκτικότητα αυτή εμφανίζεται συνήθως λόγω του υψηλού ρυθμού αντιγραφής και της επιρρεπούς σε σφάλματα αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV, η οποία οδηγεί σε συχνές γενετικές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να δημιουργήσουν αντίσταση σε συγκεκριμένα φάρμακα, καθιστώντας τα λιγότερο αποτελεσματικά ή ακόμη και αναποτελεσματικά (44). Η αντίσταση μπορεί να αναπτυχθεί εάν ένας ασθενής δεν τηρεί πλήρως την αγωγή, επιτρέποντας στον ιό να πολλαπλασιάζεται εξαιτίας των μη βέλτιστων επιπέδων φαρμάκων, γεγονός που διευκολύνει την επιλογή ανθεκτικών στελεχών (58).

Κάθε κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων έχει συγκεκριμένους μηχανισμούς αντοχής. Πιο αναλυτικά, η αντίσταση στους αναστολείς της νουκλεοσιδικής αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs) συχνά περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης που μειώνουν την ενσωμάτωση του φαρμάκου στο ιικό DNA (58). Οι μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs) μπορούν να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους μέσω μεταλλάξεων που τροποποιούν τη θέση πρόσδεσης στο ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας την αποτελεσματική πρόσδεση του φαρμάκου (44). Οι αναστολείς πρωτεάσης (PIs) αντιμετωπίζουν αντίσταση λόγω μεταλλάξεων στο ένζυμο πρωτεάση, οι οποίες μειώνουν τη συγγένεια σύνδεσης του φαρμάκου, επιτρέποντας στο ένζυμο να συνεχίσει να επεξεργάζεται τις ιικές πολυπρωτεΐνες (59). Οι NSTIs επηρεάζονται από μεταλλάξεις στο ένζυμο ιντεγκράση οι οποίες παρεμποδίζουν την ικανότητα του φαρμάκου να αποτρέπει την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή (60). Οι αναστολείς εισόδου μπορεί να καταστούν λιγότερο αποτελεσματικοί εάν ο ιός μεταλλαχθεί ώστε να χρησιμοποιεί εναλλακτικούς συνυποδοχείς ή εάν αλλάξει η οδός εισόδου του ιού (51).

## 1.3 Μεταλλάξεις HIV

Ο HIV-1, όπως πολλοί ιοί RNA, παρουσιάζει υψηλό ποσοστό μεταλλακτικότητας εξαιτίας του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο δεν μπορεί να επιδιορθώνει τα σφάλματά του. Αυτό οδηγεί σε σημαντική γενετική ποικιλομορφία στον ιό και παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα του ιού να αναπτύσσει αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα, κάτι που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (61).

Μια από τις σημαντικότερες μεταλλάξεις είναι η M184V η οποία όπως θα αναφερθεί εκτενέστερα και στη συνέχεια (βλ. §1.4) εντοπίζεται στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης, προκαλεί αντοχή σε ορισμένα φάρμακα NRTIs (λαμβουδίνη, εμτρισιταβίνη), ενώ κάνει τον ιό πιο ευαίσθητο σε άλλα φάρμακα (ζιδοβουδίνη, τενοφοβίρη). Αυτή η διπλή επίδραση απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό της θεραπείας (62).

Μια επιπλέον σημαντική μετάλλαξη είναι η K65R, που εντοπίζεται επίσης στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης, κάνει τον ιό ανθεκτικό σε διάφορα φάρμακα, συμπεριλαμβανομένης της τενοφοβίρης και της αβακαβίρης. Η μετάλλαξη αυτή μειώνει τη συγγένεια πρόσδεσης αυτών των φαρμάκων στο ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η K65R μπορεί να αλληλεπιδράσει με την M184V με τρόπους που περιπλέκουν την αντοχή (63).

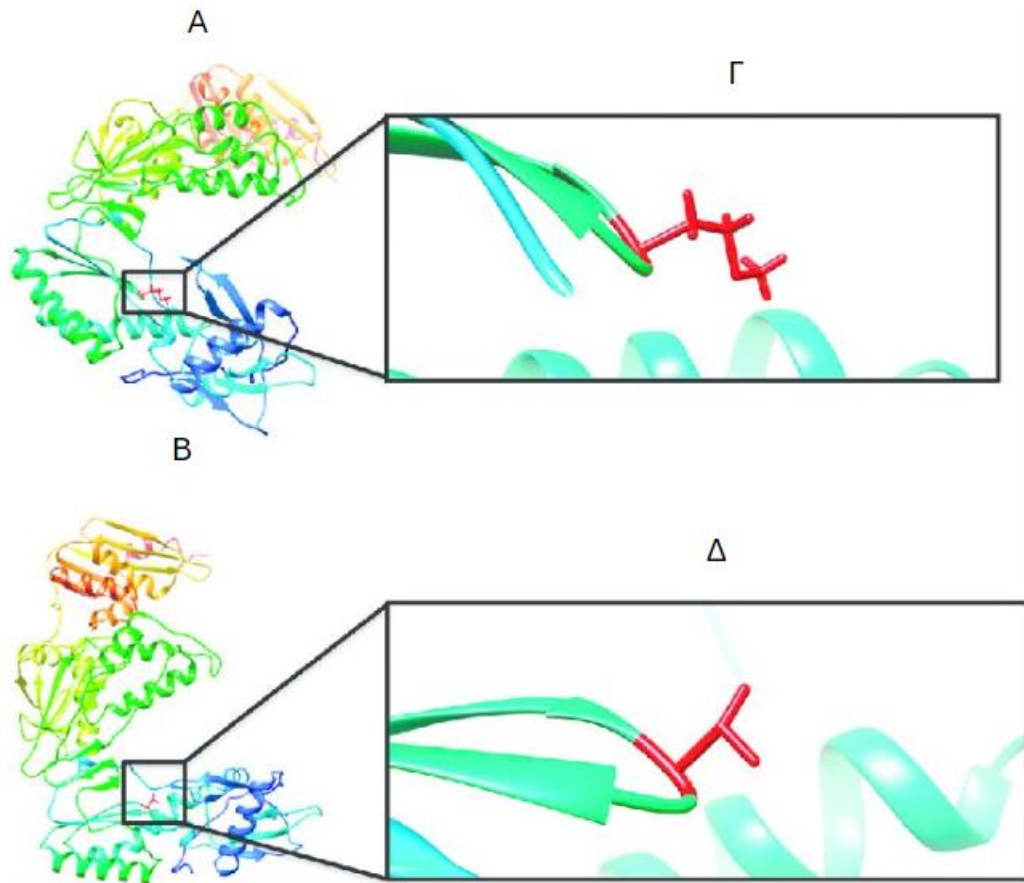
Οι μεταλλάξεις όπως η Y181C περιπλέκουν περαιτέρω τη θεραπεία, κάνοντας τον ιό ανθεκτικό στους NNRTIs (νεβιραπίνη, εφραβιρένζη). Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να απαιτήσουν αλλαγή στα θεραπευτικά σχήματα για να διατηρηθεί η αποτελεσματικότητα (64). Στο γονίδιο της πρωτεάσης, μεταλλάξεις όπως η D30N και η I50L σχετίζονται με αντοχή σε συγκεκριμένους αναστολείς όπως η νελφίναβιρη και η αταζαναβίρη, τροποποιώντας τη δομή και τη λειτουργία του ενζύμου. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο της ιντεγκράσης, όπως η N155H και η Q148H, συμβάλλουν στην αντοχή στους αναστολείς της ιντεγκράσης, οι οποίοι αποτελούν βασικά φάρμακα σε πολλά θεραπευτικά σχήματα για τον HIV (65,66). Τέλος, ο ιός μπορεί επίσης να αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο εισέρχεται στα κύτταρα μεταλλάσσοντας το γονίδιο *env*, οδηγώντας σε μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αναστολείς εισόδου (67).

#### 1.4 Μετάλλαξη M184V

Η μετάλλαξη M184V, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, εντοπίζεται στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1, είναι μία από τις σημαντικότερες μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των NRTIs, και πιο συγκεκριμένα της λαμβουδίνης και της εμτρισιταβίνης. Η μετάλλαξη αυτή αντιστοιχεί στην αντικατάσταση της μεθειονίνης (M) από βαλίνη (V) στη θέση 184 στο ένζυμο RT. Η μετάλλαξη M184V έχει σοβαρές συνέπειες για τη θεραπεία του HIV, επηρεάζοντας την αντοχή στα φάρμακα (68).

Πιο αναλυτικά, η RT είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες p66 και p51, με την υπομονάδα p66 να περιέχει τα ενεργά κέντρα πολυμεράσης και RNάσης H. Το κωδικόνιο M184 βρίσκεται εντός της περιοχής πολυμεράσης και πιο συγκεκριμένα στον βρόχο β7-β8 της υποπεριοχής του αντίχειρα. Η περιοχή αυτή διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη δέσμευση και ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων (69). Η αντικατάσταση της μεθειονίνης (ATG) από βαλίνη (GTG) στη θέση 184 έχει ως αποτέλεσμα μια μικρότερη πλευρική αλυσίδα (**Εικόνα 6**), μεταβάλλοντας τη γεωμετρία της περιοχής δέσμευσης νουκλεοτιδίων και μειώνοντας τη συγγένεια δέσμευσης για την τριφωσφορική 3TC- και FTC (70). Αυτή η δομική αλλαγή είναι υπεύθυνη για την υψηλού επιπέδου αντοχή που προσδίδει η μετάλλαξη M184V.





**Εικόνα 6: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV.** Παρουσιάζεται η HIV-RT που προκύπτει από τη φυσικού τύπου αλληλουχία (A) έναντι της HIV-RT που προκύπτει από την αλληλουχία που φέρει τη μετάλλαξη M184V (B). Σε μεγέθυνση απεικονίζεται η μεθειονίνη (Γ) και η βαλίνη (Δ) στο αμινοξύ 184 [Προσαρμογή από (76)].

Ο τρόπος με τον οποίο επιδρά η μετάλλαξη στον ιό είναι διπλός, καθώς αφενός τον καθιστά ανθεκτικό σε ορισμένα φάρμακα (3TC, FTC), αφετέρου δε τον αποδυναμώνει μειώνοντας την ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται αποτελεσματικά. Μελέτες δείχνουν ότι τα στελέχη HIV-1 με τη μετάλλαξη M184V πολλαπλασιάζονται πιο αργά σε σύγκριση με εκείνα που δεν την έχουν. Αυτό συμβαίνει επειδή η μετάλλαξη καθιστά πιο δύσκολη τη σωστή χρήση από τον ιό των δομικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του (71,72). Το γεγονός ότι η μετάλλαξη M184V μπορεί επίσης να κάνει τον HIV-1 πιο ευαίσθητο σε άλλα φάρμακα όπως η AZT και η TDF παρουσιάζει ενδιαφέρον αφού οφείλεται στον τρόπο με τον οποίο η μετάλλαξη M184V αλληλεπιδρά με άλλες μεταλλάξεις ονομαζόμενες μεταλλάξεις αναλόγων θυμιδίνης (TAMs - Thymidine Analog Mutations) που συνήθως καθιστούν τον ιό ανθεκτικό σε αυτά τα φάρμακα. Όταν υπάρχει η M184V, μπορεί εν μέρει να αντιστρέψει την ανθεκτικότητα που προκαλούν οι TAMs, καθιστώντας τα φάρμακα AZT και TDF πιο αποτελεσματικά (73). Λόγω αυτών των επιδράσεων, η μετάλλαξη M184V παίζει κρίσιμο ρόλο στον τρόπο με τον οποίο οι γιατροί αντιμετωπίζουν τον HIV-1. Παρόλο που

καθιστά τον ιό ανθεκτικό σε ορισμένα φάρμακα, η επίδραση της μετάλλαξης στην πολλαπλασιαστική ικανότητα του ιού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό του, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η πλήρης καταστολή. Επιπλέον, η κατανόηση του πώς η M184V επηρεάζει την ευαισθησία σε άλλα φάρμακα βοηθά στην επιλογή της καλύτερης συνδυαστικής θεραπείας ώστε να επιτευχθεί μια αποτελεσματική θεραπεία (74).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η μετάλλαξη M184V αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της εμφάνισης αντοχής σε NRTIs αφού μεταβάλλοντας τη δομή του ενζύμου RT, μειώνει τη συγγένεια πρόσδεσης για αυτά τα φάρμακα και προσδίδει υψηλού επιπέδου αντοχή. Η κατανόηση των δομικών, βιοχημικών και κλινικών επιπτώσεων αυτής της μετάλλαξης είναι απαραίτητη για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας του HIV-1 και τη βελτίωση της εξέλιξης της νόσου (75).

## 1.5 Μετάλλαξη M184I

Η μετάλλαξη M184I εντοπίζεται στο γονίδιο της RT του ιού όπως και η M184V. Αν και η M184I προσδίδει επίσης αντοχή στην 3TC και την FTC, είναι λιγότερο συχνή και συνήθως παρατηρείται ως μεταβατική μετάλλαξη στην πορεία προς την M184V. Ο αντίκτυπος της μετάλλαξης M184I στην ικανότητα του ιού και την ευαισθησία στα φάρμακα είναι παρόμοιος με τον M184V, αν και με ελαφρώς διαφορετικό δομικό και βιοχημικό προφίλ (77). Το κατάλοιπο ισολευκίνης έχει μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα από ό,τι η βαλίνη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές επιδράσεις εντός της θέσης δέσμευσης νουκλεοτιδίων. Ακριβώς όπως η M184V, έτσι και η M184I μπορεί μερικές φορές να αυξήσει την ευαισθησία του ιού σε άλλα φάρμακα, όπως η ζιδοβουδίνη, και παρόλο που προκαλεί ανθεκτικότητα μπορεί να κάνει τον ιό πιο ευαίσθητο σε άλλα φάρμακα, κάτι που είναι ευεργετικό σε συνδυαστικές θεραπείες (77–79).

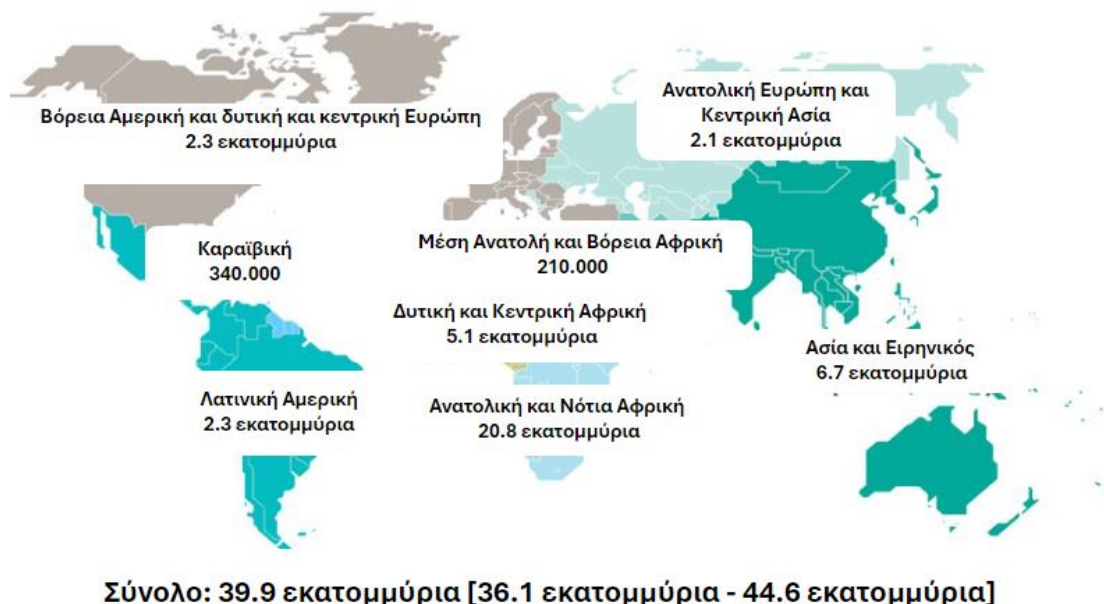
## 1.6 Επιδημιολογία

### 1.6.1 Επιδημιολογία HIV-1

Παρόλο που ο HIV συνεχίζει να αποτελεί παγκόσμια υγειονομική κρίση, με περίπου 38 εκατομμύρια ανθρώπους να ζουν με τον ιό παγκοσμίως το 2020, η επιδημία δεν επηρεάζει όλους εξίσου. Ομάδες, όπως οι άνδρες που κάνουν σεξ με άνδρες, οι χρήστες ενέσιμων ναρκωτικών, οι εργαζόμενοι στο σεξ και τα άτομα που βρίσκονται σε φυλακές βρίσκονται σε μειονεκτική θέση. Η Αφρική παραμένει η ισχυρότερα πληγείσα περιοχή, καθώς αντιπροσωπεύει σχεδόν το 67% των μολύνσεων από τον ιό HIV παγκοσμίως. Η κατάσταση είναι ιδιαίτερα ανησυχητική για τις νεαρές γυναίκες και τα κορίτσια στην εφηβεία στην υποσαχάρια Αφρική, όπου εκτιμάται ότι συμβαίνουν περίπου 4.500 νέες μολύνσεις κάθε εβδομάδα σε αυτήν την εύάλωτη ομάδα (80,81).

Στην Ανατολική Ευρώπη και την Κεντρική Ασία, η επιδημία του HIV δεν δείχνει σημάδια επιβράδυνσης (**Εικόνα 7**), κυρίως λόγω της χρήσης ενέσιμων ναρκωτικών. Παρά τις προόδους στη θεραπεία και την πρόληψη, με την αντιρετροϊκή θεραπεία να βελτιώνει τα

ποσοστά επιβίωσης, περίπου 1,5 εκατομμύριο νέες μολύνσεις καταγράφηκαν παγκοσμίως το 2020, σύμφωνα με τις αναφορές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (80,81).



**Εικόνα 7: Επιδημιολογικός χάρτης με άτομα που εκτιμάται ότι ζούσαν με τον ιό HIV κατά το έτος 2023 [Προσαρμογή από (82)].**

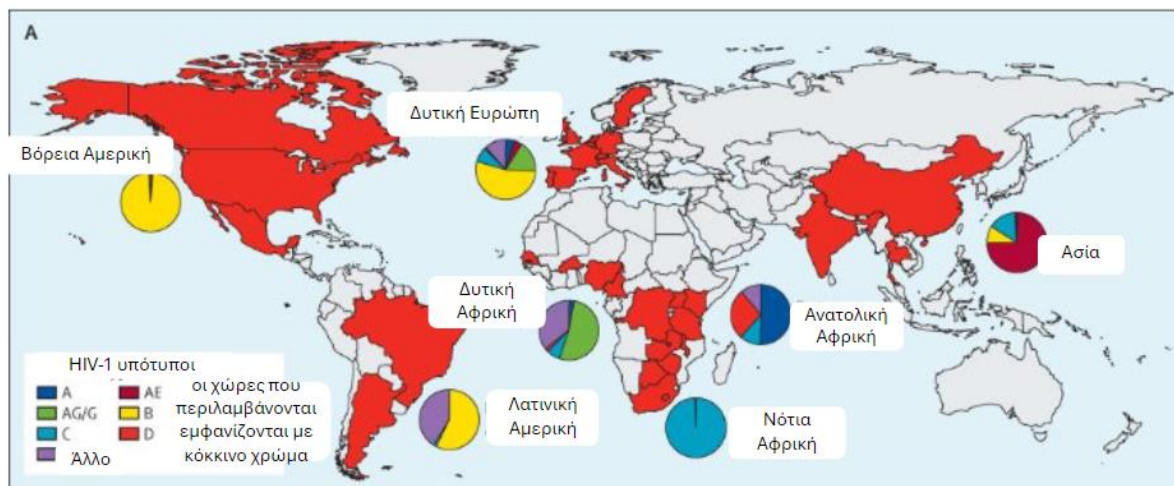
### 1.6.2 Επιδημιολογία M184V

Ο επιπολασμός της μετάλλαξης M184V ποικίλλει γεωγραφικά, αντανακλώντας τις διαφορές στις θεραπευτικές πρακτικές και τη διαθεσιμότητα των φαρμάκων. Για παράδειγμα, σε περιβάλλοντα υψηλών πόρων όπου χρησιμοποιούνται συνήθως η 3TC και η FTC, η μετάλλαξη ανιχνεύεται συχνά σε ασθενείς που εμφανίζουν ιική αποτυχία. Αντίθετα, ο επιπολασμός της μπορεί να είναι χαμηλότερος σε περιοχές όπου τα φάρμακα αυτά είναι λιγότερο προσβάσιμα ή χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά. Τα δεδομένα επιτήρησης υποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη M184V είναι παρούσα σε περίπου 10-20% των ασθενών με εμπειρία σε θεραπεία σε περιβάλλοντα υψηλών πόρων. Η μετάλλαξη ανιχνεύεται επίσης σε ασθενείς χωρίς θεραπεία, πιθανότατα λόγω της μετάδοσης στελεχών ανθεκτικών στα φάρμακα, με μελέτες να εκτιμούν ότι ο επιπολασμός είναι περίπου 2-5% σε αυτή την ομάδα (83,84).

### 1.6.3 Επιδημιολογία M184I

Ο επιπολασμός της M184I είναι συνήθως χαμηλότερος, παρατηρείται σε περίπου 1-3% των ασθενών που αποτυγχάνουν σε σχήματα με βάση την 3TC ή την FTC. Αυτή η μετάλλαξη μπορεί να είναι παροδική, καθώς μπορεί να μετατραπεί σε M184V. Γεωγραφικά, η επιδημιολογία της M184I αντικατοπτρίζει εκείνη της M184V, με υψηλότερο επιπολασμό σε

περιοχές όπου χρησιμοποιούνται ευρέως η 3TC και η FTC. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η M184I έχει ανιχνευθεί σε άτομα που δεν λαμβάνουν θεραπεία, υποδεικνύοντας πιθανή μετάδοση αυτής της ενδιάμεσης ανθεκτικής παραλλαγής, αν και είναι πολύ πιο σπάνια σε σύγκριση με την M184V (Εικόνα 8) (78,85).



**Εικόνα 8:** Ανάλυση ανθεκτικότητας και κατανομή των υποτύπων του HIV-1 [Προσαρμογή από (86)].

## 1.6 Μέθοδοι Ανίχνευσης Μεταλλάξεων

### 1.6.1 Γενικά

Η ανίχνευση της μετάλλαξης M184V πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μοριακών τεχνικών που επιτρέπουν τον ακριβή εντοπισμό συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών στο ιικό γονιδίωμα. Μια γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η αλληλούχιση κατά Sanger, η οποία περιλαμβάνει την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης από το ιικό RNA και την αλληλούχιση του προκύπτοντος τμήματος για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Αυτή η μέθοδος είναι εξαιρετικά ακριβής και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο σε κλινικές όσο και σε ερευνητικές συνθήκες για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα (87). Μια άλλη τεχνική είναι η χρήση της ειδικής ως προς το αλληλόμορφο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Allele Specific Polymerase Chain Reaction - AS-PCR), η οποία μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένης της M184V (88). Έχουν επίσης αναπτυχθεί δοκιμασίες PCR πραγματικού χρόνου, οι οποίες χρησιμοποιούν φθορίζοντες ανιχνευτές για την ποσοτικοποίηση του ιικού RNA και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε πραγματικό χρόνο, για την ανίχνευση του M184V (89). Ακόμη, οι τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) αποτελούν ένα άλλο ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση μεταλλάξεων (90,91).



## 1.6.2 Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction fragment length polymorphism (RFLPs)

### 1.6.2.1 Περιοριστικά Ένζυμα

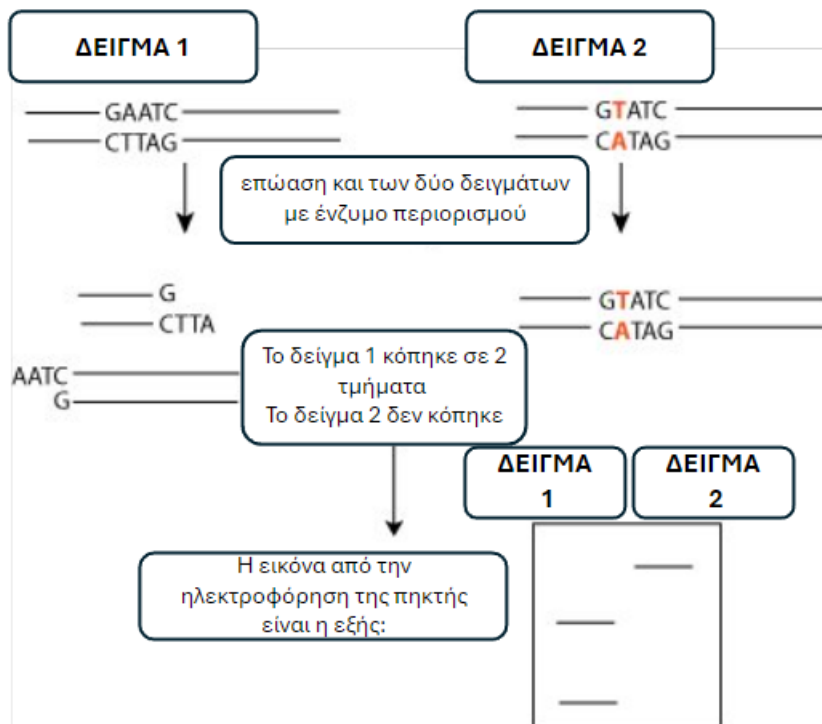
Περιοριστικά ένζυμα, ή αλλιώς περιοριστικές ενδονουκλεάσες, είναι τα ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, δημιουργώντας θραύσματα DNA. Τα συγκεκριμένα ένζυμα απαντώνται φυσιολογικά στα βακτήρια, όπου έχουν τον ρόλο του μηχανισμού άμυνας ενάντια σε εισβάλλον ιικό ή και ξένο DNA, το οποίο και διασπών σε συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης (92). Κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, μικρού μεγέθους, συνήθως μήκους 4-8 ζευγών βάσεων, η οποία πολλές φορές μπορεί να είναι και παλίνδρομη, και δρα κόβοντας το DNA στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης. Τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη μπορεί να έχουν είτε προεξέχοντα είτε τυφλά άκρα, ανάλογα με τον τρόπο κοπής. Ένα ευρέως γνωστό παράδειγμα περιοριστικών ενδονουκλεασών αποτελεί το ένζυμο *EcoRI*, που αναγνωρίζει την παλίνδρομη αλληλουχία 5'-GAATTC-3' και κόβει μεταξύ του G και του A και στις δύο αλυσίδες, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προεξέχοντα άκρα (93). Τα περιοριστικά ένζυμα ταξινομούνται σε διάφορους τύπους με βάση τη δομή τους, την αλληλουχία αναγνώρισής τους και τον τρόπο κοπής τους. Με βάση την κλασική ταξινόμηση, κατατάσσονται σε 4 τύπους, με τα ένζυμα περιορισμού τύπου II να αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα, επειδή κόβουν σε συγκεκριμένες θέσεις εντός ή δίπλα στις αλληλουχίες αναγνώρισής τους, παρέχοντας αποτελέσματα τα οποία μπορούν εύκολα να ερμηνευθούν (93). Τα ένζυμα αυτά έχουν καταστεί απαραίτητα εργαλεία στη γενετική μηχανική, τη μοριακή κλωνοποίηση και τις μελέτες των γονιδιωμάτων, επιτρέποντας τον ακριβή χειρισμό και την ανάλυση του DNA.

### 1.6.2.2 Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLPs

Ο πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού, (Restriction Fragment length Polymorphism – RFLP) είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιεί τα περιοριστικά ένζυμα που αναφέρθηκαν νωρίτερα για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στις αλληλουχίες DNA. Η μέθοδος αυτή ξεκινά με την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από το επιθυμητό δείγμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η πέψη του DNA με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού που το κόβουν σε συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης και με αυτόν τον τρόπο παράγονται θραύσματα διαφορετικού μήκους. Αυτά τα θραύσματα διαχωρίζονται με τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης, η οποία τα ταξινομεί με βάση το μέγεθος, επιτρέποντας την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και τη σύγκριση σύμφωνα με το αναμενόμενο αποτέλεσμα (**Εικόνα 9**) (94,95).

Η συγκεκριμένη τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος ποικίλων οργανισμών, στον εντοπισμό πολυμορφισμών αλλά και στον κλάδο της εγκληματολογίας. Στη χαρτογράφηση, η μέθοδος αυτή μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ή ασθένειες, εντοπίζοντας μοτίβα σύνδεσης μεταξύ δεικτών και χαρακτηριστικών σε έναν πληθυσμό (96). Στην εγκληματολογική επιστήμη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιστοίχιση δειγμάτων DNA από τόπους όπου διαπράχθηκε κάποιο έγκλημα με υπόπτους, συγκρίνοντας τα μοναδικά μοτίβα θραυσμάτων DNA (97). Τέλος, η εν λόγω μέθοδος χρησιμεύει και στην ανίχνευση

μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphism - SNP). Όταν ένας SNP μεταβάλλει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο, τότε το ένζυμο αποτυγχάνει να κόψει το DNA στη συγκεκριμένη θέση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν θραύσματα διαφορετικού μήκους, ή σε αρκετές περιπτώσεις να μην προκύπτουν καθόλου θραύσματα (98).



**Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της δράσης του περιοριστικού ενζύμου *EcoRI* για δύο τυχαία δείγματα.** Στο δείγμα 1 το ένζυμο μπορεί να πραγματοποιήσει την πέψη, οπότε προκύπτουν 2 θραύσματα ενώ στο δεύτερο δείγμα δεν μπορεί να κόψει αφού δεν εντοπίζεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει. Στην αναπαράσταση της πηκτής αγαρόζης είναι εμφανές σε ποιο δείγμα εντοπίζεται η αλληλουχία από το ένζυμο και σε ποιο όχι [Προσαρμογή από (99)].

### 1.6.2.3 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα τεχνικής

Είναι φανερό ότι μια τεχνική όπως είναι η RFLP παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, τα οποία έχουν επηρεάσει αρκετά την εφαρμογή της στον τομέα της έρευνας. Πιο αναλυτικά, το υψηλό επίπεδο ακρίβειας και αξιοπιστίας των περιοριστικών ενζύμων στην ανίχνευση γενετικών παραλλαγών αποτελεί ένα μη αμελητέο πλεονέκτημα. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει ακριβή και σαφή, αποτελέσματα τα οποία μπορούν εύκολα να ερμηνευθούν και να χρησιμοποιηθούν για τους σκοπούς που αναφέρθηκαν προωτέρα (81). Ένα σημαντικό γνώρισμά της είναι ότι δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του DNA, γεγονός που την καθιστά χρήσιμη τόσο για τη μελέτη οργανισμών αλλά και για την ανίχνευση διαφόρων παραλλαγών στο γονιδίωμά τους (96).

Στον αντίποδα, η συγκεκριμένη τεχνική έχει αρκετούς περιορισμούς, οι οποίοι αποτελούν εμπόδια στον δρόμο των ερευνητών. Πιο αναλυτικά, η τεχνική είναι χρονοβόρα, καθώς περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια, όπως η απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA, η πέψη με ένζυμα περιορισμού και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (100). Αυτή η πολυπλοκότητα καθιστά τη μέθοδο RFLP λιγότερο κατάλληλη συγκριτικά με τις νέες μεθόδους που είναι διαθέσιμες πλέον, ενώ επίσης δεν ανταποκρίνεται στους γρήγορους ρυθμούς που μπορεί να απαιτεί ένα εργαστήριο. Ακόμη, απαιτείται μια σχετικά μεγάλη ποσότητα DNA υψηλής ποιότητας, η οποία μπορεί να είναι δύσκολο να ληφθεί από ορισμένα δείγματα (97). Πέραν αυτών εμφανίζει περιορισμένη ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλής συχνότητας ή μικρών γενετικών αλλαγών, καθώς ενώ μπορεί να εντοπίσει σημαντικές ενθέσεις, απαλοιφές και ορισμένες σημειακές μεταλλάξεις, μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματική στην ανίχνευση ορισμένων σημειακών πολυμορφισμών, οι οποίοι αναλύονται καλύτερα μέσω αλληλούχησης (101). Παρά τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν, η τεχνική RFLP παραμένει ένα πολύτιμο εργαλείο για συγκεκριμένες εφαρμογές όπου τα πλεονεκτήματά της υπερτερούν των μειονεκτημάτων της.

### 1.6.3 Ανάλυση Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis (HRMA)

#### 1.6.3.1 Εισαγωγή

Η ανάλυση τήξης υψηλής ευκρίνειας (High Resolution Melting Analysis – HRMA) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων, πολυμορφισμών και επιγενετικών διαφορών σε δείγματα δίκλωνου DNA. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου, περιλαμβάνει την ενίσχυση της περιοχής-στόχου χρησιμοποιώντας PCR, κατά τη διάρκεια της οποίας μια φθορίζουσα χρωστική που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στο DNA, προσδένεται με ειδικό τρόπο σε αυτό, παράγοντας ένα σήμα που υποδηλώνει την παρουσία της (102,103). Η διαδικασία περιλαμβάνει θέρμανση του DNA σε ένα εύρος θερμοκρασιών περίπου 50-95 °C. Όταν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης επιτευχθεί η θερμοκρασία τήξης για το συγκεκριμένο μόριο DNA, αυτό αποδιατάσσεται έτσι ώστε οι δύο αλυσίδες του να διαχωριστούν η μία από την άλλη (104,105).

Το κλειδί της HRMA είναι η παρακολούθηση του διαχωρισμού των κλώνων σε πραγματικό χρόνο, που επιτυγχάνεται με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής παρεμβολής, η οποία έχει την μοναδική ιδιότητα να δεσμεύεται μόνο στο δίκλωνο DNA και μόνο τότε να φθορίζει έντονα. Στην αρχή της ανάλυσης HRMA τα επίπεδα φθορισμού είναι υψηλά στο δείγμα λόγω των δισεκατομμυρίων αντιγράφων που υπάρχουν. Καθώς όμως το δείγμα θερμαίνεται και οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται, η παρουσία του δίκλωνου DNA μειώνεται με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο φθορισμός. Το μηχάνημα διαθέτει έναν αισθητήρα που παρακολουθεί σε πραγματικό χρόνο αυτή τη διαδικασία μετρώντας τον φθορισμό (102,103). Στη συνέχεια, απεικονίζει τα δεδομένα αυτά ως γράφημα, γνωστό ως καμπύλη τήξης, που αναπαριστά το επίπεδο φθορισμού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία τήξης (Melting Temperature –  $T_m$ ) στην οποία διαχωρίζονται οι δύο αλυσίδες DNA είναι προβλέψιμη, εξαρτώμενη από την αλληλουχία των βάσεων του DNA και συσχετίζεται ισχυρά με το ποσοστό Γουανίνης G - Κυτοσίνης C (GC%). Η ανάλυση αυτών των καμπυλών τήξης επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων αφού διαφορές στην αλληλουχία

του DNA προκαλούν και διαφορές μεταξύ των καμπυλών τήξης που προκύπτουν, ενώ οι αλλαγές ενός μόνο ζεύγους βάσεων μπορούν να ανιχνευθούν ως μετατοπίσεις στην  $T_m$  ή ως αλλαγές στο σχήμα της καμπύλης τήξης (105,106).

### *1.6.3.2 Ανίχνευση της μετάλλαξης M184V με τη χρήση HRMA*

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ότι η τεχνική HRMA μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αποτελεσματικό τρόπο για την ανίχνευση διαφόρων μεταλλάξεων του HIV, συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης M184V (107). Η διαδικασία ανίχνευσης ξεκινά με την απομόνωση του ιικού RNA από δείγματα αίματος ατόμων θετικών στον ιό, ακολουθεί η αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή συμπληρωματικού DNA και στη συνέχεια ενισχύεται, μέσω PCR, συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης που περιέχει την πιθανή μετάλλαξη M184V. Η ενίσχυση γίνεται παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA σε μονές αλυσίδες, ενώ η ένταση της φθορίζουσας εκπομπής παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο για τη δημιουργία καμπυλών τήξης. Η μετάλλαξη M184V, η οποία περιλαμβάνει την αντικατάσταση της μεθειονίνης (ATG) από βαλίνη (GTG) στη θέση 184, επομένως αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα μια διακριτή αλλαγή στην καμπύλη τήξης του DNA (107).

Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιείται η ασύμμετρη PCR, μια δηλαδή παραλλαγή της τυπικής τεχνικής PCR, η οποία χρησιμοποιείται όταν στόχος είναι να ενισχυθεί περισσότερο το ένα σκέλος του DNA-στόχου έναντι του άλλου, συνήθως για τη δημιουργία μονόκλωνου DNA στα πλαίσια εφαρμογών όπως η αλληλούχιση (108). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση άνισων συγκεντρώσεων των εκκινητών, με τον εκκινητή για το επιθυμητό σκέλος να βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση (109). Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο πλαίσιο της Ανάλυσης Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας προκειμένου να εξασφαλιστεί η ύπαρξη επαρκούς ποσότητας μονόκλωνου DNA για την ακριβή ανάλυση της συμπεριφοράς τήξης. Η χρήση της ασύμμετρης PCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην ανίχνευση μεταλλάξεων και, παρόλο που αυτή η τεχνική μπορεί να απαιτεί προσεκτική βελτιστοποίηση για την ισορροπία της αντίδρασης ενίσχυσης, η εφαρμογή της μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ανάλυση (104,107).

### *1.6.3.3 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα HRMA*

Η τεχνική HRMA προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα που την έχουν καταστήσει δημοφιλή επιλογή στα εργαστηριακά και ερευνητικά περιβάλλοντα αφού η υψηλή ευαισθησία και η εξειδίκευσή της, επιτρέπει την ανίχνευση ακόμη και μονονουκλεοτιδικών αλλαγών στις αλληλουχίες του DNA Παρόλο που τα πλεονεκτήματά της συμπίπτουν με αυτή της qPCR αξίζει να αναφερθούν (105). Πιο αναλυτικά, είναι ένα σύστημα κλειστού σωλήνα (closed-tube system), το οποίο ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης και μειώνει την ανάγκη ύπαρξης περαιτέρω σταδίων μετά την PCR, όπως για παράδειγμα ηλεκτροφόρηση, επιταχύνοντας έτσι την πειραματική πορεία και μειώνοντας το κόστος (110). Η μέθοδος αυτή είναι μια σχετικά



απλή και οικονομικά αποδοτική μέθοδος που μπορεί να εκτελεστεί σε όργανα PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) τα οποία έχουν δυνατότητες τήξης υψηλής ανάλυσης (106).

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει ορισμένους περιορισμούς, ένας από τους κυριότερους είναι η ανάλυση των καμπυλών τήξης, οι οποίες μπορεί μερικές φορές να είναι πολύπλοκες και απαιτούν προσεκτική ερμηνεία (106). Τυχόν διαφοροποιήσεις ως προς την καθαρότητα και τη συγκέντρωση του δείγματος, τη συγκέντρωση της χρωστικής και τις συνθήκες PCR μπορούν να επηρεάσουν τη θερμοκρασία τήξης, οδηγώντας ενδεχομένως σε ασαφή αποτελέσματα (110). Επιπλέον, ενώ η HRMA είναι εξαιρετική για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων, η ικανότητά της να εντοπίζει άγνωστες παραλλαγές είναι περιορισμένη, καθώς βασίζεται στην παρουσία χαρακτηριστικών αλλαγών στην καμπύλη τήξης οι οποίες είναι γνωστές εξ αρχής (111). Αυτό μπορεί να την καταστήσει λιγότερο αποτελεσματική για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε εξαιρετικά ετερογενή δείγματα. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι η HRMA συνήθως λειτουργεί καλύτερα με σχετικά μικρά τμήματα έως 400 ζεύγη βάσεων, καθώς τα μεγαλύτερα τμήματα μπορεί δημιουργήσουν νέες καμπύλες ή να μεταβάλουν τη θερμοκρασία τήξης στις ήδη υπάρχουσες (102). Παρά τις προκλήσεις αυτές, η HRMA παραμένει ένα πολύτιμο εργαλείο για γρήγορο και οικονομικά αποδοτικό έλεγχο μεταλλάξεων, ιδίως σε περιβάλλοντα όπου απαιτείται υψηλή απόδοση και υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης.

## ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής διπλωματικής εργασίας είναι να αναπτυχθεί ένα αξιόπιστο και αποτελεσματικό πρωτόκολλο ανίχνευσης της μετάλλαξης M184V σε θετικά δείγματα HIV-1. Η M184V είναι μια σημειακή μετάλλαξη που εντοπίζεται στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1, η οποία επηρεάζει σημαντικά την απόκριση των ασθενών σε βασικά αντιρετροϊκά φάρμακα, όπως η λαμβουδίνη και η εμτρισιταβίνη. Η μετάλλαξη αυτή προσδίδει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα σε αυτά τα φάρμακα, τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά των σχημάτων αντιρετροϊκής θεραπείας που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για τη διαχείριση της λοίμωξης και χορηγούνται στην πλειονότητα των θετικών ατόμων με HIV-1.

Γνωρίζοντας τη σημασία του Ιού της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας για το σύστημα υγείας αλλά και τη σημαντικότητα των μεμονωμένων μεταλλάξεων αυτού, γίνεται αντιληπτό ότι η ανίχνευση της μετάλλαξης M184V είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας, τη μείωση του κινδύνου αντοχής στα φάρμακα και τη βελτίωση της απόκρισης των ασθενών στις διαθέσιμες θεραπείες. Συνεπώς προκύπτει η ανάγκη ανάπτυξης ενός γρήγορου τρόπου ανίχνευσης της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Οι μέθοδοι ανίχνευσης που αναλύονται και εφαρμόζονται στη συγκεκριμένη εργασία, είναι η ανάλυση τήξης υψηλής ευκρίνειας και ο πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Υλικά

### 2.1.1 Βιολογικά Υλικά

Για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε RNA που είχε προηγουμένως απομονωθεί από δείγματα αίματος, τα οποία προήλθαν από άτομα θετικά για τον ιό του HIV-1. Τα συγκεκριμένα αρχικά δείγματα αποτέλεσαν ευγενική παραχώρηση του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ).

### 2.1.2 Εργαστηριακός Εξοπλισμός - Αναλώσιμα

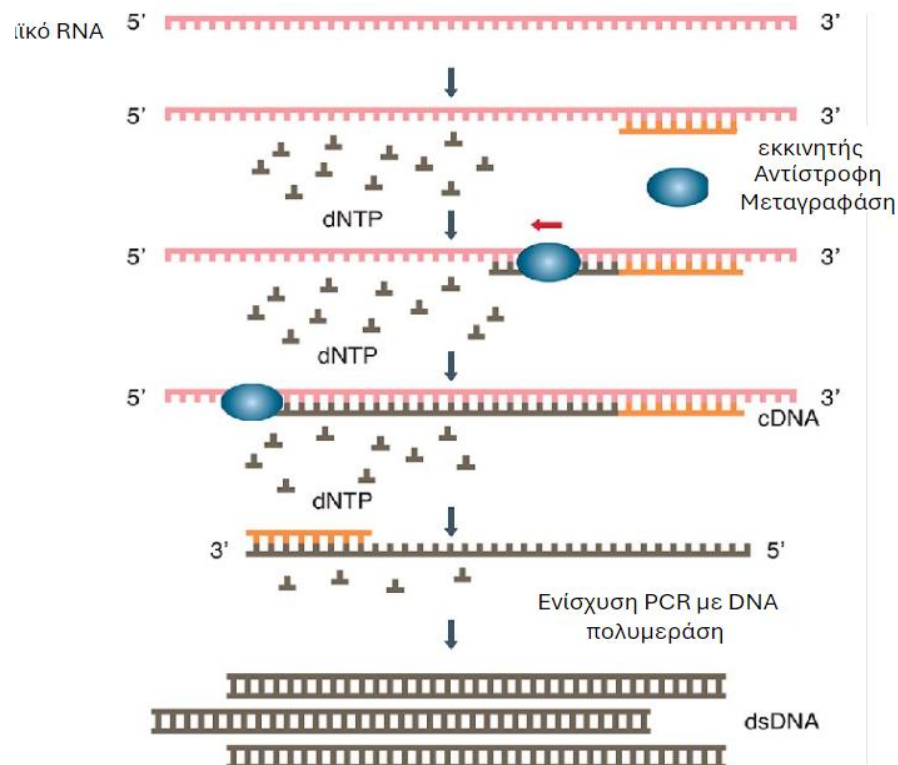
- Θάλαμος PCR (PCR Cabinet)
- Πιπέττες (0.1μl - 2.5μl , 1μl - 10μl, 2 - 20μl, 10 - 100μl, 20 - 200μl, 100 - 1000μl)
- Ρύγχη για τις πιπέττες (με φίλτρο και χωρίς φίλτρο - τα οποία είχαν αποστειρωθεί)
- Eppendorf 1.5ml (αποστειρωμένα)
- PCR σωληνάρια 0.2ml (αποστειρωμένα)
- Στατώ
- Ψυχόμενο στατώ / στατώ παγοκύστη
- Φυγόκεντρος (FastGene High Speed Mini Centrifuge)
- Φασματοφωτόμετρο NanoDrop (Quawell 9000 Spectrophotometer)
- Αναδευτήρας (Vortex)
- Αποστειρωμένες Λεπίδες
- Γυαλιά UV
- Αλουμινόχαρτο
- Κωνικές Φιάλες
- Υδροβολείς
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ψυγείο και Καταψύκτες (-20°C και -80°C)
- Ξηρός θερμικός επωαστήρας (FastGene Mini Dry Bath Advance)
- Εκμαγείο και χτενάκια (για τη δημιουργία πηκτής αγαρόζης)
- Συσκευή και δεξαμενή ηλεκτροφόρησης
- Σύστημα φωτογράφισης πηκτώματος (FastGene FAS-DIGI PRO)
- Θερμικός κυκλοποιητής συμβατικής PCR (Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cycler)
- Θερμικός κυκλοποιητής Real-Time PCR (QuantStudio 3)
- Σωληνάρια και στήλες πυριτίου
- Γάντια
- Εργαστηριακές Ποδιές

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Γενικές Μέθοδοι

#### 2.2.1.1 Αντίστροφη Μεταγραφή RNA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction - RT-PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή αλληλουχιών RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής (**Εικόνα 10**). Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη ιών που έχουν ως γενετικό υλικό RNA. Η διαδικασία ξεκινάει με εκμαγείο RNA από ένα δείγμα, το οποίο στη συνέχεια μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάσης (112).



**Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης.** Το ιικό RNA που παρουσιάζεται εδώ αντιστοιχεί στο RNA που απομονώθηκε από θετικά δείγματα για τον ιό του HIV-1. Με τη χρήση εκκινητή ειδικού ως προς την αλληλουχία-στόχο, ο οποίος προσδένεται στη συμπληρωματική αλληλουχία, αντίστροφης μεταγραφάσης και δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ξεκινάει η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής με αποτέλεσμα τη σύνθεση του cDNA [Προσαρμογή από (113)].

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript RT-PCR Kit (TAKARA, RR014B).

- Μέσα στον θάλαμο PCR που περιέχεται στο clean room (καθαρό χώρο) προετοιμάζεται το μείγμα A της αντίδρασης σε πάγο ή σε ψυχόμενη παγοκύστη. Το συγκεκριμένο

μείγμα περιλαμβάνει 10mM μείγμα dNTP (1μl), τον ειδικό εκκινητή RT\_M184V 10mM (1μl), 2mM μείγμα εξαμερών (0.2μl) και νερό υψηλής καθαρότητας κατάλληλο για PCR.

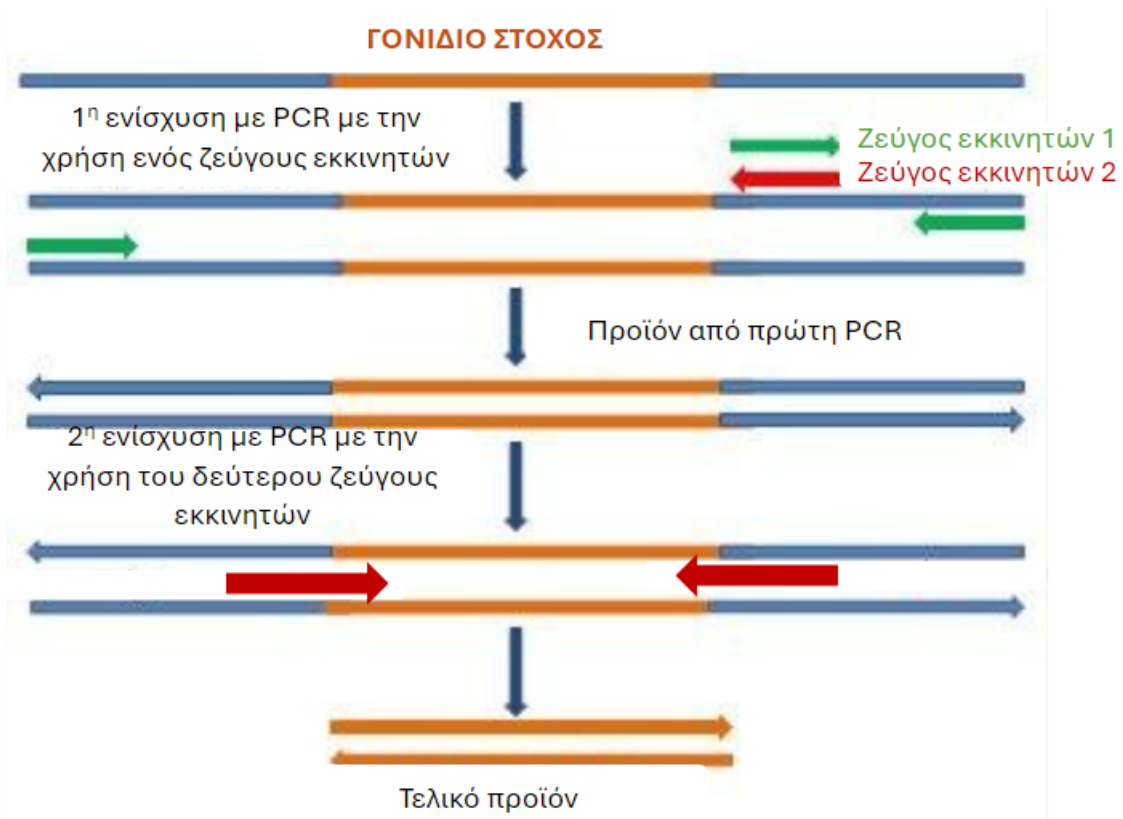
- Στον θάλαμο PCR που βρίσκεται εκτός του clean room προστίθεται το δείγμα RNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανέρχεται στα 10μl.
- Ακολουθεί σύντομη ανάδευση με τη χρήση φυγοκέντρου (spin down) επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και στους 4°C για 1 λεπτό.
- Στη συνέχεια, στο clean room προετοιμάζεται το δεύτερο μείγμα (Μείγμα Β) το οποίο περιλαμβάνει το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η προετοιμασία του μείγματος πραγματοποιείται είτε σε πάγο είτε σε ψυχόμενη παγοκύστη.
- Το Μείγμα Β αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα PrimeScript 5X (4μl), αναστολέα RNAσών 40U/μl (0.5μl), αντίστροφη μεταγραφάση Prime Script 100U/μl (0.5μl) και νερό υψηλής καθαρότητας κατάλληλο για PCR (5μl). Ο τελικός όγκος του δεύτερου μείγματος ανέρχεται στα 10μl ανά αντίδραση.
- Ανά δείγμα, προστίθεται στην αρχική αντίδραση η ποσότητα του δεύτερου μείγματος και ο τελικός όγκος που προκύπτει είναι 20μl.
- Ακολουθεί σύντομη ανάδευση με τη χρήση φυγοκέντρου και στη συνέχεια επώαση στους 42°C για 60 λεπτά, στους 70°C για 15 λεπτά, ενώ η αντίδραση διατηρείται στους 4°C.

### 2.2.1.3 Nested PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τύπου Nested PCR είναι μια τροποποιημένη εκδοχή της κανονικής PCR που αποσκοπεί στη βελτίωση της εξειδίκευσης και της ευαισθησίας της αντίδρασης σε περιπτώσεις όπου η αλληλουχία-στόχος αποτελεί μικρό ποσοστό του γενετικού υλικού που έχει προστεθεί ως εκμαγείο. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη χρήση δύο διαφορετικών ζευγών εκκινητών τα οποία εφαρμόζονται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR (**Εικόνα 11**). Το πρώτο ζεύγος εκκινητών (εξωτερικό ζεύγος) υβριδίζει με αλληλουχίες που πλαισιώνουν την περιοχή του DNA-στόχου και με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται η ενίσχυση ενός αρχικού (μεγαλύτερου) τμήματος που περιλαμβάνει την επιθυμητή αλληλουχία. Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται στη συνέχεια ως εκμαγείο για τη δεύτερη PCR. Σε αυτή την αντίδραση, γίνεται χρήση ενός δεύτερου ζεύγους εκκινητών (εσωτερικό ζεύγος) που προσδένεται σε αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται πιο κοντά στην περιοχή του DNA-στόχου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ενός μικρότερου τμήματος DNA που βρίσκεται εντός του προϊόντος που προέκυψε από την πρώτη αντίδραση (114).

Για τις ανάγκες των αντιδράσεων nested PCR στα πλαίσια της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητών από το Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Ειδικότερα, στην πρώτη αντίδραση nested PCR χρησιμοποιήθηκε το εξωτερικό ζεύγος εκκινητών Fext\_Rext, από το οποίο προκύπτει προϊόν PCR μεγέθους 861 ζευγών βάσεων, ενώ αντίστοιχα στη δεύτερη αντίδραση nested PCR χρησιμοποιήθηκε το εσωτερικό ζεύγος εκκινητών Fint\_Rint, από το οποίο προκύπτει προϊόν PCR μεγέθους 485 ζευγών

βάσεων. Σε όλες τις αντιδράσεις nested PCR χρησιμοποιήθηκε το Kapa HiFi PCR Kit (Kapa Biosystems, KK2101).



**Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της nested PCR.** Η αλληλουχία-στόχος παρουσιάζεται με πορτοκαλί χρώμα. Κατά την πρώτη αντίδραση γίνεται χρήση εξωτερικού ζεύγους εκκινητών (πράσινοι εκκινητές) και προκύπτει ένα τμήμα μεγαλύτερο σε σύγκριση με αυτό που προκύπτει κατά την επακόλουθη δεύτερη αντίδραση με τη χρήση εσωτερικού ζεύγους εκκινητών (κόκκινοι εκκινητές), οι οποίοι πλαισιώνουν την πορτοκαλί περιοχή [Προσαρμογή από (115)].

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Μέσα στον θάλαμο PCR που περιέχεται στο clean room, προετοιμάζεται το μείγμα για την PCR σε πάγο ή σε ψυχόμενη παγοκύστη. Το συγκεκριμένο μείγμα περιλαμβάνει 5X ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής πιστότητας (5μl), 10mM dNTPs (0.75μl), 10mM εκκινητής πρόσθιας κατεύθυνσης (Fext ή Fint) (0.9μl), 10mM εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Rext ή Rin) (0.9μl), 1U/μl DNA πολυμεράση KAPA (0.5μl) και νερό υψηλής καθαρότητας κατάλληλο για PCR (13.95μl).
- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται εκτός του clean room προστίθεται το cDNA (3μl) για την πρώτη αντίδραση ή το προϊόν της πρώτης nested PCR για τη δεύτερη αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης αντιστοιχεί σε 25μl.



- Ακολουθεί σύντομη ανάδευση με τη χρήση φυγοκέντρου.
- Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της πρώτης αντίδρασης nested PCR είναι το εξής:

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική Αποδιάταξη	95	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	98	20 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός	60	20 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση	72	55 δευτερόλεπτα	
Τελική Επιμήκυνση	72	1 λεπτό	1
Hold	4	HOLD	

**Πίνακας 1: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα πρώτης nested PCR**

Αντίστοιχα, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της δεύτερης αντίδρασης nested PCR είναι το εξής:

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική Αποδιάταξη	95	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	98	20 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός	65	20 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση	72	30 δευτερόλεπτα	
Τελική Επιμήκυνση	72	1 λεπτό	1
Hold	4	HOLD	

**Πίνακας 2: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα δεύτερης nested PCR**

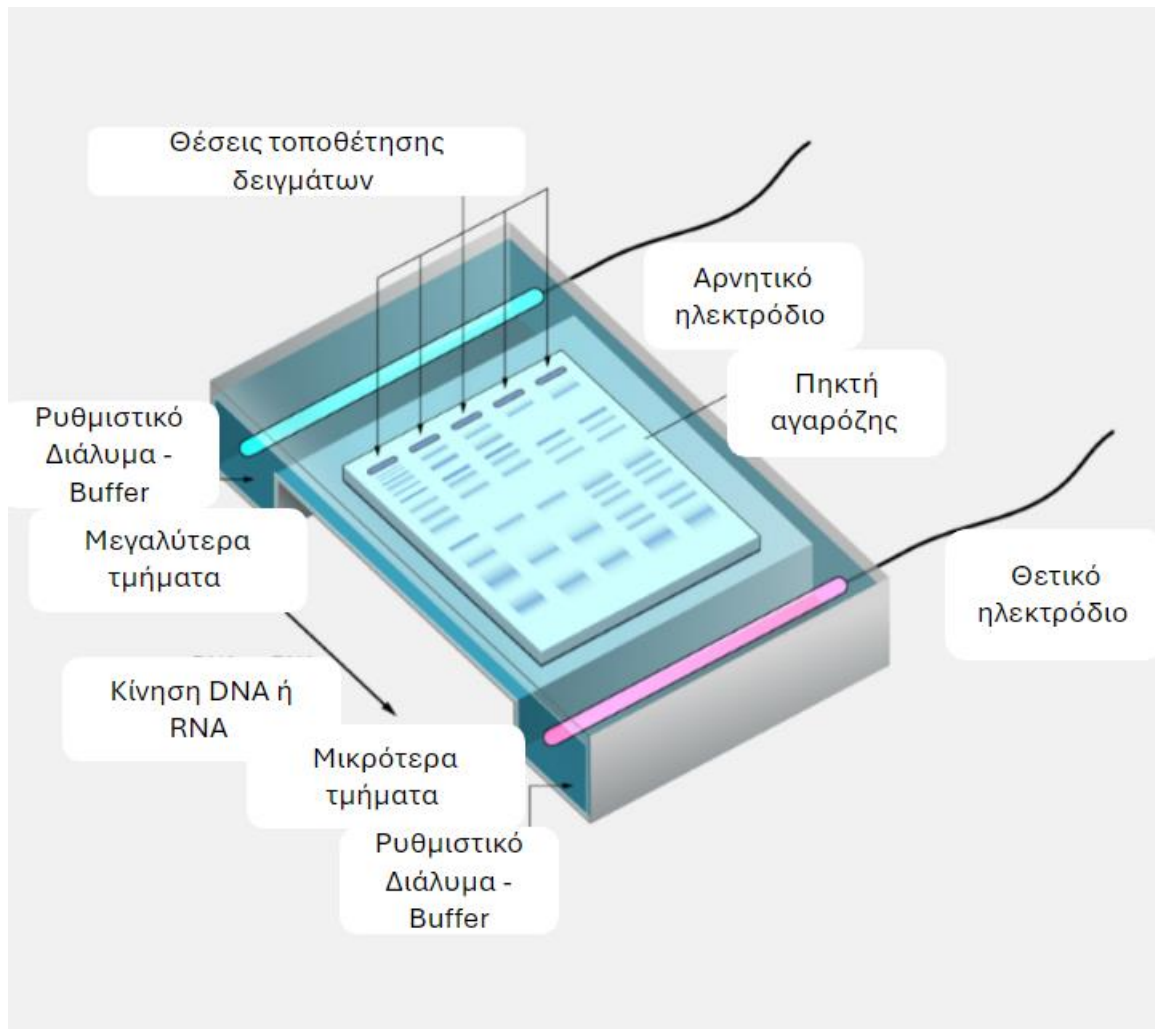
- Μετά από την PCR ακολουθεί η αξιολόγηση του αποτελέσματος με τη ηλεκτροφόρηση σε πηκτής αгарόζης 1%.

#### 2.2.1.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα από τις παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται τόσο στην έρευνα όσο στη διάγνωση, λόγω της ικανότητας που έχει να διαχωρίζει θραύσματα DNA ή RNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση των δειγμάτων DNA ή RNA σε ειδικές θέσεις που έχουν δημιουργηθεί στην πηκτή και την τοποθέτηση της πηκτής σε ηλεκτρικό πεδίο, με αποτέλεσμα τα θραύσματα να διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους (**Εικόνα 12**). Τα θραύσματα μικρότερου μεγέθους μετακινούνται ταχύτερα και σε μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με εκείνα μεγαλύτερου μεγέθους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διακριτών ζωνών που μπορούν να απεικονιστούν και να αξιολογηθούν.

Λόγω του μεγέθους των προϊόντων των αντιδράσεων nested PCR που ήδη αναφέρθηκαν, η πηκτή που χρησιμοποιείται έχει περιεκτικότητα σε αгарόζη 1%. Η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης είναι:

- Σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 1g σκόνης αгарόζης και 100ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE με συγκέντρωση 1x TBE.



**Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση μιας ηλεκτροφορητικής συσκευής.** Παρουσιάζεται η συσκευή με τα ηλεκτρόδια και ο προσανατολισμός τους, ενώ μπορούν να διακριθούν οι θέσεις στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα αλλά και η κατανομή των διάφορων ζωνών ανάλογα με το μέγεθος που έχουν [Προσαρμογή από (121)].

- Σε φούρνο μικροκυμάτων θερμαίνεται (συνήθως 2-5 λεπτά) το διάλυμα έως ότου η αγαρόζη ομογενοποιηθεί ώστε αποκτήσει την όψη ενός διαφανούς υγρού.
- Προκειμένου να κρυώσει το διάλυμα, η φιάλη τοποθετείται κάτω από τη βρύση και ανακινείται διαρκώς ενώ ταυτόχρονα διαβρέχεται εξωτερικά με τρεχούμενο νερό ώστε να μην στερεοποιηθεί.
- Στο διάλυμα προστίθεται χρωστική SYBR Safe DNA Gel Stain (1μl, Invitrogen, S33102) και αναδεύεται ελαφρώς προκειμένου να ενσωματωθεί ομοιόμορφα η χρωστική σε αυτό.
- Το διάλυμα τοποθετείται στο εκμαγείο στο οποίο είναι ήδη τοποθετημένα τα χτενάκια και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά από περίπου 30 – 45 λεπτά, όπου η πηκτή θα έχει σταθεροποιηθεί, τα χτενάκια αφαιρούνται από την πηκτή και ακολούθως η πηκτή αφαιρείται από το εκμαγείο.

- Η πηκτή τοποθετείται με τον κατάλληλο προσανατολισμό, και η τοποθέτηση γίνεται με σκοπό το DNA να οδηγηθεί από το αρνητικό ηλεκτρόδιο προς το θετικό, σε συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχει προηγουμένως προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Η στάθμη του διαλύματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε όταν τοποθετείται μέσα σε αυτό η πηκτή, να καλύπτεται πλήρως.
- Στην πρώτη θέση της πηκτής τοποθετούνται 3μl από τον Hyperladder II (Bioline, Παράρτημα I).
- Για τις υπόλοιπες θέσεις χρησιμοποιούνται 1.3μl από διάλυμα φόρτωσης (6X Loading Buffer) και 6.7μl από το εκάστοτε δείγμα.
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 40 λεπτά στα 120V.
- Αφού ολοκληρωθεί ο χρόνος, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται σε συσκευή UV ώστε να εμφανιστούν τα προϊόντα της PCR και να ληφθεί φωτογραφία.

#### 2.2.1.5 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

- Εφόσον τα προϊόντα της PCR που έχουν προκύψει έχουν το αναμενόμενο μέγεθος, τότε πραγματοποιείται απομόνωση της επιθυμητής ζώνης DNA από την πηκτή.
- Με τη βοήθεια της λάμπας UV και με τη χρήση λεπτής και αποστειρωμένης λεπίδας, η επιθυμητή ζώνη αποκόπτεται από την πηκτή, τοποθετείται σε σωληνάριο eppendorf και ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, προκειμένου να καθαριστεί το απομονωθέν τμήμα DNA, ακολουθείται το πρωτόκολλο με βάση το Kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up Mini kit for gel extraction (Macherey – Nagel).
- Ειδικότερα, αρχικά, για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης <2% προστίθενται 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT1 και το δείγμα επωάζεται για 5-10 λεπτά στους 50°C. Ανά 2-3 λεπτά το δείγμα πρέπει να αναδεύεται προκειμένου να λιώσει πλήρως η πηκτή.
- Ακολούθως, φορτώνονται μέχρι και 700 μl από το δείγμα σε στήλη που περιέχει μεμβράνη πυριτίου η οποία είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής, προκειμένου να προσδεθεί το DNA σε αυτήν. Κατόπιν φυγοκέντρωσης (30 δευτερόλεπτα, 11.000 x g), το έκλουσμα που συλλέχθηκε στο σωληνάριο συλλογής απορρίπτεται. Εάν ο όγκος του δείγματος είναι μεγαλύτερος από 700 μl, το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται έως ότου φορτωθεί όλο το δείγμα στη στήλη.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η έκπλυση του DNA που είναι προσδεμένο στη μεμβράνη πυριτίου, με προσθήκη 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη.
- Κατόπιν νέας φυγοκέντρωσης (30 s, 11.000 x g), το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο σωληνάριο συλλογής.
- Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η μεταφορά χροτροπικών αλάτων στο δείγμα και να αποφευχθούν ακατάλληλες τιμές A260/A230, το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται.
- Προκειμένου να στεγνώσει η μεμβράνη πυριτίου, το σωληνάριο φυγοκεντρείται (1 λεπτό, 11.000 x g) ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το ρυθμιστικό διάλυμα NT3.
- Για την έκλυση του DNA, η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο eppendorf 1,5 mL, προστίθενται 15-30 μL ρυθμιστικού διαλύματος NE στη μεμβράνη και επωάζεται σε

θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείται (1 λεπτό, 11.000 x g).

- Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση του καθαρισμένου DNA, το προηγούμενο βήμα μπορεί να επαναληφθεί επαναφορτώνοντας και επωάζοντας το ήδη εκλουσμένο προϊόν στην ίδια στήλη.

#### *2.2.1.6 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων*

Αφού πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός του δείγματος απαιτείται η αξιολόγηση και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του δείγματος. Αυτή πραγματοποιείται με χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop (Quawell 9000 Spectrophotometer). Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Γίνεται εκκίνηση της συσκευής του Nanodrop και καθαρισμός της ειδικής υποδοχής με ειδικό χαρτί.
- Επιλέγεται η ρύθμιση για μέτρηση δίκλωνου DNA και 1  $\mu\text{L}$  από το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο έχει πραγματοποιηθεί η έκλυση του δείγματος (NE) τοποθετείται στην ειδική θέση μέτρησης που βρίσκεται στο όργανο.
- Αφού πραγματοποιηθεί μηδενισμός του οργάνου (πατώντας την ένδειξη BLANK), η υποδοχή καθαρίζεται εκ νέου και τοποθετείται 1  $\mu\text{l}$  από το δείγμα πατώντας την ένδειξη MEASURE.
- Το DNA αξιολογείται ως προς τη συγκέντρωσή του, ελέγχοντας την αντίστοιχη ένδειξη σε  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , και ως προς την καθαρότάτά του, ελέγχοντας τον λόγο της απορρόφησης A260/A280. Ο λόγος απορρόφησης A260/A280 για το δίκλωνο DNA το οποίο μετράται στο συγκεκριμένο πείραμα πρέπει να είναι κοντά στο 1,8. Ένας χαμηλότερος λόγος υποδηλώνει την παρουσία άλλων άχρηστων στοιχείων, δηλαδή μη επαρκή καθαρισμό.

#### *2.2.1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση ηλεκτροφόρησης*

Εκτός από το Nanodrop, ο τρόπος που χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τον προσδιορισμό την συγκέντρωσης ήταν και η ηλεκτροφόρηση. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% πραγματοποιήθηκε όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. §2.2.1.4), με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε θέση φορτώθηκε 1  $\mu\text{l}$  από το δείγμα, 4  $\mu\text{l}$  νερό υψηλής καθαρότητας κατάλληλο για PCR και 1  $\mu\text{l}$  διαλύματος φόρτωσης (6x loading buffer).

### 2.2.2 Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)

Για τη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα με τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Στα πλαίσια του σχεδιασμού των

πειραμάτων RFLPs πραγματοποιήθηκαν εικονικές πέψεις με τη βοήθεια του online προγράμματος NEBCutter (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>)

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ENZΥΜΟ	ΘΕΣΕΙΣ ΚΟΠΗΣ	ΜΗΚΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ
<i>ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</i>		
<b>A</b>	1	278bp 208bp
<b>B</b>	1	277bp 209bp
<b>Γ</b>	1	265bp 221bp
<i>ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</i>		
<b>Γ</b>	2	217bp 209bp 60bp
<i>ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΘΕΣΗ ΚΑΘΟΛΙΚΗΣ ΚΟΠΗΣ</i>		
<b>Δ</b>	1	416bp 70bp

**Πίνακας 3: Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.** Στον συγκεκριμένο πίνακα αναγράφονται οι συμβολικές ονομασίες των ενζύμων, οι αριθμοί των θέσεων αναγνώρισης που υπάρχουν στο προϊόν μήκους 486 βάσεων που έχει προκύψει από τη δεύτερη PCR και τα μήκη των θραυσμάτων (τμημάτων) που δημιουργούνται μετά την αντίδραση της πέψης.

#### 2.2.2.1 Μονές πέψεις

Για την ανίχνευση της ύπαρξης ή όχι της μετάλλαξης M184V πραγματοποιήθηκαν πέψεις με ένα ένζυμο κάθε φορά.

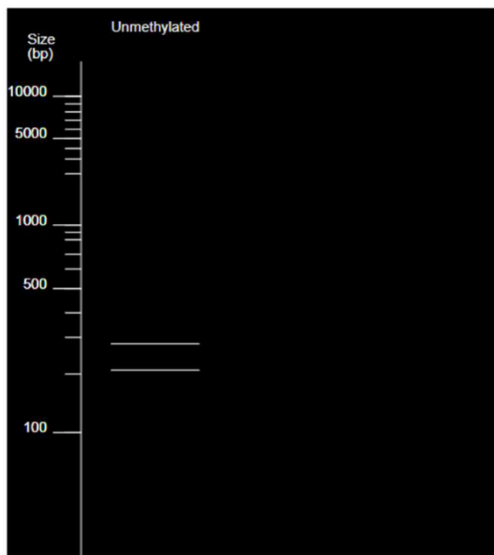
##### 2.2.2.1.1 Ένζυμο A

Το ένζυμο A διατηρείται στους -20°C και δεν απαιτεί απενεργοποίηση με θέρμανση. Το συγκεκριμένο ένζυμο πέπτει τη μεταλλαγμένη αλληλουχία δίνοντας αποτελέσματα μόνο σε περίπτωση που υπάρχει η μετάλλαξη M184V. Αν η αλληλουχία είναι αγρίου τύπου (wild type), δηλαδή αν δεν περιλαμβάνεται σε αυτήν η μετάλλαξη, τότε το τμήμα παραμένει άκοπο.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη με το ένζυμο ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το Μείγμα της αντίδρασης το οποίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα rCut Smart 10x (2μl), το ένζυμο A 5U/μl (0.4μl) και την απαιτούμενη ποσότητα νερού, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.

- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται έξω από το clean room προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος. Η ιδανική ποσότητα που έχει παρατηρηθεί ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα κυμαίνεται στα 60-90μl ανά αντίδραση.
- Ακολουθεί ανάδευση σε φυγόκεντρο (spin down) και επώαση σε Dry Bath στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C.



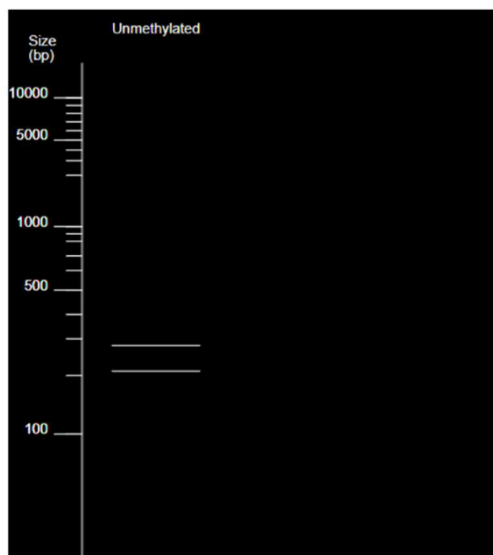
**Εικόνα 13:** Πέψη τμήματος που περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου A σε πηκτή αγαρόζης.

#### 2.2.2.1.2 Ένζυμο B

Το ένζυμο B διατηρείται στους -20°C και απαιτεί απενεργοποίηση με θέρμανση στους 65°C. Το συγκεκριμένο ένζυμο πέπτει τη μεταλλαγμένη αλληλουχία δίνοντας αποτελέσματα μόνο σε περίπτωση που υπάρχει η μετάλλαξη M184V. Αν η αλληλουχία είναι wild type δηλαδή αν δεν περιλαμβάνεται η μετάλλαξη το τμήμα παραμένει άκοπο.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη με το ένζυμο ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

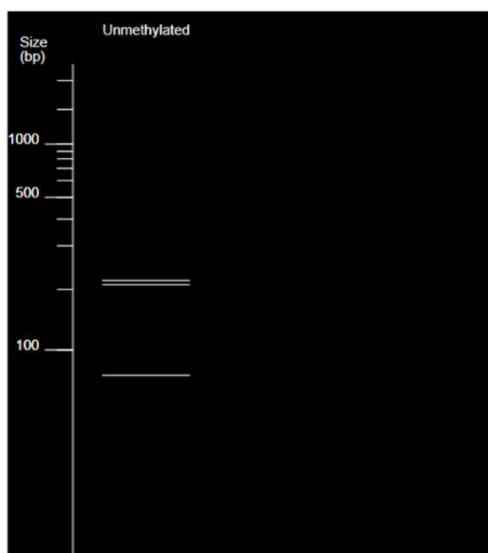
- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το Μείγμα της Αντίδρασης το οποίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα rCut Smart 10x (2μl), το ένζυμο B 10U/μl (0.2μl) και την απαιτούμενη ποσότητα νερού, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.
- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται έξω από το clean room προστίθεται η ποσότητα δείγματος. Η ιδανική συγκέντρωση που έχει παρατηρηθεί ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα κυμαίνεται στα 60-90μl ανά αντίδραση.
- Ακολουθεί ανάδευση σε φυγόκεντρο (spin down) και επώαση σε Dry Bath στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C και μετά ακολουθεί η απενεργοποίηση του ενζύμου για 20 λεπτά στους 65°C.



**Εικόνα 14:** Πέψη τμήματος που περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου B σε πηκτή αγαρόζης.

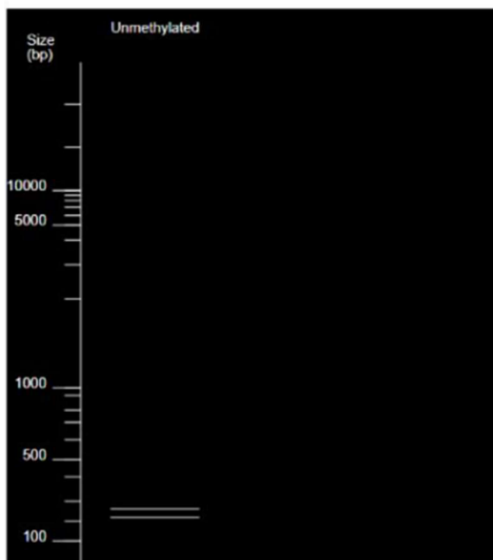
#### 2.2.2.1.3 Ένζυμο Γ

Το ένζυμο Γ διατηρείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και απαιτεί απενεργοποίηση με θέρμανση στους  $65^{\circ}\text{C}$ . Το συγκεκριμένο ένζυμο πέπτει τόσο την μεταλλαγμένη αλληλουχία όσο και την μη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Η διαφορά είναι ότι στη μεταλλαγμένη αλληλουχία η θέση αναγνώρισης υπάρχει μια μόνο φορά ενώ στην μη μεταλλαγμένη υπάρχει 2 φορές. Η διαφορά στην ποσότητα των θραυσμάτων αλλά και στα μεγέθη τους υποδηλώνει την ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης.



**Εικόνα 15:** Πέψη τμήματος που δεν περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου Γ σε πηκτή αγαρόζης.





**Εικόνα 16:** Πέψη τμήματος που περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου Γ σε πηκτική αγαρόζη.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη με το ένζυμο ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το Μείγμα της αντίδρασης το οποίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα rCut Smart 10x (2μl) και την απαιτούμενη ποσότητα νερού, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.
- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται έξω από το clean room προστίθεται η ποσότητα δείγματος. Η ιδανική συγκέντρωση που έχει παρατηρηθεί ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα κυμαίνεται στα 60-90μl ανά αντίδραση.
- Το ένζυμο Γ 10U/μl (0.2μl) προστίθεται τελευταίο στους -80°C
- Ακολουθεί ανάδευση σε φυγόκεντρο (spin down) και επώαση σε Dry Bath στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C και μετά ακολουθεί η απενεργοποίηση του ενζύμου για 20 λεπτά στους 65°C.

#### 2.2.2.1.4 Ένζυμο Δ

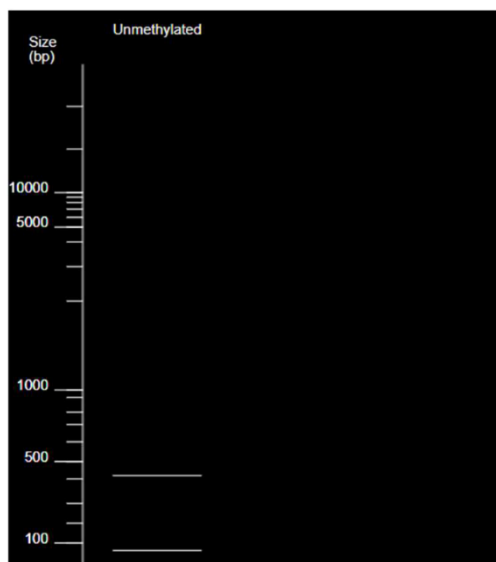
Το ένζυμο Δ διατηρείται στους -20°C και δεν απαιτεί απενεργοποίηση με θέρμανση. Πέπτει τόσο τη μεταλλαγμένη όσο και τη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία, όχι όμως στο σημείο της μετάλλαξης. Το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε προκειμένου να είναι πιο ευδιάκριτα μεταξύ τους τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη με το ένζυμο Α και το ένζυμο Β.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη με το ένζυμο ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το με το οποίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα rCut Smart 10x (2μl), το ένζυμο Δ 10U/μl (0.4μl) και την απαιτούμενη ποσότητα νερού, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.



- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται έξω από το clean room προστίθεται η ποσότητα δείγματος. Η ιδανική συγκέντρωση που έχει παρατηρηθεί ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα κυμαίνεται στα 60-90μl ανά αντίδραση.
- Ακολουθεί ανάδευση σε φυγόκεντρο (spin down) και επώαση σε Dry Bath στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C.



**Εικόνα 17:** Πέψη τμήματος DNA σε θέση ανεξάρτητη από αυτή που εντοπίζεται η μετάλλαξη. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου Δ σε πηκτική αгарόζη.

#### 2.2.2.2 Διπλές πέψεις

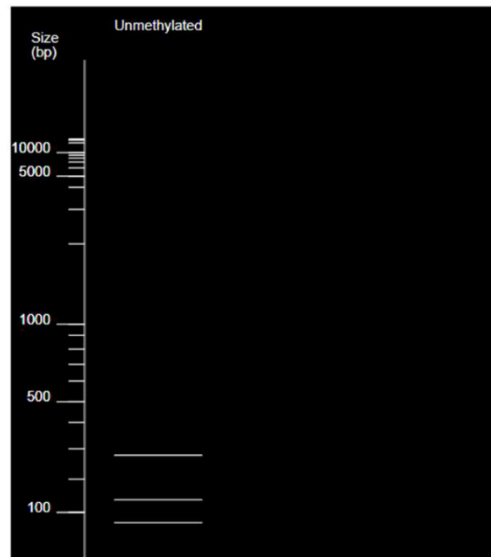
Για την ανίχνευση της ύπαρξης ή όχι της μετάλλαξης M184V πραγματοποιήθηκαν και διπλές πέψεις με τα ένζυμα που κόβουν τη μεταλλαγμένη αλληλουχία σε συνδυασμό με το ένζυμο Δ.

##### 2.2.2.2.1 Ένζυμο A – Ένζυμο Δ

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη με τα δυο αυτά ένζυμα ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

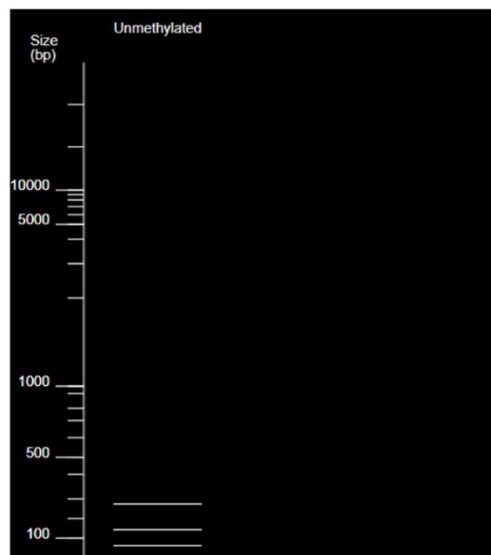
- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το Μείγμα της αντίδρασης το οποίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα rCut Smart 10x (2μl), το ένζυμο Δ 10U/μl (0.4μl), το ένζυμο A 5U/μl (0.4μl) και την απαιτούμενη ποσότητα νερού, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.
- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται έξω από το clean room προστίθεται η ποσότητα δείγματος. Η ιδανική συγκέντρωση που έχει παρατηρηθεί ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα κυμαίνεται στα πάνω από 120ng/μl ανά αντίδραση.

- Ακολουθεί ανάδευση σε φυγόκεντρο (spin down) και επώαση σε Dry Bath στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C.



**Εικόνα 18:** Διπλή πέψη τμήματος που περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου Α κα του ενζύμου Δ σε πηκτή αγαρόζης.

#### 2.2.2.2.2 Ένζυμο Β – Ένζυμο Δ



**Εικόνα 19 :** Διπλή πέψη τμήματος που περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρουσιάζεται σε προσομοίωση η κατανομή των θραυσμάτων του ενζύμου Β κα του ενζύμου Δ σε πηκτή αγαρόζης.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη με τα δυο αυτά ένζυμα ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το μείγμα της αντίδρασης το οποίο περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα rCut Smart 10x (2μl), το ένζυμο Δ 10U/μl (0.4μl), το ένζυμο Β 10U/μl (0.2μl) και την απαιτούμενη ποσότητα νερού, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.
- Στον θάλαμο PCR ο οποίος βρίσκεται έξω από το clean room προστίθεται η ποσότητα δείγματος. Η ιδανική συγκέντρωση που έχει παρατηρηθεί ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα κυμαίνεται στα πάνω από 120ng/μl ανά αντίδραση.
- Ακολουθεί ανάδευση σε φυγόκεντρο (spin down) και επώαση σε Dry Bath στο οποίο έχει προστεθεί απιονισμένο νερό. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C και ακολουθεί απενεργοποίηση για 20 λεπτά στους 65°C.

### 2.2.2.3 Ηλεκτροφόρηση

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα από κάθε πέψη (μονή και διπλή) πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,7%.

### 2.2.3 Ανάλυση Τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis (HRMA)

Εναλλακτικά της μεθόδου RFLP, το προϊόν της δεύτερης nested PCR με μέγεθος 486 bp, αφού απομονωθεί από πηκτή αγαρόζης και καθαριστεί (όπως αναφέρθηκε στην §2.2.1), μπορεί να αναλυθεί με την τεχνική ανάλυσης τήξης υψηλής ευκρίνειας. Για την πραγματοποίηση του πρωτοκόλλου HRMA στα πλαίσια της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το Kapa SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems KK4600). Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Στο clean room και σε πάγο προετοιμάζεται το Master Mix της συγκεκριμένης αντίδρασης, που περιλαμβάνει το SYBR Mix (8μl), τη χρωστική ROX low (0,04μl), τον εκκινητή πρόσθιας κατεύθυνσης 184F 5μM (1μl), τον εκκινητή αντίστροφης κατεύθυνσης 184R 0.25μM (0,6μl), τον φωσφορυλιωμένο ανιχνευτή 1μM (3μl) που είναι ειδικός είτε για την αλληλουχία φυσικού τύπου, είτε για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία), και νερό (0,36μl). Επειδή, τόσο το SYBR Mix και όσο και η ROX low είναι φωτοευαίσθητα αντιδραστήρια, κατά την ώρα της προετοιμασίας του μείγματος το σωληνάριο του Master Mix καλύπτεται με αλουμινόχαρτο.
- Το Master Mix διαμοιράζεται στα ειδικά σωληνάρια της qPCR.
- Στον θάλαμο PCR που βρίσκεται έξω από το clean room, σε κάθε σωληνάριο προστίθεται το καθαρισμένο προϊόν της δεύτερης nested PCR (3μl). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανέρχεται στα 16μl.
- Ακολουθεί μια σύντομη φυγόκεντρωση (short spin).
- Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή της real-time PCR (QuantStudio 3, Applied Biosystems), όπου επιλέγεται το θερμοκρασιακό πρόγραμμα με τις εξής ρυθμίσεις:

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι	Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας ανά δευτερόλεπτο (ramp rate)
Αρχική αποδιάταξη	95	3 λεπτά	1	3.6° C/s
Αποδιάταξη	95	5 δευτερόλεπτα	40	3.6° C/s
Υβριδισμός	50	15 δευτερόλεπτα		2.2° C/s
Επιμήκυνση	72	15 δευτερόλεπτα		3.6° C/s
Καμπύλη τήξης	95	1 λεπτό	1	3.6° C/s
	40	1 λεπτό		1° C/s
	95	5 δευτερόλεπτα		1° C/s
Αναμονή	4	∞		

**Πίνακας 4: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ανάλυσης HRMA.**

- Αφού τελειώσει το πρώτο πρόγραμμα ακολουθεί το δεύτερο πιο σύντομο πρόγραμμα, το οποίο δίνει καλύτερο γράφημα για τις καμπύλες τήξης.

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι	Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας ανά δευτερόλεπτο (ramp rate)
Καμπύλη τήξης	95	1 λεπτό	1	3.6° C/s
	45	1 λεπτό		0.5° C/s
	95	5 δευτερόλεπτα		1.6° C/s
Hold	4	Hold		

**Πίνακας 5: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα σύντομης ανάλυσης HRMA.**

- Το μέγεθος του τμήματος που προκύπτει από το ζεύγος εκκινητών 184F/184R είναι 80bp, ενώ το μέγεθος που προκύπτει από το ζεύγος εκκινητή 184F και ανιχνευτή (MUT ή WT) είναι 41bp, αντίστοιχα. Αναφορικά με την καμπύλη τήξης που αντιστοιχεί στο ζεύγους εκκινητών 184F/184R η κορυφή της παρατηρείται σε θερμοκρασία  $75.5 \pm 1$  °C, ενώ η κορυφή του ζεύγους 184F/ανιχνευτή παρατηρείται σε θερμοκρασία  $67 \pm 1$  °C, αντίστοιχα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Γενικά

Προκειμένου να ελεγχθεί το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε, στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν 26 δείγματα RNA θετικά στον ιό HIV-1 για τα οποία ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που ήδη περιγράφηκε στην §2.2. Στον Πίνακα 6 καταγράφονται τα δείγματα που αναλύθηκαν, καθώς και αν ήταν θετικά ή αρνητικά ως προς τη μετάλλαξη M184V σύμφωνα με την αλληλούχιση κατά Sanger που είχε ήδη προηγηθεί. Κάθε ένα από τα παρακάτω δείγματα υποβλήθηκε σε επεξεργασία πολλαπλές φορές προκειμένου να ελεγχθούν όλες οι παράμετροι και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες των επιμέρους τεχνικών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	M184V
20	Θετικό
22	Αρνητικό
30	Αρνητικό
73	Θετικό
103	Αρνητικό
120	Αρνητικό
126	Θετικό
225	Αρνητικό
228	Θετικό
247	Θετικό
456	Αρνητικό
584	Αρνητικό
601	Θετικό
619	Αρνητικό
634	Αρνητικό
635	Αρνητικό
636	Αρνητικό
655	Αρνητικό
661	Αρνητικό
664	Αρνητικό
666	Αρνητικό
769	Θετικό
839	Αρνητικό
842	Θετικό
919	Θετικό
990	Θετικό

**Πίνακας 6:** Δείγματα που αναλύθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία.

#### 3.1.1 Nested PCR

##### 3.1.1.1 Πρώτη PCR

Για την πρώτη «φωλιασμένη» (nested) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δοκιμάστηκαν 6 διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών, ενώ ελέγχθηκαν οι παράμετροι της θερμοκρασίας και του χρόνου υβριδισμού (annealing), όπως και ο αριθμός των κύκλων. Για

τη συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιήθηκαν 14 διαφορετικές δοκιμές, πριν την εύρεση των ιδανικών συνθηκών με τα βέλτιστα αποτελέσματα.

#### 3.1.1.1.1 Ζεύγη Εκκινητών

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι διαφορετικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την πρώτη PCR, μαζί με τη θέση τους στο γονιδίωμα του HIV με βάση την αλληλουχία με αριθμό καταχώρησης στο NCBI HXB2 K03455.1, το μήκος του εκκινητή, την  $T_m$  και το ποσοστό GC.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΜΗΚΟΣ	$T_m$ °C	GC%
<b>pol_Fout</b>	Sacks et al. 2017	20	51,2	35,00%
<b>pol_Rout</b>	Sacks et al. 2017	22	54,7	36,40%
<b>RES 3</b>	Εργαστήριο EMMA	26	52,9	31,50%
<b>RES 4</b>	Εργαστήριο EMMA	21	52,9	31,50%
<b>GEN 2</b>	Εργαστήριο EMMA	28	59,3	44,60%
<b>SEQ 5</b>	Εργαστήριο EMMA	28	56,9	42,30%
<b>Fext</b>	Παρούσα ερευνητική εργασία	22	58,4	45%
<b>Rext</b>	Παρούσα ερευνητική εργασία	20	59,4	55%

**Πίνακας 7:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την πρώτη PCR.

- Οι εκκινητές pol\_Fout – pol\_Rout χρησιμοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο για την ανίχνευση της μετάλλαξης M184V που αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του Sacks et. al 2017 (93).
- Οι εκκινητές RES 3, RES 4, GEN2 και SEQ 5 ήταν εκκινητές που διέθετε το εργαστήριο από διαφορετικά πρωτόκολλα.
- Οι εκκινητές Fext – Rext δημιουργήθηκαν από το εργαστήριο για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας.

Τα ζεύγη που δοκιμάστηκαν επιλέχθηκαν με βάση τη θερμοκρασία  $T_m$ , η οποία δεν θα πρέπει να διαφέρει πολύ μεταξύ των εκκινητών, προκειμένου να επιλεγεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού. Ένας ακόμη παράγοντας είναι το μήκος των εκκινητών το οποίο δεν ενδείκνυται να διαφέρει πολύ μεταξύ τους. Τα ζεύγη είναι τα:

- Pol\_Fout – pol\_Rout, μέγεθος προϊόντος: 1128 ζεύγη βάσεων
- Pol\_Fout – Gen 2, μέγεθος προϊόντος: 1083 ζεύγη βάσεων
- Pol\_Fout – RES 3, μέγεθος προϊόντος: 1200 ζεύγη βάσεων
- RES 3 – RES 4, μέγεθος προϊόντος: 1511 ζεύγη βάσεων
- Pol\_Fout – SEQ 5, μέγεθος προϊόντος: 914 ζεύγη βάσεων
- Fext – Rext , μέγεθος προϊόντος: 861 ζεύγη βάσεων

Το ζεύγος το οποίο επιλέχθηκε αφού έδωσε τα ιδανικότερα αποτελέσματα είναι το ζεύγος Fext - Rext.

#### 3.1.1.1.2 Θερμοκρασία Υβριδισμού

Ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε, δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν για κάθε ζεύγος.

- Pol\_Fout – pol\_Rout, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C
- Pol\_Fout – Gen 2, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 55°C, 60°C
- Pol\_Fout – RES 3, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 52°C, 55°C, 57°C, 60°C, 65°C
- RES 3 – RES 4, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C
- Pol\_Fout – SEQ 5, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C
- Fext – Rext, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 60°C

Οι ιδανικότερες συνθήκες είναι με τη χρήση του ζεύγους Fext – Rext στους 60 °C.

#### 3.1.1.1.3 Χρόνος Υβριδισμού

Μια ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες είναι ο χρόνος υβριδισμού. Παρακάτω παρουσιάζονται οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζεύγος ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος που προέκυψε.

- Pol\_Fout – pol\_Rout, χρόνος 30 δευτερόλεπτα, 20 δευτερόλεπτα
- Pol\_Fout – Gen 2, χρόνος 30 δευτερόλεπτα, 25 δευτερόλεπτα
- Pol\_Fout – RES 3, χρόνος 30 δευτερόλεπτα
- RES 3 – RES 4, χρόνος 30 δευτερόλεπτα
- Pol\_Fout – SEQ 5, χρόνος 30 δευτερόλεπτα
- Fext – Rext, χρόνος 20 δευτερόλεπτα

Οι ιδανικότερες συνθήκες είναι με τη χρήση του ζεύγους Fext – Rext στα 20 δευτερόλεπτα.

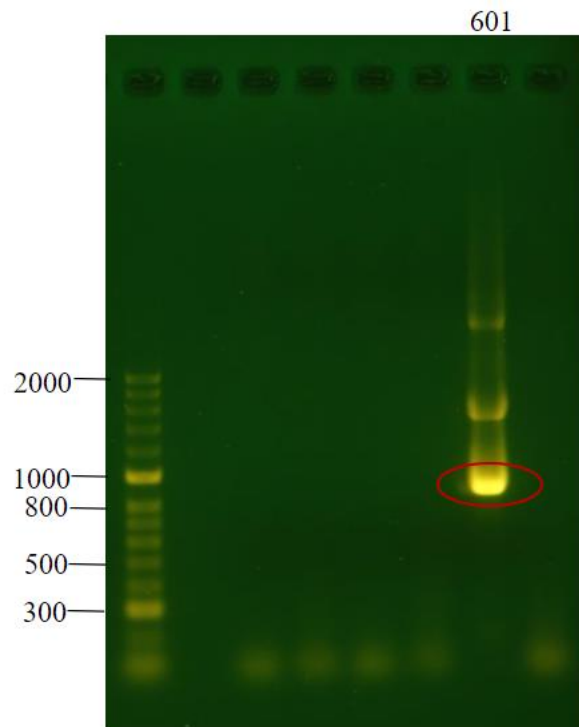
#### 3.1.1.1.4 Αριθμός κύκλων

Οι δοκιμές αναφορικά με τους κύκλους της PCR για κάθε ζεύγος ήταν στους 35 και τους 40. Οι 35 κύκλοι αποδείχθηκε ότι έδιναν καλύτερα αποτελέσματα.

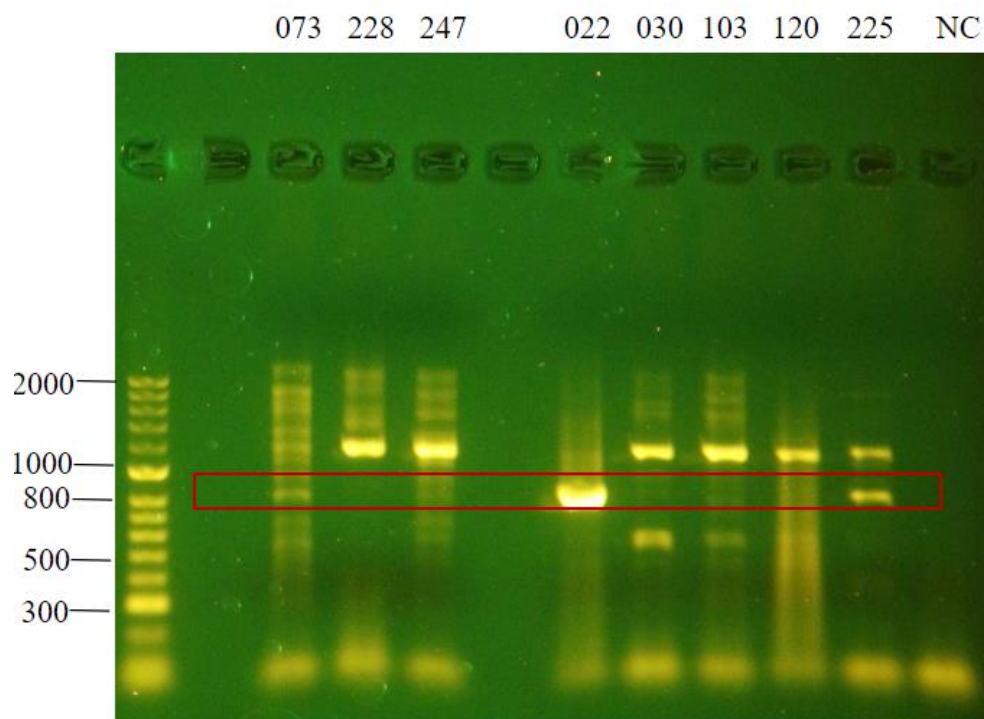
#### 3.1.1.1.5 Εικόνες Ηλεκτροφόρησης

Παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες εικόνες με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης από την πρώτη PCR. Οι συγκεκριμένες δοκιμές προέκυψαν με τη χρήση του επιλεγμένου ζεύγους εκκινητών Fext - Rext. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 861 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη). Η πηκτή αγαρόζης έχει περιεκτικότητα 1%, ενώ ο χρόνος στον οποίο λήφθηκε η φωτογραφία είναι 45 λεπτά στα 120V.



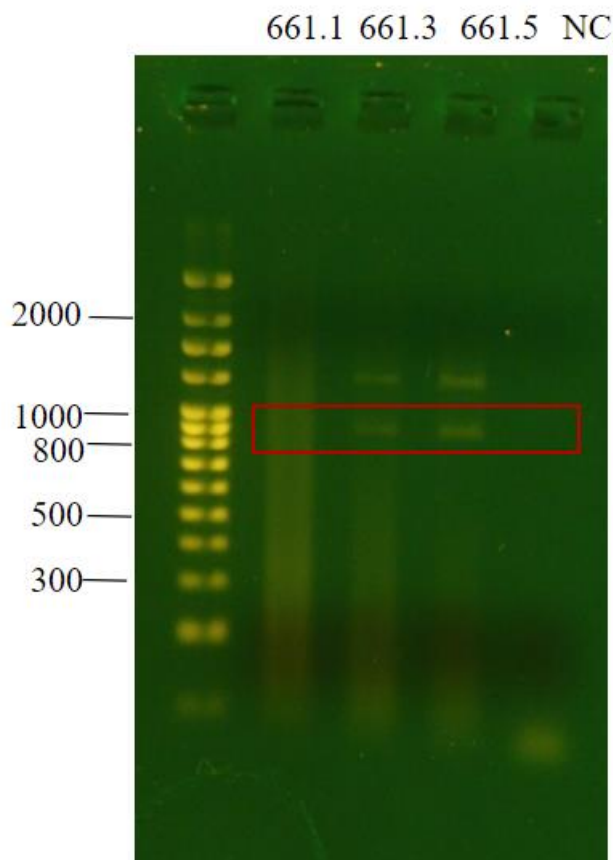


**Εικόνα 20:** Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πρώτης PCR για ένα θετικό δείγμα (κωδικός 601). Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 861 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη).



**Εικόνα 21:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πρώτης PCR για 8 θετικά δείγματα. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 861 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη). Οι κωδικοί των δειγμάτων αναγράφονται στο επάνω μέρος της εικόνας. Το δείγμα NC πρόκειται

για τον αρνητικό μάρτυρα (negative control), που αντιστοιχεί σε δείγμα με νερό αντί για cDNA.



**Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πρώτης PCR για ένα αρνητικό δείγμα.** Η συγκεκριμένη δοκιμή προέκυψε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών Fext - Rext. Το επιθυμητό μέγεθος είναι 861 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη). Στη συγκεκριμένη δοκιμή έχει αναλυθεί 1 δείγμα για το οποίο έχουν δοκιμαστεί 3 διαφορετικές ποσότητες προτύπου cDNA (1μl, 3μl και 5μl, αντίστοιχα) και ένα NC (negative control).

### 3.1.1.2 Δεύτερη PCR

Για τη δεύτερη nested PCR δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών, ενώ ελέγχθηκαν οι παράμετροι της θερμοκρασίας και του χρόνου για το στάδιο του υβριδισμού, όπως και ο αριθμός των κύκλων. Για τη συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιήθηκαν 10 διαφορετικές δοκιμές, πριν την εύρεση των ιδανικών συνθηκών με τα βέλτιστα αποτελέσματα.

#### 3.1.1.2.1 Ζεύγη Εκκινητών

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται οι διαφορετικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την πρώτη PCR μαζί με την θέση τους στο γονιδίωμα του HIV με βάση την αλληλουχία με αριθμό καταχώρησης στο NCBI HXB2 K03455.1, το μήκος του εκκινητή, το Tm και το ποσοστό GC

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΜΗΚΟΣ	T <sub>m</sub> °C	GC
<b>pol_Fin</b>	Sacks et al. 2017	19	52,4	42,10%
<b>pol_Rin</b>	Sacks et al. 2017	18	51,4	49,70%
<b>184R</b>	Sacks et al. 2017	23	57,1	39,10%
<b>SEQ 5</b>	Εργαστήριο EMMA	28	56,9	42,30%
<b>Fint</b>	Παρούσα ερευνητική εργασία	20	53,2	40%
<b>Rint</b>	Παρούσα ερευνητική εργασία	21	57,9	48%

**Πίνακας 8:** Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δεύτερη PCR.

- Οι εκκινήτες pol\_Fout, pol\_Rout και 184R χρησιμοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο για την ανίχνευση της μετάλλαξης M184V που αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του Sacks et. al 2017 (93)(83).
- Ο εκκινήτης SEQ 5 ήταν εκκινήτης που διέθετε το εργαστήριο από διαφορετικά πρωτόκολλα.
- Οι εκκινήτες Fint – Rint δημιουργήθηκαν από το εργαστήριο για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας.

Τα ζεύγη που δοκιμάστηκαν επιλέχθηκαν με βάση τη θερμοκρασία T<sub>m</sub>, η οποία δεν θα πρέπει να διαφέρει πολύ μεταξύ των εκκινήτων, προκειμένου να επιλεγεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού. Ένας ακόμη παράγοντας είναι το μήκος των εκκινήτων το οποίο δεν ενδείκνυται να διαφέρει πολύ μεταξύ τους. Τα ζεύγη είναι τα:

- Pol\_Fin – Pol\_Rin, μέγεθος προϊόντος: 985 ζεύγη βάσεων
- Pol\_Fin – Seq 5, μέγεθος προϊόντος: 808 ζεύγη βάσεων
- Pol\_Fin – 184R, μέγεθος προϊόντος: 654 ζεύγη βάσεων
- Fint – Rint, μέγεθος προϊόντος: 485 ζεύγη βάσεων

Το ζεύγος το οποίο επιλέχθηκε αφού έδωσε τα ιδανικότερα αποτελέσματα είναι το ζεύγος Fint – Rint.

### 3.1.1.2.2 Θερμοκρασία Υβριδισμού

Ανάλογα με το ζεύγος εκκινήτων δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν για κάθε ζεύγος.

- Pol\_Fin – Pol\_Rin, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C
- Pol\_Fin – Seq 5, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 55°C, 60°C
- Pol\_Fin – 184R, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 55°C, 60°C
- Fint – Rint, θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C

Οι ιδανικότερες συνθήκες είναι με την χρήση του ζεύγους Fint – Rint στους 65 °C.

### 3.1.1.2.3 Χρόνος Υβριδισμού

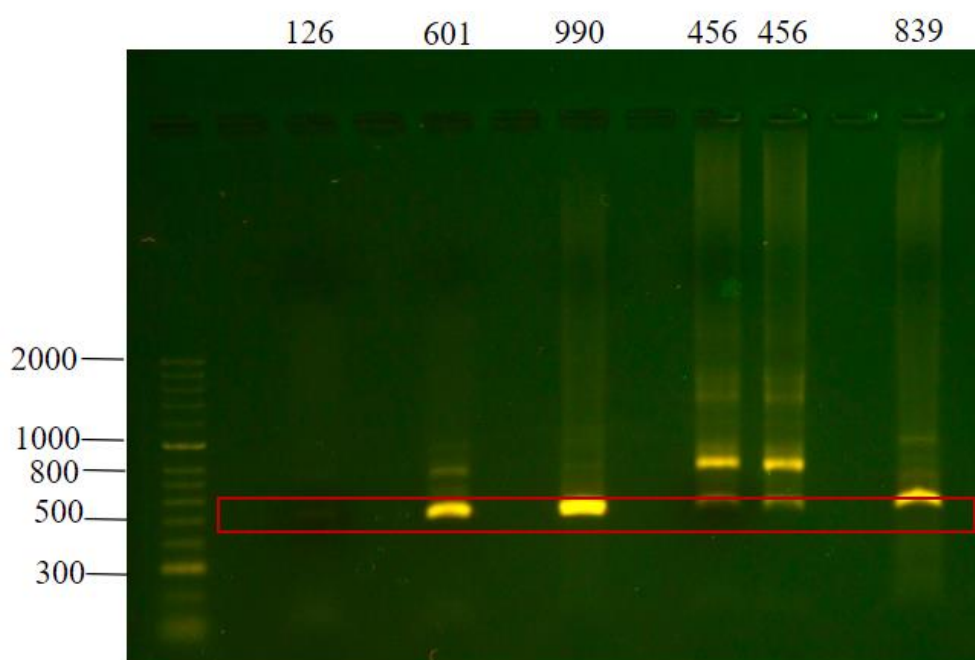
Όλα τα ζεύγη εξετάστηκαν στα 20 δευτερόλεπτα και αποδείχθηκε ότι οι ιδανικότερες συνθήκες είναι με τη χρήση του ζεύγους Fint – Rint είναι στα 20 δευτερόλεπτα.

### 3.1.1.2.4 Αριθμός κύκλων

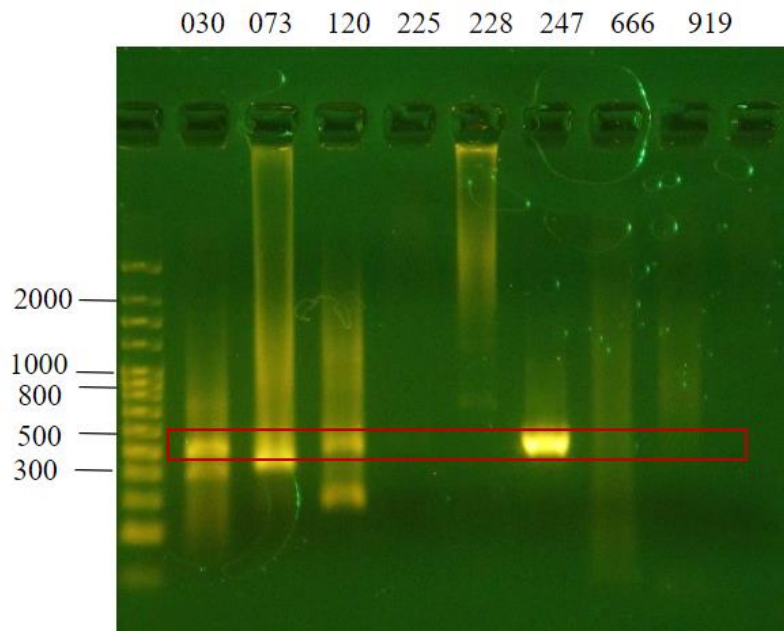
Οι δοκιμές αναφορικά με τους κύκλους της PCR για κάθε ζεύγος ήταν 35 και 40. Οι 35 κύκλοι αποδείχθηκαν ότι έδιναν καλύτερα αποτελέσματα.

### 3.1.1.2.5 Εικόνες Ηλεκτροφόρησης

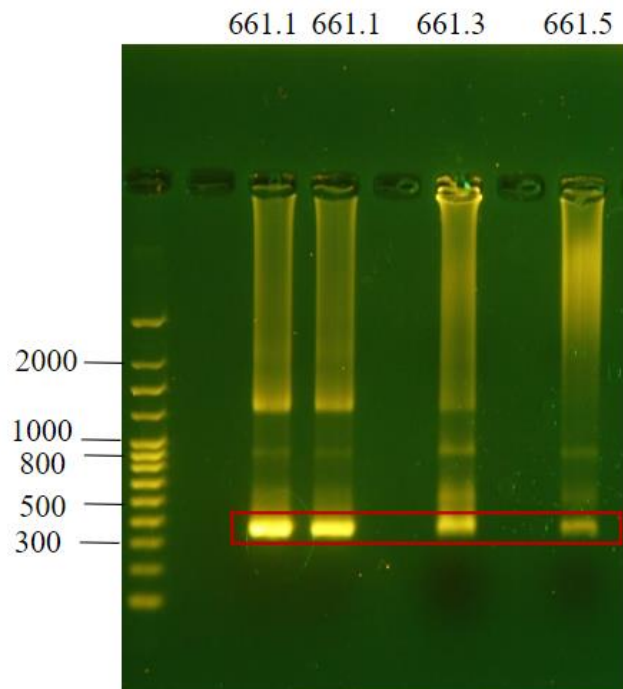
Παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες εικόνες με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης από τη δεύτερη PCR. Οι συγκεκριμένες δοκιμές προέκυψαν με τη χρήση του επιλεγμένου ζεύγους εκκινητών Fint – Rint. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 485 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη). Η πηκτή αγαρόζης έχει περιεκτικότητα 1%, ενώ ο χρόνος στον οποίο λήφθηκε η φωτογραφία είναι 45 λεπτά στα 120V.



**Εικόνα 23:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της δεύτερης PCR για 5 θετικά δείγματα. Οι κωδικοί των δειγμάτων αναγράφονται στο επάνω μέρος της εικόνας. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 485 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη).



**Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της δεύτερης PCR για 8 δείγματα.** Οι κωδικοί των δειγμάτων αναγράφονται στο επάνω μέρος της εικόνας. Τα δείγματα 030, 120, 225 και 666 είναι αρνητικά. Τα δείγματα 073, 228, 247 και 919 είναι θετικά. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 485 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη).



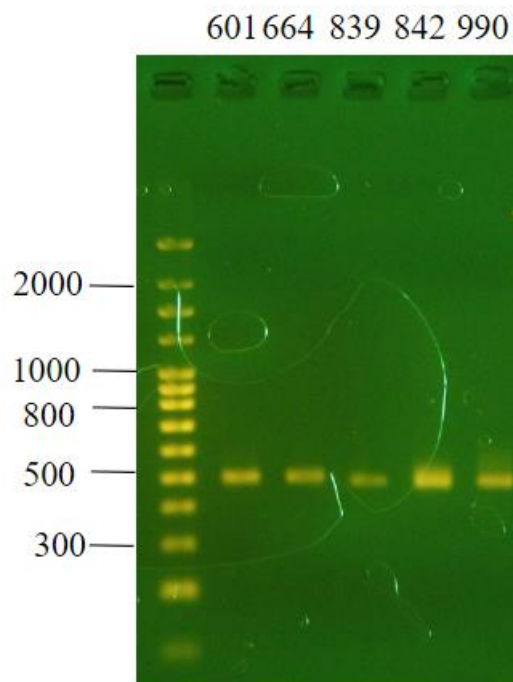
**Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της δεύτερης PCR για ένα αρνητικό δείγμα.** Στη συγκεκριμένη δοκιμή έχει αναλυθεί 1 δείγμα για το οποίο έχουν δοκιμαστεί 3 διαφορετικές ποσότητες προτύπου DNA από την πρώτη PCR (1μl, 3μl και 5μl, αντίστοιχα). Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος αντιστοιχεί σε 485 ζεύγη βάσεων (κυκλωμένη ζώνη).

### 3.1.2 Απομόνωση προϊόντος PCR από πηκτή αγαρόζης (Gel Extraction)

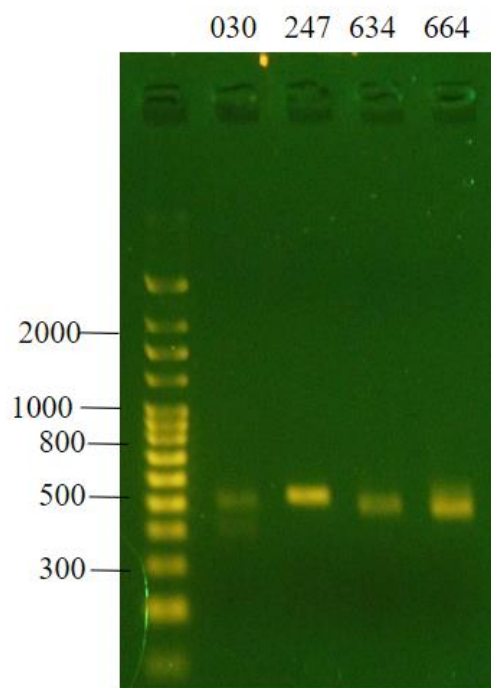
Προκειμένου να απομονωθεί η επιθυμητή ζώνη από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε εκτομή της από την πηκτή με τη χρήση αποστειρωμένης λεπίδας και στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός του τμήματος από την αγαρόζη. Παρουσιάζονται ορισμένα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση που ακολούθησε τον καθαρισμό.

#### 3.1.2.1 Εικόνες Ηλεκτροφόρησης

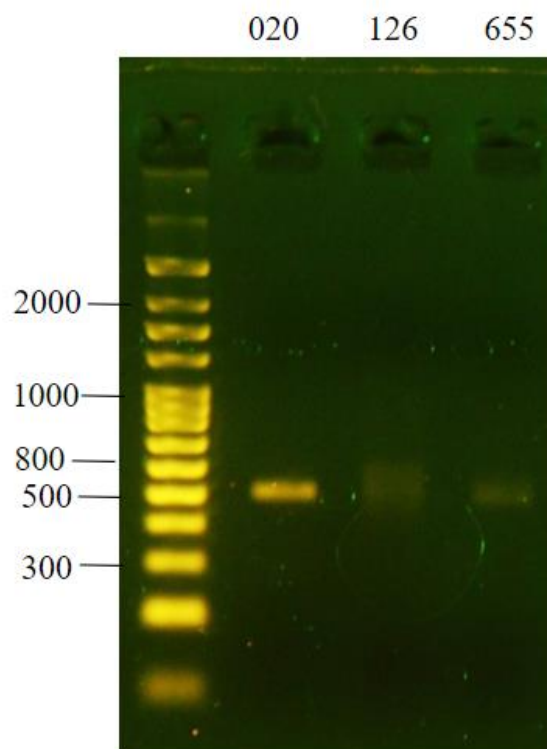
Παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες εικόνες με τα αποτελέσματα του καθαρισμού που ακολούθησαν την απομόνωση ζώνης DNA από την πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή αγαρόζης έχει περιεκτικότητα 1%, ενώ ο χρόνος στον οποίο λήφθηκε η φωτογραφία είναι 45 λεπτά στα 120V.



**Εικόνα 26:** Ηλεκτροφόρηση 5 καθαρισμένων προϊόντων, εκ των οποίων τα 2 είναι αρνητικά (664,839) και τα υπόλοιπα 3 θετικά (601,842,990).



**Εικόνα 27:** Ηλεκτροφόρηση 4 καθαρισμένων προϊόντων, εκ των οποίων τα 3 είναι αρνητικά (030, 634, 664) και το ένα θετικό (247).



**Εικόνα 28:** Ηλεκτροφόρηση 3 καθαρισμένων προϊόντων, εκ των οποίων τα 2 είναι αρνητικά (020, 655) και το ένα θετικό (126).



### 3.2 Μέθοδος RFLPs

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν τόσο για τις μονές όσο και για τις διπλές πέψεις ήταν η συγκέντρωση του ενζύμου που προστίθεται κάθε φορά στην αντίδραση και η ποσότητα του δείγματος. Παρακάτω παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για τα ένζυμα αλλά και οι ποσότητες για τα δείγματα.

Αλληλουχία	Αναμενόμενα μεγέθη θραυσμάτων ανά χρησιμοποιούμενο ένζυμο (bp)					
	A	B	Γ	Δ	A - Δ	B - Δ
Μεταλλαγμένη Αλληλουχία	278 208	277 209	265 221	416 70	278 138 70	277 139 70
Μη μεταλλαγμένη Αλληλουχία	- 485	- 485	221 205 60	416 70	416 70	416 70

**Πίνακας 9:** Θραύσματα που προκύπτουν μετά την πέψη των ενζύμων στη μεταλλαγμένη και στη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία.

#### 3.2.1 Συγκέντρωση Ενζύμου

Ένζυμο	Συγκέντρωση ενζύμου ανά αντίδραση (U/μl)		
A	4		2
B	2	3	4
Γ	4		2
Δ	4		2

**Πίνακας 10:** Παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν για κάθε ένζυμο.

#### 3.2.2 Ποσότητα Δείγματος

Δοκιμάστηκαν αρκετά δείγματα σε διαφορετικές ποσότητες αλλά το ιδανικό εύρος της ποσότητας του δείγματος προσδιορίστηκε ως:

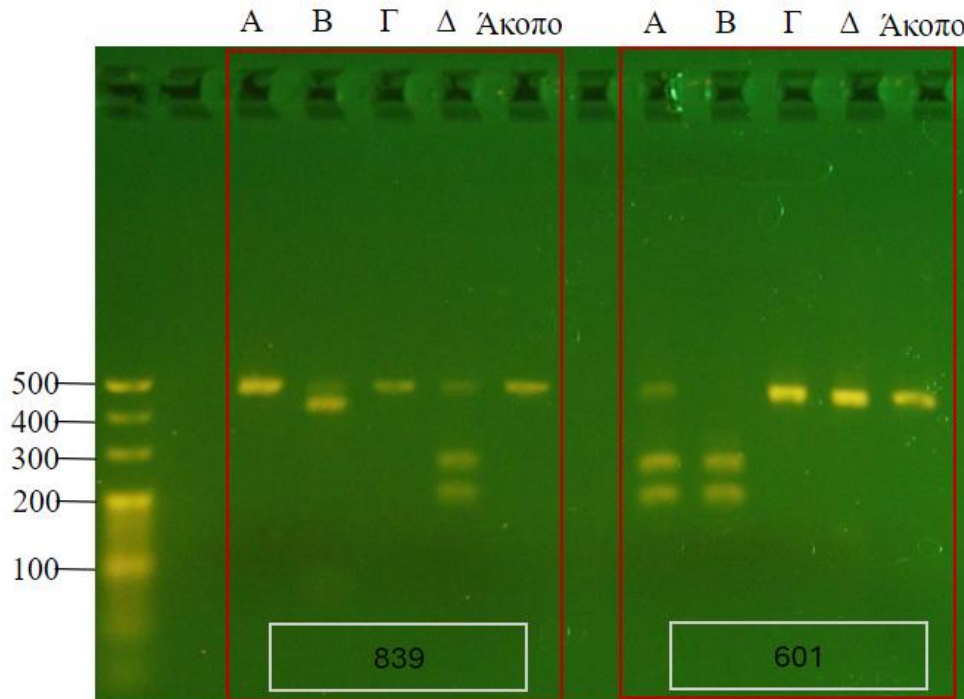
Πέψη	Ποσότητα ανά αντίδραση (ng)
Μονή	90-120
Διπλή	>120

**Πίνακας 11:** Παρουσιάζεται το ιδανικό εύρος συγκεντρώσεων των δειγμάτων για μονή και διπλή πέψη.

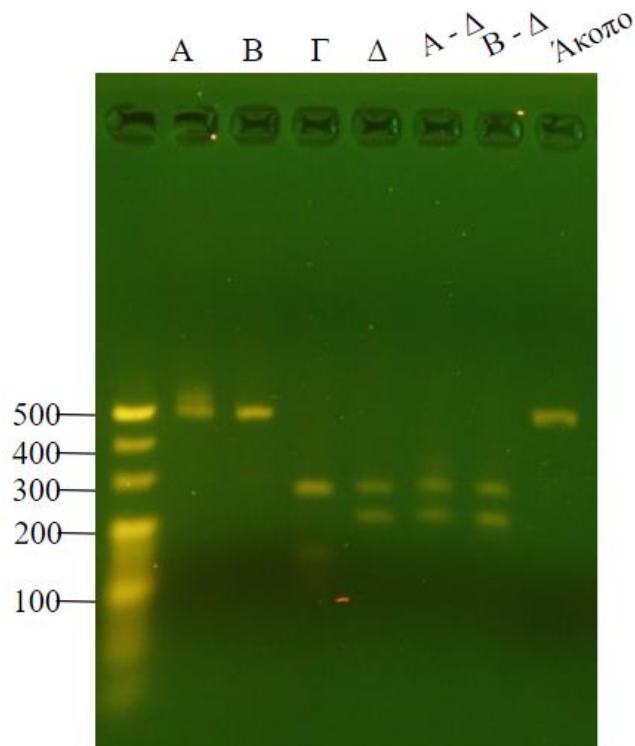


### 3.2.3 Εικόνες Ηλεκτροφόρησης

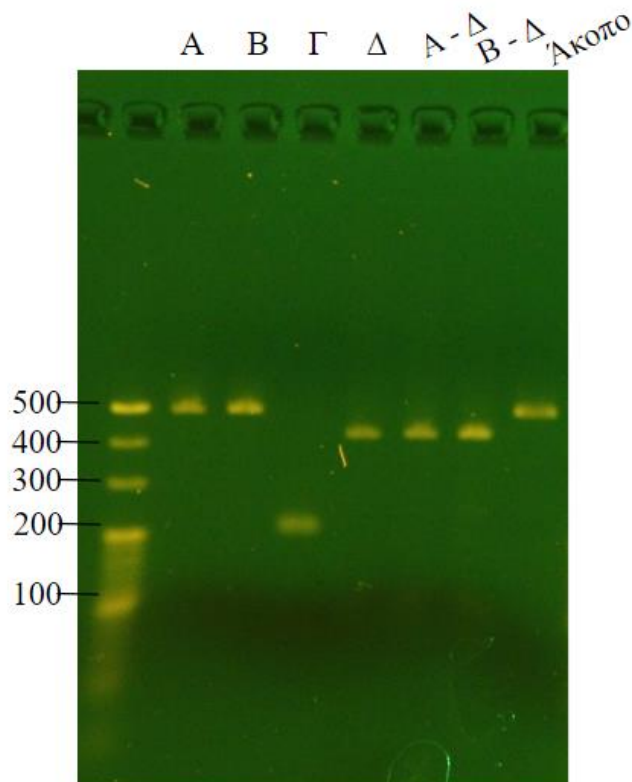
Παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες εικόνες με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης από τις πέψεις. Στις εικόνες που παρουσιάζονται παρακάτω η πηκτή αγαρόζης έχει περιεκτικότητα 1,7% w/v, ο χρόνος στον οποίο λήφθηκε η φωτογραφία είναι 90 λεπτά στα 100V.



Εικόνα 29: Μονές πέψεις για τα δείγματα 839 (αρνητικό) και 601 (θετικό).



Εικόνα 30: Μονή και διπλή πέψη για το δείγμα 655 (αρνητικό).



Εικόνα 31: Μονή και διπλή πέψη για το δείγμα 661 (αρνητικό).

### 3.2 Μέθοδος HRMA

Για τη συγκεκριμένη τεχνική εξετάστηκαν αρκετές παράμετροι λόγω της πολυπλοκότητας της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η συγκέντρωση του δείγματος, η συγκέντρωση των εκκινητών και του ανιχνευτή, οι κύκλοι, η θερμοκρασία υβριδισμού, οι χρόνοι για την αντίδραση της PCR, ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με τον χρόνο συλλογής των δεδομένων των καμπυλών.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR μαζί με τη θέση στην οποία αντιστοιχούν στο γονιδίωμα του HIV σύμφωνα με την αλληλουχία με αριθμό καταχώρησης στο NCBI HXB2 K03455.1, το μήκος του εκκινητή, την  $T_m$  και το ποσοστό GC.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ 5'-3'	ΜΗΚΟΣ	ΑΡΧΗ	ΤΕΛΟΣ	$T_m$ oC	GC %
<b>184F</b>	AGCAAAAAATCCAGAAATAGTCA TC	25	<b>3065</b>	<b>3089</b>	56,4	32,00 %
<b>184R</b>	CTATGTTGCCCTATTCTAAGTC	23	<b>3123</b>	<b>3145</b>	57,1	39,10 %
<b>PROBEWT184V</b>	TCATCCATATATTGA	15	<b>3092</b>	<b>3106</b>	34,7	26,70 %
<b>PROBEMUT184V</b>	TCATCCACATATTGA	15	<b>3092</b>	<b>3106</b>	39	33,30 %

Πίνακας 12: Παρουσιάζονται οι ανιχνευτές και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση HRMA.

### 3.2.1 Συγκεντρώσεις δειγμάτων

Τα δείγματα από τα καθαρισμένα προϊόντα PCR που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο δοκιμάστηκαν σε αρκετές συγκεντρώσεις στην αντίδραση (5ng/μl, 1ng/μl, 0,5ng/μl, 0,1ng/μl, 0,05ng/μl, 0,01ng/μl, 0,005ng/μl, 0,001ng/μl, 0,0001ng/μl). Ωστόσο, με βάση τις δοκιμές δεν προέκυψε κάποιο σαφές αποτέλεσμα ως προς την ιδανική συγκέντρωση του DNA εκμαγείου.

### 3.2.2 Συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών

Ο εκκινητής 184R αλλά και οι ανιχνευτές (mutant probe, wild type probe) ελέγχθηκαν σε αρκετές συγκεντρώσεις. Πιο αναλυτικά:

- Εκκινητής 184R: 0,05μM, 0,1μM, 0,15μM, 0,2μM, 0,25μM, 0,5μM, 1μM
- Ανιχνευτής: 0,5μM, 1μM, 2μM, 3μM

Μετά από αρκετούς ελέγχους οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν:

- Εκκινητής 184F: 5μM
- Εκκινητής 184R: 0,25μM
- Ανιχνευτής: 1μM

### 3.2.3 Κύκλοι

Για τη συγκεκριμένη ανάλυση εξετάστηκε και ο παράγοντας του αριθμού των κύκλων της PCR. Το εύρος στο οποίο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν από 35 – 50 κύκλους. Όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, ο αριθμός των κύκλων επηρεάζεται κάθε φορά από τη συγκέντρωση του δείγματος.

### 3.2.4 Θερμοκρασία Υβριδισμού

Οι θερμοκρασίες υβριδισμού που δοκιμάστηκαν είναι οι: 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50°C, 52 °C, 54°C. Μετά από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν η θερμοκρασία που επιλέχθηκε είναι: 50 °C.

### 3.2.5 Χρόνοι Υβριδισμού

Οι χρόνοι υβριδισμού που εξετάστηκαν είναι 15 δευτερόλεπτα, 20 δευτερόλεπτα και 30 δευτερόλεπτα, με τα 30 δευτερόλεπτα να επιλέγονται για την πορεία της ανάλυσης.

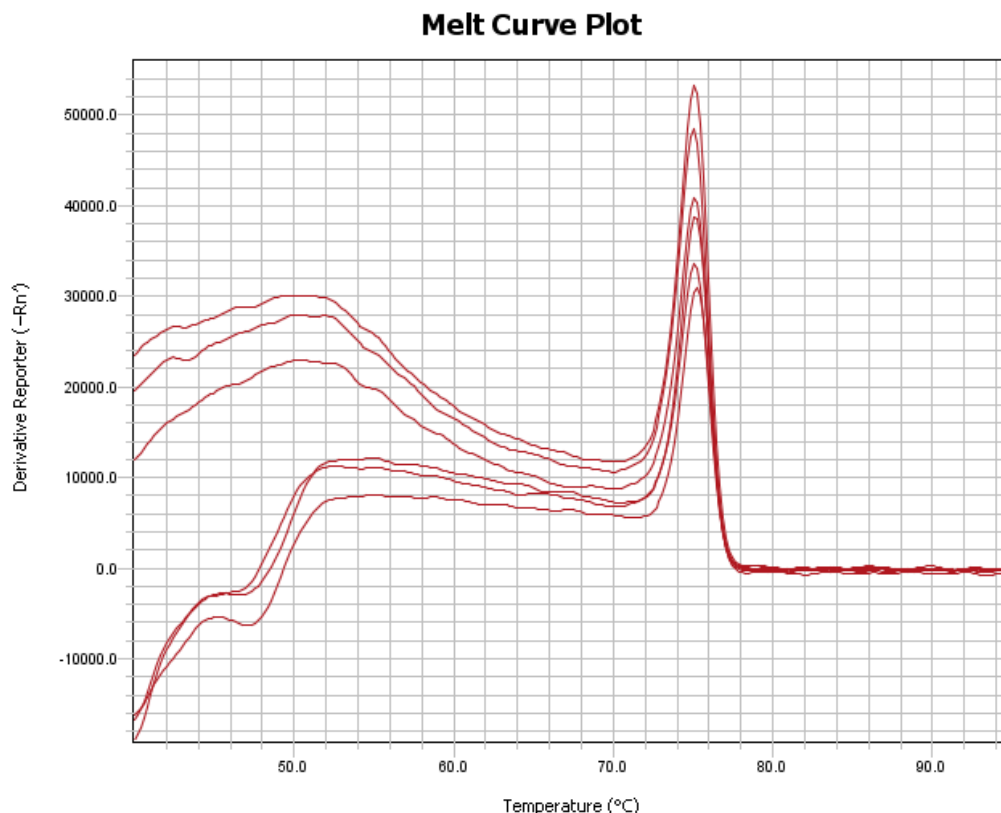
### 3.2.6 Ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας και συλλογή δεδομένων

Προκειμένου να γίνει συλλογή των καμπυλών τήξης δοκιμάστηκαν διαφορετικοί τρόποι τους οποίους διέθετε το μηχάνημα της Real Time PCR. Πιο συγκεκριμένα, για την τελική φάση της αντίδρασης κατά την οποία γίνεται η ανάλυση των καμπυλών τήξης μέσω συλλογής δεδομένων φθορισμού στο τέλος του κανονικού θερμοκρασιακού προγράμματος, δοκιμάστηκε η εφαρμογή 25 ή 5 σημείων δεδομένων (data points), καθώς και εναλλακτικά η

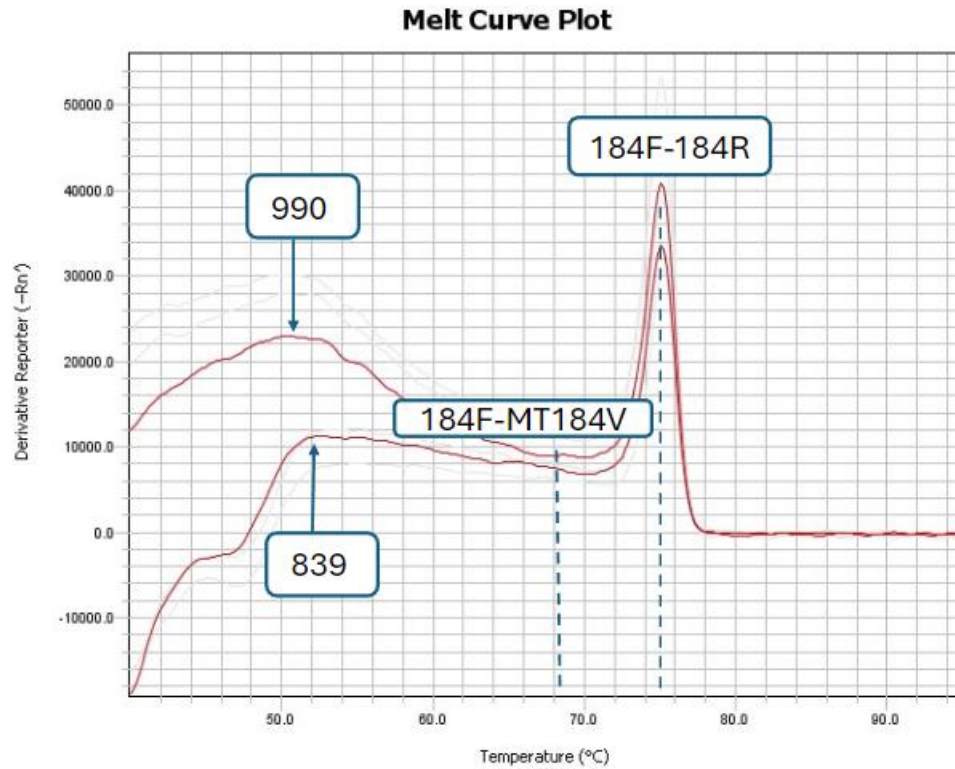
εφαρμογή του σύντομου προεγκατεστημένου στο QuantStudio 3 θερμοκρασιακού προγράμματος «short melt curve». Μετά από επανειλημμένες δοκιμές, επιλέχθηκαν τα 5 σημεία δεδομένων για το πρόγραμμα της PCR, ενώ το πρόγραμμα «short melt curve» είναι η ανάλυση που ακολουθεί και δίνει πιο σαφή αποτελέσματα.

### 3.2.7 Αποτελέσματα Ανάλυσης HRMA

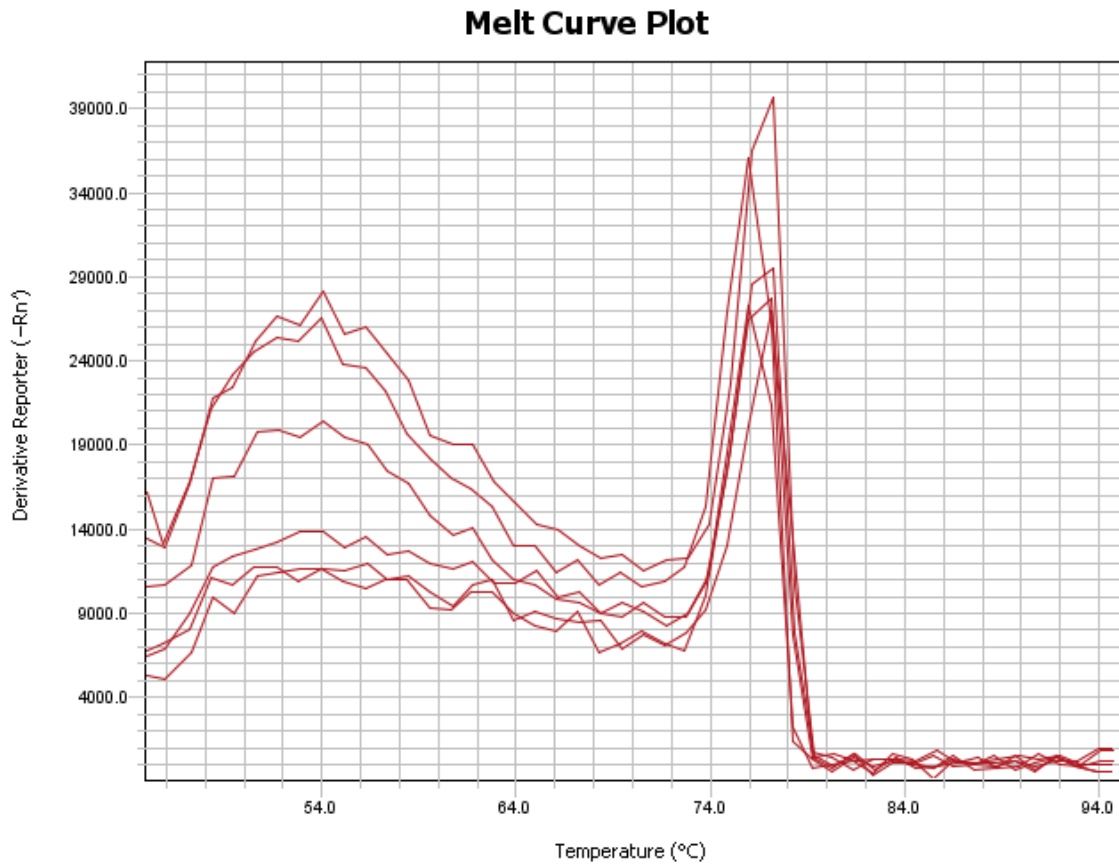
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένα αποτελέσματα από τις γραφικές παραστάσεις (καμπύλες τήξης) που προέκυψαν μετά την ανάλυση HRMA.



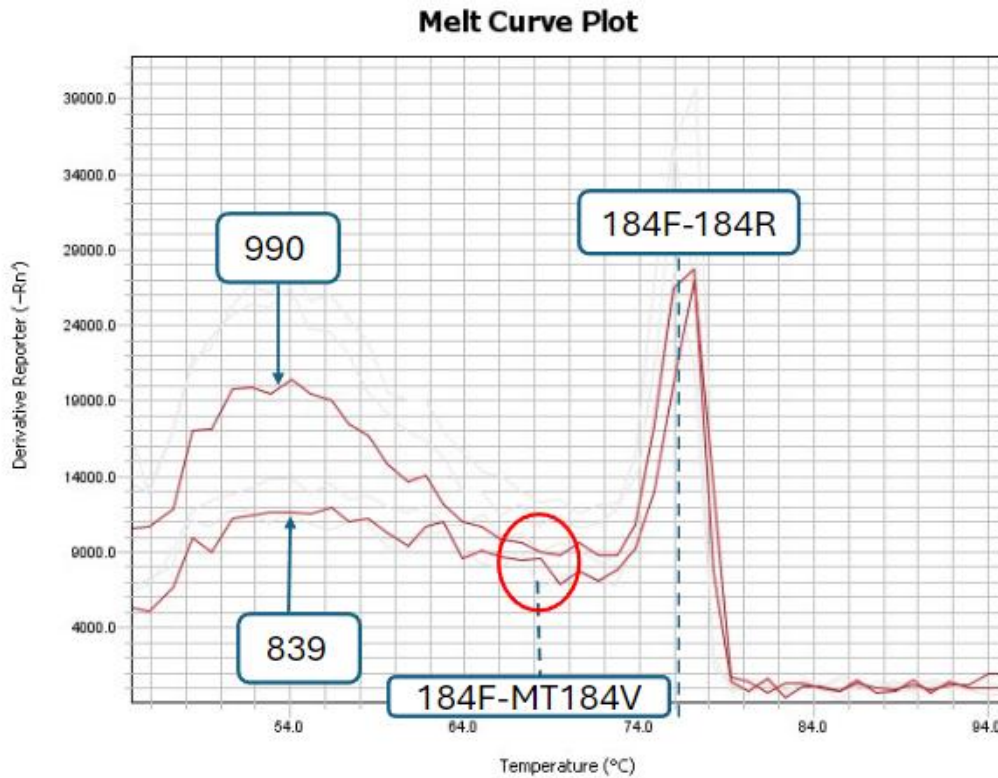
**Εικόνα 32Α: Ανάλυση καμπυλών τήξης.** Το συγκεκριμένο διάγραμμα καμπυλών τήξης έχει προκύψει με τη λήψη 5 σημείων δεδομένων και το συγκεκριμένο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με χρήση του ανιχνευτή για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Έχουν χρησιμοποιηθεί 2 δείγματα (σε τρεις διαδοχικές αραιώσεις το καθένα), ένα θετικό και ένα αρνητικό. Από την ανάλυση των καμπυλών τήξης αναμένεται να αναδεικνύεται μια κορυφή για το ζεύγος εκκινητών 184F\_184R σε θερμοκρασία:  $75.5 \pm 1$  °C και μια κορυφή για το ζεύγος 184F\_MT184V σε θερμοκρασία  $67 \pm 1$  °C (107).



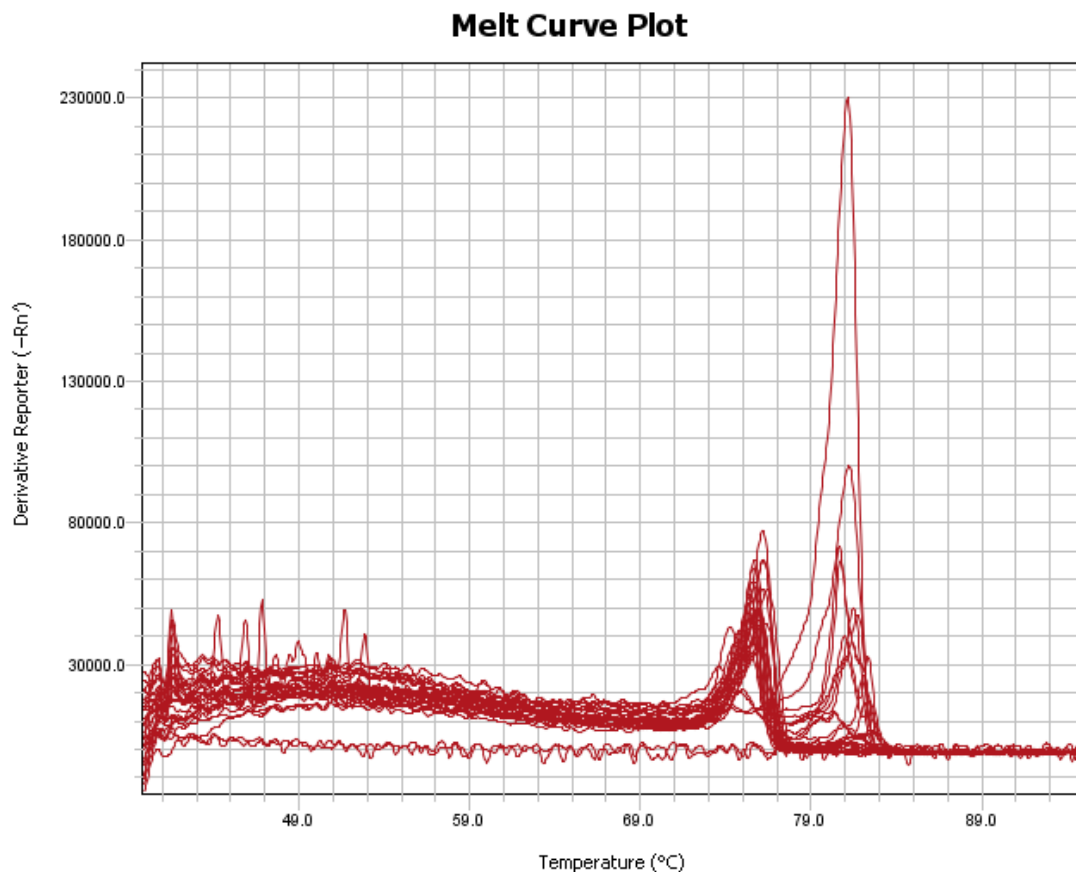
**Εικόνα 32B:** Ανάλυση καμπυλών τήξης για τα δείγματα 839 (αρνητικό) και 990 (θετικό) στις ίδιες συνθήκες με την Εικόνα 32A με θερμοκρασία υβριδισμού 47°C. Με διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται τα σημεία στα οποία αναμένεται η ύπαρξη επιπλέον καμπυλών τήξης.



**Εικόνα 33Α: Σύντομη ανάλυση καμπύλων τήξης.** Οι συγκεκριμένες καμπύλες τήξης έχουν ληφθεί με short melt curve και το συγκεκριμένο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση του ανιχνευτή για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Η συγκεκριμένη ανάλυση ακολούθησε αυτή στις Εικόνας 32Α.

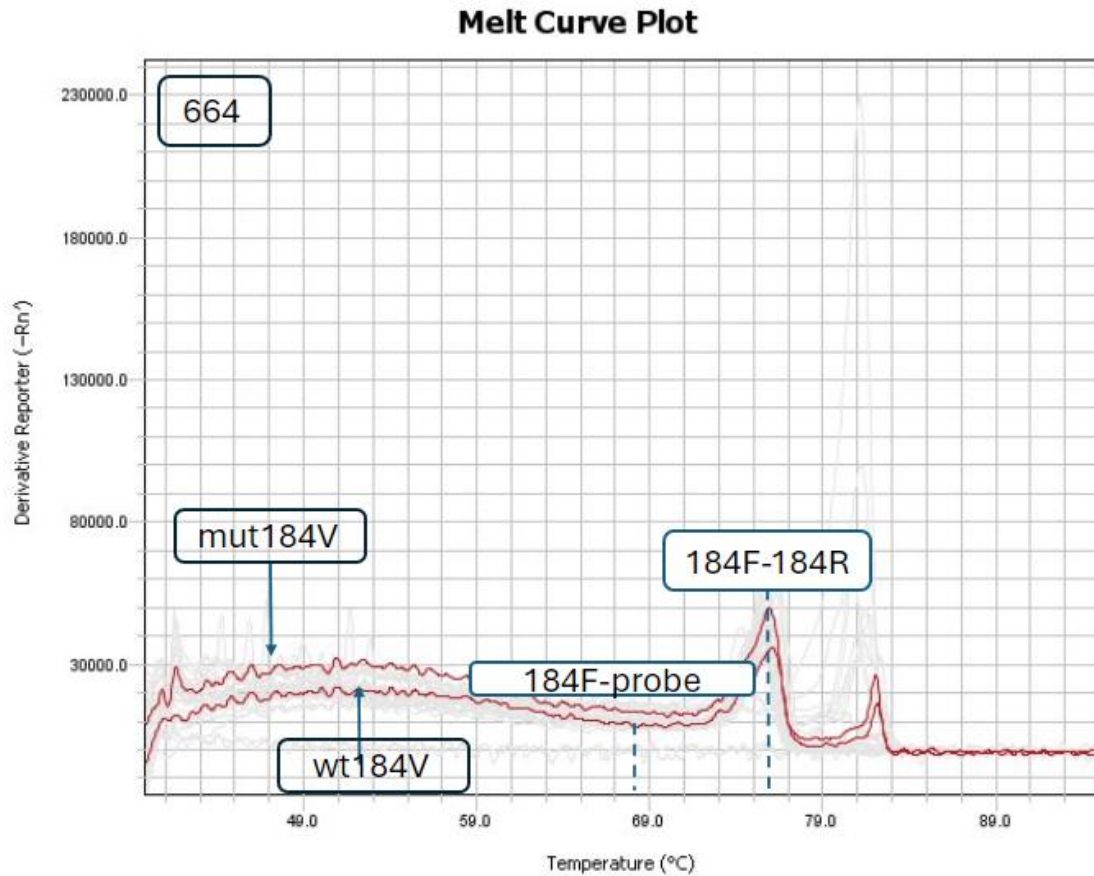


**Εικόνα 33B: Σύντομη ανάλυση καμπυλών τήξης για τα δείγματα 839 (αρνητικό) και 990 (θετικό).** Οι συγκεκριμένες καμπύλες τήξης έχουν ληφθεί με short melt curve. Παρόλο που υπάρχει μια κορυφή στο σημείο που έχει κυκλωθεί, αυτή δεν είναι ορθή αφού θα έπρεπε να υπάρχει στο δείγμα 990 εφόσον έχει χρησιμοποιηθεί ο ανιχνευτής της μεταλλαγμένης αλληλουχίας. Άρα πιθανώς πρόκειται για τυχαίο και λανθασμένο εύρημα. Στις 2 εικόνες (32 και 33) έχουν αναλυθεί τα δείγματα 839 (αρνητικό) και 990 (θετικό), ωστόσο όμως δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στις 2 καμπύλες η οποία να υποδηλώνει την ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης.

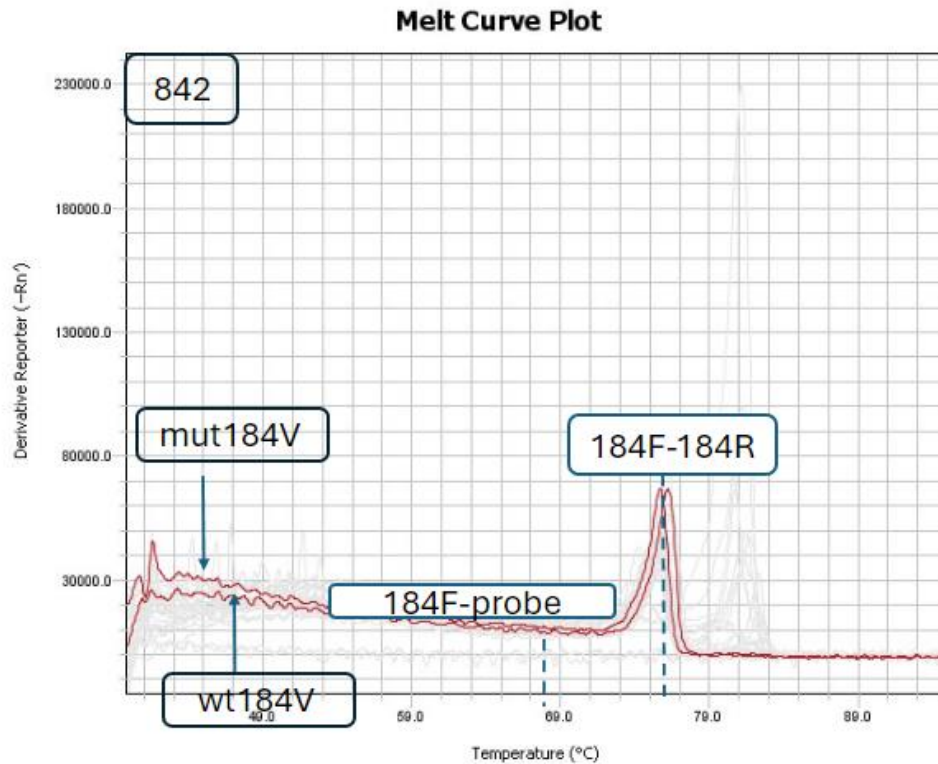


**Εικόνα 34A: Ανάλυση καμπυλών τήξης.** Οι συγκεκριμένες καμπύλες τήξης έχουν ληφθεί με 5 σημεία δεδομένων και το συγκεκριμένο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση ανιχνευτών τόσο για τη μεταλλαγμένη όσο και για τη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Από την ανάλυση των καμπυλών τήξης αναμένεται να αναδεικνύεται μια κορυφή για το ζεύγος εκκινητών 184F\_184R σε θερμοκρασία:  $75.5 \pm 1$  °C και μια κορυφή για το ζεύγος 184F\_MT184V ή 184F\_WT184V σε θερμοκρασία  $67 \pm 1$  °C.

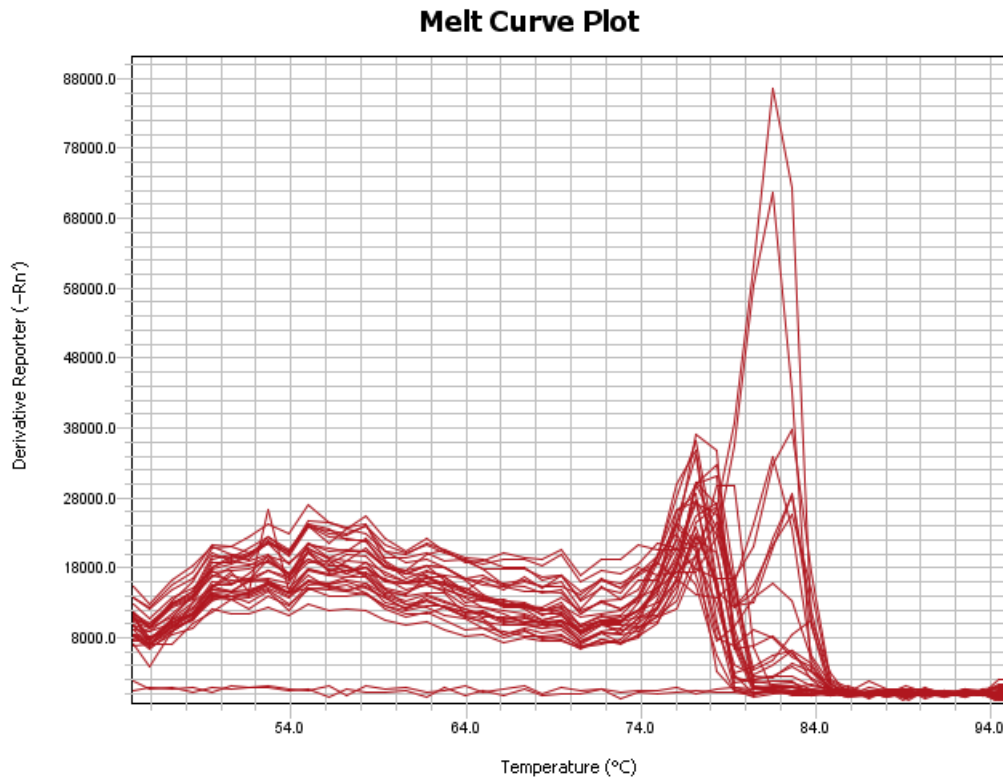




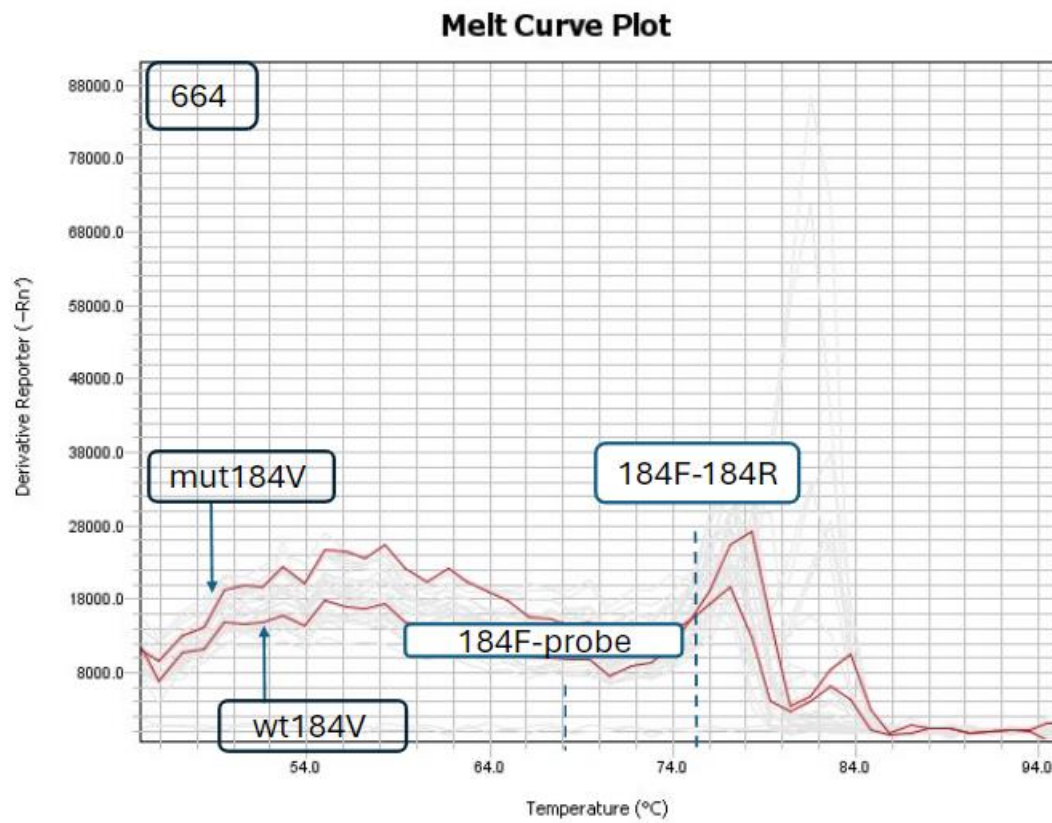
**Εικόνα 34B:** Ανάλυση καμπυλών τήξης για ένα αρνητικό δείγμα με τη χρήση τόσο του μεταλλαγμένου όσο και του μη μεταλλαγμένου ανιχνευτή. Ενώ παρατηρείται η κορυφή για το ένα ζεύγος εκκινητών (184F=184R), δεν ανιχνεύεται κορυφή για το ζεύγος 184F και ανιχνευτή. Ακόμη, είναι ορατή και μια δεύτερη καμπύλη (~82°C) η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί.



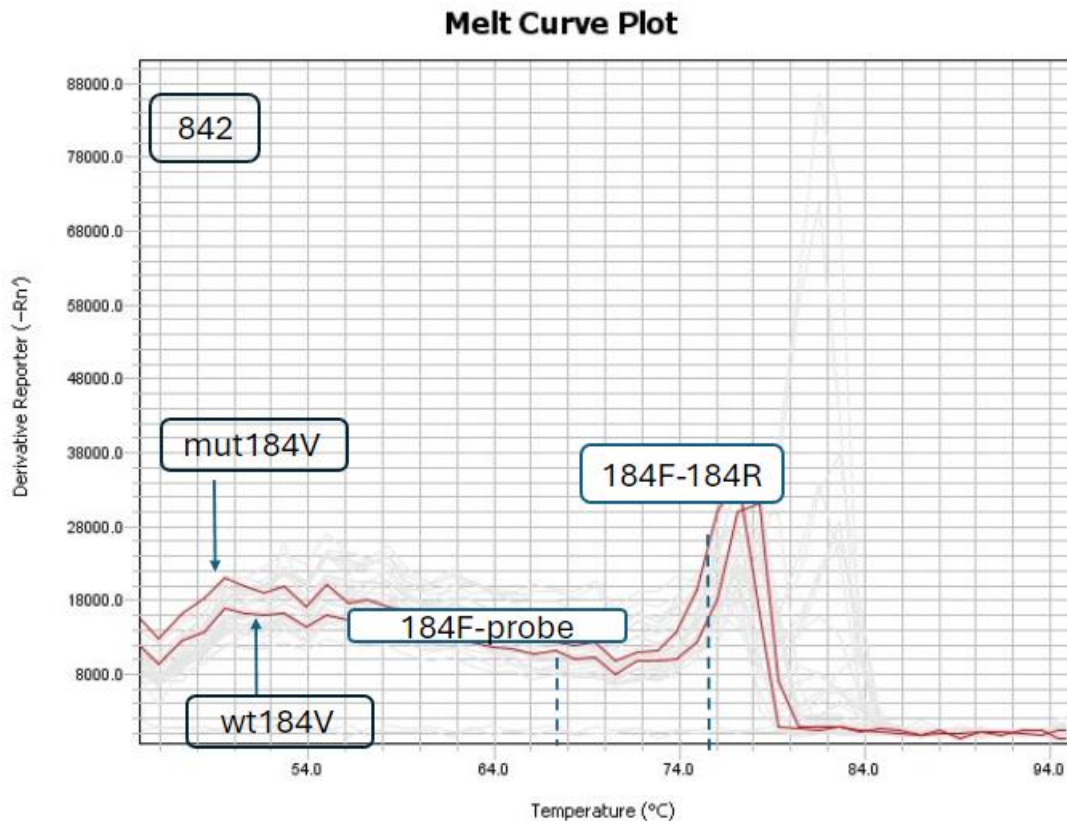
**Εικόνα 34Γ:** Ανάλυση καμπυλών τήξης για ένα θετικό δείγμα με τη χρήση τόσο του μεταλλαγμένου όσο και του μη μεταλλαγμένου ανιχνευτή. Ενώ παρατηρείται η κορυφή για το ζεύγος εκκινητών 184F\_184R, δεν υπάρχει η κορυφή που αντιστοιχεί στο ζεύγος 184F και ανιχνευτή.



**Εικόνα 35A: Σύντομη ανάλυση καμπύλων τήξης.** Οι συγκεκριμένες καμπύλες τήξης έχουν ληφθεί με short melt curve και το συγκεκριμένο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με χρήση ανιχνευτών τόσο για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία όσο και για τη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία.



**Εικόνα 35B:** Σύντομη ανάλυση καμπυλών τήξης για ένα αρνητικό δείγμα με χρήση των ανιχνευτών τόσο για τη μεταλλαγμένη όσο και για τη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία.



**Εικόνα 35Γ:** Σύντομη ανάλυση καμπυλών τήξης για ένα θετικό δείγμα με χρήση ανιχνευτών τόσο για τη μεταλλαγμένη όσο και για τη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 4.1 Κοινά βήματα πρωτοκόλλου για τις διαδικασίες RFLP και HRMA

### 4.1.1 Αντίστροφη μεταγραφή

Στη συγκεκριμένη εργασία το πρώτο βήμα για την ανίχνευση της μετάλλαξης M184V στον HIV-1 ήταν η αντίστροφη μεταγραφή. Το βήμα αυτό ήταν κρίσιμο για τη μετατροπή του ιικού RNA σε συμπληρωματικό DNA, επιτρέποντας την επακόλουθη ανάλυσή του. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο primer IN3, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο των Sacks et. al. (2017), βάσει της αποτελεσματικότητάς του στα πλαίσια της ενίσχυσης των αλληλουχιών του HIV-1 όπως υποστηρίζεται από το συγκεκριμένο άρθρο. Ωστόσο, δεν προέκυψαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα από τη nested PCR, απαιτώντας περαιτέρω βελτιστοποίηση ή και τροποποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου.

Αφού μελετήθηκε η αλληλουχία του HIV-1, και λαμβάνοντας υπόψιν τις περιοχές που ο ιός εμφανίζει τις περισσότερες μεταλλάξεις ώστε αυτές να παραλειφθούν κατά το δυνατόν, σχεδιάστηκε ένας νέος εκκινητής RTM184V. Ο RTM184V βελτίωσε την αποδοτικότητα της αντίδρασης, δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα τόσο στην πρώτη (**Εικόνα 21**) όσο και στη δεύτερη PCR (**Εικόνα 25**) που ακολούθησε.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μια ακόμη αλλαγή που πραγματοποιήθηκε σε σχέση με το τυπικό πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής. Αντί να χρησιμοποιηθεί μηχανήμα PCR για τα βήματα επώασης σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες, χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο τύπου dry bath στο οποίο είχε προστεθεί απιονισμένο νερό. Το dry bath προσφέρει έναν απλούστερο και ενδεχομένως πιο συνεπή μηχανισμό ρύθμισης της θερμοκρασίας, συνεπώς χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση των απαραίτητων θερμοκρασιών επώασης. Η συγκεκριμένη αλλαγή οδήγησε σε βελτιωμένα αποτελέσματα αναφορικά με την επίτευξη των επιθυμητών προϊόντων PCR.

### 4.1.2 Nested PCR

Τόσο για την πρώτη όσο και για την δεύτερη nested PCR αρχικά χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές από το πρωτόκολλο των Sacks et al. 2017 (107) οι οποίοι ήταν ειδικά σχεδιασμένοι για την ενίσχυση των αλληλουχιών HIV-1 (pol\_Fout – Pol\_Rout και pol\_Fin – pol\_Rin). Παρόλο που το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις προτεινόμενες συνθήκες, τα αποτελέσματα δεν ήταν τα επιθυμητά. Η πηκτή ηλεκτροφόρησης έδειξε ότι οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στο ενισχυμένο DNA δεν ήταν πάντα έντονες ή υπαρκτές σε διαφορετικά δείγματα, φαινόμενο που μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες. Πρώτον, οι εκκινητές του δημοσιευμένου πρωτοκόλλου, αν και θεωρητικά σωστοί, μπορεί να μην είχαν απόλυτη συμπληρωματικότητα με τις συγκεκριμένες αλληλουχίες-στόχους που υπήρχαν στα συγκεκριμένα δείγματα, επηρεάζοντας έτσι τον υβριδισμό των εκκινητών και την αποδοτικότητα της ενίσχυσης. Ένα άλλο ενδεχόμενο πρόβλημα θα μπορούσε να σχετίζεται με τις συνθήκες της PCR, όπως είναι οι θερμοκρασίες ή η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, καθώς είναι γνωστό ότι διακυμάνσεις σε αυτούς τους παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την αποδοτικότητα της αντίδρασης. Παρόλο που δοκιμάστηκαν αρκετοί συνδυασμοί αυτών των παραγόντων, ενδέχεται να μην βρέθηκαν οι ιδανικές συνθήκες.

Για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που παρατηρήθηκαν με τις αρχικές δοκιμές PCR, σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν νέα εναλλακτικά ζεύγη εκκινητών. Βελτίωση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε και στις δυο αντιδράσεις με τη δεύτερη nested PCR να αποδίδει σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα (**Εικόνα 24**), με πιο έντονες και ακριβείς ζώνες, συνεπώς με μεγαλύτερη ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος PCR. Ως εκ τούτου, οι νέοι εκκινητές είχαν υψηλότερα ποσοστά συμπληρωματικότητας με τις αλληλουχίες-στόχους των δειγμάτων, ενώ ακόμη βελτιστοποιήθηκαν αποτελεσματικά οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν τελικά.

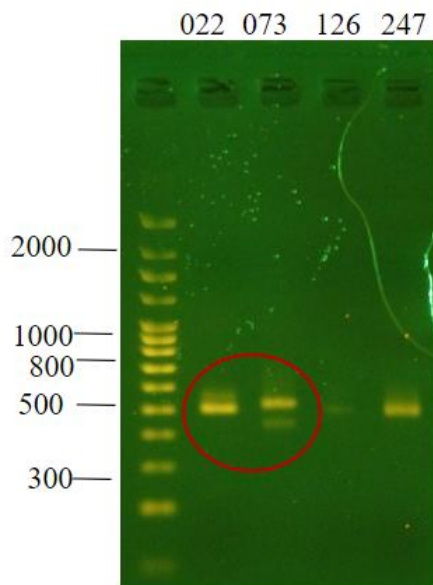
Ωστόσο, παρά την επίτευξη ενός νέου ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου nested PCR που οδηγεί στο επιθυμητό προϊόν, ορισμένα δείγματα εξακολουθούσαν να αποτυγχάνουν ως προς την παραγωγή ανιχνεύσιμων ζωνών (**Εικόνα 23** - δείγμα 126, **Εικόνα 24** - δείγματα 228, 666 και 919). Το επίμονο αυτό πρόβλημα μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, όπως η κατάσταση του αρχικού δείγματος RNA το οποίο λόγω των πολλών δοκιμών που είχαν πραγματοποιηθεί μπορεί να είχε εν μέρει αποικοδομηθεί προτού ολοκληρωθεί η αντίστροφη μεταγραφή του. Ακόμη, ένας μη αμελητέος και εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας είναι και η φύση του ίδιου του ιού, ο οποίος όπως έχει ήδη αναφερθεί μεταλλάσσεται με ραγδαίους ρυθμούς και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αλληλουχία των εκκινητών να μην είναι πάντα πλήρως συμπληρωματική με το εκάστοτε δείγμα.

#### 4.1.3 Απομόνωση από πηκτή αγαρόζης

Η διαδικασία απομόνωσης τμήματος από την πηκτή αγαρόζης αποτέλεσε ένα κρίσιμο βήμα στον καθαρισμό των επιθυμητών αλληλουχιών DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση, όπου τα τμήματα DNA διαχωρίστηκαν με βάση το μέγεθος, η επιθυμητή ζώνη 485 ζευγών βάσεων που αντιστοιχούσε στο ενισχυμένο προϊόν αποκόπηκε προσεκτικά από την πηκτή. Αυτή η διαδικασία απαιτούσε λεπτομέρεια και ακρίβεια, καθώς ο στόχος ήταν να απομονωθεί μια συγκεκριμένη ζώνη ενώ υπήρχε κίνδυνος συναπομόνωσης γειτονικών ζωνών (**Εικόνα 36**). Οποιοδήποτε σφάλμα σε αυτό το βήμα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει στην απομόνωση λανθασμένης ζώνης DNA η οποία πιθανότατα δεν θα περιείχε την αλληλουχία-στόχο, επηρεάζοντας κατά συνέπεια τις περαιτέρω αναλύσεις. Για να μειωθεί αυτός ο κίνδυνος, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη λεπίδα καθώς και προσεκτική οπτική επιθεώρηση της πηκτής υπό φως UV. Μετά την αποκοπή του τμήματος της πηκτής, το DNA καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας τις οδηγίες του κιτ καθαρισμού «Macherey – Nagel Nucleospin Gel and PCR Clean-up». Ένας από τους κρίσιμους παράγοντες σε αυτό το στάδιο ήταν η έκλυση του DNA από τη μεμβράνη. Ο στόχος ήταν να εκλυστεί το DNA σε έναν όγκο που να μην είναι επαρκής για τις επόμενες εφαρμογές, αλλά όχι τόσο μεγάλος δε ώστε να μειώσει σημαντικά τη συγκέντρωση του DNA. Αυτή η ισορροπία ήταν κρίσιμη διότι δείγματα υπερβολικά αραιωμένα θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ασθενή ή αναξιόπιστα αποτελέσματα στις επακόλουθες αναλύσεις (RFLP και HRMA), ενώ υψηλής συγκέντρωσης δείγματα θα είχαν μικρό όγκο και επομένως δεν θα επέτρεπαν μεγάλο αριθμό επακόλουθων αναλύσεων. Συνολικά, η διαδικασία απομόνωσης, αν και απλή, απαιτεί λεπτό χειρισμό και προσοχή στις



λεπτομέρειες προκειμένου να εξασφαλιστεί η καθαρότητα και η κατάλληλη συγκέντρωση του απομονωμένου DNA.



**Εικόνα 36: Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων δειγμάτων.** Στη συγκεκριμένη εικόνα είναι εμφανές ότι η απομόνωση των δυο πρώτων δειγμάτων πιθανώς προκάλεσε επιμόλυνση με κάποια γειτονική ζώνη, γι' αυτό και παρατηρείται διπλή ζώνη.

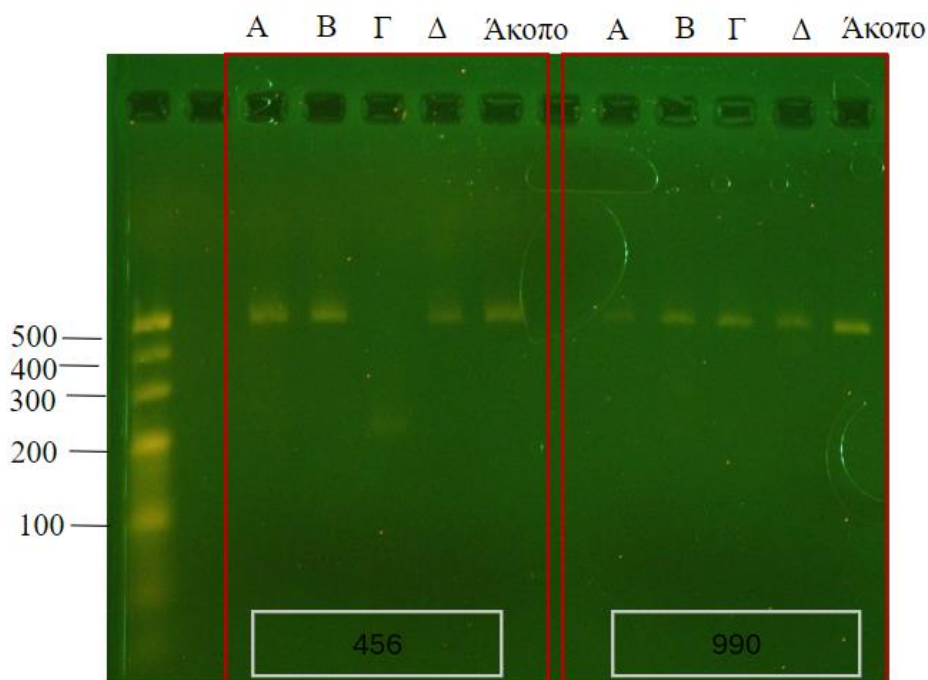
#### 4.2 Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων Περιορισμού - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs)

Η δυνατότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης M184V στον HIV-1 διερευνήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RFLPs, η οποία περιλάμβανε τόσο μονές όσο και διπλές πέψεις. Σε αυτή τη μελέτη, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα που θα αναγνώριζαν και θα έκοβαν το DNA στο σημείο της μετάλλαξης M184V, επιτρέποντας έτσι τη διάκριση μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων αλληλουχιών βάσει των θραυσμάτων που προκύπτουν. Η επιλογή των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αλληλουχίας του HIV-1 και της χρήσης διαδικτυακών εργαλείων όπως η ιστοσελίδα της εταιρείας NEB (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>).

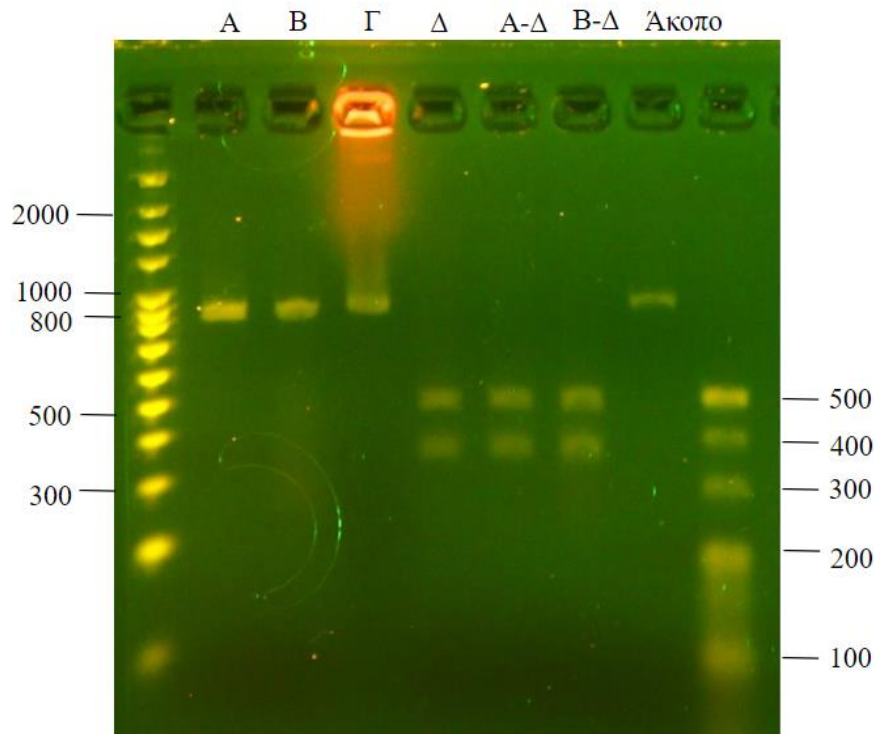
Η μονή πέψη με τη μέθοδο RFLP περιλάμβανε τη χρήση ενός περιοριστικού ενζύμου που στόχευε μόνο στο συγκεκριμένο σημείο όπου απαντάται η M184V μέσα στο ενισχυμένο θραύσμα DNA. Αυτή η προσέγγιση είχε σκοπό να απλοποιήσει την ανάλυση και να παρέχει μια σαφή διάκριση μεταξύ των μεταλλαγμένων και μη στελεχών. Για να ενισχυθεί η αξιοπιστία της ανάλυσης RFLP, δοκιμάστηκε και διπλή πέψη χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα. Η λογική πίσω από αυτή την προσέγγιση ήταν ότι η πέψη είτε από το ένζυμο A είτε και το ένζυμο B δημιουργεί 2 τμήματα παρόμοιου μεγέθους (278 και 208 ζευγών βάσεων), οπότε υπήρχε ο κίνδυνος να μην είναι ευδιάκριτα ως ξεχωριστές ζώνες στην πηκτική αгарόζης. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ένα ακόμη ένζυμο, το Δ το οποίο κόβει τόσο τη

μεταλλαγμένη όσο και τη μη μεταλλαγμένη αλληλουχία του ιού, και με τον τρόπο αυτό μπορούν να διαφοροποιηθούν τα δύο τμήματα που εμφανίζουν κοντινό μέγεθος. Παρόλα αυτά, στην πράξη αποδείχθηκε ότι η διπλή πέψη δεν είναι απαραίτητη, καθώς και στη μονή πέψη τα αποτελέσματα μπορούν εύκολα να ερμηνευθούν με την προϋπόθεση ότι η πηκτή έχει ηλεκτροφορηθεί για τον απαραίτητο χρόνο (Εικόνες 30 και 31).

Παρόλο που η συγκεκριμένη μέθοδος οδήγησε αρκετά σύντομα σε ακριβή και σαφή αποτελέσματα, υπήρχαν περιπτώσεις όπου οι εικόνες από την ηλεκτροφόρηση ήταν μη αναμενόμενες (Εικόνα 37) και το εύρημα αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Ένας πιθανός λόγος θα μπορούσε να είναι η υψηλή μεταλλακτικότητα της ίδιας της αλληλουχίας του HIV-1. Δεδομένου του υψηλού ποσοστού μεταλλάξεων, ορισμένα ιικά στελέχη ενδέχεται να έχουν παραλλαγές στην αλληλουχία αναγνώρισης ή κοντά σε αυτήν. Αυτές οι μεταλλάξεις θα μπορούσαν να εμποδίσουν το ένζυμο περιορισμού να κόψει σωστά το DNA, οδηγώντας σε ατελή πέψη ή ακόμη και σε καθόλου πέψη. Ένας άλλος παράγοντας μπορεί να είναι η συγκέντρωση ή και η καθαρότητα του DNA που χρησιμοποιείται στην ανάλυση, που μπορεί να επηρεάσουν την δράση του ενζύμου. Τέλος, δεν αποκλείεται και ο παράγοντας του ανθρώπινου σφάλματος ο οποίος μπορεί να επηρέασε την ανάλυση.



**Εικόνα 37: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης RFLPs για ένα αρνητικό (456) και ένα θετικό δείγμα (990).** Το αρνητικό δείγμα 456 μπορεί να διακριθεί από την ηλεκτροφόρηση, αφού τα δύο πρώτα ένζυμα (A και B) που πραγματοποιούν την πέψη μόνο για τα θετικά δείγματα δεν έχουν κόψει, ενώ το τρίτο ένζυμο (Γ) που κόβει το μη μεταλλαγμένο αφήνοντας θραύσματα στα 217-209-60 ζεύγη βάσεων έχει κόψει, με το θραύσμα στα 217 να είναι διακριτό. Το θετικό δείγμα 990 ωστόσο δεν έχει κοπεί από κανένα ένζυμο δίνοντας ασαφή αποτελέσματα, και το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί αφού, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, το συγκεκριμένο δείγμα περιείχε υποπληθυσμούς θετικών και αρνητικών αλληλουχιών.



**Εικόνα 38: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης RFLPs για το αρνητικό δείγμα 655.** Ειδικά σε αυτή την περίπτωση, η πέψη έγινε στο προϊόν από την πρώτη nested PCR μεγέθους 862 ζευγών βάσεων. Τα δυο πρώτα ένζυμα (A και B) δεν έχουν κόψει, όπως ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι πρόκειται για αρνητικό δείγμα, ωστόσο το τρίτο ένζυμο (Γ) που θα έπρεπε να είχε κόψει αφήνοντας 3 θραύσματα (440 – 362 – 60) δεν έχει κόψει καθόλου.

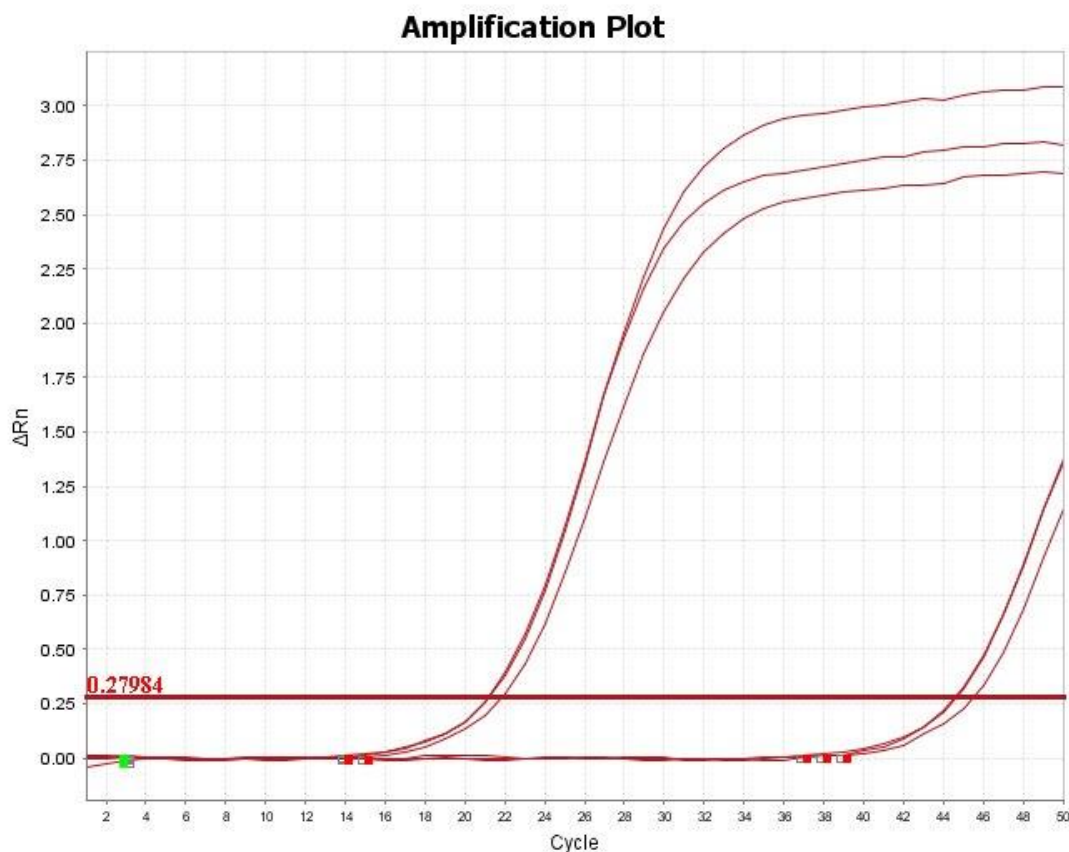
#### 4.3 Ανάλυση τήξης Υψηλής Ευκρίνειας - High Resolution Melting Analysis (HRMA)

Η τεχνική HRMA χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά για την ανίχνευση της μετάλλαξης M184V στον HIV-1 χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο DNA το καθαρισμένο προϊόν της δεύτερης nested PCR. Δεδομένης της πολυπλοκότητας αυτής της τεχνικής, διάφορες κρίσιμες παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν προσεκτικά προκειμένου να εξασφαλιστεί η ακρίβεια και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Παρά την αυστηρή τήρηση του πρωτοκόλλου των Sacks et al. 2017 (107) και τη λεπτομερή ρύθμιση αυτών των παραμέτρων, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν τελικά ασαφή, τονίζοντας με τον τρόπο αυτό τις προκλήσεις που σχετίζονται με την HRMA.

Η πρώτη κρίσιμη παράμετρος που απαιτούσε βελτιστοποίηση ήταν η συγκέντρωση των δειγμάτων DNA. Τα ακριβή αποτελέσματα HRMA εξαρτώνται από την επαρκή συγκέντρωση του DNA, καθώς η πολύ μικρή ποσότητα εκμαγείου DNA μπορεί να οδηγήσει σε ασθενή σήματα φθορισμού, ενώ η υπερβολική μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μη ειδικών καμπυλών τήξης. Η εξασφάλιση ότι το κάθε δείγμα είχε βέλτιστη συγκέντρωση DNA ήταν απαραίτητη για την επίτευξη σαφών και ερμηνεύσιμων αποτελεσμάτων.

Επιπλέον, προσοχή απαιτεί και ο αριθμός των κύκλων της PCR. Αρχικά, ορίστηκε ένας τυπικός αριθμός κύκλων (35 κύκλοι), αλλά καθώς προχωρούσε η ενίσχυση, ο σχηματισμός

των καμπυλών παρακολουθούνταν σε πραγματικό χρόνο ούτως ώστε να γίνει εν δυνάμει αύξηση του αριθμού των κύκλων. Αυτή η τροποποίηση πραγματοποιήθηκε για να διασφαλιστεί ότι η ενίσχυση έφτανε σε επαρκή επίπεδα, ιδίως για δείγματα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αρχικού εκμαγείου (Εικόνα 39).

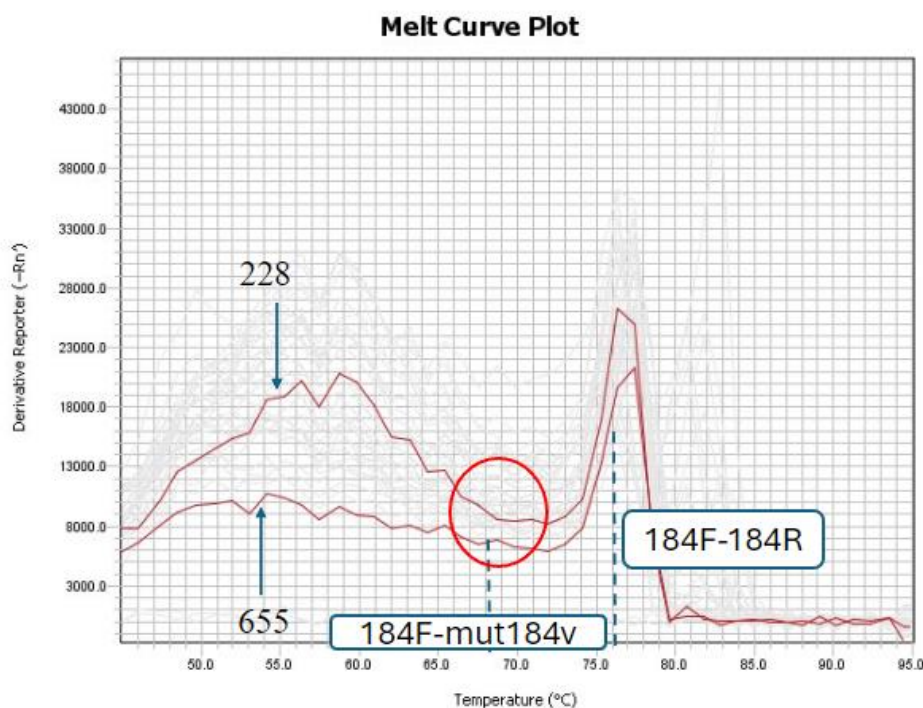


**Εικόνα 39: Διάγραμμα ενίσχυσης.** Οι κύκλοι στο συγκεκριμένο πείραμα αυξήθηκαν στους 50 εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης που είχε το δεύτερο δείγμα, του οποίου η ενίσχυση ξεκίνησε από τον 43ο κύκλο.

Όπως αναφέρθηκε και πρωτίτερα στη συγκεκριμένη ανάλυση εφαρμόστηκε η ασύμμετρη PCR, στην οποία οι εκκινητές χρησιμοποιούνται σε άνισες συγκεντρώσεις, συνήθως με περίσσεια ενός εκκινητή έναντι του άλλου με σκοπό να ευνοείται ο σχηματισμός δυο προϊόντων, όπου το ένα προκύπτει από το ζεύγος των δυο εκκινητών ενώ το άλλο από το ζεύγος εκκινητή και ανιχνευτή (108,109). Με τον τρόπο αυτό αν ενισχυθεί το δεύτερο τμήμα είναι εύκολο να διαπιστωθεί αν υπάρχει ή όχι μετάλλαξη. Η παραλλαγή αυτή δυσκόλεψε αρκετά την πειραματική πορεία επειδή παρά τις αρκετές δοκιμές αλλά και τις υποδείξεις από το πρωτόκολλο των Sacks et. al 2017 (107) δεν επιτεύχθηκε ο βέλτιστος συνδυασμός προκειμένου να είναι ευδιάκριτη η ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης.

Συμπερασματικά, ενώ όλες οι σχετικές παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν προσεκτικά σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Sacks et. al (2017), αλλά και τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα της HRMA παρέμειναν ασαφή. Μια υπόθεση που μπορεί να πραγματοποιηθεί

είναι ότι η χρήση αντιδραστηρίων πιο εξειδικευμένων για την ανάλυση HRMA (στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε SYBR Mix) μπορεί να οδηγήσει σε πιο σαφή αποτελέσματα αναφορικά με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Επίσης, απαραίτητος κρίνεται ο σχεδιασμός και η δοκιμή άλλων ανιχνευτών με διαφορετικές αλληλουχίες ή και μήκος, εφόσον έχει παρατηρηθεί πολλές φορές ότι η αλληλουχία του κάθε δείγματος διαφέρει αρκετά από αυτή του ανιχνευτή (βλ. **Παράρτημα 3**).



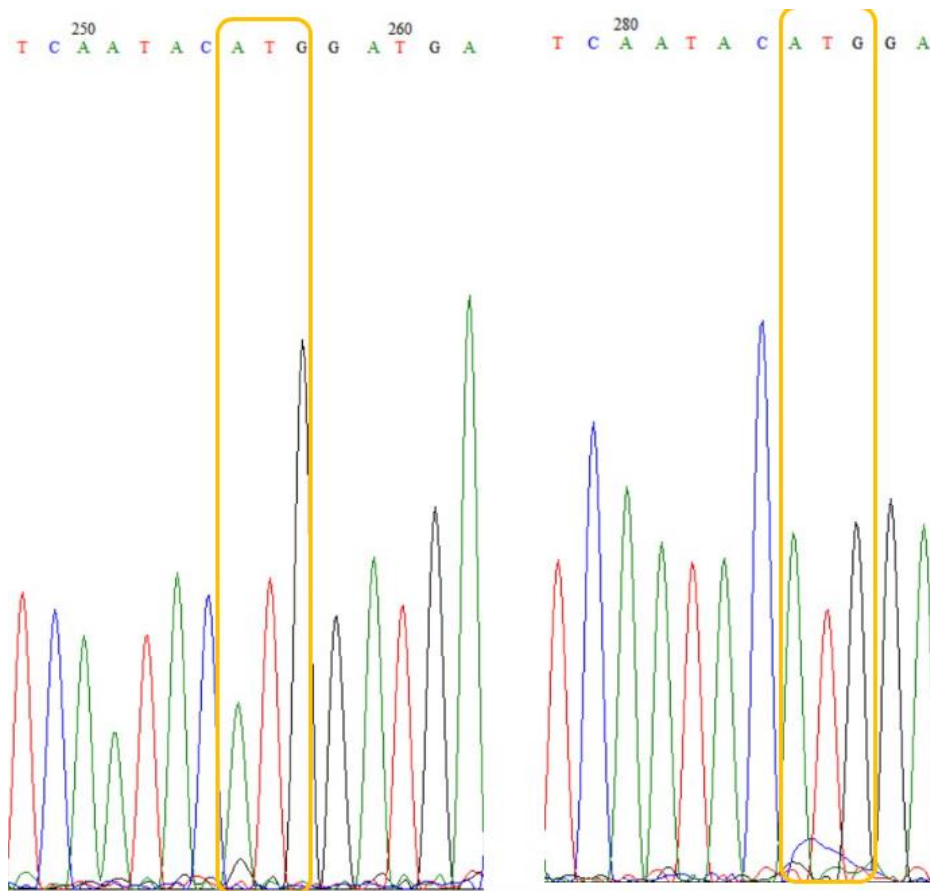
**Εικόνα 40: Καμπύλη τήξης.** Η συγκεκριμένη καμπύλη τήξης έχει ληφθεί με short melt curve και το συγκεκριμένο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με χρήση του ανιχνευτή για την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Πρόκειται για 2 διαφορετικά δείγματα 228 (θετικό) και 655 (αρνητικό). Παρόλα αυτά δεν εντοπίζεται καμία διαφορά μεταξύ των δύο καμπυλών που να υποδηλώνει την ύπαρξη της μετάλλαξης. Αν και μπορεί να διακριθεί μια διαφορά στο κυκλωμένο σημείο και υπάρχει μια μικρή καμπύλη, δεν πρόκειται παρά για τυχαίο εύρημα αφού η καμπύλη θα έπρεπε να υπάρχει στο δείγμα 228 το οποίο είναι θετικό.

#### 4.4 Το πρόβλημα της ύπαρξης υποπληθυσμών της αλληλουχίας-στόχου

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δεύτερη PCR, το προϊόν της HRMA qPCR για το δείγμα 990 αναλύθηκε μέσω αλληλούχισης κατά Sanger. Αυτό το βήμα ήταν κρίσιμο για να διασφαλιστεί ότι το ενισχυμένο προϊόν της δεύτερης nested PCR αντιπροσώπευε όντως την επιθυμητή περιοχή του γονιδιώματος του HIV-1 που περιέχει τη μετάλλαξη M184V. Παρόλο που ήταν γνωστό ότι το δείγμα ήταν θετικό, η αλληλούχιση έδειξε ωστόσο ότι το συγκεκριμένο δείγμα εμφάνιζε μίγμα αρνητικών και θετικών υποπληθυσμών (**Εικόνα 41**). Η παρουσία αυτών των υποπληθυσμών αποτελεί



σημαντικό εύρημα, καθώς υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της ανίχνευσης της συγκεκριμένης μετάλλαξης σε ικούς πληθυσμούς. Παράλληλα εξηγεί και τα αμφίσημα αποτελέσματα που προκύπτουν τόσο για το ίδιο δείγμα όσο και για τα υπόλοιπα. Επιπλέον, η ανίχνευση τόσο αρνητικών όσο και θετικών υποπληθυσμών σε ένα επιβεβαιωμένα θετικό δείγμα για τη μετάλλαξη M184V, υποδηλώνει ότι η αποκλειστική χρήση της PCR ενδέχεται να μην παρέχει πλήρη εικόνα. Για τον λόγο αυτό, συνιστάται η ενσωμάτωση της αλληλούχισης ή και άλλων μεθόδων υψηλής ανάλυσης στα διαγνωστικά πρωτόκολλα για τη διασφάλιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης με ακρίβεια.



**Εικόνα 41: Αποτελέσματα αλληλούχισης για το δείγμα 990.** Η κίτρινη περιοχή πλαισιώνει το κωδικόνιο 184 στο οποίο περιλαμβάνεται η μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης δείχνουν ότι το δείγμα είναι θετικό, εφόσον ανιχνεύεται το νουκλεοτίδιο της Αδενίνης (A, πράσινη κορυφή). Παρόλα αυτά, είναι διακριτή και μια μικρότερη μαύρη κορυφή η οποία αντιστοιχεί στον πληθυσμό της Γουανίνης (G). Με τον τρόπο αυτό, γίνεται κατανοητό ότι παρόλο που ένα δείγμα μπορεί να είναι θετικό (ATG), υπάρχει περίπτωση να εντοπίζονται υποπληθυσμοί που δεν έχουν την μετάλλαξη (GTG) ή το αντίστροφο. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να περιπλέξει τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

Η παρουσία υποπληθυσμών, η οποία μεταφράζεται εναλλακτικά σε ύπαρξη των κωδικών αμφισημίας (ambiguity codes) είναι μια παράμετρος η οποία θα έπρεπε να ληφθεί υπόψιν. Οι κωδικές αμφισημίας του DNA προκύπτουν όταν μια θέση νουκλεοτιδίου μέσα σε μια αλληλουχία μπορεί να καταλαμβάνεται από περισσότερες της μίας βάσεις, αντικατοπτρίζοντας έτσι την παρουσία μικτών πληθυσμών μεταξύ διαφορετικών μορίων που αντιστοιχούν στην ίδια αλληλουχία. Για παράδειγμα, το «R» μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε την αδερίνη (A) είτε τη γουανίνη (G), και το «Y» μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε την κυτοσίνη (C) είτε τη θυμίνη (T) (**Εικόνα 42**). Αυτό το φαινόμενο δίνει έναν βαθμό μεταβλητότητας σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας DNA, περιπλέκοντας τα πειράματα με σκοπό την ανίχνευση της μετάλλαξης M184V(118).

ΙUPAC κώδικας αμφισημίας	Βάσεις
R	A or G
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G

**Εικόνα 42: Κωδικές Αμφισημίας [Προσαρμογή από (118)]**

#### 4.5 Καινοτομία της παρούσας εργασίας και μελλοντικές προσεγγίσεις

Παρόλο που τόσο η τεχνική RFLP και όσο και η τεχνική HRMA αντιμετώπισαν προκλήσεις σε αυτή τη μελέτη, είναι σημαντικό να αναγνωριστεί η σημαντική συμβολή αυτών των μεθόδων στην κατανόηση των πιθανών τρόπων ανίχνευσης της μετάλλαξης M184V στον HIV-1.

Το πρωτόκολλο της τεχνικής RFLP που αναπτύχθηκε με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων αποτελεί μία αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων με πολλές προοπτικές, και σε αυτή τη μελέτη, εντόπισε με επιτυχία την ύπαρξη ή μη, της μετάλλαξης M184V σε αρκετά δείγματα. Το γεγονός ότι η RFLP μπόρεσε να παράσχει σαφή αποτελέσματα για πολλά από τα δείγματα που δοκιμάστηκαν καταδεικνύει τη χρησιμότητά της ως διαγνωστικό εργαλείο. Η επιτυχία της RFLP σε αυτό το πλαίσιο θα πρέπει να θεωρείται ως επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές.

Τα αποτελέσματα της RFLP που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη υπογραμμίζουν επίσης τη σημασία της συνέχισης χρήσης και της βελτίωσης αυτής της τεχνικής στην Ιολογία και ευρύτερα στη Μοριακή Διάγνωση. Παρόλο που μπορεί να θεωρείται παλαιότερη μέθοδος σε σύγκριση με πιο σύγχρονες προσεγγίσεις (όπως είναι η HRMA και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς), η αξιοπιστία της στην ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων είναι αδιαμφισβήτητη. Το γεγονός ότι επιτεύχθηκε ο εντοπισμός της μετάλλαξης M184V σε πολλά δείγματα αποδεικνύει τη συνεχιζόμενη σημασία της στον τομέα.

Ομοίως, το γεγονός ότι η HRMA, παρά τις δυσκολίες, παρείχε σημαντικά δεδομένα, υπογραμμίζει τη δυναμική της ως ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο. Τα ασαφή προς το παρόν αποτελέσματα δεν μειώνουν την αξία της, αλλά αντίθετα αναδεικνύουν τις πολυπλοκότητες της συγκεκριμένης μελέτης η οποία εστίασε σε έναν ιό με εξαιρετικά μεγάλη γενετική αστάθεια και ποικιλομορφία όπως ο HIV-1. Η διαδικασία βελτιστοποίησης της HRMA για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει θέσει σημαντικά θεμέλια, ενώ οι εν δυνάμει μελλοντικές προσαρμογές, όπως η περαιτέρω βελτίωση των συνθηκών αντίδρασης, θα μπορούσαν να ενισχύσουν σημαντικά την αποτελεσματικότητά της.

Η ευαισθησία της HRMA είναι το χαρακτηριστικό που την καθιστά τόσο πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Το γεγονός ότι μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και μικρές διαφορές στις θερμοκρασίες τήξης, πράγμα που αποδεικνύεται από τις πολλαπλές καμπύλες στα γραφήματα που παρουσιάστηκαν πρωτύτερα, σημαίνει ότι με τις σωστές βελτιώσεις θα μπορούσε δυνητικά να διακρίνει μεταξύ άγριου τύπου και μεταλλαγμένων στελεχών με μεγάλη ακρίβεια. Τα δεδομένα που παράγονται εδώ θα είναι αναμφισβήτητα πολύτιμα για άλλους ερευνητές που επίσης επιδιώκουν να βελτιώσουν την HRMA για παρόμοιες εφαρμογές.

Συμπερασματικά, παρά τις προκλήσεις που αντιμετωπίστηκαν τόσο με την RFLP όσο και με την HRMA, η παρούσα εργασία οδήγησε σε σημαντικά αποτελέσματα και παρείχε κρίσιμες γνώσεις σχετικά με τους περιορισμούς και τη δυναμική αυτών των μεθόδων για την ανίχνευση προς μετάλλαξης M184V στον HIV-1. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία της συνεχιζόμενης βελτίωσης αυτών των τεχνικών, καθώς και την ανάγκη για συμπληρωματικές προσεγγίσεις με στόχο την επίτευξη ακριβέστερων αποτελεσμάτων. Οι δυσκολίες που αντιμετωπίστηκαν δεν αποτελούν αποτυχίες, αλλά μάλλον σκαλοπάτια προς την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και αξιόπιστων διαγνωστικών εργαλείων.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

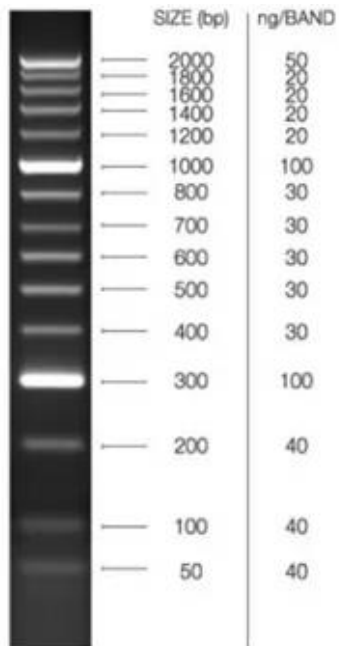
Η μετάλλαξη M184V στον HIV-1, που προκύπτει από μία μόνο σημειακή αλλαγή στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα, ιδιαίτερα έναντι των αναστολέων νουκλεοσιδικής αντίστροφης μεταγραφάσης. Η ακριβής ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική θεραπεία ασθενών που είναι θετικοί στον ιό HIV.

Η συγκεκριμένη εργασία ερεύνησε τη χρήση των αναλύσεων RFLP και HRMA για την ανίχνευση της μετάλλαξης M184V σε κλινικά δείγματα HIV-1. Παρόλο που και οι δύο τεχνικές είναι πολύτιμες στη Μοριακή Διάγνωση, αποκαλύφθηκαν περιορισμοί που επηρεάζονται από τον υψηλό ρυθμό μεταλλακτικότητας και τη γενετική ποικιλομορφία του HIV-1. Η ανάλυση RFLP έδωσε σαφή αποτελέσματα σε αρκετά δείγματα, αν και υπήρξαν δείγματα που έδωσαν ασαφείς ή μη αναμενόμενες ζώνες. Από την άλλη πλευρά, παρά τη σχολαστική βελτιστοποίηση της μεθόδου HRMA, τα αποτελέσματα ήταν σε μεγάλο βαθμό ασαφή, με την πολυπλοκότητα του γονιδιώματος του HIV-1 να επηρεάζει σημαντικά την ερμηνεία των καμπυλών τήξης.

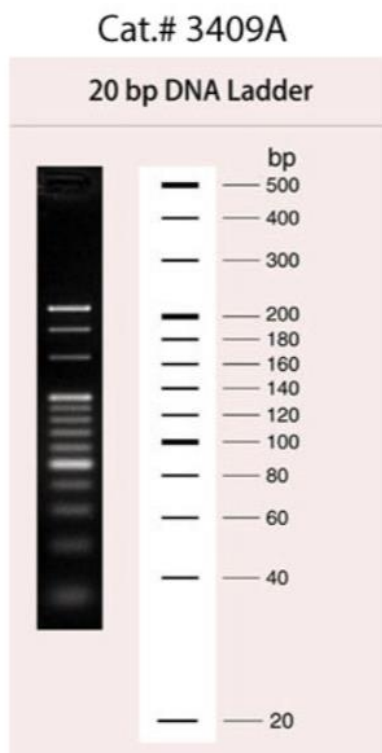
Οι περιορισμοί των δυο τεχνικών υποδεικνύουν ότι μία μόνο μέθοδος ενδέχεται να μην είναι επαρκής για την ολοκληρωμένη και αξιόπιστη ανίχνευση μεταλλάξεων. Η ενσωμάτωση συμπληρωματικών τεχνικών, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς, θα μπορούσε να παρέχει πιο ακριβή αποτελέσματα. Συνεπώς, ενθαρρύνεται η συνδυαστική χρήση τεχνολογιών αλληλούχισης για την υπέρβαση των προβλημάτων που αφορούν την αλληλουχία του HIV.

Όπως προκύπτει λοιπόν, ο HIV παραμένει μια από τις σημαντικότερες παγκόσμιες προκλήσεις για την υγεία, επηρεάζοντας εκατομμύρια ζωές και απαιτώντας συνεχείς εξελίξεις στη θεραπεία και τη διάγνωση. Η μετάλλαξη M184V είναι ιδιαίτερα κρίσιμη και αποτελεί τροχοπέδη στην πορεία προς την αντιμετώπιση της νόσου. Επομένως, η συνεχής έρευνα και η καινοτομία στον τομέα αυτό είναι ζωτικής σημασίας για να διασφαλιστεί ότι οι θεραπείες παραμένουν αποτελεσματικές και κυρίως προσαρμόζονται στη διαρκώς εξελισσόμενη φύση του ιού.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Hyperladder II (Bioline).** Παρουσιάζεται ο ladder που χρησιμοποιήθηκε για λόγους αναφοράς.



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: 20bp DNA Ladder (Takara).** Παρουσιάζεται ο ladder που χρησιμοποιήθηκε για λόγους αναφοράς. Ο συγκεκριμένος χρησιμοποιήθηκε για τα μικρότερα τμήματα που προέκυψαν στις πέψεις με περιοριστικά ένζυμα.

	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1
HXB2 SEQUENCE	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	G
PROBE SEQUENCE			T	C	A	A	T	A	T	A	T	G	G	A	T	G	A					
456	T	A	T	C	A	R	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	Y	T	T	T	G
634	T	A	T	C	A	A	T	A	T	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	T
636	T	A	C	C	A	A	T	A	T	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	A
664	T	A	T	C	A	G	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	G
842	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
919	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
020	T	A	C	C	A	A	T	A	T	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	A
601	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	A
839	T	A	C	C	A	G	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
103	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
120	T	A	C	C	A	A	T	A	T	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	A
225	T	A	T	C	A	G	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
990	T	A	Y	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
022	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	G
030	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	G
073	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	A	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
126	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	G	G	A	T	G	A	T	T	T	T	G
228	T	A	T	C	A	G	T	A	C	A	T	R	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G
247	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	T	A	G	A	T	G	A	C	T	T	T	G

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3:** Οι αλληλουχίες των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε σύγκριση με τους ανιχνευτές και την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς του HIV

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep 1;1(1):a006841–a006841.
2. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* (1979). 2014 Oct 3;346(6205):56–61.
3. Piot P, Bartos M, Ghys PD, Walker N, Schwartländer B. The global impact of HIV/AIDS. *Nature*. 2001 Apr 19;410(6831):968–73.
4. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* (1979). 1983 May 20;220(4599):868–71.
5. Montagnier L. A History of HIV Discovery. *Science* (1979). 2002 Nov 29;298(5599):1727–8.
6. Deeks SG, Lewin SR, Havlir D V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet*. 2013 Nov;382(9903):1525–33.
7. Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol*. 2013 Jul 26;23(4):221–40.
8. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 May 27;100(11):6588–92.
9. Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998 Jun;67(1):1–25.
10. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Apr 16;10(4):279–90.
11. Hu WS, Hughes SH. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Oct 1;2(10):a006882–a006882.
12. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Aug 1;2(8):a006866–a006866.
13. Malim MH, Emerman M. HIV-1 Accessory Proteins—Ensuring Viral Survival in a Hostile Environment. *Cell Host Microbe*. 2008 Jun;3(6):388–98.
14. van Heuvel Y, Schatz S, Rosengarten JF, Stitz J. Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine. *Toxins* (Basel). 2022 Feb 14;14(2):138.
15. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu Rev Immunol*. 1999 Apr;17(1):657–700.
16. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 Pathogenesis: The Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Dec 1;2(12):a007443–a007443.
17. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA Integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jul 1;2(7):a006890–a006890.

18. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Feb 1;2(2):a006916–a006916.
19. Ott M, Geyer M, Zhou Q. The Control of HIV Transcription: Keeping RNA Polymerase II on Track. *Cell Host Microbe*. 2011 Nov;10(5):426–35.
20. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Aug 29;13(8):484–96.
21. Sundquist WI, Krausslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jul 1;2(7):a006924–a006924.
22. Ono A. Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell*. 2010 Jun 3;102(6):335–50.
23. Bieniasz PD. The Cell Biology of HIV-1 Virion Genesis. *Cell Host Microbe*. 2009 Jun;5(6):550–8.
24. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 Apr;18(2):203–17.
25. Hulme AE. Mock Drug Activity Enhances Student Learning About the Challenges of HIV/AIDS Therapy. *CourseSource*. 2022;9.
26. Pope M, Haase AT. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):847–52.
27. Shaw GM, Hunter E. HIV Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Nov 1;2(11):a006965–a006965.
28. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral Load and Heterosexual Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *New England Journal of Medicine*. 2000 Mar 30;342(13):921–9.
29. Weller SC, Davis-Beaty K. Condom effectiveness in reducing heterosexual HIV transmission. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2002 Jan 21;2012(3).
30. Homer JB, St. Clair CL. A Model of HIV Transmission through Needle Sharing. *Interfaces (Providence)*. 1991 Jun;21(3):26–49.
31. Scott SR, Wu Z. Risks and challenges of HIV infection transmitted via blood transfusion. *Biosaf Health*. 2019 Dec;1(3):124–8.
32. Management of Needlestick Injuries in the Health Care Setting. *AMA J Ethics*. 2005 Oct 1;7(10).
33. The Effects of Vertical Transmission on the Spread of HIV/AIDS in the Presence of Treatment. *Mathematical Biosciences and Engineering*. 2006;3(2):297–312.
34. Fowler MG, Qin M, Fiscus SA, Currier JS, Flynn PM, Chipato T, et al. Benefits and Risks of Antiretroviral Therapy for Perinatal HIV Prevention. *New England Journal of Medicine*. 2016 Nov 3;375(18):1726–37.
35. Kuhar DT, Henderson DK, Struble KA, Heneine W, Thomas V, Cheever LW, et al. Updated US Public Health Service Guidelines for the Management of Occupational Exposures to Human Immunodeficiency Virus and

- Recommendations for Postexposure Prophylaxis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013 Sep 2;34(9):875–92.
36. Ford N, Mayer KH, Barlow L, Bagyinszky F, Calmy A, Chakroun M, et al. World Health Organization Guidelines on Postexposure Prophylaxis for HIV: Recommendations for a Public Health Approach. *Clinical Infectious Diseases*. 2015 Jun 1;60(suppl\_3):S161–4.
  37. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2011 Aug 11;365(6):493–505.
  38. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, van Lunzen J, et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA*. 2016 Jul 12;316(2):171.
  39. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *The Lancet*. 2010 Jul;376(9734):49–62.
  40. Piacenti FJ. An Update and Review of Antiretroviral Therapy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2006 Aug 6;26(8):1111–33.
  41. Broder S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):1–18.
  42. Quercia R, Perno CF, Koteff J, Moore K, McCoig C, St. Clair M, et al. Twenty-Five Years of Lamivudine: Current and Future Use for the Treatment of HIV-1 Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2018 Jun 1;78(2):125–35.
  43. De Clercq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. Presented at the Eleventh International Conference on Antiviral Research, San Diego, CA, 5–10 April 1998. *Antiviral Res*. 1998 Jun;38(3):153–79.
  44. Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature*. 2001 Apr;410(6831):995–1001.
  45. Maksimovic-Ivanic D, Fagone P, McCubrey J, Bendtzen K, Mijatovic S, Nicoletti F. HIV-protease inhibitors for the treatment of cancer: Repositioning HIV protease inhibitors while developing more potent NO-hybridized derivatives? *Int J Cancer*. 2017 Apr 15;140(8):1713–26.
  46. Scarsi KK, Havens JP, Podany AT, Avedissian SN, Fletcher C V. HIV-1 Integrase Inhibitors: A Comparative Review of Efficacy and Safety. *Drugs*. 2020 Nov 29;80(16):1649–76.
  47. Mayer S, Rayeed N, Novak RM, Li J, Palella FJ, Buchacz K, et al. INSTI-Based Initial Antiretroviral Therapy in Adults with HIV, the HIV Outpatient Study, 2007–2018. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2021 Oct 1;37(10):768–75.



48. Zhao AV, Crutchley RD, Guduru RC, Ton K, Lam T, Min AC. A clinical review of HIV integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) for the prevention and treatment of HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2022 Oct 22;19(1):22.
49. Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 Apr 1;57(4):619–27.
50. Tilton JC, Doms RW. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):91–100.
51. Esté JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *The Lancet*. 2007 Jul;370(9581):81–8.
52. Capetti A, Rizzardini G. Cobicistat: a new opportunity in the treatment of HIV disease? *Expert Opin Pharmacother*. 2014 Jun 12;15(9):1289–98.
53. Marzolini C, Gibbons S, Khoo S, Back D. Cobicistat versus ritonavir boosting and differences in the drug–drug interaction profiles with co-medications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016 Jul;71(7):1755–8.
54. Sherman EM, Worley M V., Unger NR, Gauthier TP, Schafer JJ. Cobicistat: Review of a Pharmacokinetic Enhancer for HIV Infection. *Clin Ther*. 2015 Sep;37(9):1876–93.
55. Astuti N, Maggiolo F. Single-Tablet Regimens in HIV Therapy. *Infect Dis Ther*. 2014 Jun 20;3(1):1–17.
56. Schouten J, Cinque P, Gisslen M, Reiss P, Portegies P. HIV-1 infection and cognitive impairment in the cART era: a review. *AIDS*. 2011 Mar 13;25(5):561–75.
57. Eisinger RW, Dieffenbach CW, Fauci AS. HIV Viral Load and Transmissibility of HIV Infection. *JAMA*. 2019 Feb 5;321(5):451.
58. Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, et al. Adherence to Protease Inhibitor Therapy and Outcomes in Patients with HIV Infection. *Ann Intern Med*. 2000 Jul 4;133(1):21.
59. Kim R, Baxter JD. Protease Inhibitor Resistance Update: Where Are We Now? *AIDS Patient Care STDS*. 2008 Apr;22(4):267–77.
60. Tzou PL, Rhee SY, Descamps D, Clutter DS, Hare B, Mor O, et al. Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-resistance mutations for the surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Jan 1;75(1):170–82.
61. Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016 Dec 8;73(23):4433–48.
62. Whitcomb JM, Huang W, Limoli K, Paxinos E, Wrin T, Skowron G, et al. Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1. *AIDS*. 2002 Oct;16(15):F41–7.
63. Brenner BG, Coutsinos D. The K65R Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase: Genetic Barriers, Resistance Profile and Clinical Implications. *HIV Ther*. 2009 Nov 30;3(6):583–94.

64. Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A Mechanism of AZT Resistance. *Mol Cell*. 1999 Jul;4(1):35–43.
65. Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, et al. Subgroup and Resistance Analyses of Raltegravir for Resistant HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2008 Jul 24;359(4):355–65.
66. Boden D, Markowitz M. Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Nov;42(11):2775–83.
67. Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, et al. Reduced Maximal Inhibition in Phenotypic Susceptibility Assays Indicates that Viral Strains Resistant to the CCR5 Antagonist Maraviroc Utilize Inhibitor-Bound Receptor for Entry. *J Virol*. 2007 Mar;81(5):2359–71.
68. Diallo K, Götte M, Wainberg MA. Molecular Impact of the M184V Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. Vol. 47, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. p. 3377–83.
69. Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark AD, Ding J, Whitcomb JM, et al. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J*. 2001 Mar 15;20(6):1449–61.
70. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. Structure of a Covalently Trapped Catalytic Complex of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implications for Drug Resistance. *Science (1979)*. 1998 Nov 27;282(5394):1669–75.
71. Kellam P, Larder BA. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol*. 1995 Feb;69(2):669–74.
72. Meyer PR, Matsuura SE, So AG, Scott WA. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Nov 10;95(23):13471–6.
73. Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. Broad Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor Cross-Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clinical Isolates. *J Infect Dis*. 2003 Oct;188(7):992–1000.
74. Wainburg MA. The impact of the M184V substitution on drug resistance and viral fitness. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004 Feb 10;2(1):147–51.
75. White KL, Margot NA, Wrin T, Petropoulos CJ, Miller MD, Naeger LK. Molecular Mechanisms of Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Reverse Transcriptase Mutations K65R and K65R+M184V and Their Effects on Enzyme Function and Viral Replication Capacity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3437–46.
76. Bhakat, S., Martin, A. J. M., & Soliman, M. E. S. An integrated molecular dynamics, principal component analysis and residue interaction network approach reveals the impact of M184V mutation on HIV reverse transcriptase resistance to lamivudine. (2014). *Mol. BioSyst.*, 10(8), 2215–2228.

77. Kulkarni R, Babaoglu K, Lansdon EB, Rimsky L, Van Eygen V, Picchio G, et al. The HIV-1 Reverse Transcriptase M184I Mutation Enhances the E138K-Associated Resistance to Rilpivirine and Decreases Viral Fitness. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2012 Jan 1;59(1):47–54.
78. Nicolas Margot RRIMRHCC. Differential detection of M184V/I between plasma historical HIV genotypes and HIV proviral DNA from PBMCs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;
79. Oliveira M, Ibanescu RI, Pham HT, Brenner B, Mesplède T, Wainberg MA. The M184I/V and K65R nucleoside resistance mutations in HIV-1 prevent the emergence of resistance mutations against dolutegravir. *AIDS*. 2016 Sep 24;30(15):2267–73.
80. UNAIDS. Global HIV & AIDS Statistics — Fact Sheet. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
81. World Health Organization. HIV/AIDS Report. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
82. UNAIDS. "Adults and Children Estimated to be Living with HIV, 2023." *UNAIDS Global AIDS Update 2023*, Geneva: UNAIDS; 2023.
83. Gao, W., Zhou, G., Li, M., Wang, P., Li, J., & Deng, R. . HIV drug resistance: analysis of viral genotypes and mutation loci in people living with HIV in Chongqing, China (2016–2023). *AIDS Research and Therapy* (2024), 21(1), 62.
84. Chen, G. J., Lee, Y. L., Lee, C. H., Sun, H. Y., Cheng, C. Y., Tsai, H. C., Huang, S. H., Lee, Y. C., Hsieh, M. H., Chang, S. Y., Chuang, Y. C., Su, L. S., Chang, S. F., Tang, H. J., & Hung, C. C. (2020). Impact of archived M184V/I mutation on the effectiveness of switch to co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine and tenofovir alafenamide among virally suppressed people living with HIV. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(10), 2986–2993.
85. Kuritzkes, D. R. New Perspectives on the Virologic Consequences of M184V or I in Human Immunodeficiency Virus-1 Reverse Transcriptase. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(7), 1067–1069. (2020)
86. Gregson, J., Tang, M., Ndembu, N., Hamers, R. L., Rhee, S.-Y., Marconi, V. C., Diero, L., Brooks, K. A., Theys, K., Rinke de Wit, T., Arruda, M., Garcia, F., Monge, S., Günthard, H. F., Hoffmann, C. J., Kanki, P. J., Kumarasamy, N., Kerschberger, B., Mor, O., ... Gupta, R. K. (2016). Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 565–575.
87. Palich, R., Teyssou, E., Sayon, S., Abdi, B., Soulie, C., Cuzin, L., Tubiana, R., Valantin, M. A., Schneider, L., Seang, S., Wirden, M., Pourcher, V. C. D. S., Katlama, C., Calvez, V., & Marcelin, A. G. (2022). Kinetics of Archived M184V Mutation in Treatment-Experienced Virally Suppressed HIV-Infected Patients. *Journal of Infectious Diseases*, 225(3), 502–509.

88. Wainberg, M. A., Moisi, D., Oliveira, M., Toni, T. D., & Brenner, B. G. (2011). Transmission dynamics of the M184V drug resistance mutation in primary HIV infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2346–2349.
89. Paredes, R., Marconi, V. C., Campbell, T. B., & Kuritzkes, D. R. (2007). Systematic evaluation of allele-specific real-time PCR for the detection of minor HIV-1 variants with pol and env resistance mutations. *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 136–146.
90. Li, M., Liang, S., Zhou, C., Chen, M., Liang, S., Liu, C., Zuo, Z., Liu, L., Feng, Y., Song, C., Xing, H., Ruan, Y., Shao, Y., & Liao, L. (2021). HIV Drug Resistance Mutations Detection by Next-Generation Sequencing during Antiretroviral Therapy Interruption in China. *Pathogens*, 10(3), 264.
91. Nannyonjo, M., Omooja, J., Bugembe, D. L., Bbosa, N., Lunkuse, S., Nabirye, S. E., Nassolo, F., Namagembe, H., Abaasa, A., Kazibwe, A., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. (2024). Next-Generation Sequencing Reveals a High Frequency of HIV-1 Minority Variants and an Expanded Drug Resistance Profile among Individuals on First-Line ART. *Viruses*, 16(9), 1454.
92. Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Apr 26;102(17):5905–8.
93. Pingoud A. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*. 2001 Sep 15;29(18):3705–27.
94. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980 May;32(3):314–31.
95. Williams RC. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Am J Phys Anthropol*. 1989;32(S10):159–84.
96. Beckmann JS, Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*. 1983 Nov;67(1):35–43.
97. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature*. 1985 Jul;316(6023):76–9.
98. Zhang R, Zhu Z, Zhu H, Nguyen T, Yao F, Xia K, et al. SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR-RFLP assay design. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul 1;33(Web Server):W489–92.
99. Rybicka, M., Stalke, P., & Bielawski, K. P. (2016). Current molecular methods for the detection of hepatitis B virus quasispecies. *Reviews in Medical Virology*, 26(5), 369–381.
100. Jarcho J. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Curr Protoc Hum Genet*. 1994 May;1(1).
101. Kwok PY, Chen X. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms 43 Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. Vol. 5, Issues Mol. Biol. 2003.

102. Vossen RHAM. Genotyping DNA Variants with High-Resolution Melting Analysis. In 2017. p. 17–28.
103. Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*. 2010 Apr;50(4):250–61.
104. SMITH BL, LU C -P., ALVARADO BREMER JR. High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Mol Ecol Resour*. 2010 Jan 16;10(1):193–6.
105. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-Resolution DNA Melting Analysis for Simple and Efficient Molecular Diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007 Jun 11;8(6):597–608.
106. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clin Chem*. 2003 Jun 1;49(6):853–60.
107. Sacks D, Ledwaba J, Morris L, Hunt GM. Rapid Detection of Common HIV-1 Drug Resistance Mutations by Use of High-Resolution Melting Analysis and Unlabeled Probes. *J Clin Microbiol*. 2017 Jan;55(1):122–33.
108. Tolnai, Z., Harkai, Á., Szeitner, Z., Scholz, É. N., Percze, K., Gyurkovics, A., & Mészáros, T. (2019). A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR. *Analytica Chimica Acta*, 1047, 225–230.
109. Tan, C. S., Tominaga, J., Citartan, M., Tang, T.-H., Tan, S.-C., Hoe, C.-H., Saini, R., & Gopinath, S. C. B. (n.d.). *Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production*.
110. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clin Chem*. 2004 Jul 1;50(7):1156–64.
111. Li BS, Wang XY, Ma FL, Jiang B, Song XX, Xu AG. Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human Disease-Associated Mutations? A Meta Analysis. *PLoS One*. 2011 Dec 14;6(12):e28078.
112. Rio, D. C. (2014). Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(11), pdb.prot080887.
113. Carter, L. J., Garner, L. v., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., Beskid, T. R., Jervey, S. R., & Liu, C. (2020). Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science*, 6(5), 591–605
114. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb.prot095182.
115. Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., & Goswami, A. (2014). International Journal of Advanced Research in Biological Sciences A critical review on PCR, its types and applications. *Int. J. Adv. Res. Biol.Sci*, 1(7), 65–80.

116. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62.
117. Lumpkin, O. J., Déjardin, P., & Zimm, B. H. (1985). Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers*, 24(8), 1573–1593.
118. Johnson, A. D. (2010). An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics*, 26(10), 1386–1389.
119. [https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:HIV-SIV-phylogenetic-tree\\_straight.svg](https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:HIV-SIV-phylogenetic-tree_straight.svg)
120. <https://blogs.jwatch.org/hiv-id-observations/index.php/learning-the-names-of-hiv-drugs-is-horribly-difficult-heres-why/2019/11/03/>
121. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>