

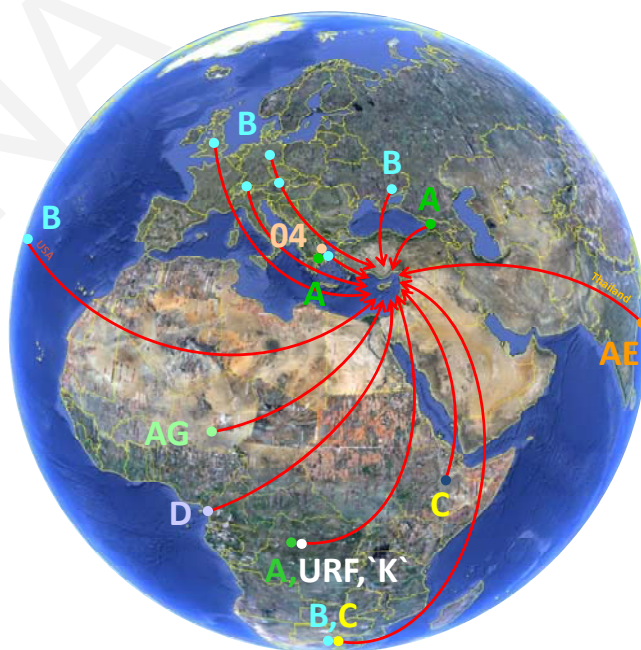


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ  
(ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΛΕΟΝΤΙΟΣ Γ. ΚΩΣΤΡΙΚΗΣ)

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΙΟΥ  
ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΥΠΟΥ 1 (HIV-1)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ *Ph.D.*

**ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΥΣΙΑΠΠΑ**



## Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

1. **Ημερομηνία Εισδοχής στο Τμήμα Βιολογικών Επιστημών:** 4 Σεπτεμβρίου, 2006
2. **Ερευνητικός Σύμβουλος:** Λεόντιος Γ. Κωστρίκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
3. **Ημερομηνία Περιεκτικής Εξέτασης:** 10 Δεκεμβρίου, 2007
4. **Ημερομηνία Παρουσίασης Ερευνητικής Πρότασης Διδακτορικής Διατριβής:**  
01 Δεκεμβρίου, 2008
5. **Μέλη Πενταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**
  - I. Λεόντιος Γ. Κωστρίκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κύπρου
  - II. Παντελής Γεωργιάδης, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κύπρου (Προεδρεύων)
  - III. Κατερίνα Στρατή, Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κύπρου
  - IV. Πέτρος Καραγιάννης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής, Imperial College London
  - V. Γεώργιος Πολλάκης, Α΄ Ερευνητής Τμήματος Ανθρώπινων Ρετροϊών, Ιατρικό Ακαδημαϊκό Κέντρο, Πανεπιστήμιο Άμστερνταμ
6. **Ημερομηνία Καταθέσεως Διδακτορικής Διατριβής:** 12 Φεβρουαρίου 2010

**Υπογραφή Ερευνητικού Συμβούλου:**

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΥΥΣΙΑΠΠΑ

*Στους Γονείς μου  
Χριστόφορο και Μαρία Κουσιάπα*

## Περίληψη

Στην παρούσα ερευνητική διατριβή μελετήθηκε η μοριακή ετερογένεια του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1), με επίκεντρο τις επιδράσεις της μοριακής εξέλιξης του ιού ως προς την φυσική του ετερογένεια και την επιλεκτική πίεση από τα αντιρετροϊκά φάρμακα. Για την επίτευξη του πιο πάνω στόχου, διεξήχθησαν τρεις επιμέρους μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από HIV-1 οροθετικούς ασθενείς που διαγνώστηκαν στην Κύπρο από το 1986 έως το 2006.

Η μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 μόλυνσης μελετήθηκε για πρώτη φορά στην Κύπρο στα μέσα της δεκαετίας του '90, αλλά η έκταση της HIV-1 γενετικής ποικιλομορφίας παρέμεινε απροσδιόριστη τα τελευταία 20 χρόνια. Σε μια προσπάθεια να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα έγινε μια αναδρομική μελέτη για να διερευνηθεί η γενετική διασπορά του ιού HIV-1 και να καθοριστεί η δυναμική της επιδημίας στην Κύπρο. Εξετάστηκαν στελέχη από μια ομάδα 77 HIV-1 οροθετικών που αντιπροσωπεύουν το 38% του γνωστού μολυσμένου πληθυσμού στην Κύπρο την περίοδο 1986 έως 2006. Το RNA του σχεδόν-πλήρες μήκους γονιδιώματος πολλαπλασιάστηκε σε τέσσερα διαδοχικά nested RT-PCRs σε όλα τα HIV-1 δείγματα και αλληλουχήθηκε, χρησιμοποιώντας ένα νέο πρωτόκολλο. Έγιναν λεπτομερείς φυλογενετικές αναλύσεις και αναλύσεις ανασυνδυασμού στις αλληλουχίες των δειγμάτων για τη φυλογενετική ταξινόμηση των στελεχών. Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης των HIV-1 αλληλουχιών σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος έδειξαν ότι ο υπότυπος B είναι ο κυρίαρχος υπότυπος (61%), και ακολουθείται από τον υπότυπο A (23.3%), τον υπότυπο C (5.2%), τη CRF02\_AG (3.9%) και τους υπότυπους D, CRF01\_AE και CRF04\_cpx (από 1.3%). Δύο HIV-1 στελέχη (2.6%), με προέλευση τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (DRC) δεν ταξινομήθηκαν σε οποιονδήποτε γνωστό (υπο)υπότυπο ή μεταδιδόμενη ανασυνδυασμένη μορφή (CRF). Η ανάλυση ανασυνδυασμού και η φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι το ένα στέλεχος έχει ένα νέο, μοναδικό ανασυνδυασμένο πρότυπο, που περιλαμβάνει τμήματα των υποτύπων D και G και είναι διαφορετικό από οποιοδήποτε άλλο CRF ή URF αναφερόμενο μέχρι τώρα. Η λεπτομερής ανάλυση του δεύτερου άγνωστου στελέχους κατέδειξε ότι φυλογενετικά βρίσκεται κοντά στις αλληλουχίες αναφοράς του υπότυπου K, αλλά δεν ταξινομείται μέσα στον κλάδο K και ίσως είναι ένας υπο-υπότυπος του K ή νέος HIV-1 υπότυπος. Η συσχέτιση των φυλογενετικών στοιχείων με τις επιδημιολογικές πληροφορίες των ασθενών δείχνουν ότι, η HIV-1 λοίμωξη στην Κύπρο τροφοδοτείται από μια συνεχή

είσοδο νέων στελεχών από άλλες χώρες τα τελευταία είκοσι χρόνια, καθιερώνοντας μια εξελισσόμενη και πολυφυλετική λοίμωξη στο νησί.

Στην δεύτερη μελέτη, παρουσιάζεται μια μοριακή επιδημιολογική έρευνα, όπου διερευνήθηκε η γενετική ποικιλότητα και η μεταδιδόμενη ανθεκτικότητα ως προς την αντιρετροϊκή θεραπεία σε 37 στελέχη νεοδιαγνωσθέντων HIV-1 ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε αντιρετροϊκή θεραπεία κατά το διάστημα 2003-2006. Το RNA των κωδικών περιοχών *gag*, *pol*(PR-RT) και *env* πολλαπλασιάστηκε σε τρία nested RT-PCRs σε όλα τα HIV-1 δείγματα. Τα PCR προϊόντα αλληλουχίστηκαν και αναλύθηκαν φυλογενετικά. Παράλληλα, έγινε καθορισμός της επικράτησης της μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας στα διαθέσιμα αντιρετροϊκά φάρμακα και της πρόγνωσης του κυτταρικού τροπισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υπότυπος A είναι ο πιο κοινός υπότυπος (38%) μεταξύ των HIV-1 στελεχών των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων στην περίοδο 2003-2006 και ακολουθεί ο υπότυπος B (35%), ο υπότυπος C (13%), η CRF02\_AG (8%) και ο υπότυπος D και CRF01\_AE (από 3%). Δύο HIV-1 οροθετικά άτομα είχαν μια αμινοξική αντικατάσταση στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) (>25% των HIV-1 quasispecies) που συνδέεται με υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στους RT αναστολείς. Δεν υπήρξε κανένας ασθενής με ανθεκτικές μεταλλάξεις ως προς τους αναστολείς της πρωτεάσης (PI). Ένα άτομο είχε μια αμινοξική αντικατάσταση στην *env* gp41(HR1 περιοχή) που σχετίζεται με μείωση 2 φορές στην ευαισθησία του αναστολέα σύντηξης.

Μια από τις πιο πρόσφατες κατηγορίες φαρμάκων του HIV-1 είναι οι αναστολείς της ιντεγκράσης (IN), ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους και τα πρότυπα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα στελέχη της ομάδας M είναι υπό διερεύνηση. Στην τρίτη μελέτη έγινε μια γενετική ανάλυση του γονιδίου της IN και μια δομική ανάλυση της δέσμευσης των αναστολέων της IN στην πρωτεΐνη, σε σχέση με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αναλύθηκαν 108 HIV-1 IN αλληλουχίες από HIV-1 στελέχη της Κύπρου που πολλαπλασιάστηκαν με ένα νέο σχεδιασμένο πρωτόκολλο. Τα αμινοξικά κατάλοιπα της IN που συνδέονται με την καταλυτική δραστηριότητα και την πρωτοταγή ανθεκτικότητα στους αναστολείς της IN είναι συντηρημένα μεταξύ των στελεχών. Παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί σε κατάλοιπα που σχετίζονται με δευτεροταγή ανθεκτικότητα και τον τρόπο δέσμευσης του αναστολέα *raltegravir*.

Στο σύνολο τους τα αποτελέσματα, παρουσιάζουν μια εκτεταμένη γενετική ετερογένεια της HIV-1 λοίμωξης στην Κύπρο, προερχόμενη από την εισαγωγή πολλαπλών μη-B γενετικών μορφών από άλλες χώρες τα τελευταία χρόνια, ενώ υπάρχει μια χαμηλή επικράτηση μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας στα HIV-1 αντιρετροϊκά φάρμακα.

## Abstract

In the present dissertation the molecular heterogeneity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) was studied, focusing on effects of molecular evolution on the natural heterogeneity of the viral genome and the selective pressure by antiretroviral drugs. For the achievement of this objective, three individual studies were carried out, in which samples from HIV-1 seropositives diagnosed in Cyprus from 1986 up onwards were used.

The molecular epidemiology of HIV-1 infection was first studied in Cyprus in the mid-1990s but the extent of HIV-1 diversity has remained indefinable for the last 20 years. In an effort to address this issue, a retrospective study was conducted in order to investigate the genetic dissemination of HIV-1 virus and to determine the dynamics of the epidemic in Cyprus. Strains isolated from 77 HIV-1 infected individuals, representing 38% of the known infected population in Cyprus in the period from 1986 to 2006 were examined. RNA of the near-full length genome was amplified with four nested RT-PCRs in all HIV-1 samples and sequenced using a new protocol. Detailed phylogenetic and recombination analyses were conducted for the classification of the samples. The results of the phylogenetic analysis of the HIV-1 near-full length sequences showed that subtype B is the dominant subtype (61%) and is followed by A (23.3%), C (5.2%), CRF02\_AG (3.9%) and D, CRF01\_AE and CRF04\_cpx (1.3% each). Two HIV-1 strains (2.6%), originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) could not be classified in any known (sub)subtype or circulating recombinant form (CRF). Recombination and phylogenetic analysis showed that one of the unknown strains reveals a new, unique recombinant pattern, which includes segments of subtype D and G and is different from any other CRFs or URFs reported so far. Detail analysis of the second unknown strain showed that it is phylogenetically close to subtype K reference strains, but does not classify with K and perhaps is a new HIV-1 subtype or (sub)subtype of K. Cross-correlation of the phylogenetic data with the patient's epidemiological data demonstrated that HIV-1 infection in Cyprus is being fueled by a continuous entry of new strains from other countries over the past twenty years, establishing an evolving and polyphyletic infection in the island.

In the second study, molecular epidemiological research is represented, where we investigated the genetic diversity and transmitted drug resistance against antiretroviral drugs in 37 strains of newly diagnosed naive HIV-1 patients during 2003-2006. The RNA

of the *gag*, *pol*(PR-RT) and *env* coding regions was amplified with three nested RT-PCRs in all samples. The PCR products were sequenced and analyzed phylogenetically. At the same time, the amplified products were studied to determine the prevalence of drug-resistance-associated mutations and to prognosticate the co-receptor tropism. The results showed that subtype A was the most common subtype present (38%) among the 37 HIV-1 strains of newly diagnosed untreated HIV-1 patients, followed by subtype B (35%), C (13%), CRF02\_AG (8%) and D and CRF01\_AE (3% each). Two newly diagnosed untreated HIV-1 patients had an amino acid substitution in the reverse transcriptase (RT) (>25% of the HIV-1 quasispecies) associated with high-level resistance to RT inhibitors. There were no patients with resistant mutations to protease inhibitors (PI). Additionally, one patient had an amino acid substitution within the *env* gp41 (HR1 domain) conferring 2-fold change in the susceptibility of the fusion inhibitor.

One of the latest classes of HIV-1 drugs is the integrase (IN) inhibitors and their efficacy and resistance patterns among M-group strains are currently under investigation. In the third study, genetic analysis of the IN gene and structural analysis of the binding of IN inhibitors into the protein were carried out, in correlation with the development of resistance. This study 108 HIV-1 IN sequences from HIV-1 strains in Cyprus were analyzed with a newly designed method. The IN aminoacid residues associated with catalytic activity and primary resistance to IN inhibitors were conserved among all 108 analyzed HIV-1 strains. Variations were observed in residues associated with secondary resistance and the binding mode of raltegravir.

Altogether, these findings exhibit the extensive molecular heterogeneity of HIV-1 infection in Cyprus; derived from the introduction of multiple non-B genetic strains from other countries the past years, and the existence of a low prevalence of transmitted resistance to current HIV-1 antiretroviral drugs.

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Ερευνητικό μου Σύμβουλο Αναπληρωτή Καθηγητή, Δρ. Λεόντιο Γ. Κωστρίκη για την επίβλεψη της παρούσας διατριβής και για τη συνεχή καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Μοριακής Ιολογίας. Οι χρήσιμες και πολύτιμες συμβουλές του Δρ. Κωστρίκη θα αποτελούν πυξίδα για την μεταγενέστερη πορεία μου στο χώρο της έρευνας. Είμαι ευγνώμων στο Λέκτορα, Δρ. Βασίλη Προμπονά για την πρόθυμη καθοδήγηση και τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά την διάρκεια του διδακτορικού προγράμματος. Ευχαριστίες θα ήθελα να μεταφέρω και στον επιδημιολόγο, Δρ. David A.M.C. van de Vijver για τις ωφέλιμες οδηγίες του και τη στοχευόμενη καθοδήγηση του κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ επίσης, τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, Δρ. Πέτρο Καραγιάννη, Δρ. Γεώργιο Πολλάκη, Δρ. Παντελή Γεωργιάδη και Δρ. Κατερίνα Στρατή για τα εποικοδομητικά τους σχόλια και παρατηρήσεις.

Θερμές ευχαριστίες οφείλονται στους οροθετικούς ασθενείς που αποδέχτηκαν να συμμετάσχουν στην έρευνα, καθώς και στο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Γρηγόρειου Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας, που παρ' όλες τις δύσκολες καταστάσεις που αντιμετωπίζουν καθημερινώς και τον λίγο ελεύθερο χρόνο που έχουν στη διάθεση τους, συνεργάστηκαν μαζί μας και είχαν την καλοσύνη να διευκολύνουν το έργο μας όσον αφορά τη συμμετοχή των HIV-1 οροθετικών, τη συλλογή δειγμάτων και πληροφοριών. Ειδικά, ευχαριστώ το Διευθυντή Δρ. Ιωάννη Δημητριάδη, το Δρ. Κωνσταντίνο Κασάπη, την τέως Βοηθό Προϊσταμένη Νοσηλευτική Λειτουργό - Σύμβουλο για το AIDS και την Ηπατίτιδα κα Ευρυδίκη Λαζάρου, την Προϊσταμένη Νοσηλευτική Λειτουργό κα Ειρήνη Χριστοδούλου και όλο το νοσηλευτικό προσωπικό της Γρηγορείου Κλινικής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω, όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εποικοδομητική και αλληλέγγυα συνεργασία κατά το διάστημα παραμονής μου στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Μοριακής Ιολογίας. Συγκεκριμένα, θέλω να ευχαριστήσω το Γιώργο Θεμιστοκλέους, τη Βικτώρια Δημητρίου, τη Johanka Hezka, την Ευθυμία Γιακουμή, την Αλίνα Γιάντσου-Κυριακού και τη Sarah Gilliland.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της ψυχής μου τους γονείς μου, τα δύο μου αδέρφια και τους φίλους μου που ήταν πάντοτε πλάι μου, ηθικοί αρωγοί σε όλες τις δύσκολες και ευχάριστες στιγμές και μου έδιναν δύναμη για να φτάσω στο τέρμα αυτού του φιλόδοξου ταξιδιού που ονομάζεται διδακτορικό.



## Περιεχόμενα

<b>Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής</b>	II
<b>Αφιέρωση</b>	III
<b>Περίληψη</b>	IV
<b>Abstract</b>	VI
<b>Ευχαριστίες</b>	VIII
<b>Περιεχόμενα</b>	1
<b>Κατάλογος Εικόνων-Σχημάτων-Πινάκων</b>	4
Εικόνες	4
Σχήματα	4
Πίνακες	4
<b>Γενικό Μέρος</b>	5
<b>Κεφάλαιο 1. Μοριακή Βιολογία του ιού HIV-1</b>	6-25
1.1 Δομή	6
1.2 Γονιδίωμα	6
1.3 Δομικές Πρωτεΐνες	8
1.4 Ενζυμικές Πρωτεΐνες	10
1.5 Πρωτεΐνες του φακέλου	13
1.6 Ρυθμιστικές Πρωτεΐνες	14
1.7 Πρωτεΐνες με Συνοδευτικό ρόλο	15
1.8 Αναδιπλασιασμός του ιού HIV-1	18
<b>Κεφάλαιο 2. Μοριακή Επιδημιολογία του ιού HIV</b>	26-45
2.1 Η πανδημία του ιού HIV-1/AIDS	26
2.2 Γενετική ταξινόμηση του ιού HIV	27
2.3 Παγκόσμια κατανομή των HIV-1 γενότυπων της ομάδας M	31
2.4 Προέλευση του ιού HIV-1	38
2.5 Βιολογική Σημασία της HIV-1 Ετερογένειας	40

<b>Κεφάλαιο 3. Παθογένεια του ιού HIV-1 και Αντιρετροϊκή Θεραπεία</b>	46-73
3.1 Κλινική πορεία της HIV-1 λοίμωξης	46
3.2 HIV-1 Αντιρετροϊκή θεραπεία και ανθεκτικότητα	49
3.3 Η εύρεση ανθεκτικών μεταλλάξεων στην πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης	68
<b>Κεφάλαιο 4. Κυτταρικός τροπισμός και πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης</b>	74-81
4.1 Ο βιολογικός φαινότυπος και κυτταρικός τροπισμός του ιού HIV-1	74
4.2 Καθορισμός τροπισμού	75
4.3 Αναστολείς της δέσμευσης του HIV-1 με τους συνυποδοχείς χυμοκίνης	77
4.4 Πρόγνωση κυτταρικού τροπισμού του HIV-1	78
<b>Ειδικό Μέρος</b>	82
<b>Κεφάλαιο 5. Γενετική ανάλυση του ιού HIV-1 στην Κύπρο</b>	83-86
<b>Κεφάλαιο 6. Μεθοδολογία</b>	87-125
6.1 Συμμετέχοντες HIV-1 οροθετικοί	87
6.2 Συλλογή και απομόνωση δειγμάτων	88
6.3 Εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων	91
6.4 Πρωτόκολλο ενίσχυσης της σχεδόν πλήρους μήκους HIV-1 αλληλουχίας	96
6.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested RT-PCR/PCR	102
6.6 Αλληλούχιση PCR προϊόντων	105
6.7 Επεξεργασία HIV-1 αλληλουχιών	115
6.8 Φυλογενετική ανάλυση	116
6.9 Ανάλυση ανασυνδυασμού	118
6.10 Γενοτυπική ανάλυση για εύρεση μεταλλάξεων ανθεκτικότητας	119
6.11 Γενοτυπική μέθοδος πρόγνωσης κυτταρικού τροπισμού	123
6.12 Γενοτυπική ανάλυση IN	124
<b>Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα</b>	126-152
7.1 Αποτελέσματα αναδρομικής γενετικής μελέτης	126
7.2 Αποτελέσματα μοριακής επιδημιολογικής μελέτης	140
7.3 Γενετική ανάλυση γονιδίου IN	149
<b>Κεφάλαιο 8. Συζήτηση Αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα</b>	153-162
8.1 Ιική ετερογένεια στην Κύπρο – Αναδρομή είκοσι χρόνων	153
8.2 Η ική ετερογένεια ανάμεσα στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς	156

8.3	Μετάδοση ανθεκτικών μεταλλάξεων και πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης	157
8.4	Γενοτυπικός τροπισμός και πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης	158
8.5	Σημαντικότητα γενετικών πολυμορφισμών της IN	158
8.6	Γενικά συμπεράσματα-Μελλοντική κατεύθυνση	161

<b>Βιβλιογραφία</b>		163
---------------------	--	-----

<b>Παράρτημα</b>		190
------------------	--	-----

I.	Συνομογραφίες	190
----	---------------	-----

II.	Ανάτυπα δημοσιευμένων εργασιών	192
-----	--------------------------------	-----

## Κατάλογος Εικόνων-Σχημάτων-Πινάκων

### Εικόνες

1. Γονιδίωμα του ιού HIV-1 (στέλεχος HXB2) 8
2. Διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής του HIV-1 γονιδιώματος 19
3. Παγκόσμια κατανομή των HIV γενότυπων 32

### Διάγραμμα

1. Αντιρετροϊκοί στόχοι και ανθεκτικότητα 52

### Σχήματα

1. Πρωτόκολλο ενίσχυσης της σχεδόν πλήρους μήκους HIV-1 αλληλουχίας 97
2. Νέα γενοτυπική μέθοδος εύρεσης ανθεκτικότητας στα γονίδια *PP* και *RT* 120
3. Πρωτόκολλο ενίσχυσης της αλληλουχίας του γονιδίου *IN* 124
4. Φυλογενετικό δέντρο HIV-1 αλληλουχιών σχεδόν-πλήρους γονιδιώματος 132
5. Ανάλυση ανασυνδυασμού στελέχους CY063 135
6. Ανάλυση ανασυνδυασμού στελέχους CY090 137
7. Χρονιαία κατανομή HIV-1 στελεχών 1986-2006 138
8. Γεωγραφικός χάρτης της εισαγωγής HIV-1 στελεχών στην Κύπρο 139
9. Φυλογενετικά δέντρα HIV-1 *gag*, *pol*(*PR* και *RT*) και *env*(*gp160*) αλληλουχιών 145
10. Πρωτεϊνικό μοτίβο HIV-1 *IN* και φυσικοί πολυμορφισμοί ανθεκτικ 152

### Πίνακες

1. Εκκινητές της αντίδρασης nested RT-PCR/PCR και της κυκλικής αλληλούχισης 99
2. Θερμοκρασίες υβριδισμού εκκινητών αλληλούχισης 109
3. Εκκινητές PCR και αλληλούχισης πρωτοκόλλου γενοτυπικής ανθεκτικότητας 119
4. Επιδημιολογικά γνωρίσματα των HIV-1 ασθενών της 1<sup>ης</sup> υπό μελέτη ομάδας 127
5. Επιδημιολογικά γνωρίσματα των HIV-1 ασθενών της 2<sup>ης</sup> υπό μελέτη ομάδας 141
6. Χαρακτηριστικά των δειγμάτων της 2<sup>ης</sup> υπό μελέτη ομάδας 143

**Γενικό Μέρος**

## Κεφάλαιο 1. Μοριακή Βιολογία του ιού HIV-1

### 1.1 Δομή

Τα ώριμα στελέχη του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) έχουν σφαιρική μορφολογία με διάμετρο 100-120 nm και αποτελούνται από μια διπλοειδή λιπιδική μεμβράνη που περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο (πυρήνα). Το νουκλεοκαψίδιο που έχει κωνικό σχήμα, περιέχει τα γενωμικά μόρια RNA, τα ιικά ένζυμα πρωτεάση (PR), αντίστροφη μεταγραφάση (RT), ιντεγκράση (IN), τις ικές συνοδευτικές πρωτεΐνες Vpu, Vif, Vpr και Nef, και μερικούς κυτταρικούς παράγοντες. Η λιπιδική διπλοειδής μεμβράνη έχει κυτταρική προέλευση και αποτελείται από 72 προεξοχές της ικής γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου (Env) και ορισμένες κυτταρικές πρωτεΐνες (Sierra *et al.*, 2005). Οι κύριες ικές δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν τον πυρήνα είναι η MA/p17, η οποία σχηματίζει το κέλυφος του πυρήνα και γειτνιάζει άμεσα με την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης διαμέσου των N-τελικών άκρων της (Wu *et al.*, 2004)· η CA/24, της οποίας οι N-τελικές της περιοχές συγκροτούνται σε εξαμερικούς δακτύλιους σχηματίζοντας το καψίδιο (Briggs *et al.*, 2003) και η NC/p7, η οποία σχετίζεται με τη συγκρότηση του καψιδίου και τη σταθεροποίηση του γενωμικού RNA (Goel *et al.*, 2002).

### 1.2 Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα του ιού HIV-1 αποτελείται από δύο ταυτόσημα 9.2 Kbp μονόκλινα RNA μόρια. Μέσα στα μολυσμένα κύτταρα η μορφή του γονιδιώματος έχει τη μορφή του προ-ιικού δίκλωνου DNA. Υπάρχουν τέσσερις διακριτές περιοχές στο γονιδίωμα του προ-ιού HIV-1 (Εικ 1.).

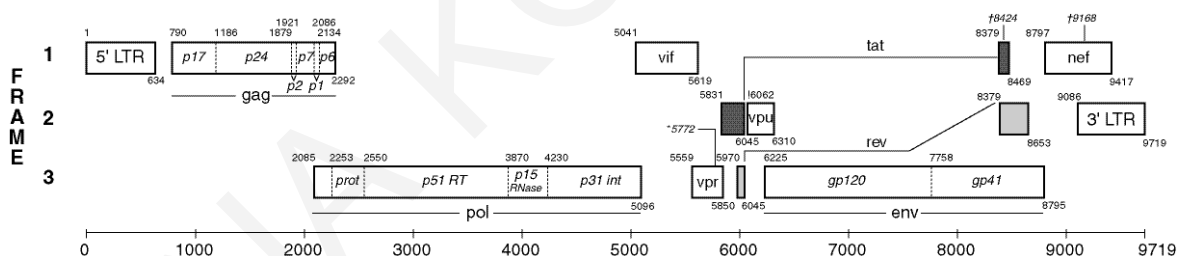
Η πρώτη περιοχή αντιστοιχεί στα μακριά τελικά επαναλαμβανόμενα τμήματα (LTRs) που δεν μεταφράζονται και βρίσκονται στα δύο άκρα των μορίων RNA, πλευρικά των κωδικών περιοχών. Τα δύο LTRs είναι περίπου 640 bp το κάθε ένα και έχουν την ίδια διάταξη αλληλουχιών. Το HIV-1 5' LTR αποτελεί ένα μοντέλο συστήματος υποκινητή, σε αντίθεση με το 3' LTR που λαμβάνει μέρος στην λήξη της μεταγραφής και την πολυαδενυλίωση. Το 3' LTR μπορεί να δράσει ως υποκινητής μόνο σε συνθήκες διατάραξης του 5' LTR (Ramirez de Arellano *et al.*, 2006). Η ρύθμιση της προ-ιικής γονιδιακής έκφρασης του HIV-1 συνδέεται στενά με τη δέσμευση κυτταρικών πρωτεϊνών σε μια ποικιλία cis-ενεργοποιητικών DNA αλληλουχιών που βρίσκονται στα LTRs (Pereira *et al.*, 2000). Κάθε LTR αποτελείται από τρεις υποπεριοχές την U3, την R και την

U5. Οι δύο πρώτες υποπεριοχές περιέχουν τέσσερις λειτουργικές περιοχές που σχετίζονται με τη ρύθμιση της HIV-1 μεταγραφής. Η περιοχή R (+1 έως +100 nt) φέρει την αλληλουχία transactivation response element (TAR), ενώ η περιοχή U3 (-454 έως -1 nt) τον υποκινητή (-78 έως -1 nt), ένα ενισχυτή (-104 έως -79 nt) και μια ρυθμιστική περιοχή (-454 έως -105 nt) (Ramirez de Arellano *et al.*, 2006, Pereira *et al.*, 2000). Η αλληλουχία TAR δεσμεύεται από την ική πρωτεΐνη Tat και ενεργοποιεί την παραγωγή ικών μεταγράφων (Richter *et al.*, 2002b). Ο υποκινητής περιέχει το στοιχείο TATAA στο οποίο δεσμεύεται ο μεταγραφικός παράγοντας TFIID και βρίσκεται 25 nt πάνω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Επίσης, περιέχει τρεις θέσεις δέσμευσης της πρωτεΐνης Sp1 και δύο για τον παράγοντα NF-κB (Freed, 2001). Ο ενισχυτής φέρει μοτίβα δέσμευσης, επίσης για τον NF-κB (Ramirez de Arellano *et al.*, 2006). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η ρυθμιστική περιοχή φέρει θέσεις αλληλεπίδρασης με πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως CREB, Ets, LEF-1, c-Myb, NF-AT, USF, COUP και πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς (Ramirez de Arellano *et al.*, 2006, Pereira *et al.*, 2000). Η περιοχή U5 (+100 έως +181 nt) περιέχει άλλες θέσεις δέσμευσης και αλληλεπίδρασης του DNA με κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως AP-1, AP3-like, Sp1, σημαντικούς για την μολυσματικότητα του ιού (Pereira *et al.*, 2000, Ramirez de Arellano *et al.*, 2006).

Οι υπόλοιπες τρεις περιοχές του HIV-1 γονιδιώματος αντιστοιχούν στις κωδικές περιοχές. Αρχικά είναι η περιοχή των γονιδίων *gag-pol* που κωδικοποιούν δύο πρόδρομες πολυ-πρωτεΐνες, την Gag πολυ-πρωτεΐνη (Pr55<sup>Gag</sup>) και την Gag-Pol πολυ-πρωτεΐνη (Pr160<sup>GagPol</sup>). Ακολουθεί η περιοχή του γονιδίου *env* που κωδικοποιεί το πρόδρομο πολυπεπίτιδιο Env(gp160) και τέλος είναι η περιοχή των γονιδίων *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpru* και *nef* που κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές και συνοδευτικές πρωτεΐνες (Freed, 2001, Sierra *et al.*, 2005). Συνολικά το HIV-1 γονιδίωμα εκφράζει 17 πρωτεΐνες: τέσσερις δομικές, MA/p17, CA/p24, NC/p7, p6 και δύο πεπίτιδια, p2 και p1 προερχόμενες από την επεξεργασία της Pr55<sup>Gag</sup> από την ική PR· τρία ένζυμα, RT, PR και IN προερχόμενες από την πρωτεολυτική διάσπαση της Pr160<sup>GagPol</sup> από την ική PR· τις δύο γλυκοπρωτεΐνες του Env, την επιφανειακή gp120 και τη διαμεμβρανική gp41, προερχόμενες από την πρωτεολυτική διάσπαση της πρωτεΐνης gp160 του HIV-1 από κυτταρικές πρωτεάσες· δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες, την Tat και την Rev και τέσσερις συνοδευτικές πρωτεΐνες, Nef, Vif, Vpr και Vpru.

Οι ικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά και με κυτταρικές πρωτεΐνες του ξενιστή. Έχει βρεθεί από μια πρόσφατη έρευνα, όπου κατασκευάστηκε μια βάση δεδομένων αλληλεπίδρασης ικών/κυτταρικών πρωτεϊνών ότι συνολικά 1448 ανθρώπινες

πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το HIV-1 μέσα από 2589 μοναδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η αλληλεπίδρασή με τις κυτταρικές πρωτεΐνες γίνεται είτε με άμεσο τρόπο (δέσμευση) στο 32% των αλληλεπιδράσεων της βάσης, είτε με έμμεσο τρόπο (ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν τα κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος) στο 68%. Το 37% των ανθρώπινων πρωτεϊνών στην προαναφερόμενη βάση δεδομένων βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με περισσότερες από μια HIV-1 πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα η μιτωτική πρωτεϊνική κινάση 1 (MAPK1) που αλληλεπιδρά με 10 διαφορετικές ιικές πρωτεΐνες, ενώ η μιτωτική πρωτεϊνική κινάση 3 (MAPK3), η πρωτεϊνική κινάση C-alpha (PRKCA) και η ιντερφερόνη-γ (interferon-gamma) με εννέα διαφορετικές ιικές πρωτεΐνες. Ένας μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων με κυτταρικές πρωτεΐνες έχει δημοσιευτεί για την ιική ρυθμιστική πρωτεΐνη Tat και τις πρωτεΐνες του φακέλου, 30% και 33% αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η Tat φαίνεται να αλληλεπιδρά με 273 διαφορετικές πυρηνικές πρωτεΐνες, από τις οποίες οι 40 είναι μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμιστές, ενώ 219 πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου χώρου αλληλεπιδρούν με τη gp120 και 67 με τη gp41, περιλαμβάνοντας 70 κυτταρικούς υποδοχείς, ιντεγκρίνες και μόρια προσκόλλησης (Ptak *et al.*, 2008).



**Εικόνα 1.** Γονιδίωμα του ιού HIV-1 (στέλεχος HXB2, αριθμός GeneBank K03455). Τα μεταφραστικά αναγνωστικά πλαίσια παρουσιάζονται ως ορθογώνια. Η έναρξη του γονιδίου ενδείκνυται από τον αριθμό στην πάνω αριστερή γωνία κάθε ορθογωνίου και αντιστοιχεί στην πρώτη θέση του κωδικονίου έναρξης ATG για το συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ ο αριθμός κάτω δεξιά αντιστοιχεί στη τελευταία θέση του κωδικονίου λήξης. Τα εξώνια των γονιδίων *tat* και *rev* είναι σκιασμένα. Στο HXB2, η θέση \*5772 δείχνει μια αλλαγή στο αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *vpr* που προκαλείται από ένα επιπλέον T, η θέση !6062 δεικνύει ένα ελαττωματικό κωδικόνιο έναρξης ACG στο γονίδιο *vpu*, οι θέσεις †8424 και †9168 επισημαίνουν ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στα γονίδια *tat* και *nef* (Kuiken *et al.*, 1999).

### 1.3 Δομικές Πρωτεΐνες

#### 1.3.1. Πρωτεΐνη MA/p17

Η πρωτεΐνη MA/p17 αποτελεί την N-τελική δομή της Pr55<sup>Gag</sup> (131 aa). Εμπλέκεται στη δέσμευση της Gag στην πλασματική μεμβράνη, στην ενσωμάτωση των Env



γλυκοπρωτεϊνών μέσα στο ιοειδές και σε γεγονότα πριν την είσοδο στο κύτταρο (Freed, 1998). Μετά την μετάφρασή της Pr55<sup>Gag</sup>, η δομή της MA τροποποιείται μετα-μεταφραστικά στο N-τελικό άκρο από το μυριστικό οξύ για να καταστεί δυνατή η δέσμευση της πλασματικής μεμβράνης από την Pr55<sup>Gag</sup>. Ακολούθως, αφού συγκροτηθεί και εξωκυτταρωθεί το ανώριμο ιοειδές θα επέλθει η πρωτεόλυση της Pr55<sup>Gag</sup> και η δομή της MA θα απελευθερωθεί. Μετά την πρωτεόλυση, η MA/p17 υφίσταται μια μετατόπιση και το τμήμα του N-τελικού άκρου της που τροποποιήθηκε από το μυριστικό οξύ απομονώνεται, χάνοντας μερικώς την ικανότητα δέσμευσης της στην κυτταρική μεμβράνη (Zhou *et al.*, 1996). Στο ώριμο ιοειδές η πρωτεΐνη MA/p17 σχηματίζει το κέλυφος του πυρήνα. Η MA/p17 βρίσκεται σε άμεση γεινίαση με την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης του φακέλου διαμέσου των N-τελικών άκρων της (Wu *et al.*, 2004). Κρυσταλλογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η MA/p17 βρίσκεται σε μορφή τριμερούς μέσα στα κύτταρα (Morikawa *et al.*, 2000). Η πρωτεΐνη διπλώνεται σε μια συμπαγή δομή, που αποτελείται κυρίως από α-έλικες και ένα β-πτυχωτό πλέγμα. Τα 30 αμινοξικά κατάλοιπα του C-τελικού της MA/p17 σχηματίζουν μια α-έλικα η οποία φαίνεται να συνδέει τις δομές MA και CA στην Pr55<sup>Gag</sup> (Freed, 1998).

### 1.3.2. Πρωτεΐνη CA/p24

Η δομή CA στην Pr55<sup>Gag</sup> έχει ένα σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση του ιοειδούς. Μετά την πρωτεόλυση της Pr55<sup>Gag</sup>, η ώριμη πρωτεΐνη CA/p24 σχηματίζει το καψίδιο του πυρήνα, ενώ ο ρόλος της επεκτείνεται στην ωρίμανση του ιοειδούς και σε γεγονότα πριν την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή (Freed, 1998). Αποτελείται από δύο ανεξάρτητες δομές, την N-τελική (1-145 aa) και την C-τελική (151-231 aa) που συνδέονται με ένα εύκαμπτο συνδετικό πεπτίδιο (Gamble *et al.*, 1997). Η N-τελική δομή (NTD) είναι αναγκαία για τη μορφογένεση του ώριμου, συμπυκνωμένου, κωνικού σχήματος πυρήνα (Dorfman *et al.*, 1994). Αποτελείται από επτά α-έλικες, δύο β-πτυχωτές επιφάνειες και μια εκτεταμένη θηλιά πλούσια σε προλίνη (P) η οποία δεσμεύεται από την κυτταρική ισομεράση κυκλοφιλίνη A (CypA). Αυτή η πρωτεΐνη πακετάρεται στα νεοσχηματιζόμενα ιοσωμάτια και ενισχύει την μολυσματικότητα του ιού (Gamble *et al.*, 1997). Το σύμπλοκο β-πτυχωτής επιφάνειας/ελίκων του NTD σταθεροποιείται από μια κρυμμένη γέφυρα άλατος. Ο σχηματισμός αυτής της γέφυρας επάγεται από το αμινοξικό κατάλοιπο θετικού φορτίου προλίνης P133 το οποίο συνδέεται με το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο ασπαρτικού (D) στη θέση 183, μέσα στην τρίτη α-έλικα. Αμινοξικές αλλαγές στο υψηλά συντηρημένο D183 της HIV-1 CA, όπως D183E (γλουταμινικό) και D183N (ασπαραγίνη) οδήγησαν

στη μείωση της ικής μολυσματικότητας σε διαπερατά T-κύτταρα και προκάλεσαν ασυνήθιστες μορφολογίες στον πυρήνα του ιού και καταστολή της αντίστροφης μεταγραφής. Επίσης, η αμινοξική αλλαγή D183N μειώνει την παραγωγή ισοματίων (Leschonsky *et al.*, 2007). Η C-τελική (CTD) σφαιρική δομή αποτελείται από τέσσερις έλικες και φέρει την κύρια ομόλογη περιοχή, η οποία είναι πολύ συντηρημένη ανάμεσα στους ρετροϊούς και είναι αναγκαία για την συγκρότηση των νεοσχηματιζόμενων ισοματίων αφού προάγει την αλληλεπίδραση Gag-Gag πρωτεϊνών (Dorfman *et al.*, 1994, Freed, 1998, Freed, 2001).

### 1.3.3. Πρωτεΐνη NC

Η πρωτεΐνη NC παρουσιάζει μη-ειδική και ειδική δέσμευση για το γονιδιωματικό HIV-1 RNA. Για την μη-ειδική δέσμευση ευθύνονται τα βασικά κατάλοιπα που περιβάλλουν δύο μοτίβα δακτύλων  $Zn^{+2}$  του τύπου «CCHC» που περιέχονται στο μόριο της NC. Για την ειδική δέσμευση συνεισφέρουν τόσο τα μοτίβα δακτύλων  $Zn^{+2}$ , όσο και τα βασικά κατάλοιπα που τους περιβάλλουν. Η NC ευθύνεται για την ειδική δεσμευση του RNA κατά τη διαδικασία δημιουργίας του καψιδίου που θα εμπερικλείει τον πυρήνα του νέου ιοειδούς (Freed, 2001). Η ικανότητα της NC να συμπεριφέρεται ως chaperone της επιτρέπει να τροποποιεί την πτύχωση των μορίων των νουκλεϊκών οξέων στην προτιμότερη ενεργειακά διαμόρφωση τους. Επίσης, λαμβάνει μέρος και σε πολλές άλλες διεργασίες του ικού κύκλου ζωής, όπως στις Gag-Gag αλληλεπιδράσεις, την αντίστροφη μεταγραφή και σταθεροποίηση του συμπλέγματος προ-ενσωμάτωσης (PIC) (Freed, 1998).

### 1.3.4 Πρωτεΐνη p6

Η περιοχή του πεπτιδίου p6 βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της Pr55<sup>Gag</sup> και είναι πλούσια σε προλίνη. Το αμινοξικό μοτίβο προλίνης-θρεονίνης-αλανίνης-προλίνης (PTAP) που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου ή αλλιώς L-δομή (late), ευθύνεται για την επιτυχή απελευθέρωση του νεοσχηματιζόμενου ιοειδούς από την πλασματική μεμβράνη (Freed, 1998, Freed, 2001).

## 1.4 Ενζυμικές Πρωτεΐνες

### 1.4.1 Πρωτεΐνη Αντίστροφη Μεταγραφή

Η HIV-1 RT καταλύει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής του μονόκλωνου HIV-1 RNA προς δίκλωνο DNA. Είναι ένα ένζυμο με πολλές λειτουργίες,

έχοντας δράσεις RNA κατευθυνόμενης DNA πολυμεράσης, DNA κατευθυνόμενης DNA πολυμεράσης και δράση ριβονουκλεάσης H (RNaseH). Η RT είναι ένα ασύμμετρο ετεροδιμερές δύο υπομονάδων, της p66 (66 kDa) και της p51 (51 kDa) με κοινό N-τελικό άκρο. Οι δύο υπομονάδες προέρχονται από την ίδια περιοχή της Pr160<sup>GagPol</sup> πρόδρομης πρωτεΐνης. Η p51 δημιουργείται όταν η C-τελική 15 kDa RNaseH δομή του p66 αφαιρεθεί από την PR (di Marzo Veronese *et al.*, 1986). Όλες οι ενζυμικές δραστηριότητες βρίσκονται στην p66 της RT, ενώ η p51 είναι καταλυτικά ανενεργή και έχει δομικό ρόλο (Le Grice *et al.*, 1991). Ο διμερισμός των δύο υπομονάδων και οι σχετικές στερεοδιατακτικές αλλαγές είναι αναγκαίες για τη λειτουργικότητα της RT. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η RT έχει μια αρχιτεκτονική όμοια με το δεξί χέρι με τέσσερις δομικές περιοχές, τα δάχτυλα, την παλάμη, τον αντίχειρα και τις συνδετικές δομές. Το ενεργό κέντρο της πολυμεράσης βρίσκεται στην παλάμη της p66 μέσα σ' ένα βαθύ σχίσμα (θέση δέσμευση του RNA) που σχηματίζεται από την παλάμη, τις δομές των δακτύλων και του αντίχειρα (Arnold *et al.*, 1992). Η p51 αν και περιέχει τις ίδιες δομικές περιοχές, έχει διαφορετική χωρική διάταξη με αποτέλεσμα να έχει μια κλειστή δομή, όπου η συνδετική δομή περιστρέφεται ώστε το ενεργό κέντρο της p51 να κρύβεται στο βάθος (Kohlstaedt *et al.*, 1992). Η ετεροδιμερής RT είναι η βιολογικά ενεργή μορφή του ενζύμου, ενώ οι μονομερείς υπομονάδες p66 και p51 παρουσιάζουν χαμηλή καταλυτική δραστηριότητα (Restle *et al.*, 1990).

#### 1.4.2 Πρωτεΐνη Πρωτεάση

Η HIV-1 PR είναι μέλος της οικογένειας των όξινων πρωτεασών και καταλύει την πρωτεολυτική επεξεργασία των Pr55<sup>Gag</sup> και Pr160<sup>GagPol</sup> πολύ-πρωτεϊνών. Η PR βρίσκεται σε μορφή ομοδιμερούς για να είναι λειτουργικό ένζυμο, αφού και οι δύο υπομονάδες συνεισφέρουν από ένα καταλυτικό κατάλοιπο D για να σχηματιστεί το ενεργό κέντρο (Navia *et al.*, 1989). Η θέση δέσμευσης για το υποστρώμα εντοπίζεται πάνω από το ενεργό κέντρο και καλύπτεται από δύο εύκαμπτα φύλλα (ένα από το κάθε μονομερές) που κλείνουν προς το ενεργό κέντρο μετά τη δέσμευση του υποστρώματος (Nicholson *et al.*, 1995). Το ένζυμο σταθεροποιείται στη μορφή του διμερούς από την αλληλεπίδραση ενός β-πτυχωτού πλέγματος τεσσάρων αντιπαράλληλων αλυσίδων με τέσσερα κατάλοιπα (κατάλοιπα 1-4 και 96-99) στα N-τελικά και C-τελικά άκρα των δύο PR υπομονάδων (Wlodawer *et al.*, 1989) και από ένα ικρίωμα δεσμών υδρογόνου που ενισχύουν το ενεργό κέντρο (Ingr *et al.*, 2003). Η PR έχει αυτοκαταλυτική ιδιότητα και είναι υπεύθυνη για τη δική της καταλυτική απελευθέρωση από το Pr160<sup>GagPol</sup>, ενώ οι πρώτες πρωτεολυτικές

εγκοπές φαίνεται να γίνονται ενδομοριακά (Pettit *et al.*, 2004). Ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην αυτοκαταλυτική αποκοπή της PR δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη.

### 1.4.3 Πρωτεΐνη Ιντεγκράση

Η HIV-1 IN έχει μοριακό βάρος 32 kDa και καταλύει την ενσωμάτωση του γραμμικού δίκλωνου HIV-1 DNA στο κυτταρικό χρωμόσωμα. Το ένζυμο της HIV-1 IN αποτελείται από τρεις διακριτές δομές, την NTD (κατάλοιπα 1-49), την καταλυτική δομή του πυρήνα (CCD, κατάλοιπα 50-212) και την CTD (κατάλοιπα 213-288). Η κρυσταλλική δομή της IN σε όλο το μήκος της ακόμη να διασαφηνιστεί. Υπάρχουν όμως οι κρυσταλλικές ή NMR δομές των επιμέρων δομών της IN και συγκεκριμένα του CCD με το NTD και του CCD με το CTD σε διάφορους συνδυασμούς, καθώς και η CCD δομή της IN με την πυρηνική κυτταρική πρωτεΐνη LEDGF/p75 (Marchand *et al.*, 2006). Και οι τρεις δομές είναι σημαντικές για τον πολυμερισμό του ενζύμου και είναι αναγκαίες για την επιτυχή συμπλήρωση της διαδικασίας του 3'-processing και της μεταφοράς του ιικού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή (strand transfer) (Chiu *et al.*, 2004). Η NTD περιέχει το συντηρημένο μοτίβο δέσμησης HHCC- (H12, H16, C40, C43) που δεσμεύει ένα άτομο ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ). Η δομή του δαχτύλου  $Zn^{2+}$  αποτελείται από μια  $\alpha$ -έλικα και μια  $\beta$ -πτυχωση που δεσμεύονται από ένα μόνο άτομο  $Zn^{2+}$ . Η δομή του δάχτυλου  $Zn^{2+}$  αναγνωρίζει ειδικά τρινουκλεοτίδια της DNA αλληλουχίας με την ενσωμάτωση πολλών  $\alpha$ -ελίκων στη μεγάλη αύλακα του DNA, συνεισφέροντας έτσι στη δυναμική και ειδική αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-DNA (Leon *et al.*, 2000). Η δέσμηση του  $Zn^{2+}$  σταθεροποιεί το δίπλωμα της NTD δομής και απαιτείται για την ενεργότητα της IN. Κάθε μονομερές IN δεσμεύει και από ένα ιόν  $Zn^{2+}$  (Zheng *et al.*, 1996). Μεταλλάξεις στο μοτίβο HHCC- διαταράσσουν τη λειτουργία της ενσωμάτωσης και της αντίστροφης μεταγραφής (Anthony, 2004). Η NTD φτιάχνει διμερή, διαφορετικά σε κρυσταλλικές δομές και σε δομές που βρίσκονται σε διαλύματα, στοιχείο που μαρτυρεί πολλαπλές διευθετήσεις των πολυμερών της IN σε τετραμερή σύμπλοκα της IN. Η δομή αυτή αλληλεπιδρά με τις κυτταρικές πρωτεΐνες IN1 και LEDGF/p75 (Chiu *et al.*, 2004, Marchand *et al.*, 2006, Van Maele *et al.*, 2005). Η δομή CCD περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Φέρει το μοτίβο DDE, που αποτελείται από τρία καταλυτικά αμινοξικά κατάλοιπα, στις θέσεις 64, 116 και 152 αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα αυτά δημιουργούν σύμπλοκα με δύο δισθενή μέταλλα ( $Mg^{2+}$  ή  $Mn^{2+}$ ) στο σύμπλεγμα που δημιουργείται με το ιικό και κυτταρικό DNA. Μετάλλαξη σε οποιαδήποτε από τα τρία αυτά κατάλοιπα οδηγεί στην απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας (Marchand *et al.*, 2006, Chiu *et al.*, 2004). Ειδικές και συνεχείς

μεταλλάξεις υπάρχουν και στις κωδικές θέσεις T66, S153 και M154 της IN, οι οποίες είναι συντηρημένες και πολύ κοντά στα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου του ενζύμου D64 και E152 (Anthony, 2004). Επίσης, βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στα βασικά κατάλοιπα 186-188, προκαλούν αδυναμία στον ολιγομερισμό των δύο διμερών IN μέσα στους ιούς και στο σύστημα yeast two hybrid (Berthoux *et al.*, 2007). Η δομή CTD δείχνει κάποια ομοιότητα με SH3 (Src homology domains) δομές. Πιστεύεται ότι συμμετέχει στη μη επιλεκτική δέσμευση του DNA (Anthony, 2004, Chiu *et al.*, 2004). Η IN φαίνεται ότι λειτουργεί σαν πολυμερές με την επικρατέστερη μορφή του τετραμερούς. Μεταλλάξεις στην IN επηρεάζουν διάφορες διαδικασίες, όπως την ενσωμάτωση ιικού DNA στο DNA του ξενιστή, την ική μορφολογία, τη σύνθεση πρωτεϊνών, την αντίστροφη μεταγραφή και την πυρηνική μεταφορά του συμπλόκου προ-ενσωμάτωσης (Harrich *et al.*, 2002).

### 1.5 Πρωτεΐνες του φακέλου

Η γλυκοπρωτεΐνη Env είναι ένα ετεροδιμερές της εξωτερικής πρωτεΐνης gp120 και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης gp41 που συνδέονται με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς. Η πρωτεΐνη gp120 φέρει τις θέσεις δέσμευσης του υποδοχέα CD4 και των συνυποδοχέων CCR5/CXCR4. Η gp120 είναι οργανωμένη μέσα σε πέντε συντηρημένες περιοχές (C1-C5) και πέντε ετερογενείς περιοχές (V1-V5), οι οποίες βρίσκονται κατά κύριο τρόπο σε θηλιές που δένονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (Freed, 2001, Sierra *et al.*, 2005). Η θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας του υποδοχέα CD4 προς την gp120 αντιστοιχεί σε ένα μικρό τμήμα της N-τελικής εξωκυτταρικής δομής. Η περιοχή της πρωτεΐνης gp120 που εμπλέκεται στη δέσμευση του υποδοχέα CD4 προσδιορίζεται στις συντηρημένες δομές C3 και C4 του gp120, ενώ και άλλες περιοχές του gp120 παίζουν ρόλο (Freed, 2001). Οι συνυποδοχείς του HIV-1, CXCR4 και CCR5 ανήκουν στην οικογένεια των G πρωτεϊνών με την 7-διαμεμβρανική δομή και έχουν ρόλο υποδοχέων των  $\alpha$  και  $\beta$  χυμοκινών, αντίστοιχα. Η θέση δέσμευσης του συνυποδοχέα δεν είναι εκτεθειμένη και αποκαλύπτεται μετά την δέσμευση του υποδοχέα CD4, λόγω μιας στερεοδιατακτικής αλλαγής όπου και την αποκαλύπτει. Η θέση αυτή σχηματίζεται από τις περιοχές V1/V2, V3-θηλιά και C4 (Sierra *et al.*, 2005). Η πρωτεΐνη gp41 αποτελείται από τρεις δομές, την εξωκυττάρια δομή, τη διαμεμβρανική δομή πρόσδεσης και την δομή που βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα μετά την πρόσδεση (Freed, 2001). Η gp41 προσδένει το σύμπλοκο gp120/gp41 στην μεμβράνη και περιέχει δομές που είναι αναγκαίες για την κατάλυση της μεμβρανικής σύντηξης μεταξύ της ικής και κυτταρικής λιπιδικής μεμβράνης κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Sierra *et al.*, 2005, Freed, 2001).

## 1.6 Ρυθμιστικές Πρωτεΐνες

### 1.6.1 Tat Πρωτεΐνη

Το παράγωγο του γονιδίου HIV-1 *Tat* κωδικοποιείται από δύο εξόνια. Τα δύο εξόνια κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 101 aa που είναι αναγκαία για την ική μεταγραφή από το HIV-1 LTR και τον βέλτιστο ικό αναδιπλασιασμό. Σε κάποια στελέχη παράγεται μια μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης των 72 aa που κωδικοποιείται από το πρώτο εξόνιο (Freed, 2001, Harrich *et al.*, 2002). Η *Tat* περιέχει πέντε διακριτές λειτουργικές δομές. Οι τρεις πρώτες περιλαμβάνουν μια περιοχή (1-20 aa) πλούσια σε P του N-τελικού άκρου, μια περιοχή (21-40 aa) πλούσια σε κυστεΐνη (C) και μια τρίτη δομή (41-48 aa) που περιέχει το μοτίβο αργινίνης-λυσίνης-γλυκίνης-λευκίνης-γλυκίνης-ισολευκίνης (RKGLGI). Οι πιο πάνω περιοχές αποτελούν την ενεργή δομή της *Tat* και αλληλεπιδρούν με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες. Τέταρτη στη σειρά είναι η δομική περιοχή (49-72 aa) που συμμετέχει στη δέσμευση της *Tat* με το TAR του RNA και στην πυρηνική μετατόπιση μέσω του σήματος NLS. Η πέμπτη δομική περιοχή (73-101 aa) προέρχεται από το δεύτερο εξόνιο και έχει άγνωστη λειτουργία (Liang *et al.*, 2002). Η *Tat* προσανατολίζει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες στον υποκινητή του LTR, καθώς και ένζυμα με ενεργότητα ιστονών και ακετυλοτρασφερασών τα οποία τροποποιούν τη διαμόρφωση της χρωματίνης στο σημείο ενσωμάτωσης του ικού DNA. Παρόλο που οι περισσότεροι παράγοντες που σχετίζονται με την *Tat* είναι ενεργοποιητές, άλλοι δρουν ως αναστολείς (Ramirez de Arellano *et al.*, 2006). Μετά την έναρξη της μεταγραφής του HIV-1 και την διαδοχική σύνθεση του TAR RNA, η ακετυλιωμένη HIV-1 *Tat* αλληλεπιδρά με το κυτταρικό σύμπλοκο pTEFb (cyclinT1/CDK9) (Bannwarth *et al.*, 2005). Η cyclinT1 δεσμεύει την *Tat* με ένα  $Zn^{2+}$ -εξαρτώμενο τρόπο μέσω της C261 και διευκολύνει τη σύνδεση της *Tat* στο TAR. Όταν το σύμπλοκο cyclinT1/*Tat* σχηματιστεί, η *Tat* προωθεί τη δέσμευση της cyclinT1 (nt 252-260) στην ουρακίλη της θέσης 31 (U31) της θηλιάς του TAR, ενώ η cyclinT1 προωθεί την αλληλεπίδραση της K50 του *Tat* με τη γλυκίνη της θέσης 34 (G34) της θηλιάς του TAR (Richter *et al.*, 2002a). Αυτή η αλληλεπίδραση ενδυναμώνει την συγγένεια και ειδικότητα της δέσμευσης της *Tat* στην περιοχή του TAR RNA με αποτέλεσμα τη διαδοχική φωσφορύλιωση του CDT της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II από την κινάση CDK9, αντίδραση αναγκαία για τον αποτελεσματικό πολυμερισμό του HIV-1 mRNA (Harrich *et al.*, 2002, Bannwarth *et al.*, 2005, Ramirez de Arellano *et al.*, 2006). Έχει βρεθεί ότι η *Tat* εμπλέκεται στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του HIV-1 RNA, είτε ως ενεργοποιητής κατά την έναρξη του κύκλου

αναδιπλασιασμού του ιού, είτε ως αναστολέας κατά τα τελευταία στάδια του κύκλου, εμποδίζοντας την πρόδρομη αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα και προωθώντας τη συγκρότηση του ιοειδούς (Liang *et al.*, 2002). Παράλληλα, η Tat αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με τις κυτταρικές πρωτεΐνες Sp1, TBP, TAF55, TAF250, TFIIB, RNAPII οι οποίες συμμετέχουν στο PIC (Bannwarth *et al.*, 2005). Επίσης, η Tat έχει διάφορες πλειοτροπικές επιδράσεις στα κύτταρα, όπως την επαγωγή της απόπτωσης στα T-κύτταρα, την ενεργοποίηση πολλών κυτταρικών γονιδίων κυτοκινών (IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) με ένα TAR ανεξάρτητο τρόπο, επάγει τον τροπισμό των πρωτεϊνών MCP-1 και IL-8 και επηρεάζει την έκφραση των χυμοκινών και των υποδοχέων χυμοκινών στα νευρικά και αιμοποιητικά κύτταρα (Harrich *et al.*, 2002).

### 1.6.2 *Rev* Πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη Rev είναι μία φωσφοπρωτεΐνη 19 kDa που κωδικοποιείται από δύο εξόνια. Η Rev περιέχει δύο λειτουργικές δομές: μια δομική περιοχή πλούσια σε R που χρειάζεται για τη δέσμευση του RNA και την είσοδο στον πυρήνα και ένα υδρόφοβο μοτίβο πλούσιο σε L, το οποίο μεσολαβεί για την εξαγωγή του ιικού RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Η Rev είναι η πρωτεΐνη που ευθύνεται για τη μεταφορά των ιικών RNA μεταγράφων από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Το RRE (Rev responsive element) είναι μια RNA αλληλουχία (250 nt) με υψηλή οργάνωση που εντοπίζεται στο γονίδιο *env* και είναι παρών σε όλα τα μη-συρραφώνα και μερικώς συρραφόμενα HIV-1 RNA μετάγραφα. Ένα οκταμερές Rev δεσμεύεται στην αλληλουχία RRE και ακολουθεί ο σχηματισμός ενός συμπλόκου που αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό μηχανισμό εξόδου από τον πυρήνα με αποτέλεσμα τα RNA μετάγραφα του HIV-1 που περιέχουν το RRE να μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για την μετάφρασή τους. Ακολούθως, η Rev επιστρέφει πίσω στον πυρήνα χρησιμοποιώντας το σήμα NLS που περιέχει (Freed, 2001, Pollard *et al.*, 1998).

## 1.7 Πρωτεΐνες με Συνοδευτικό ρόλο

### 1.7.1 *Vpr* Πρωτεΐνη

Η Vpr είναι μια εσωτερική μεμβρανική φωσφοπρωτεΐνη 81 aa (14 kDa), η οποία διενεργεί δύο κύριες λειτουργίες κατά τον αναδιπλασιασμό του HIV-1. Πρώτον, ενισχύει την απελευθέρωση του νεοσχηματιζόμενου ιοειδούς από τη μεμβράνη σχηματίζοντας ιοντικά αγωγίμους πόρους (Bell *et al.*, 2007, Ewart *et al.*, 1996, Nomaguchi *et al.*, 2008)

και δεύτερον, προωθεί την αποικοδόμηση των CD4 υποδοχέων μέσω του μονοπατιού ουμπικουϊτίνης/πρωτεοσώματος (Bell *et al.*, 2007, Nomaguchi *et al.*, 2008, Willey *et al.*, 1992, Iwatani *et al.*, 1997).

### 1.7.2 Vpr Πρωτεΐνη

Το γονίδιο *vpr* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Vpr, 96 aa (14 kDa), η οποία ενσωματώνεται μέσα στα ιοειδή και τροποποιεί διάφορες κυτταρικές διαδικασίες. Για την ενσωμάτωσή της στο ιοειδές ευθύνεται η αλληλεπίδραση της με μια περιοχή πλούσια σε L στην CTD δομή του πεπτιδίου p6. Μια από τις πιο κύριες κυτταρικές δράσεις της είναι η επαγωγή της στασιμότητας των κυττάρων στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου μέσω τριών μηχανισμών. Πρώτον, αλληλεπιδρά, με τις πρωτεΐνες 14-3-3σ, προκαλώντας φωσφορυλίωση και κυτταροπλασματική μετατόπιση στη φωσφατάση Cdc25c, κρατώντας το κύτταρο στη G2 φάση. Δεύτερον, αλληλεπιδρά με τη Rad3-σχετική κινάση, η οποία φωσφορυλιώνει στη συνέχεια την κινάση Chk1 η οποία αναστέλλει τη Cdc25c. Τέλος, ενεργοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου *survivin*, αυξάνοντας την έκφρασή του κατά τη G2 φάση, πιθανόν συνεισφέροντας στη διατήρηση της ζωτικότητας του κυττάρου κατά την ιική αντιγραφή. Η Vpr επάγει την απόπτωση των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων και σχετικών κυττάρων με την αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Andersen *et al.*, 2005, Bell *et al.*, 2007). Επιπλέον, επηρεάζει το ρυθμό μεταλλακτικότητας του HIV-1 με τον έλεγχο της ακρίβειας της αντίστροφης μεταγραφής, μέσω της αλληλεπίδρασής της με το UNG2, το ένζυμο SMUG και την uracil DNA γλυκοσυλάση. Η Vpr ενεργοποιεί ασθενώς την γονιδιακή έκφραση μέσω της αλληλεπίδρασής της με το μεταγραφικό παράγοντα Sp1, ο οποίος ενεργοποιεί τον υποκινητή του LTR. Επίσης, η Vpr διευκολύνει τη μεταφορά του PIC στον πυρήνα του κυττάρου και επάγει την επιλεκτική δραστηριότητα καναλιών κατιόντων (Bell *et al.*, 2007).

### 1.7.3 Vif Πρωτεΐνη

Η Vif είναι μία πρωτεΐνη 192 aa (23 kDa) ουσιαστική για τον ικό αναδιπλασιασμό στα κύτταρα του ξενιστή. Η Vif αντιδρά έναντι της αντιρετροϊκής δράσης της κυτταρικής πρωτεΐνης APOBEC3G μειώνοντας την έκφραση της και προλαμβάνοντας την ενσωμάτωσή της στα παραγόμενα ιοειδή κατά τη συγκρότηση τους. Αυτό γίνεται με τη δέσμευση της Vif στην APOBEC3G και εν συνεχεία στο σύμπλοκο ElonginB-ElonginC-Cullin5 E3 λιγάση. Ακολουθεί η ουμπικουϊτίνωση της δεσμευμένης APOBEC3G και η αποικοδόμησή της στα πρωτεοσώματα του κυτταροπλάσματος για αποικοδόμηση. Χωρίς



τη δράση της Vif, η ενσωματωμένη APOBEC3G θα κατάστρεφε τα ιικά μετάγραφα και θα διακόπτε την ιική γονιδιακή έκφραση στον επόμενο κύκλο αντιγραφής. Η APOBEC3G δρα με τη απαμίνωση της κυτοσίνης της αρνητικής αλυσίδας του ιικού DNA που παράγεται κατά την αντίστροφη μεταγραφή προς ουρακίλη, με αποτέλεσμα να παράγονται μεταλλάξεις από γουανίνη σε αδενίνη στη θετική αλυσίδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των αντίστροφων μεταγράφων πριν την ενσωμάτωσή τους και επιπλέον η εισαγωγή πολλών κωδικονίων λήξης στα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια των μεταγράφων δεν θα επέτρεπε τη μετάφρασή τους (Bell *et al.*, 2007, Schrofelbauer *et al.*, 2004, Navarro *et al.*, 2004, Kao *et al.*, 2003). Η Vif συσσωρεύεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου εκεί μπορεί να αλληλεπιδράσει με Gag πρωτεΐνες (Simon *et al.*, 1997), ενώ μπορεί επίσης να αναστείλει και τη δράση της PR (Kotler *et al.*, 1997). Επίσης, η Vif επηρεάζει το σχήμα και τη σταθερότητα του ιικού πυρήνα (Ohagen *et al.*, 2000).

#### 1.7.4 Nef Πρωτεΐνη

Η Nef είναι μια φωσφοπρωτεΐνη 206 aa (27 kDa) αναγκαία για την αντιγραφή των ιοειδών στο κύτταρο του ξενιστή και τη μολυσματικότητα των κυττάρων ξενιστών. Η Nef έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στη μεμβράνη και αυτό οφείλεται στην ομοιοπολική σύνδεση του μυριστικού οξέος με το N-τελικό άκρο της (Freed, 2001, Harrich *et al.*, 2002). Η έκφραση της Nef έχει πολλαπλές επιδράσεις στα κύτταρα. Μια από τις δράσεις της είναι η αρνητική ρύθμιση των επιπέδων των υποδοχέων CD4 και των πρωτεϊνών του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας της τάξης I και II (MHC-I, -II) στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της ενδοκύτωσης (Das *et al.*, 2005). Η Nef φέρει μια συντηρημένη θέση δέσμευσης για SH3 δομές (Src homology region 3), μια ιδιότητα που της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με κινάσες του τύπου Src-like και να επηρεάζει τις δράσεις τους, όπως για παράδειγμα με τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επιδρούν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η Tat-εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση (Joseph *et al.*, 2005). Παράλληλα, με την εισαγωγή του Nef στα νέο-σχηματιζόμενα ιοειδή είναι πιθανή και η προσέλκυση διάφορων κυτταρικών κινασών (Freed, 2001, Harrich *et al.*, 2002). Για παράδειγμα, οι ενεργές κινάσες MAPK και ERK1 μπορούν να φωσφορυλιώσουν διάφορες δομικές (CA/p24 και MA/p17) και συνοδευτικές πρωτεΐνες (Rev, Nef, Tat) *in vitro*, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η HIV-1 μολυσματικότητα (Yang *et al.*, 1999).

## 1.8 Αναδιπλασιασμός του ιού HIV-1

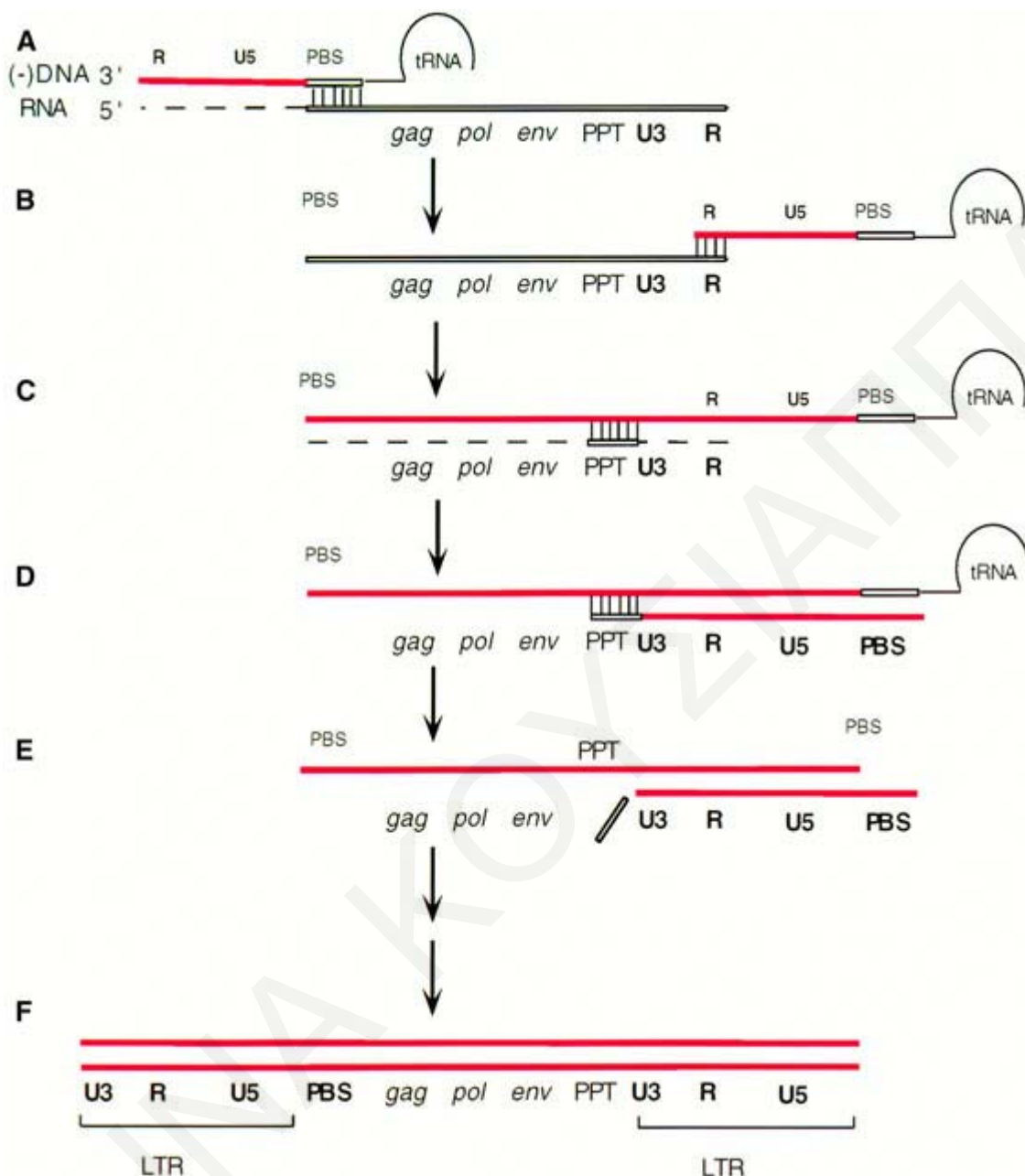
### 1.8.1 Είσοδος στο κύτταρο

Τα κύτταρα που προσβάλλονται από το HIV-1 είναι τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα του αιμοποιητικού συστήματος. Η λοίμωξη αρχίζει με την πρόσδεση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου. Η γλυκοπρωτεΐνη gp120 του ιού HIV-1 αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό υποδοχέα CD4 (Sattentau *et al.*, 1993) και αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση της gp120, με συνέπεια την αύξηση της συγγένειας δέσμευσης της με τους συνυποδοχείς CCR5 και CXCR4. Με τη δέσμευση του συνυποδοχέα προκαλείται μια στερεοδιατακτική αλλαγή στην gp41, που διευκολύνει τη μεμβρανική σύντηξη της ιικής και κυτταρικής μεμβράνης. Το υδρόφοβο N-τελικό άκρο και δύο μοτίβα επαναλαμβανόμενων επτάδων, η N-έλικα και η C-έλικα της εξωκυττάριας δομής της gp41 (πεπτιδίο σύντηξης) παίζουν ρόλο στη διαδικασία σύντηξης των δύο μεμβρανών. Οι δύο έλικες μιας τριμερούς gp41 πακετάρονται αντιπαράλληλα και δημιουργούν μια δέσμη έξι-ελίκων, οι οποίες με τη δέσμευση του CD4/συνυποδοχέα υφίστανται αλλαγές και επιτρέπουν στο N-τελικό άκρο της εξωκυττάριας περιοχής να εισέρθει στην μεμβράνη του κυττάρου (Melikyan, 2008, Murakami *et al.*, 2000).

### 1.8.2 Διεργασίες μετά την είσοδο στο κύτταρο

Μετά τη σύντηξη ο ιικός πυρήνας απελευθερώνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Κυτταρικοί πρωτεϊνικοί παράγοντες και οι ικές πρωτεΐνες MA/p17, Vif και Nef συμβάλλουν στην αποδιοργάνωση του ιικού πυρήνα και συγκεκριμένα στη διάσπαση της CA/p24 και την καταστροφή της. Η αποσυγκρότηση του πυρήνα οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου της αντίστροφης μεταγραφής (RTC) το οποίο αποτελείται από το HIV-1 RNA, την RT, τις MA, NC, Vpr, IN και το κυτταρικό μόριο tRNA<sup>lys3</sup> του οποίου τα τελευταία 18 nt είναι συμπληρωματικά της περιοχής primer binding site (PBS) του ιικού RNA (183-201 nt) (Bukrinsky, 2004, Freed, 2001, Harrich *et al.*, 2002). Το σύμπλοκο RTC για να φτάσει στην πυρηνική μεμβράνη χρησιμοποιεί τον κυτταροσκελετό. Στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος οι κινήσεις του RTC γίνονται σε συνεργασία με τον κυτταροσκελετό ακτίνης (Bukrinskaya *et al.*, 1998), ενώ η μετακίνηση προς τον πυρήνα με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (McDonald *et al.*, 2002).

Το ιικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε όλο το μήκος του σε δίκλωνο DNA από την RT μέσα στο κυτταρόπλασμα, καθώς το HIV-1 RTC σύμπλοκο μετακινείται (Bukrinsky, 2004, Harrich *et al.*, 2002). Η έναρξη της σύνθεσης του DNA αρχίζει με τη



**Εικόνα 2:** Διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής του HIV-1 γονιδιώματος. (A) Η σύνθεση της minus αλυσίδας του DNA (σε κόκκινο χρώμα) ξεκινά χρησιμοποιώντας ένα κυτταρικό tRNA που δεσμεύεται στο PBS. Η RNA αλυσίδα του ετερόδιπλου RNA:DNA αποικοδομείται από την RNaseH της HIV-1 RT. (B) Η πρώτη μεταφορά αλυσίδας επιτρέπει τον υβριδισμό του νεοσχηματιζόμενου DNA στο 3'-άκρο του ιικού γονιδιώματος. Η μεταφορά γίνεται χρησιμοποιώντας τις ταυτόσημες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (R). (C) Η λήξη της σύνθεσης της minus αλυσίδας του DNA συνοδεύεται από πέψη όλων των RNA τμημάτων, εκτός του PPT από την RNaseH. (D) Το PPT χρησιμοποιείται ως εκκινήτης για τη σύνθεση της δεύτερης DNA αλυσίδας. (E) Η RNaseH απομακρύνει το tRNA και το PPT. (F) Συμπλήρωση της σύνθεσης της δεύτερης αλυσίδας, καταλήγοντας σε ένα γραμμικό διπλό DNA με τα LTRs και στα δύο άκρα (Sarafianos SG *et al.*, 2001).

δέσμευση του tRNA<sup>lys3</sup> στην περιοχή PBS και με κατεύθυνση σύνθεσης το 5' άκρο του RNA, παράγεται ένα μονόκλωνο DNA προϊόν 181 nt ((-)ssDNA= minus-strand strong-stop DNA). Το RNA μέρος του υβριδίου RNA/DNA που σχηματίζεται αποικοδομείται

από την RT, μέσω της ενεργότητας της RNaseH (Freed, 2001, Harrich *et al.*, 2002) (Εικ. 2.A). Η αποτελεσματική έναρξη της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής απαιτεί την ύπαρξη μιας θηλιάς του HIV-1 RNA πλούσιας σε αδενίνες (169-172 nt) κοντά και λίγο πιο πάνω από το PBS, η οποία προσδένεται στη θηλιά του αντικωδικονίου του tRNA<sup>lys3</sup> και σταθεροποιεί το σύμπλοκο PBS/tRNA<sup>lys3</sup>/RT που δημιουργείται. Επίσης, η θέση TAR εμπλέκεται στην διαδικασία έναρξης της αντίστροφης μεταγραφής, αλλά το πώς, είναι άγνωστο. Προτάθηκαν δύο μηχανισμοί αλληλεπίδρασης της TAR, είτε με την άμεση δέσμευση της στην RT ή σε άλλες RNA αλληλουχίες για να σταθεροποιήσει το RTC, είτε προσελκύοντας παράγοντες που ενισχύουν την έναρξη της αντίδρασης (Harrich *et al.*, 2002). Το (-)ssDNA χρησιμοποιώντας τις ομόλογες περιοχές R των LTRs μεταναστεύει από το 5' άκρο στο 3' άκρο του HIV-1 γονιδιώματος, ένα στάδιο που ονομάζεται πρώτη μεταφορά αλυσίδας (first strand transfer) και χρησιμοποιείται ως εκκινήτης με κατεύθυνση το 3' άκρο του για τη σύνθεση της DNA αρνητικής αλυσίδας (Εικ. 2.B). Η λήξη της σύνθεσης της minus αλυσίδας του DNA συνοδεύεται από πέψη όλων των RNA τμημάτων, εκτός του polyurine tract (PPT) από την RNaseH (Εικ. 2.C). Η σύνθεση της DNA θετικής αλυσίδας συμβαίνει με την χρησιμοποίηση τμημάτων RNA που απέμειναν από τη σύνθεση της αρνητικής DNA αλυσίδας, όπως το PPT (Εικ. 2.D). Το tRNA<sup>lys3</sup> δεσμευμένο στο PBS απομακρύνεται από την RNaseH επιτρέποντας να γίνει η δεύτερη μεταφορά αλυσίδας (second strand transfer) (Εικ. 2.E). Η σύνθεση της θετικής αλυσίδας προχωρεί ως το τέλος της αρνητικής αλυσίδας (Εικ. 2.F). Στο κέντρο του γονιδιώματος υπάρχει μια επιπλέον θέση λήξης της αντιγραφής (CTS) στο 3' άκρο της πλούσιας σε αδενίνες περιοχής, με αποτέλεσμα 100 nt να εκτοπίζονται από τη θετική αλυσίδα και να σχηματίζεται ένα «κενό» στο κέντρο του DNA (Freed, 2001, Sarafianos SG *et al.*, 2001).

Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής επηρεάζεται επίσης από μερικές ικές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων οι Nef, Tat, Vif, Vpr, MA, NC/p7 και IN. Οι Nef και Vif δεν δρουν κατά τη διάρκεια έναρξης της αντίστροφης μεταγραφής, αλλά λόγω του ότι επηρεάζουν την μορφολογία του ιοειδούς, εν απουσία τους η αναποτελεσματική δέσμευση και αποσυγκρότηση του πυρήνα θα οδηγήσουν σε μια ελαττωματική σύνθεση του προϊκού DNA (Schwartz *et al.*, 1995). Η ακρίβεια της διαδικασίας αυτής επηρεάζεται επίσης από την κυτταρική πρωτεΐνη APOBEC3G εν απουσία της Vif (Kao *et al.*, 2003). Η Vpr φαίνεται να αναστέλλει την αμινοακετυλίωση του tRNA<sup>lys3</sup> με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμο να δράσει ως εκκινήτης (Stark *et al.*, 1998). Η NC/p7 βοηθά στον υβριδισμό του tRNA<sup>lys3</sup> στο RNA και αυξάνει την αποτελεσματικότητα της έναρξης της αντίστροφης μεταγραφής (Harrich *et al.*, 2002). Ο

ακριβής ρόλος της Tat δεν έχει εξακριβωθεί, ενώ η IN είναι αναγκαία για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής. Η CCD δομή της IN δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη στην έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής, αφού μεταλλάξεις στα συντηρημένα αμινοξέα DDE δεν εμπόδισαν την έναρξη της διαδικασίας. Αναγκαίες στη διαδικασία αυτή είναι η CTD και το συντηρημένο μοτίβο δέσμησης  $Zn^{+2}$  FKRR<sup>(185-188)</sup> της IN (F για φαινυλαλανίνη) (Harrich *et al.*, 2002).

Με την αποπεράτωση της αντίστροφης μεταγραφής η RT δίσταται από το σύμπλοκο, μειώνοντας το μέγεθος του συμπλόκου που θα περάσει από τον πυρηνικό πόρο και το οποίο μετατρέπεται σε σύμπλοκο προ-ενσωμάτωσης (PIC) που περιέχει το ιικό DNA, τις MA/p17, IN και Vpr και άλλους παράγοντες (Miller *et al.*, 1997). Το PIC αλληλεπιδρά με υποδοχείς εισδοχής της πυρηνικής μεμβράνης (importins  $\alpha/\beta$ , 7) και κυτταρικούς παράγοντες που προστατεύουν το ιικό DNA από την αποικοδόμηση και διευκολύνουν την ενσωμάτωσή του (Turelli *et al.*, 2001). Για την αλληλεπίδραση με τις importins ο ρόλος των ιικών πρωτεϊνών Vpr, MA/p17 και IN είναι ουσιαστικός αφού όλες φέρουν σήματα NLSs, αλλά η σχετική τους συνεισφορά είναι αβέβαιη (Bukrinsky, 2004). Η Vpr δεσμεύει την importin  $\alpha$  και αλλάζει την χημική της συγγένεια προς το NLS κατευθύνοντας το PIC προς την πυρηνική μεμβράνη (Poron *et al.*, 1998), όπου θα τη διαπεράσει διαμέσου του πυρηνικού πόρου (Haffar *et al.*, 2005). Επίσης, η Vpr δεσμεύεται άμεσα στις νουκλεοπορίνες της πυρηνικής μεμβράνης ενισχύοντας περισσότερο τη δέσμηση του PIC στον πυρηνικό πόρο (Le Rouzic *et al.*, 2002).

Πριν την ενσωμάτωση το ιικό DNA μπορεί να βρεθεί στον πυρήνα σε τρεις μορφές: γραμμικό, 1-LTR ή 2-LTR κύκλους. Το γραμμικό δίκλωνο HIV-1 DNA ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή μέσω της ιικής IN. Η τετραμερής IN τροποποιεί το ιικό DNA στα 3' LTRs άκρα του με μια διαδικασία που ονομάζεται 3'-processing και γίνεται στο κυτταρόπλασμα (Vandegraaff *et al.*, 2007). Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται ενδονουκλεολυτική κοπή των 3' άκρων του ιικού DNA και συγκεκριμένα στο συντηρημένο μοτίβο του δινουκλεοτιδίου CA, δίνοντας ένα ιικό DNA με υδροξυλιωμένο (3'-OH) ελεύθερο άκρο. Όταν το PIC εισέλθει στον πυρήνα θα αρχίσει η διαδικασία της μεταφοράς αλυσίδας (strand transfer). Τα δύο ελεύθερα 3'-OH άκρα του ιικού DNA δεσμεύονται στη 5' φωσφορική ομάδα του DNA του ξενιστή πάντα στην μεγάλη αύλακα του DNA, αφήνοντας ένα κενό πέντε βάσεων. Το 5'-άκρο του ιικού DNA τροποποιείται κόβοντας τα δύο τελευταία νουκλεοτίδια έτσι ώστε να ενωθεί με το 3'-OH DNA άκρο του ξενιστή. Τα κενά που δημιουργούνται φαίνεται ότι συμπληρώνονται από κυτταρικά ένζυμα που συμμετέχουν στις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA. Και οι δύο

αντιδράσεις, 3'-processing και strand transfer, καταλύονται μέσω της δημιουργίας συμπλόκου της IN με ένα δισθενές μέταλλο, το οποίο πιστεύεται ότι είναι το  $Mg^{2+}$ . Το  $Mg^{2+}$  δημιουργεί σύμπλοκο με το ελεύθερο 3'-OH άκρο του ιικού cDNA με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υδροξυλίου, ούτως ώστε να αντιδράσει με τη 5'-φωσφορική ομάδα του DNA του ξενιστή (Marchand *et al.*, 2006, Van Maele *et al.*, 2005, Vandegraaff *et al.*, 2007, Pommier *et al.*, 2005)

### 1.8.3 *Ιική γονιδιακή έκφραση*

Μετά την ενσωμάτωση, αρχίζουν οι πρώτοι κύκλοι μεταγραφής του προ-ιικού γονιδιώματος από την κυτταρική RNA πολυμεράση II, αφού πρώτα μερικοί κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες δεσμευτούν στην περιοχή LTR (πχ. NF-κB). Στην πρώιμη φάση του κύκλου αναδιπλασιασμού παράγονται μόνο τα πολλαπλώς συρραφώμενα mRNAs (1.7-2.0 kb mRNAs των Tat, Rev και Nef) και χρησιμοποιώντας την κυτταρική μηχανή επεξεργασίας τα μετάγραφα αυτά γίνονται capped στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο (5' UTR) και πολυαδενυλιώνονται στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο (3' UTR). Ακολούθως τα επεξεργασμένα συρραφώμενα mRNAs θα βγουν από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστούν από την κυτταρική μηχανή. Μόλις παραχθεί η κατάλληλη ποσότητα Tat, θα ενεργοποιηθεί η μετέπειτα μεταγραφή των HIV-1 γονιδίων, μέσω της δέσμευσης της Tat στην περιοχή TAR του LTR και σε άλλους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Harrich *et al.*, 2002). Όταν παραχθεί αρκετή ποσότητα Rev δίνεται σήμα, έτσι ώστε να παραχθούν τα μη-συρραφώμενα μετάγραφα (mRNAs των Pr55<sup>Gag</sup> και Pr160<sup>GagPol</sup> πολυπρωτεϊνών) ή τα μια μόνο φορά συρραφώμενα μετάγραφα (5 kb mRNAs των Env, Vif, Vpr και Vpr). Η Rev προσδέεται στην αλληλουχία RRE των προαναφερόμενων μεταγράφων και διευκολύνει την έξοδό τους διαμέσου της πυρηνικής μεμβράνης, αλληλεπιδρώντας με πυρηνικούς υποδοχείς εξόδου (πχ. CRM1), προφυλάσσοντας τα από τη συρραφή και επιτρέποντας τους να μεταφραστούν στο κυτταρόπλασμα (Pollard *et al.*, 1998).

Η παραγωγή ιικών πρωτεϊνών κινδυνεύει πρώτον, από τα δομικά μοτίβα στην 5' UTR περιοχή όπου αναστέλλουν την αναγνώριση από το ριβόσωμα και την έναρξη της μετάφρασης (Miele *et al.*, 1996) και δεύτερον, από την αναστολή της κυτταρικής μεταφραστικής μηχανής λόγω της επαγόμενης G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου από την ιική Vpr ή άλλες στρεσογόνες κυτταρικές καταστάσεις. Έχει προταθεί ένα μοντέλο για την έναρξη της μετάφρασης των HIV-1 μεταγράφων στο οποίο χρησιμοποιούνται cap-εξαρτώμενοι, καθώς και cap-μη εξαρτώμενοι μηχανισμοί (Yilmaz *et al.*, 2006). Στο

μοντέλο αυτό προτείνεται ότι κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης με το HIV-1, ο cap-εξαρτώμενος μηχανισμός είναι ο κύριος μηχανισμός και διατηρεί ένα επίπεδο ικής πρωτεϊνικής σύνθεσης που δεν είναι επιβλαβές για το κύτταρο. Σε μεταγενέστερα στάδια της λοίμωξης ή ως αντίδραση στο αυξημένο στρες του κυτταρικού περιβάλλοντος, ο cap-εξαρτώμενος μηχανισμός μπορεί να αντικατασταθεί από τον cap-μη εξαρτώμενο μηχανισμό. Στον cap-μη εξαρτώμενο μηχανισμό μοναδικά μοτίβα στα εναλλακτικά 5' UTRs ενός ή και περισσοτέρων HIV-1 μεταγράφων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά σήματα έναρξης της μετάφρασης χωρίς την ύπαρξη του capped 5' UTR άκρου. Αυτά τα μοτίβα περιέχουν ένα εσωτερικό σήμα εισόδου στα ριβοσώματα (IRES) που διευκολύνει τη σύνθεση των προϊόντων των ικών γονιδίων με ένα ανεξάρτητο τρόπο ως προς τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα κατά τη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου όπου η cap-εξαρτώμενη μετάφραση μειώνεται, η HIV-1 πρωτεϊνική σύνθεση δεν μειώνεται, γεγονός που ενισχύει τη χρησιμοποίηση του cap-μη εξαρτώμενου μηχανισμού (Yilmaz *et al.*, 2006).

Η μετάφραση του HIV-1 τροποποιείται, είτε με θετικό είτε με αρνητικό τρόπο, από την αλληλεπίδραση της δομής TAR με κυτταρικούς παράγοντες που δεσμεύονται σ' αυτό στο κυτταρόπλασμα. Μεταλλάξεις στην περιοχή του TAR RNA μειώνουν αισθητά την HIV-1 μεταγραφή, τη μετάφραση και την ική παραγωγή. Η δευτεροταγής δομή του TAR μπορεί να μπλοκαριστεί από την ενεργή μορφή της πρωτεϊνικής κινάσης R (PKR). Στην παρουσία των κυτταρικών πρωτεϊνών La autoantigen και TAR RNA δεσμευτική πρωτεΐνη (TRBP), που δεσμεύονται στο TAR, αυξάνεται η επαγόμενη (Bannwarth *et al.*, 2005).

Το γονίδιο *env* μεταφράζεται στην πρόδρομη πρωτεΐνη gp160 μέσα στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η πρωτεΐνη μετα-μεταφραστικά εισέρχεται στον αυλό του ER, όπου και γλυκοζυλιώνεται. Μέσα στο ER η gp160 σχηματίζει ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και πολυμερίζεται συνήθως σε τριμερές, αν και μπορεί να ανιχνευτούν και διμερή και τετραμερή. Στη συνέχεια η gp160 μεταφέρεται μέσω του μονοπατιού έκκρισης κυστιδίων προς την πλασματική μεμβράνη, όπου και θα ενσωματωθεί. Κατά την πορεία της προς την κυτταρική μεμβράνη στο διάστημα που παραμένει στο σύστημα Golgi πρωτεολύεται από την κυτταρική πρωτεάση (της οικογένειας των furin) για να παραχθούν οι γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41. Η πρωτεόλυση γίνεται στο C-τελικό άκρο ενός συντηρημένου K/R-X-K/R-R μοτίβου. Ακολούθως, η gp41 αλληλεπιδρά μη-ομοιοπολικά με τη gp120 και προσδένει το σύμπλοκο Env στην πλασματική μεμβράνη. Παράλληλα, τα γονίδια *gag-pol* μεταφράζονται αρχικά παράγοντας την Pr55<sup>Gag</sup>, η οποία είναι 55kDa και κατά την

ωρίμανση του νέου ιού επεξεργάζεται πρωτεολυτικά δίνοντας τέσσερεις δομικές πρωτεΐνες και δύο πεπτίδια, οι οποίες συμβάλουν στη συγκρότηση του ιικού σωματίου. Μια προγραμματισμένη μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου του συντηρημένου επταμερούς UUUUUUA κατά τη μετάφραση της Pr55<sup>Gag</sup> στο ριβόσωμα, οδηγεί στην έκφραση της Pr160<sup>GagPol</sup>. Σε αντίθεση με το Pr55<sup>Gag</sup> που η έναρξη του αναγνωστικού πλαισίου ξεκινά με το δεύτερο U στην πιο πάνω αλληλουχία, για το Pr160<sup>GagPol</sup> η έναρξη ξεκινά από το πρώτο U. Το πρώτο U σχηματίζει μέρος της θηλιάς που ενδυναμώνει τη ριβοσωμική ολίσθηση στο mRNA με αποτέλεσμα την -1 μετατόπιση και τη μετάφραση της Pr160<sup>GagPol</sup> (Hill *et al.*, 2005). Η στρατηγική της αλλαγής του αναγνωστικού πλαισίου διασφαλίζει ότι η οι Pol πρωτεΐνες εκφράζονται στο 5-10% των Gag πρωτεϊνών. Η αλλαγή αυτή διασφαλίζει τη διατήρηση του λόγου 20 Gag μόρια για κάθε ένα Gag-Pol μόριο (Jacks *et al.*, 1988). Η διατήρηση του λόγου 20:1 είναι κρίσιμο στάδιο για το διμερισμό του RNA, τη συγκρότηση του ιοειδούς, την αντιγραφή και τη μολυσματικότητα. Οι Pr55<sup>Gag</sup> και Pr160<sup>GagPol</sup> μεταφέρονται και αυτές στην περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης, όπου ακολουθεί η συγκρότηση του νέου ιοειδούς (Derdowski *et al.*, 2004).

#### 1.8.4 Παραγωγή του ιικού σωματιδίου

Μετά τη σύνθεση των ιικών πρωτεϊνών θα αρχίσει η συγκρότηση του ιοειδούς που λαμβάνει χώρα στην κυτταρική μεμβράνη. Τα ιικά ένζυμα, το πλήρες-μήκους γονιδιωματικό RNA και διάφοροι κυτταρικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν τον ανώριμο πυρήνα του ιοειδούς. Τον κύριο ρόλο σε αυτή την διαδικασία έχει η Pr55<sup>Gag</sup>, η οποία φέρει καθοριστικά στοιχεία που τη στοχεύουν και τη δεσμεύουν στην κυτταρική μεμβράνη, προωθούν τις αλληλεπιδράσεις Gag-Gag, τη δημιουργία του καψιδίου του πυρήνα του ιοειδούς, την αλληλεπίδραση με τις γλυκοπρωτεΐνες Env και την ενεργοποίηση της εξωκυττάρωσης. Η δομή μεμβρανικής αλληλεπίδρασης (M) της MA της Pr55<sup>Gag</sup> ευθύνεται για τη στόχευση και τη δέσμευση της κυτταρικής μεμβράνης. Η δομή M αποτελείται από την μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη δομή της MA στο N-τελικό άκρο της από το μυριστικό οξύ (Gheysen *et al.*, 1989). Παράλληλα, η δομή MA πτυχώνεται ούτως ώστε να εκτεθούν μερικά βασικά κατάλοιπα τα οποία θα δεσμευθούν στην μεμβράνη. Αυτή η θετικά φορτισμένη όψη της MA αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα όξινα φωσφολιπίδια της εσωτερικής πλευράς της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της μεμβρανικής δέσμευσης (Morikawa, 2003, Zhou *et al.*, 1994). Η δημιουργία του καψιδίου του πυρήνα του ιοειδούς που θα εσωκλείσει το γονιδιωματικό RNA του ιού ενεργοποιείται από την δομή αλληλεπίδρασης (I). Η δομή I βρίσκεται στο N-



τελικό άκρο της NC της Pr55<sup>Gag</sup> και αλληλεπιδρά με το σήμα πακεταρίσματος (ψ-site) (Freed, 2001, Morikawa, 2003, Sandefur *et al.*, 2000), που βρίσκεται στο RNA 5' άκρο του κωδικονίου έναρξης του gag και αποτελείται από τέσσερις δομές μίσχου-θηλιάς (SL1-SL4). Πέραν των αλληλεπιδράσεων Gag/μεμβράνης και Gag/RNA, η Gag όταν φτάσει στην πλασματική μεμβράνη αλληλεπιδρά και με άλλα μόρια Gag για την συγκρότηση του ιοειδούς. Για την αλληλεπίδραση αυτή ευθύνονται οι δομές του C-τελικού άκρου της δομής της CA, το πεπτίδιο p2 και η N-τελική περιοχή της NC (Freed, 2001).

Το τελικό στάδιο της διαδικασίας του αναδιπλασιασμού του ιού HIV-1 είναι η απελευθέρωση του νεοσχηματιζόμενου ιοειδούς από τη μεμβράνη με εξωκυττάρωση παράγοντας ένα ανώριμο ιοειδές. Η δομή p6 της Pr55<sup>Gag</sup> φέρει τη δομή L, η οποία προωθεί την απελευθέρωση του ιοειδούς (Morikawa, 2003, Huang *et al.*, 1995). Για την ική συγκρότηση και εξωκυττάρωση είναι αναγκαίο να υπάρχει μια μείωση στον αριθμό των CD4 μορίων που βρίσκονται στη μεμβράνη για να μην αλληλεπιδράσουν με τα νεοσυντιθέμενα gp120. Οι HIV-1 Nef, Env και Vpu έχουν το ρόλο τους στη διαδικασία αυτή. Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης το Nef συγκεντρώνει με ενδοκύτωση και άμεση αποικοδόμηση τα CD4 μόρια (Das *et al.*, 2005). Σε μετέπειτα στάδια, η πρόδρομη πρωτεΐνη gp160 παγιδεύει τα νεοσυντιθέμενα CD4 μόρια μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τέλος η Vpu επάγει την αποικοδόμηση αυτών των μορίων και απελευθερώνει τα gp160 μόρια επιτρέποντας την ωρίμανση τους και τη μετανάστευση τους (Iwatani *et al.*, 1997, Freed, 2001). Η εξωκυττάρωση διεγείρει την ενεργοποίηση της PR, η οποία αυτοκαταλυτικά αποκόβεται από την Pr160<sup>GagPol</sup> και εν συνεχεία, πρωτεολύει τις Pr55<sup>Gag</sup> και Pr160<sup>GagPol</sup> πρόδρομες πολύ-πρωτεΐνες απελευθερώνοντας τις δομικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα. Η πρωτεόλυση θέτει σε ενεργοποίηση μια σειρά από δομικές αναδιατάξεις που θα οδηγήσουν στην ωρίμανση του ιού. Το πιο ορατό αποτέλεσμα της ωρίμανσης του HIV-1 ιοειδούς είναι η αλλαγή της μορφολογίας του πυρήνα του ιοειδούς, το οποίο μετατρέπεται από ένα κυκλικό πυρήνα που έχει αραιό ηλεκτρονιακό κέντρο σε ένα κωνικό πυρήνα με ένα πυκνό ηλεκτρονιακό κέντρο. Η κάθε πρωτεΐνη στη συνέχεια θα υποστεί επιπλέον αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, όπως την αλληλεπίδραση των CA και NC για να σχηματίσουν το κωνικό νουκλεοκαψίδιο (Freed, 2001).

## Κεφάλαιο 2. Μοριακή Επιδημιολογία του ιού HIV

### 2.1 Η πανδημία του ιού HIV-1/AIDS

Από τις αρχές της δεκαετίας του 80' όπου ταυτοποιήθηκε ο ιός HIV ως το αίτιο που προκαλεί το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), η ανθρωπότητα βιώνει μία από τις μεγαλύτερες πανδημίες στην ιστορία της. Το AIDS είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως και υπολογίζεται ότι μέχρι σήμερα έχουν χάσει τη ζωή τους πέραν των 30 εκατομμυρίων ανθρώπων. Ο ιός HIV προκαλεί κατάπτωση του ανοσολογικού συστήματος του ασθενούς, αφήνοντας τον έρμαιο σε πληθώρα μολύνσεων και καρκίνων που τελικά επιφέρουν το θάνατο. Μεταδίδεται κυρίως από σωματικά βιολογικά υγρά όπως αίμα, σπέρμα, κολπικά υγρά και μητρικό γάλα. Οι πιο διαδεδομένοι τρόποι μετάδοσης του είναι από μη ασφαλή σεξουαλική επαφή, μη αποστειρωμένες βελόνες, μεταγγίσεις μη ελεγμένου αίματος και κατά τον τοκετό ή το θηλασμό από τη θετική μητέρα στο βρέφος.

Η πρόοδος που έχει επιτευχθεί όσον αφορά στην καταγραφή και αρχειοθέτηση των ασθενών με ιό HIV σε πολλές χώρες, καθώς και οι βελτιωμένες υπολογιστικές αναλύσεις, έχουν δώσει την ευκαιρία στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και στο Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το AIDS/HIV (UNAIDS) να υπολογίσουν κατά προσέγγιση τον αριθμό των ασθενών που ζουν σήμερα ανά το παγκόσμιο. Από τα δεδομένα του UNAIDS φαίνεται ότι η επιδημία έχει σταθεροποιηθεί, αλλά σε ένα απρόσμενα υψηλό αριθμό. Ο αριθμός των ατόμων που πάσχουν από AIDS ανά το παγκόσμιο έχει φθάσει το 2007 στα  $33 \times 10^6$  άτομα και ο ετήσιος αριθμός νέων HIV μολύνσεων έχει μειωθεί από  $3.0 \times 10^6$  το 2001 σε  $2.7 \times 10^6$  το 2007. Οι νέοι άνθρωποι μεταξύ 15-24 ετών αποτελούν το 45% των νέων HIV μολύνσεων στους ενήλικες (UNAIDS, 2008). Η υπο-Σαχάρια Αφρική παραμένει ως η πιο επηρεαζόμενη περιοχή του πλανήτη μετρώντας για το 67% του παγκόσμιου ποσοστού μολυσμένων με HIV ατόμων και για το 72% των θανάτων ανά το παγκόσμιο από AIDS το 2007. Στην υπο-Σαχάρια Αφρική, οι περισσότερες επιδημίες έχουν σταθεροποιηθεί ή έχουν αρχίσει να μειώνονται. Πέραν της Αφρικής, οι μολύνσεις με τον ιό HIV-1 αυξάνονται σε διάφορες χώρες, όπως η Ανατολική Ευρώπη, η Κεντρική Ασία και η Νοτιο-Ανατολική Ασία, επηρεάζοντας ομάδες πληθυσμού όπως οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (IDUs), ομοφυλόφιλους άνδρες και ιερόδουλες (UNAIDS, 2008). Ο αριθμός ατόμων που ζει με τον ιό HIV-1 στην Καραϊβική, τη δεύτερη πιο επηρεαζόμενη περιοχή του κόσμου, έχει σταθεροποιηθεί και η επικράτηση του HIV-1 δεν διαφοροποιήθηκε το 2005 σε σχέση με το 2003 (UNAIDS/WHO, 2005). Το γενικό

ποσοστό των γυναικών που είναι μολυσμένες με HIV έχει μείνει σταθερό γύρω στο 50% για πολλά χρόνια ανά το παγκόσμιο (UNAIDS, 2008). Έχει υπολογιστεί ότι το 2007 ζούσαν  $15.4 \times 10^6$  γυναίκες μολυσμένες με τον ιό HIV-1 σε σχέση με  $13.8 \times 10^6$  το 2001. Αντίστοιχα, και στους μολυσμένους με HIV-1 άντρες το ποσοστό που υπολογίστηκε το 2007 ήταν  $15.4 \times 10^6$  σε σχέση με  $13.7 \times 10^6$  το 2001. Ωστόσο, το ποσοστό των γυναικών που μολύνονται αυξάνει σε ορισμένες περιοχές (UNAIDS/WHO, 2007), όπως η Ασία, η Λατινική Αμερική, η Καραβαϊκή, η Ανατολική Ευρώπη, η Κεντρική Ασία και η υπο-Σαχάρια Αφρική (UNAIDS, 2008). Ο ετήσιος αριθμός νέων HIV μολύνσεων ανάμεσα στα παιδιά ανά το παγκόσμιο έχει μειωθεί από το 2002, καθώς οι υπηρεσίες λαμβάνουν τα απαραίτητα μέτρα για την ελαχιστοποίηση της μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί κατά τον τοκετό ή το θηλασμό. Παγκοσμίως, ο αριθμός των παιδιών κάτω των 15 ετών που ζουν με το HIV αυξήθηκε από  $1.6 \times 10^6$  το 2001 σε  $2.0 \times 10^6$  το 2007. Το 90% αυτών των παιδιών ζουν στην υπο-Σαχάρια Αφρική. Περίπου 370,000 παιδιά κάτω των 15 ετών έχουν μολυνθεί μέσα στο 2007. Από το 2003 και μετά, υπήρξε μείωση στο ρυθμό θανάτων παιδιών με AIDS, κάτι που οφείλεται στην αναβάθμιση της προσφερόμενης αντιρετροϊκής θεραπείας (UNAIDS, 2008).

## 2.2 Γενετική ταξινόμηση του ιού HIV

### 2.2.1 Οι τύποι του ιού HIV

Ο ιός HIV-1 μαζί με τον ιό HIV-2 είναι οι δύο τύποι του HIV. Έχουν εξελιχθεί από την ομάδα του γένους *lentiviruses* (λεντιϊών) της υποοικογένειας *Orthoretrovirinae*, οικογένεια *Retroviridae* (Ρετροϊοί) που προσβάλλουν τα κύτταρα των πρωτεύοντων στην Κεντρική Αφρική (Gao *et al.*, 1999). Αντιπροσωπεύουν δια-ειδικές ζωνοτικές μολύνσεις από συγκεκριμένα πρωτεύοντα στον άνθρωπο. Και οι δύο αυτοί τύποι του ιού προκαλούν την ασθένεια AIDS. Ο HIV-1 κατανέμεται ανά το παγκόσμιο και είναι υπεύθυνος για την πλειοψηφία των λοιμώξεων. Αντιθέτως, ο HIV-2 περιορίζεται στη Δυτική Αφρική και στη νότιο-δυτική Ινδία (Schim van der Loeff *et al.*, 1999). Σποραδική επικράτηση και μικρές μεταδοτικές εξαπλώσεις του HIV-2 έχουν αναφερθεί σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες (Cilla *et al.*, 2001, Damond *et al.*, 2004) και σε χώρες της Βορείου και Νοτίου Αμερικής, (Sullivan *et al.*, 1998) καθώς και στην Κορέα (Nam *et al.*, 2006). Η σεξουαλική και η κατά τον τοκετό μετάδοση του HIV-2 είναι λιγότερο αποτελεσματική από ότι του HIV-1 (Kanki *et al.*, 1994). Η παρατήρηση αυτή συνεισφέρει στη διατήρηση ενός χαμηλού ιικού φορτίου κατά τη διάρκεια της ασυμπτωματικής φάσης και μαζί με τη γεωγραφική απομόνωση του

HIV-2, είναι οι λόγοι που ο αριθμός των ατόμων με τη λοίμωξη HIV-2 παραμένει μικρός (Schim van der Loeff *et al.*, 1999). Έχει παρατηρηθεί διπλή μόλυνση με τους ιούς HIV-1 και HIV-2 σε περιοχές που υπάρχουν και οι δύο τύποι στελεχών (Rayfield *et al.*, 1988). Το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί κυρίως στη Δυτική Αφρική που ο HIV-2 είναι ενδημικός, αλλά έχει επίσης περιγραφεί στην Ινδία, τη Βραζιλία και την Ευρώπη (Gottlieb *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Γενετική ταξινόμηση του ιού HIV-1

Ο ιός HIV-1 βρίσκεται ανάμεσα στα ανθρώπινα παθογόνα με τη μεγαλύτερη φυσική ετερογένεια (Wain-Hobson, 1993). Η εκτενής γενετική ποικιλότητα του ιού αυτού προκαλείται από διάφορους παράγοντες, όπως την εισαγωγή μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής λόγω απουσίας επιδιορθωτικών μηχανισμών των λαθών του ενζύμου RT (Roberts *et al.*, 1988), τον υψηλό ρυθμό ιικής παραγωγής ( $10^{10}$  σωματίδια ανά μέρα) (Ho *et al.*, 1995) και τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Robertson *et al.*, 1995). Οι φυλογενετικές αναλύσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *env* από στελέχη του ιού HIV-1 έδειξαν ότι ο ιός ταξινομείται σε τρεις ομάδες την M (Main), την O (Outlier) και την N (Non-M, Non-O) (Robertson *et al.*, 2000). Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών που παράγονται από το γονίδιο *env* των ομάδων M και O διαφέρουν κατά 30-50%, ενώ της N απέχουν φυλογενετικά ίση απόσταση από την M και O (Kandathil *et al.*, 2005).

Η κυριότερη ομάδα είναι η M, η οποία προκαλεί το 99,6% των λοιμώξεων. Διαχωρίζεται σε εννέα γενετικούς υπότυπους: A, B, C, D, F, G, H, J και K και πολλές ανασυνδυασμένες μορφές επιδημικές και μή (Robertson *et al.*, 2000). Περιγράφεται διεξοδικά παρακάτω.

Στις αρχές του '90 αναγνωρίστηκαν τα πρώτα στελέχη της ομάδας O στο Καμερούν που διαφέρουν αρκετά από τις αλληλουχίες άλλων HIV-1 στελεχών (Gurtler *et al.*, 1994). Οι λοιμώξεις με στελέχη της ομάδας O περιορίζονται σε χώρες της Δυτικής Κεντρικής Αφρικής (Καμερούν, Γκαμπόν, Νιγηρία), αλλά υπάρχουν και σποραδικές περιπτώσεις ακόμη και σε άλλες χώρες της Δυτικής Αφρικής και σε χώρες της Νοτιο-Ανατολικής Αφρικής (Peeters *et al.*, 1997). Οι μολύνσεις με στελέχη της ομάδας O σε αυτές τις περιοχές αντιπροσωπεύουν μια πολύ μικρή μειονότητα των HIV-1 μολύνσεων (Peeters *et al.*, 1997, Roques *et al.*, 2002). Η γενετική ετερογένεια ανάμεσα στα στελέχη της ομάδας O είναι υψηλότερη από στελέχη των υπότυπων της ομάδας M (Roques *et al.*, 2002). Σε μια έρευνα των Roques *et al.*, το 2002, αν και χαρακτηρίστηκαν τρία μεγάλα

φυλογενετικά υποσύνολα στην ομάδα O (A, B και C, με μεγαλύτερο το υποσύνολο A), η διάκριση σε υπότυπους δεν ήταν δυνατή σε σχέση με την έντονη ταξινόμηση της παγκόσμιας ομάδας M σ' ένα φυλογενετικό δένδρο που οδήγησε στην αναγνώριση υποτύπων (Roques *et al.*, 2002).

Το 1995 βρέθηκαν στελέχη του ιού HIV-1 που είναι πολύ διαφορετικά από στελέχη της ομάδας M και O με αποτέλεσμα να σχηματίσουν την ομάδα N του ιού HIV-1 (Ayoub *et al.*, 2000). Λοιμώξεις με στελέχη της ομάδας N έχουν βρεθεί κυρίως στο Καμερούν, ενώ το ποσοστό των ατόμων που είναι μολυσμένοι είναι πολύ μικρό (Simon *et al.*, 1998). Δεν έχουν αλληλουχηθεί πολλά στελέχη της ομάδας N και γι' αυτό το λόγο δεν έχουν αναγνωριστεί υπότυποι της (Los Alamos HIV and SIV Nomenclature, 2009).

#### 2.2.2.1 HIV-1 Υπότυποι

Η κύρια ομάδα M, ταξινομείται σε εννέα διακριτούς γενετικούς υπότυπους: A-D, F-H, J και K (Robertson *et al.*, 2000). Οι υπότυποι E και I που περιγράφηκαν προηγουμένως και αναφέρονταν σε παλαιότερη βιβλιογραφία λείπουν από την ονοματολογία. Ο λόγος είναι ότι δεν βρέθηκε ακόμη η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος τους που να είναι χαρακτηριστική και μοναδική έτσι ώστε να μπορέσει να χαρακτηριστεί ως ξεχωριστός υπότυπος. Ο «υπότυπος E» μετονομάστηκε σε CRF01\_AE (βλέπε 2.2.2.2 για εξήγηση) λόγω του ότι η πλήρης αλληλουχία του αποτελείται εν μέρη από αλληλουχίες του υπότυπου A και άγνωστες μη-A αλληλουχίες που συμβολίστηκαν ως «E». Παρομοίως, ο «υπότυπος I» μετονομάστηκε σε CRF04\_cpx λόγω του ότι αποτελείται από αλληλουχίες των υπότυπων A, G, H, K και U (Unknown~Άγνωστος) (Robertson *et al.*, 2000).

Σε μερικούς από αυτούς τους υπότυπους αναγνωρίστηκαν και άλλες διακριτές φυλογενετικές δομές, που όμως δεν είναι τόσο γενετικά διαφοροποιημένες όσο πρέπει για να καθορίσουν ένα νέο υπότυπο και έτσι υποδιαιρούνται σε υπο-υπότυπους, όπως τον A σε A1, A2 (Robertson *et al.*, 2000, Gao *et al.*, 2001) και A3 (Meloni *et al.*, 2004) και τον F σε F1 και F2 (Robertson *et al.*, 2000). Οι αμινοξικές διαφορές ανάμεσα στους διάφορους υπότυπους της ομάδας M του HIV-1 φθάνουν σχεδόν το 25-30% στην αλληλουχία του γονιδίου *env* και 15% στην αλληλουχία του γονιδίου *gag* (Robertson *et al.*, 2000). Επίσης, στελέχη των διαφορετικών υπο-υπότυπων διαφέρουν 10% με 17% στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες *gag* και *env*, αντίστοιχα (Gao *et al.*, 2001). Επίσης, μέσα σε κάθε υπότυπο, υπάρχει μια πληθώρα HIV-1 παραλλαγών που είναι εκφράσεις ενδο-υποτυπικής

(intrasubtype) γονιδιωματικής πολυμορφίας με μέση νουκλεοτιδική απόσταση περίπου 11%.

#### 2.2.2.2 HIV-1 Ανασυνδυασμένες μορφές

Έχει αναγνωριστεί η ύπαρξη μωσαϊκών στελεχών της ομάδας M του HIV-1, όπου διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος ενός τέτοιου στελέχους ανήκουν σε διαφορετικό υπότυπο. Η επιμόλυνση με διαφορετικά στελέχη HIV-1 ( $\geq 2$ ) δεν είναι σπάνιο γεγονός και ιδιαίτερα σε μέρη που υπάρχουν πολλοί υπότυποι και υψηλή ετερογένεια στελεχών του ιού HIV-1. Ορισμένες από αυτές τις μωσαϊκές μορφές παίζουν σημαντικό ρόλο στην πανδημία του AIDS ανά το παγκόσμιο και έχουν αναγνωριστεί σε πολλούς ασύνδετους επιδημιολογικά μεταξύ τους φορείς, έτσι μετονομάστηκαν σε μεταδιδόμενες ανασυνδυασμένες μορφές (CRFs) (Robertson *et al.*, 2000). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 43 CRFs (Los Alamos. Database). Με βάση τη διεθνή ονοματολογία το κάθε CRF σχεδιάζεται με ένα αναγνωριστικό αριθμό και με γράμματα που συμβολίζουν τους υπότυπους από τους οποίους αποτελείται, συνήθως δύο. Εάν το γονιδίωμα του περιέχει αλληλουχίες που προέρχονται από περισσότερους υπότυπους τότε τα γράμματα αντικαθίστανται από το cpx (complex, (Robertson *et al.*, 2000)). Για να καθοριστεί ένας νέος υπότυπος, υπο-υπότυπος ή CRF τα αντιπροσωπευτικά στελέχη πρέπει να αναγνωριστούν σε τρία επιδημιολογικά μη συνδεδεμένα άτομα, μέσω αλληλούχισης τριών σχεδόν πλήρους-μήκους αλληλουχιών ή δύο αλληλουχιών πλήρους-μήκους και τμημάτων από ένα τρίτο στέλεχος (Robertson *et al.*, 2000).

Μια άλλη κατηγορία μωσαϊκών μορφών είναι οι μοναδικές ανασυνδυασμένες μορφές HIV-1 (URFs), οι οποίες δεν φαίνεται να προκαλούν επιδημία (McCutchan, 2000). Φαίνεται ότι προέρχονται από έντονα γεγονότα ανασυνδυασμού σε περιοχές όπου κυκλοφορούν ποικίλα στελέχη, έχουν μοναδικές ανασυνδυασμένες δομές και παρατηρούνται σε ένα μόνο άτομο ή σε μια μικρή ομάδα επιδημιολογικά συνδεδεμένων ατόμων. Τα URFs εντοπίζονται κυρίως, σε περιοχές που υπάρχουν πολλοί υπότυποι και μεγάλη ετερογένεια. Ένας μεγάλος αριθμός URFs έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα σε διάφορες περιοχές του κόσμου, όπως στη Λαϊκή Δημοκρατία Κονγκό (DRC) (A/G/J, F1/J/U) (Vidal *et al.*, 2000), στην Τανζανία (A1/C, A1/D) (Hoelscher *et al.*, 2001), στην Αργεντινή (B/F) (Thomson *et al.*, 2000), στην Ισπανία (B/G) (Thomson *et al.*, 2001), στην Ινδία (A/C) (Lole *et al.*, 1999), στη Μυανμάρ (διάφορες ανασυνδυασμένες μορφές μεταξύ των B', C, CRF01\_AE) (Takebe *et al.*, 2003) και στην Κίνα (B'/C) (Yang *et al.*, 2002). Στο Καμερούν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ανασυνδυασμού μεταξύ των ομάδων M και

Ο λόγω διπλών μολύνσεων (Vergne *et al.*, 2003), όπως το πρότυπο O/D/CRF02\_AG (Takehisa *et al.*, 1999).

### 2.2.3 Γενετική ταξινόμηση του ιού HIV-2

Οι φυλογενετικές αναλύσεις του ιού HIV-2 έδειξαν υψηλή ομοιότητα με τον ιό SIVsm, που μολύνει το πρωτεύον sooty mangabey (*Cercocebus atys*). Υπάρχουν οκτώ γενετικές ομάδες του ιού HIV-2, A-H (Damond *et al.*, 2004). Φαίνεται ότι όλες οι ομάδες του HIV-2 δημιουργήθηκαν από ξεχωριστά δια-ειδικά γεγονότα μετάδοσης του ιού SIVsm από το πρωτεύον sooty mangabey στον άνθρωπο (Hahn *et al.*, 2000). Από τις οκτώ ομάδες μόνο οι ομάδες A και B διαδίδονται στον ανθρώπινο πληθυσμό (Schim van der Loeff *et al.*, 1999), ενώ οι C-H αποτελούν μοναδικές περιπτώσεις μόλυνσης. Η ομάδα A επικρατεί στο δυτικό μέρος της Δυτικής Αφρικής (Μάλι, Γκάμπια, Σενεγάλη, Γουινέα), ενώ η ομάδα B έχει βρεθεί σε χώρες της Κεντρικής Αφρικής (Ακτή Ελεφαντοστού, Γκάνα, Νιγηρία). Το HIV-2 ανιχνεύθηκε και σε άλλες χώρες, εκτός της Αφρικής, όπως Λίβανο (Pieniazek *et al.*, 1998), Πορτογαλία, Ινδία (Bhanja *et al.*, 2004), Κορέα και Φιλιππίνες (Kandathil *et al.*, 2005).

## 2.3 Παγκόσμια κατανομή των HIV-1 γενότυπων της ομάδας M

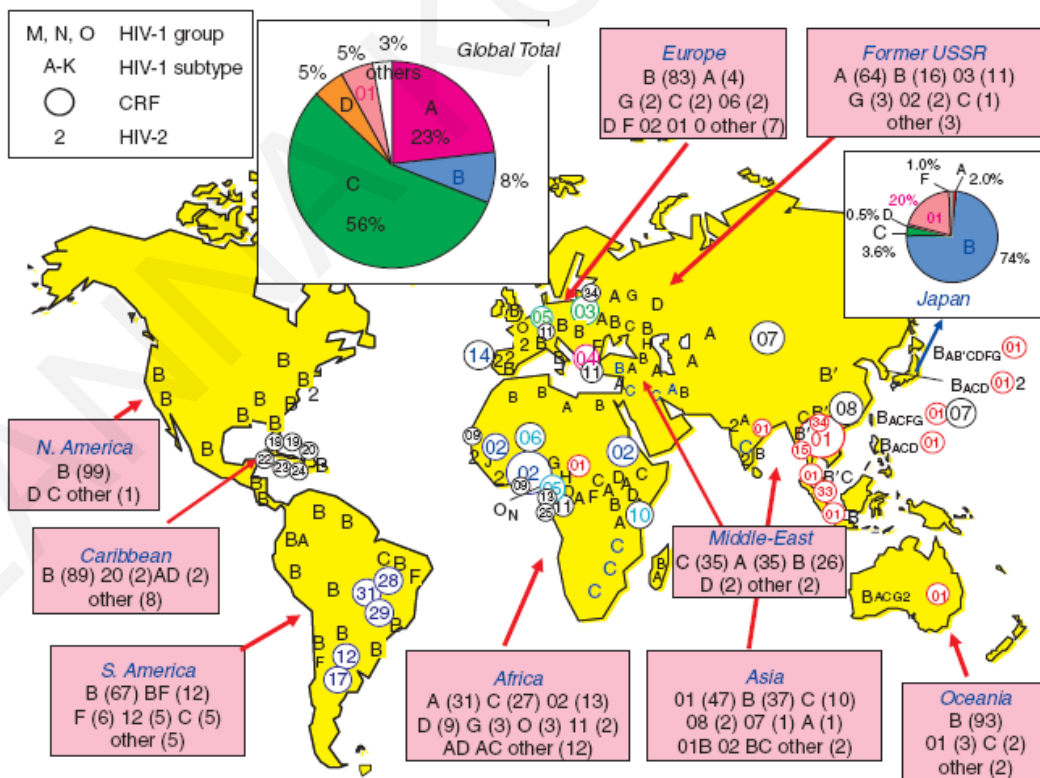
### 2.3.1 Παγκόσμια ποικιλότητα του HIV-1

Ο υπότυπος C είναι ο πολυπληθέστερος υπότυπος μέσα στην ομάδα M του HIV-1 (Robertson *et al.*, 2000, Rodenburg *et al.*, 2001, Kandathil *et al.*, 2005). Σε παγκόσμια κλίμακα ο υπότυπος C προκαλεί το 56% των λοιμώξεων και ακολουθούν ο υπότυπος A και το CRF02\_AG με 23%, ο υπότυπος B με 8%, ο υπότυπος D με 5% και το CRF01\_AE με 5% (Εικ. 2.) (Takebe *et al.*, 2008).

Ο υπότυπος C κυριαρχεί στην Ανατολική Αφρική (Robbins *et al.*, 1999) και στη Νότια Αφρική (Puren, 2002, van Harmelen *et al.*, 1997), με το 30% του πληθυσμού της τελευταίας να είναι μολυσμένο (Kandathil *et al.*, 2005). Είναι ο επικρατέστερος υπότυπος στην Νότια και Νοτιοανατολική Ασία, και ειδικά στη Μαλαισία και την Ινδία (Osmanov *et al.*, 2002). Επίσης, υπάρχουν αναφορές για ύπαρξη του ιού στην Κίνα, στη Ρωσία, στο Ηνωμένο Βασίλειο, στις ΗΠΑ (Robbins *et al.*, 1999), στη Νότια Αμερική και στην Ιαπωνία (Osmanov *et al.*, 2002, Kandathil *et al.*, 2005). Ο Rodenburg και οι συνεργάτες του (Rodenburg *et al.*, 2001) ανέλυσαν για πρώτη φορά το πλήρες γονιδίωμα 13 στελεχών από την Αφρική, την Ινδία, την Βραζιλία, και την Κίνα που είχαν χαρακτηριστεί

προηγουμένως ως C εστιάζοντας σε συγκεκριμένα τμήματα της αλληλουχίας (*gag*, *env*). Βρέθηκε ότι υπάρχουν τρεις υποομάδες μέσα στον υπότυπο C, η μία αφορά τα στελέχη της Αιθιοπίας/ Τζιμπουτί, η άλλη τα στελέχη της Βραζιλίας και η τρίτη τα στελέχη της Κίνας/ Ινδίας. Ο λόγος της ύπαρξης αυτών των ομάδων ίσως να είναι η πιο πρόσφατη εισαγωγή στελεχών του υπότυπου C σ' αυτές τις χώρες (Rodenburg *et al.*, 2001). Τα στοιχεία δείχνουν ότι η κύρια πηγή μετάδοσης του υπότυπου C είναι η ετεροφυλόφιλη σεξουαλική επαφή, αλλά υπάρχουν ευρήματα μετάδοσης του ιού μέσω χρήσης ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών στη Λατινική Αμερική (Osmanov *et al.*, 2002) και στην Ασία, όπως στην Κίνα (Su *et al.*, 2000) και στο Νεπάλ (Oelrichs *et al.*, 2000). Στο Νεπάλ ο υπότυπος C που μεταδίδεται μέσω των IDUs χωρίζεται σε δύο ομάδες, η μία είναι πιο κοντά στον υπότυπο C της Ινδίας και έχει τα περισσότερα στελέχη, ενώ η άλλη είναι συγγενέστερη με τον υπότυπο C της Αφρικής και φέρει λιγότερα στελέχη. Η γενετική ετερογένεια της πρώτης ομάδας είναι μεγαλύτερη από τη δεύτερη δείχνοντας ότι η δεύτερη εισαγωγή του υπότυπου C είναι πιο πρόσφατη (Oelrichs *et al.*, 2000).

Ο υπότυπος A εξαπλώθηκε ραγδαία στην Κεντρική και Ανατολική Αφρική, όπως Κένυα (Osmanov *et al.*, 2002, Robbins *et al.*, 1999), Ουγκάντα (Kaleebu *et al.*, 2000),



**Εικόνα 3.** Παγκόσμια κατανομή των HIV γενότυπων και των κατ' εκτίμηση αναλογιών τους. Οι αριθμοί στην παρένθεση μετά από κάθε υπότυπο είναι το μερίδιο (ποσοστιαίο) του δεικνυόμενου γενότυπου στην αντίστοιχη περιοχή (Takebe *et al.*, 2008).



Τανζανία και Ρουάντα, καθώς και στη Δυτική Αφρική (Σενεγάλη, Ακτή Ελεφαντόδοντου και Νιγηρία) (Osmanov *et al.*, 2002). Ο υπότυπος A έχει διαδοθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια και στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης: ξεκινώντας από την Ουκρανία επεκτάθηκε προς Ρωσία, Λετονία, Εσθονία (Zetterberg *et al.*, 2004, Smolskaya *et al.*, 2006), λόγω της αλόγιστης χρήσης ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών στις χώρες αυτές. Επιπλέον, μολύνσεις με τον υπότυπο A έχουν αναφερθεί στην Ανατολική Ασία, όπως Ιαπωνία (Takebe *et al.*, 2004), σε χώρες του Ειρηνικού, ενώ σποραδικές περιπτώσεις βρέθηκαν στην Δυτική Ευρώπη, στη Βόρεια Αμερική (Osmanov *et al.*, 2002) και στη Μέση Ανατολή, όπως στο Λίβανο (Pieniazek *et al.*, 1998), το Ισραήλ (Grossman *et al.*, 2005) και το Ιράν (Tagliamonte *et al.*, 2007, Naderi *et al.*, 2006). Ο κύριος παράγοντας μόλυνσης είναι η ετεροφυλική σεξουαλική επαφή (Osmanov *et al.*, 2002), αλλά και η χρήση μολυσμένων συριγγών από χρήστες ναρκωτικών. Τμήματα του υπότυπου A έχουν βρεθεί και σε ανασυνδυασμένες μορφές, όπως CRF01\_AE, CRF02\_AG, CRF03\_AB και CRF04\_cpx (Gao *et al.*, 1998b, Gao *et al.*, 2001, Liitsola *et al.*, 1998) κλπ. Ο Gao και οι συνεργάτες του (Gao *et al.*, 2001) μελέτησαν στελέχη HIV-1 από την Κύπρο (Kostrikis *et al.*, 1995), τη Νότιο Κορέα και τη DRC που είχαν χαρακτηριστεί παλαιότερα με μερική ανάλυση αλληλουχίας ότι ανήκουν στον υπότυπο A. Η φυλογενετική ανάλυση δύο αλληλουχιών πλήρους-μήκους και δύο άλλων σχεδόν πλήρους-μήκους απεκάλυψε την ύπαρξη ενός νέου κλάδου, που ομαδοποιείται με τον κανονικό κλάδο του υπότυπου A σαν αδελφός κλάδος, αλλά δεν διαφέρει τόσο, ώστε να χαρακτηριστεί ως καινούριος υπότυπος, οπότε αυτά τα στελέχη ταξινομήθηκαν ως στελέχη του υπο-υπότυπου A2 (Gao *et al.*, 2001). Βρέθηκαν και άλλες αλληλουχίες που ανήκουν σε αυτό το νέο κλάδο και σύμφωνα με τους κανονισμούς της ονοματολογίας του ιού HIV-1 ο υπότυπος A διαχωρίστηκε στους υπο-υπότυπους A1, A2 (Robertson *et al.*, 2000). Ο υπο-υπότυπος A1 έχει την πλειοψηφία των στελεχών A, έναντι του A2 (Kandathil *et al.*, 2005). Παράλληλα, βρέθηκε και μια τρίτη ομάδα αλληλουχιών που ομαδοποιείται ξεχωριστά από τους άλλους υπο-υπότυπους του A στην περιοχή του env (C2-V3), η A3 (Meloni *et al.*, 2004), αλλά δεν έχει συμπεριληφθεί ακόμη στην ονοματολογία επειδή είναι λιγότερο καθιερωμένη και δεν ομαδοποιείται ξεχωριστά από τον υπότυπο A1 σε όλο το γονιδίωμα της (Leitner *et al.*, 2005).

Η μορφή CRF02\_AG είναι η δεύτερη ανασυνδυασμένη μορφή που βρέθηκε και αποτελείται από περιοχές που ανήκουν στον υπότυπο A και στον υπότυπο G (Robertson *et al.*, 2000). Η πρωτότυπη αλληλουχία της CRF02\_AG είναι η IbNg που βρέθηκε στη Νιγηρία (Howard *et al.*, 1994), η οποία αναλύθηκε κατά μήκος όλου του γονιδιώματος και

βρέθηκε ότι περιέχει αλληλουχίες που ανήκουν στον υπότυπο A και άγνωστες αλληλουχίες (Howard *et al.*, 1996). Ο CRF και οι συνεργάτες του το 1998 (Carr *et al.*, 1998), αναγνώρισαν ότι οι άγνωστες αλληλουχίες του IbNg ανήκουν στον υπότυπο G. Μετά από σύγκριση της γενετικής ετερογένειας μέσα στο στέλεχος IbNG με τη γενετική ετερογένεια άλλων υπότυπων, κατέστησαν εμφανές το γεγονός ότι το στέλεχος IbNg είναι το ίδιο παλιό όσο οι μη-ανασυνδυασμένοι υπότυποι (Carr *et al.*, 1998). Η μορφή CRF02\_AG είναι ένας από τους κύριους παίκτες της μετάδοσης HIV-1 στην Δυτική Αφρική, ενώ υπάρχουν και αναφορές σε χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Αφρικής (Osmanov *et al.*, 2002, Takebe *et al.*, 2004). Στελέχη του CRF02\_AG βρέθηκαν και στην Ευρώπη, όπως στην Ισπανία (Holguin *et al.*, 2005) που έχουν προέλευση από τις χώρες της Κεντρικής/Δυτικής Αφρικής.

Ο υπότυπος B είναι κυρίαρχος στη Δυτική Ευρώπη, στη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Αμερική (Oelrichs *et al.*, 2000, Takebe *et al.*, 2004), καθώς και στην Αυστραλία και στην Ιαπωνία (Takebe *et al.*, 2004). Ακόμη, το 40% των νέων λοιμώξεων στη Βόρεια Αφρική και τη Μέση Ανατολή προκαλείται από τα στελέχη του υπότυπου αυτού (Osmanov *et al.*, 2002). Ο υπότυπος Thai B', είναι μια μοναδική ποικιλία που αρχικά μεταδόθηκε σε IDUs στην Ταϊλάνδη και μετά εξαπλώθηκε σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας (Takebe *et al.*, 2004), όπως Κίνα (Wang *et al.*, 2007b), Ινδία, Myanmar, Bangladesh (Bhanja *et al.*, 2005). Στη νοτιοανατολική Ινδία, τη μοναδική περιοχή της χώρας που ανιχνεύεται ο υπότυπος Thai B', ο υπότυπος αυτός έρχεται δεύτερος σε διάδοση μετά τον υπότυπο C και μεταδίδεται ανάμεσα στους IDUs (Bhanja *et al.*, 2007). Στην περιοχή αυτή, καθώς και σε γειτονικές χώρες υπάρχουν περιπτώσεις ανασυνδυασμών μεταξύ του υπότυπου C και Thai B' (Bhanja *et al.*, 2007). Μια πρόσφατη μελέτη φυλογεωγραφικής προσέγγισης παρακολούθησε την κινητικότητα του HIV-1 υπότυπου B σε 16 ευρωπαϊκές χώρες και το Ισραήλ (Paraskevis *et al.*, 2009). Από τη μελέτη διαφάνηκε ότι στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης, η επιδημία με στελέχη του υπότυπου B εισήχθη από πολλαπλές πηγές και στη συνέχεια διαδόθηκε μέσα στα τοπικά δίκτυα. Η μόνη χώρα που αποτελεί εξαίρεση είναι η Πολωνία, αφού οι περισσότερες από τις μολύνσεις με στελέχη του υπότυπου B ήταν το αποτέλεσμα μιας μοναδικής ιδρυτικής εισαγωγής. Η φυλογεωγραφική προσέγγιση αποκάλυψε ότι στην Ευρώπη υπάρχουν δύο σημαντικές μεταναστευτικές δίοδοι διασποράς των στελεχών του υπότυπου B. Συγκεκριμένα, οι χώρες του νότου, Ισπανία, Ελλάδα, Πορτογαλία και Σερβία, συμπεριφέρονται ως πηγές μεταναστευτικών γεγονότων (δότες), δηλαδή μεταδίδουν στελέχη του υπότυπου, ενώ η Αυστρία, το Βέλγιο και το Λουξεμβούργο, αφ' ενός είναι μεταναστευτικοί στόχοι (δέκτες),

δηλαδή εισάγουν στελέχη του υπότυπου B. Οι υπόλοιπες χώρες που έλαβαν μέρος στη μελέτη, Δανία, Γερμανία, Ιταλία, Ισραήλ, Νορβηγία, Ολλανδία, Σουηδία, Ελβετία και Ηνωμένο Βασίλειο είχαν αμφίδρομη μετανάστευση στελεχών του υπότυπου B, εκτός από την Πολωνία, για την οποία δεν προέκυψε κανένα σημαντικό μεταναστευτικό μονοπάτι (Paraskevis *et al.*, 2009).

Ο υπότυπος D, επικρατεί στην Κεντρική και Ανατολική Αφρική (Takebe *et al.*, 2004). Έχει αναφερθεί ότι στη DRC υπάρχει υψηλή επικράτηση του υπότυπου D (5,3%) σε σχέση με άλλες γειτονικές χώρες (Takebe *et al.*, 2004), ενώ επίσης στη Τανζανία (Koulinska *et al.*, 2001) και στην Ουγκάντα (Kaleebu *et al.*, 2000) τα ποσοστά είναι υψηλά. Οι υπότυποι B και D είναι πολύ κοντά μεταξύ τους, από ότι άλλοι υπότυποι και στις πιο πολλές γονιδιωματικές τους περιοχές συμπεριφέρονται ως υπο-υπότυποι (Leitner *et al.*, 2005).

Η μορφή CRF01\_AE που παλαιότερα ονομαζόταν υπότυπος E είναι η επικρατέστερη ανασυνδυασμένη μορφή του ιού HIV-1 στην Νοτιοανατολική Ασία, όπως στην Κίνα, τη Ταϊλάνδη, τη Μαλαισία, το Βιετνάμ, την Ιαπωνία, τις Φιλιππίνες (Osmanov *et al.*, 2002, Takebe *et al.*, 2004, Lim *et al.*, 2004, Tran *et al.*, 2004, Paladin *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2006). Στη Νοτιοανατολική Κίνα τα στελέχη CRF01\_AE είναι πολύ συγγενικά με στελέχη του Βιετνάμ (Piyasirisilp *et al.*, 2000, Laeyendecker *et al.*, 2005). Σε μια επιδημιολογική έρευνα που έγινε σε δύο ομάδες Αυστραλών IDUs με καταγωγή ή όχι το Βιετνάμ, βρέθηκε ότι το 55% των Αυστραλο-Βιετναμέζων φέρουν στελέχη του CRF01\_AE, ενώ το 89,5% των μη-Βιετναμέζων Αυστραλών φέρουν στελέχη του υπότυπου B. Η γενετική ποικιλότητα του CRF01\_AE των στελεχών αυτών είναι μικρότερη από ότι του υπότυπου B, κάτι που φανερώνει ότι το CRF01\_AE εισήχθη από το Βιετνάμ στην Αυστραλία πρόσφατα (Ryan *et al.*, 2004). Στη Μαλαισία βρέθηκε να υπάρχει μια νέα επιδημική ανασυνδυασμένη μορφή η CRF01\_AE/B ανάμεσα στους IDUs (Tee *et al.*, 2005), η οποία ονομάστηκε se CRF33\_01B (Tee *et al.*, 2006).

### 2.3.2 HIV-1 μορφές με γεωγραφική σημασία

Οι λιγότερο επικρατέστεροι HIV-1 υπότυποι ή CRFs, αλλά κοινοί σε τοπική κλίμακα, ανευρίσκονται σε διάφορες περιοχές του κόσμου και έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια επιδημιολογία του HIV-1 (Anastassopoulou *et al.*, 2006).

Ο υπότυπος F καθορίστηκε αρχικά σε μια επιδημία που είχε συμβεί σε ορφανοτροφεία της Ρουμανίας, κατά την οποία τα παιδιά μολύνθηκαν με μολυσμένα παράγωγα αίματος από τεχνικές μη αποτελεσματικής αποστείρωσης ιατρικών εργαλείων

(Dumitrescu *et al.*, 1994). Στελέχη του υπότυπου F έχουν βρεθεί σε διάφορες χώρες της Νότιας Αμερικής, όπως Βραζιλία και Αργεντινή (Marquina *et al.*, 1996), καθώς και στην Αφρική, όπως DRC, Καμερούν, Γκαμπόν (Laukkanen *et al.*, 2000). Σποραδικές περιπτώσεις διαπιστώθηκαν στην Ευρώπη και στην Ιαπωνία (Takebe *et al.*, 2004). Ο υπότυπος F διαχωρίζεται σε δύο υπο-υπότυπους, τον F1 και τον F2 (Robertson *et al.*, 2000). Αναλύσεις πλήρους-μήκους που έγιναν σε δείγματα που απομονώθηκαν από την Κεντρική και Νότια Αφρική, έδειξαν ότι ομαδοποιούνται με στελέχη F από τη Βραζιλία και τη Ρουμανία σχηματίζοντας τον υπο-υπότυπο F1 (Triques *et al.*, 1999). Στελέχη που απομονώθηκαν από το Καμερούν (Δυτική Αφρική) σχηματίζουν τον υπο-υπότυπο F2 (Laukkanen *et al.*, 2000, Triques *et al.*, 2000). Τα στοιχεία δείχνουν ότι η προέλευση του υπότυπου F είναι Αφρικανική και ότι οι δύο υπο-υπότυποι έχουν ένα κοινό πρόγονο (Triques *et al.*, 2000).

Ο υπότυπος G επικρατεί κυρίως στην Δυτική και Κεντρική Αφρική (Takebe *et al.*, 2004). Επιπλέον, βρέθηκε και στην Ισπανία ανάμεσα σε μολυσμένους IDUs και στη Πορτογαλία (Thomson *et al.*, 2001). Οι υπότυποι H και J διαδίδονται στην Κεντρική Αφρική (Janssens *et al.*, 2000, Laukkanen *et al.*, 1999). Ο υπότυπος K ανευρίσκεται κυρίως στην Κεντρική και Δυτική Αφρική. Ανακαλύφθηκε σε στελέχη HIV-1 από το Καμερούν και τη DRC μετά την πλήρους-μήκους ανάλυση του γονιδιώματος τους (Triques *et al.*, 2000).

Διάφορες νέες μορφές CRFs έχουν ανευρεθεί σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές του κόσμου τα τελευταία χρόνια. Ορισμένα παραδείγματα παρατίθενται πιο κάτω. Στην Ανατολική Ευρώπη και συγκεκριμένα στη πόλη Kaliningrad της Ρωσίας εξαπλώθηκε η επιδημία μιας νέας ανασυνδυασμένης μορφής μεταξύ των υπότυπων A/B στα μέσα του 1990, ανάμεσα σε IDUs (Liitsola *et al.*, 1998). Οι πατρικοί υπότυποι του ανασυνδυασμένου ιού A/B του Kaliningrad προέρχονταν από την Ουκρανία και φαίνεται ότι το πρωταρχικό γεγονός ανασυνδυασμού να έγινε εκεί και αργότερα να μεταφέρθηκε στο Kaliningrad όπου βρήκε πιο γόνιμο έδαφος για να εξαπλωθεί (Liitsola *et al.*, 2000). Ο ανασυνδυασμένος αυτός γενότυπος καθιερώθηκε ως CRF03\_AB, σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας (Robertson *et al.*, 2000).

Μια επιδημιολογική μελέτη της περιοχής C2-C5 του HIV-1 στην Κύπρο, το 1995 απεκάλυψε δύο στελέχη που φαινόταν τότε να ανήκουν σε ένα καινούριο υπότυπο τον «I». Οι δύο ασθενείς που μολύνθηκαν με τον υπότυπο «I» ήταν επιδημιολογικά συνδεδεμένοι και IDUs που ζούσαν για πολλά χρόνια στην Ελλάδα (Kostrikis *et al.*, 1995). Ο νέος υπότυπος έγινε αποδεκτός από το Los Alamos National Laboratory μετά από

ανεξάρτητη ανάλυση. Ακολούθησαν περαιτέρω έρευνες όσον αφορά στον υπότυπο I που βρέθηκε στην Κύπρο και ανευρέθηκε ότι ο υπότυπος «I» ήταν μια ανασυνδυασμένη μορφή του τύπου A/G/H/K/U (Gao *et al.*, 1998a, Paraskevis *et al.*, 2001a, Paraskevis *et al.*, 2001b). Η νέα ανασυνδυασμένη μορφή ονομάστηκε CRF04\_cpx και ανευρέθηκε μόνο στην περιοχή της Κύπρου και της Ελλάδας (Paraskevis *et al.*, 1999). Στην Ελλάδα αποτελεί το 2% των λοιμώξεων του HIV-1 (Paraskevis *et al.*, 1999). Το CRF04-cpx φαίνεται να προέρχεται από την Αφρική αφού οι υπότυποι H και K δεν βρίσκονται εύκολα σε περιοχές εκτός της Αφρικής, έτσι το πρωταρχικό γεγονός του ανασυνδυασμού πρέπει να έγινε στην Αφρική (Paraskevis *et al.*, 2001b). Η μορφή CRF06\_cpx είναι ένα πολύπλοκο ανασυνδυασμένο στέλεχος που αποτελείται από τους υπότυπους A/G/J/K και βρίσκεται κυρίως σε χώρες της Δυτικής Αφρικής (Montavon *et al.*, 1999, Montavon *et al.*, 2002a). Ένα μεγάλο ποσοστό στελεχών CRF06\_cpx έχει βρεθεί στην Εσθονία σε μια νέα επιδημία που εξαπλώθηκε μετά το 2000 σε IDUs (Adojaan *et al.*, 2005).

Οι μορφές CRF07\_BC και CRF08\_BC είναι οι κύριες ανασυνδυασμένες μορφές που βρέθηκαν στην Κίνα και ο κύριος τρόπος μετάδοσης τους είναι μέσω χρήσης ενδοφλέβιων ναρκωτικών (Li *et al.*, 2005, Beyrer *et al.*, 2000), η μορφή CRF07\_BC στη Βορειοδυτική Κίνα (Su *et al.*, 2000) και την Ταϊβάν (Chang *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2006) και η CRF08\_BC στη Νοτιοανατολική Κίνα (McCutchan *et al.*, 2002), αντίστοιχα. Οι δύο πατρικοί υπότυποι είναι ο υπότυπος Thai B' και ο υπότυπος C της Ινδίας (Yang *et al.*, 2003, Piyasirisilp *et al.*, 2000). Σε αντίθεση με το CRF07\_BC, το CRF08\_BC φέρει διαφορετικό πρότυπο ανασυνδυασμού, το πρώτο με πέντε σημεία ανασυνδυασμού και το δεύτερο με τρία (Piyasirisilp *et al.*, 2000, Laeyendecker *et al.*, 2005, Su *et al.*, 2000).

Διάφορες ανασυνδυασμένες μορφές έχουν χαρακτηριστεί στη Δυτική Αφρική, όπως το CRF09\_cpx (McCutchan *et al.*, 2004), το CRF10\_CD (Koulinska *et al.*, 2001), το CRF11\_cpx (Montavon *et al.*, 2002b), το CRF13\_cpx (Wilbe *et al.*, 2002). Στην Ευρώπη, και συγκεκριμένα στη Νότια Ισπανία και την Πορτογαλία, αναγνωρίστηκε ο ανασυνδυασμένος γενότυπος του ιού HIV-1 CRF14\_B/G σε μια μειοψηφία μολυσμένων IDUs (Delgado *et al.*, 2002, Thomson *et al.*, 2001). Μία ποικιλία ανασυνδυασμένων μορφών έχει βρεθεί στη Νότια Αμερική, όπως το CRF12\_BF και το CRF17\_BF στην Αργεντινή (Marquina *et al.*, 1996, Takebe *et al.*, 2008) και τα CRF28\_BF, CRF29\_BF, CRF31\_BC στη Βραζιλία (Takebe *et al.*, 2008). Ένα μεγάλο εύρος καινούριων CRFs έχει αναφερθεί στην Κούβα, μεταξύ των οποίων το CRF18\_cpx (Thomson *et al.*, 2005), το CRF19\_cpx (Casado *et al.*, 2005), το CRF20\_BG, το CRF22\_01A1, το CRF23\_BG και το

CRF24\_BG, μωσαϊκά στελέχη που χαρακτηρίζουν το 20% της HIV-1 λοίμωξης της Κούβας (Takebe *et al.*, 2008).

### 2.3.3 Η επικράτηση των HIV-1 ανασυνδυασμένων μορφών

Παρόλο, που η ακριβής επικράτηση των ανασυνδυασμένων στελεχών είναι άγνωστη, τα προκαταρκτικά δεδομένα δείχνουν ότι τα ποσοστά ανασυνδυασμένων gag/env δειγμάτων ποικίλουν από 10% μέχρι 40% στην Αφρική, 10 με 30% στην Μυανμάρ και >60% στην Νοτιοδυτική Κίνα (Takebe *et al.*, 2008). Το 2002 τουλάχιστον το 20% των HIV-1 στελεχών που διαδίδονταν αποτελούσαν ανασυνδυασμένα στελέχη μεταξύ διαφορετικών υπότυπων (Osmanov *et al.*, 2002). Οι ανασυνδυασμένοι ιοί συνεισφέρουν ουσιαστικά στην παγκόσμια πανδημία και η πιθανότητα δημιουργίας ανασυνδυασμένων στελεχών θα συνεχίσει να αυξάνεται, όσο οι διαφορετικοί HIV-1 υπότυποι εξαπλώνονται παγκοσμίως (Peeters *et al.*, 2000). Επιπλέον, αυξάνεται και η πιθανότητα του ανασυνδυασμού των ήδη μωσαϊκών ιών, δημιουργώντας μια δεύτερη γενιά ανασυνδυασμένων μορφών, τα inter-CRFs (ICRFs). Τέτοια μορφή έχει ήδη παρατηρηθεί στην Κίνα, η ICRF\_0708, όπου είναι το ανασυνδυασμένο στέλεχος CRF07\_BC/CRF08\_BC (Yang *et al.*, 2003).

## 2.4 Προέλευση του ιού HIV-1

Το HIV-1 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1983 (Chermann *et al.*, 1983). Υπάρχουν δύο υποθέσεις για την προέλευση του HIV-1. Η πρώτη υπόθεση υποστηρίζει ότι οι τρεις φυλογενετικές ομάδες του ιού HIV-1 είναι το αποτέλεσμα τριών ανεξάρτητων επιδημιολογικών διεργασιών του προγονικού ιού SIVcpz που μεταφέρθηκε ζωνοτικά από το χιμπατζή του υποείδους *P.t.troglodytes* στον άνθρωπο και εξελίχθηκε ξεχωριστά στην κάθε ομάδα (Gao *et al.*, 1999, Hahn *et al.*, 2000). Η μετάδοση των ιών SIVcpz και SIVsm στον άνθρωπο πιθανόν να έχει γίνει μέσω της έκθεσης δερματικών ή βλεννογονικών μεμβρανών του ανθρώπου σε μολυσμένο αίμα ζώου (Hahn *et al.*, 2000). Αντιθέτως, η δεύτερη υπόθεση υποστηρίζει ότι οφείλεται σε πολλαπλές δια-ειδικές μολύνσεις που άρχισαν με τη χρήση του εμβολίου κατά του ιού της πολιομυελίτιδας (που παράχθηκε σε νεφρικά κύτταρα χιμπατζή) σε κατοίκους του Βελγικού Κονγκό το διάστημα 1957-1960 (Elswood *et al.*, 1994, Stricker *et al.*, 1997).

Τα περισσότερα στοιχεία συγκλίνουν προς την πρώτη άποψη. Μετά από μια γονιδιωματική ανάλυση τεσσάρων SIVcpz που πάρθηκαν από πρωτεύοντα του είδους *Pan troglodytes*, έγινε ανάλυση αλληλουχιών του mt-DNA από το κάθε πρωτεύον για να

καθοριστεί σε ποιο υποείδος του είδους άνηκε ο κάθε ιός, καθώς και σύγκριση των SIVcrz που απομονώθηκαν με στελέχη αναφοράς HIV και SIV. Βρέθηκε ότι όλα τα γνωστά στελέχη HIV-1 που μολύνουν τον άνθρωπο σχετίζονται περισσότερο με το SIVcrz του υποείδους *P.t.troglodytes*. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ομάδα N του HIV-1 είναι μωσαϊκό αλληλουχιών του SIVcrz US και αλληλουχιών της ομάδας M του HIV-1, πράγμα που φανερώνει ένα γεγονός συνλοίμωξης και ανασυνδυασμού αποκλινόντων στελεχών SIVcrz σε ένα ξενιστή χιμπαντζή (Roques *et al.*, 2004, Gao *et al.*, 1999). Επίσης, υπάρχει η παρατήρηση ότι ο φυσικός θώκος του *P.t.troglodytes* συμπίπτει μοναδικά με περιοχές στις οποίες ενδημούν οι τρεις ομάδες του HIV-1 M, O και N (Gao *et al.*, 1999). Τα πιο πάνω στοιχεία δείχνουν ότι ο *P.t.troglodytes* είναι το πρωτεύον-πηγή από το οποίο έγιναν οι τρεις ανεξάρτητες εισαγωγές του ιού SIVcrz προς τον άνθρωπο, και η κάθε μια εξελίχθηκε προς μία από τις ομάδες του HIV-1 (Gao *et al.*, 1999).

Η Korber *et al.*, (Korber *et al.*, 2000) ανέλυσαν *gag* και *env* αλληλουχίες της ομάδας M του HIV-1 για να υπολογίσουν πότε υπήρξε ο τελευταίος πρόγονος της ομάδας αυτής. Χρησιμοποιώντας παράλληλους υπολογιστές και υποθέτοντας ένα σταθερό ρυθμό εξέλιξης εφάρμοσαν τη φυλογενετική μέθοδο του αλγορίθμου της μέγιστης πιθανοφάνειας σ' ένα σημαντικό αριθμό αλληλουχιών. Χρησιμοποιώντας τη στοίχιση γονιδιωματικών αλληλουχιών πλήρους μήκους υπολόγισαν ότι ο τελευταίος κοινός πρόγονος της ομάδας M υπήρξε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα και συγκεκριμένα το 1931 με όρια εμπιστοσύνης +/- 20 χρόνια (Korber *et al.*, 2000).

Τα ικά στελέχη από τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (DRC) της Αφρικής έχουν μια ποσοτική διαφορά στη δομή των φυλογενετικών δένδρων από ικά στελέχη που προέρχονται από άλλα μέρη του πλανήτη. Το στοιχείο αυτό δείχνει ότι η δομή της HIV-1 φυλογένειας είναι το αποτέλεσμα επιδημιολογικών διεργασιών που γίνονται μέσα στους ανθρώπινους πληθυσμούς, μόνο, και δεν αφεύεται σε πολλαπλά γεγονότα δια-ειδικών μεταδόσεων που ξεκίνησαν από τον εμβολιασμό για τον ιό της πολυομελίτιδας. Η φυλογένεια της ομάδας M των στελεχών του DRC και των παγκόσμιων στελεχών ίσως ήταν το αποτέλεσμα διαφορετικών επιδημιολογικών γεγονότων. Πολλά στελέχη του DRC φαίνεται να είναι βασικά και η ερευνητική ομάδα του Rambaut *et al.*, υποστηρίζει ότι κάθε παγκόσμιος υπότυπος είναι το αποτέλεσμα της τυχαίας εξαγωγής κάποιων στελεχών από το DRC προς άλλες γεωγραφικές περιοχές που παρήγαγαν φαινόμενα ιδρυτού. Τα στοιχεία αυτά δεν συμφωνούν με τη θεωρία του εμβολίου, αντιθέτως, δείχνουν ότι ο τελευταίος κοινός πρόγονος της ομάδας M του HIV-1 ήταν παρών στον άνθρωπο ξενιστή (Rambaut *et al.*, 2001).

## 2.5 Βιολογική Σημασία της HIV-1 Ετερογένειας

Η γενετική ποικιλότητα του HIV-1 και η εξέλιξη του στο χρόνο έχουν σημαντικές συνέπειες για τον έλεγχο της μολυσματικής αυτής ασθένειας. Η γενετική ποικιλότητα αντικατοπτρίζεται με διαφορές στα βιολογικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη μεταδοτικότητα, την παθογένεια και την ανοσογονικότητα. Η γενετική ποικιλομορφία του HIV-1 πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ανάπτυξη ή την προσαρμογή διαγνωστικών τεστ και εμβολίων, καθώς και κατά την εκτίμηση του φορτίου νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η ταυτοποίηση στελεχών ή υποτύπων αποδείχθηκε επίσης, να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της εξάπλωσης του ιού σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές και πληθυσμούς.

### 2.5.1 Σχέση HIV-1 υπότυπου και ανάπτυξης παθογένειας

Έχει διατυπωθεί ότι οι υπότυποι του HIV-1 μπορούν να επηρεάζουν την ική μεταδοτικότητα και την παθογένεια. Ωστόσο, η ύπαρξη πολλών άλλων παραγόντων κάνει πολύ δύσκολη την καθιέρωση της πραγματικής επίδρασης των ικών υποτύπων. Η σύνδεση μεταξύ των HIV-1 υποτύπων και της εξέλιξης της νόσου του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) είναι αμφιλεγόμενη. Σε μια μελέτη μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης της ασθένειας ανάμεσα σε Αφρικανούς και Σουηδούς, όπου τα HIV-1 στελέχη τους ανήκαν σε τέσσερεις διαφορετικούς υπότυπους (A, B, C, D). Εξετάστηκαν παράμετροι που περιλάμβαναν τη μείωση στις μετρήσεις των CD4 κυττάρων, το HIV-1 ικό φορτίο και την κλινική εξέλιξη. Τα στοιχεία έδειξαν να μην υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των ατόμων που ήταν μολυσμένοι με τους υπότυπους A, B, C ή D ως προς την ανάπτυξη της ασθένειας και είναι ανεξάρτητη της εθνικότητας (Alaeus *et al.*, 1999). Σε δύο άλλες μελέτες στη Ταϊλάνδη παρατηρήθηκε ότι η πορεία της ασθένειας στους ασθενείς που ήταν μολυσμένοι με τη μορφή CRF01\_AE είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς μολυσμένους με τον υπότυπο B στη Δύση (Amornkul *et al.*, 1999, Kilmarx *et al.*, 2000).

Σε αντίθεση, διάφορες μελέτες έδειξαν ότι οι HIV-1 υπότυποι διαφέρουν στους ρυθμούς ανάπτυξης προς την ασθένεια. Σε μια μελέτη που διερεύνησε την επιβίωση σε γυναίκες που έχουν μολυνθεί με διαφορετικούς υπότυπους έδειξε να υπάρχουν διαφορετικές καμπύλες επιβίωσης που εξαρτώνται από τους υπότυπους. Οι γυναίκες που ήταν μολυσμένες με τους υπότυπους C, D ή G είχαν οκτώ φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν AIDS από αυτές που είναι μολυσμένες με τον υπότυπο A (Kanki *et al.*, 1999). Μια άλλη έρευνα στην Κένυα, όπου υπάρχουν οι υπότυποι A, C και D, έδειξε ότι



τα υψηλότερα επίπεδα RNA πλάσματος υπήρχαν σε άτομα μολυσμένα με τον υπότυπο C (Neilson *et al.*, 1999). Ανάλυση της περιοχής LTR του γονιδιώματος του υπότυπου C αποκάλυψε την ύπαρξη τριών θέσεων δέσμησης του κυτταρικού παράγοντα NFκB, σε αντίθεση με άλλους υπότυπους που έχουν τουλάχιστον μια ή δύο θέσεις δέσμησης. Αυτά τα *cis* στοιχεία είναι σημαντικά για τους ρυθμούς μεταγραφής του HIV-1. Στον ιό του υπότυπου C αυτές οι θέσεις είναι λειτουργικές και αυτό φαίνεται από την αυξανόμενη απόκριση προς τον ενεργοποιητικό παράγοντα μεταγραφής TNF-α. Τα στοιχεία αυτά μαρτυρούν ότι ο υπότυπος C ίσως να έχει πλεονέκτημα ως προς την αντιγραφή σε άτομα με χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Montano *et al.*, 2000). Επίσης, σε μια άλλη έρευνα βρέθηκε ότι στελέχη με LTRs του υπότυπου C έχουν έξι φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να μεταδοθούν από ότι αυτά με υπότυπο D (Blackard *et al.*, 2001). Μια άλλη έρευνα στην Ουγκάντα έδειξε ότι ο υπότυπος D σχετίζεται με πιο γρήγορο ρυθμό προς το θάνατο και με χαμηλότερες μετρήσεις CD4 από ότι ο υπότυπος A (Kaleebu *et al.*, 2002).

### 2.5.2 Διπλές μολύνσεις με τον ιό HIV-1 και ανασυνδυασμός

Οι διπλές μολύνσεις διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τη συνλοίμωξη (coinfection) και την επιλοίμωξη (superinfection). Η συνλοίμωξη καθορίζεται ως η λοίμωξη με δύο ετερόλογα στελέχη, που συμβαίνει είτε ταυτόχρονα είτε μέσα σε ένα μικρό χρονικό διάστημα (ένας μήνας) πριν η μόλυνση του πρώτου στελέχους καθιερωθεί και αναπτυχθεί μια ανοσολογική απόκριση. Σε αντίθεση, η επιλοίμωξη καθορίζεται ως η μόλυνση με ένα δεύτερο στέλεχος HIV-1 αφού η ανοσολογική απόκριση προς το πρώτο στέλεχος έχει καθιερωθεί μέσα στο μολυσμένο άτομο (Smith *et al.*, 2005, van der Kuyl *et al.*, 2007). Ακόμη και για τους ιούς που εμμένουν, πολλά μη μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή είναι διαθέσιμα για τη μόλυνση από ένα δεύτερο ιικό στέλεχος (van der Kuyl *et al.*, 2007). Οι διπλές μολύνσεις μπορούν να επιτευχθούν με διάφορες μεταδοτικές οδούς, όπως την κάθετη μετάδοση, σεξουαλική επαφή, μετάγγιση αίματος ή χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών. Διπλές μολύνσεις με διαφορετικούς υπότυπους έχουν αναφερθεί σε περιοχές όπου ενδημούν πολλαπλές ποικιλίες του ιού (Takebe *et al.*, 2008). Η μόλυνση με περισσότερα από δύο HIV-1 στελέχη είναι σπάνιο φαινόμενο, αλλά όχι αδύνατο σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (van der Kuyl *et al.*, 2007). Διάφορες μελέτες προτείνουν ότι οι διπλές μολύνσεις με το HIV-1 είναι συχνά, αλλά όχι πάντα, συνδεδεμένες με την επιταχυνόμενη παθογένεια. Λόγω της έλλειψης μακροπρόθεσμων συστηματικών ερευνών σε μια ομάδα ελέγχου, είναι προς το παρόν ασαφές εάν η HIV-1 συνλοίμωξη και

επιλοίμωξη έχουν διαφορετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη της ασθένειας (van der Kuyl *et al.*, 2007).

Η διπλή μόλυνση μπορεί να οδηγήσει στην αυξανόμενη καταλληλότητα του ιικού πληθυσμού και είναι ο πρόδρομος στην δημιουργία του φαινομένου του ανασυνδυασμού. Εάν δύο γενετικά διαφορετικοί ιοί HIV-1 μολύνουν ένα κύτταρο παράγονται προϊόντα με RNA από τον κάθε ιό. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει ανασυνδυασμό μεταξύ των συσκευασμένων ετερόλογων RNA μορίων μέσω της αλλαγής αλυσίδας μήτρας κατά τον επόμενο κύκλο αντιγραφής (Blackard *et al.*, 2002, Galetto *et al.*, 2005). Η αλλαγή μήτρας οφείλεται στην ικανότητα της RT να αλλάζει μήτρα RNA κατά την αντίστροφη μεταγραφή από το ένα RNA στο άλλο, λόγω της χαμηλής συγγένειας της αλληλεπίδρασης RT/μήτρας με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μωσαϊκοί ιοί (Blackard *et al.*, 2002). Σε *in vitro* πειράματα βρέθηκε ότι συμβαίνουν 2-3 γεγονότα ανασυνδυασμού ανά γονιδίωμα HIV-1 ανά κύκλο αντιγραφής, στοιχείο που καταδεικνύει ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει συχνότερα από το ρυθμό συσώρευσης μεταλλάξεων (Jetzt *et al.*, 2000). Τρεις διαφορετικές κατηγορίες ομόλογου ανασυνδυασμού επικρατούν στον ιό HIV-1, μεταξύ στελεχών του ίδιου υπότυπου (intrasubtype), μεταξύ στελεχών διαφορετικών υπότυπων (intersubtype) και μεταξύ στελεχών διαφορετικών ομάδων του ιού HIV-1 (intergroup) (Magiorkinis *et al.*, 2003).

Δύο διαφορετικά πρότυπα έχουν προταθεί για το μηχανισμό του ανασυνδυασμού, το πρότυπο επιλογής αντιγράφου (copy-choice model) και το πρότυπο μετατόπισης της αλυσίδας (strand displacement model) (Galetto *et al.*, 2005). Το πρώτο πρότυπο προτείνει ότι η εναλλαγή RNA μήτρας οδηγείται κυρίως από τα σπασίματα, θέσεις λήξης και δευτερεύοντες δομές του ιικού RNA, αναγκάζοντας κατά συνέπεια την RT να αλλάξει μήτρα επιλέγοντας το άλλο αντίγραφο του γονιδιωματικού RNA. Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο, ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της πρώτης DNA αλυσίδας (minus strand). Αντιθέτως, το δεύτερο πρότυπο προτείνει ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της δεύτερης DNA αλυσίδας (plus strand), όταν σε ένα από τα δύο προπορευόμενα συμπλέγματα σύνθεσης της δεύτερης αλυσίδας cDNA, ένα εσωτερικό τμήμα DNA μετατοπίζεται από ένα άλλο αναπτυσσόμενο τμήμα DNA που βρίσκεται πιο πάνω, με αποτέλεσμα το πρώτο να μένει ελεύθερο να υβριδοποιηθεί και να συνεχίσει τη σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας από το άλλο σύμπλεγμα cDNA σύνθεσης (Galetto *et al.*, 2005). Τα δεδομένα από διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ανασυνδυασμός με το πρότυπο επιλογής αντιγράφου είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός στο

HIV-1 (Jetzt *et al.*, 2000, Galetto *et al.*, 2005), αν και υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν το δεύτερο πρότυπο (Galetto *et al.*, 2005, Magiorkinis *et al.*, 2003).

Ο intersubtype ανασυνδυασμός των HIV-1 στελεχών δεν είναι μια τυχαία διαδικασία, αλλά εμφανίζεται περισσότερο ή λιγότερο συχνά σε ορισμένες γονιδιωματικές περιοχές που έχουν χαμηλή ετερογένεια, όπως ένα μέρος του *RT*, τα *vif/vpr*, τα πρώτα εξόνια των *tat/rev*, το *gpr* και η περιοχή *env(gp41)* (Magiorkinis *et al.*, 2003). Στην περιοχή C2-V3 του γονιδίου *env*, που είναι η πιο ετερογενής περιοχή του HIV-1 γονιδιώματος δεν παρατηρήθηκε κανένα σημείο ανασυνδυασμού (Magiorkinis *et al.*, 2003), ενώ αντίθετα οι δύο άκρες του γονιδίου *env* είναι περιοχές που παρατηρούνται σημεία ανασυνδυασμού (Fan *et al.*, 2007). Ένας άμεσος συσχετισμός παρατηρήθηκε μεταξύ της συχνότητας ανασυνδυασμού και της ομοιότητας της αλληλουχίας σε όλο το HIV-1 γονιδίωμα, δείχνοντας ότι η ικανοποιητική ομοιότητα αλληλουχίας απαιτείται πριν το σημείο ανασυνδυασμού (Magiorkinis *et al.*, 2003, Worobey *et al.*, 1999). Σε αντίθεση οι Fan *et al.*, δεν βρήκαν αρκετά στοιχεία που να υποστηρίζουν αυτό το συσχετισμό (Fan *et al.*, 2007, Magiorkinis *et al.*, 2008). Οι *in vivo* ενδείξεις δείχνουν ότι η ομοιότητα αλληλουχίας οδηγεί στην αλλαγή RNA μήτρας στον ομόλογο ανασυνδυασμό ρετροϊών, ενώ η ανομοιότητα αλληλουχίας ίσως να είναι το κύριο περιοριστικό μέτρο σε γεγονότα ανασυνδυασμού, μεταξύ αρκετά διαφορετικών στελεχών (Magiorkinis *et al.*, 2003).

### 2.5.3 Βιολογική σημασία HIV-1 ανασυνδυασμού

Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των HIV-1 γονιδιωμάτων είναι μια σημαντική ιική εξελικτική στρατηγική, δεδομένου ότι διευρύνει ουσιαστικά την ποικιλομορφία των ικών HIV πληθυσμών (quasispecies) μέσα σε έναν ασθενή. Δεν είναι μια τυχαία σποραδική διαδικασία, αλλά αποτελεί μέρος της αντίστροφης μεταγραφής του HIV-1. Οι ανασυνδυασμένες μορφές του ιού ίσως να έχουν πλεονεκτήματα έναντι των πατρικών στελεχών, λόγω της εισαγωγής ενός μεγάλου αριθμού γενετικών αλλαγών, όπως έδειξαν διάφορα μοντέλα *in vitro* (van der Kuyl *et al.*, 2007). Έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στον τροπισμό, στην ικανότητα αντιγραφής, στην ιική παθογένεια, στην ευαισθησία στην αντιρετροϊκή θεραπεία και στη διαγνωστική ακρίβεια των συνηθισμένων ορολογικών και μοριακών αναλύσεων. Κάτω από την επιλεκτική πίεση που θέτουν τα αντιρετροϊκά φάρμακα, οι ανασυνδυασμένες μορφές που προέρχονται από στελέχη με διαφορετική ευαισθησία στα φάρμακα ή ήδη ανθεκτικά στελέχη δίνουν HIV-1 ιοειδή με πολλαπλή ανθεκτικότητα (Takebe *et al.*, 2004, van der Kuyl *et al.*, 2007). Ο ανασυνδυασμός μικραίνει το χρόνο που απαιτείται για να μετατραπεί ένα στέλεχος που ήδη φέρει ένα σετ

μεταλλάξεων που προσδίδουν μερική ανθεκτικότητα στα αντιρετροϊκά φάρμακα σε στέλεχος με πλήρη ανθεκτικότητα (Galletto *et al.*, 2005). Παράλληλα, η συχνή επικράτηση του ανασυνδυασμού φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει πολύ σημαντικά την αλληλεπίδραση των διαφόρων HIV ικών στελεχών με το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, αποφεύγοντας ευκολότερα την ανοσολογική αντίδραση, μια σχέση που ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί. Αφού η ανοσολογική αντίδραση είναι σημαντικό κριτήριο για την πρόληψη της καθιέρωσης μιας χρόνιας λοίμωξης, πρέπει να θεωρηθεί ότι ο ανασυνδυασμός ίσως δυσχεράνει την ανάπτυξη ενός επιτυχούς εμβολίου (Galletto *et al.*, 2005).

Ο προσδιορισμός των κύριων σημείων ανασυνδυασμού είναι σημαντικός για την ανάπτυξη των σύνθετων ρετροϊών, που χρησιμοποιούνται ως υλικά για την ανάπτυξη των HIV-1 εμβολίων. Παράλληλα, ο προσδιορισμός αυτός αποδίδει τις πιο κατάλληλες περιοχές για την ανίχνευση HIV-1 intersubtype ανασυνδυασμένων στελεχών διευκολύνοντας έτσι τις HIV-1 μοριακές επιδημιολογικές μελέτες που βασίζονται στην ανάλυση μερικών γονιδιωματικών περιοχών. Επιπλέον, στις γονιδιωματικές περιοχές όπου ο ανασυνδυασμός εμφανίζεται λιγότερο συχνά, η υπόθεση ότι η ιική απόκλιση εξαρτάται από τις μεταλλάξεις σημείου δεν αθετείτε, καθιστώντας τις τις πιο κατάλληλες περιοχές για φυλογενετικές αναλύσεις και υπολογισμούς του μοριακού ρολογιού (Magiorkinis *et al.*, 2003). Η ύπαρξη ορισμένων κύριων σημείων ανασυνδυασμού μέσα σε διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές θα μπορούσε να εξηγηθεί, ενδεχομένως από τα δομικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του ενζύμου RT, το οποίο προκαλεί την αλλαγή RNA μήτρας ή από τους όποιους πιθανούς λειτουργικούς περιορισμούς μεταξύ διαφορετικών γονιδιωματικών περιοχών που ανήκουν σε διαφορετικούς HIV-1 υπότυπους (Magiorkinis *et al.*, 2003).

#### **2.5.4 Ετερογένεια ιού HIV-1 μέσα στο άτομο**

Ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων που εισαγάγει η HIV-1 RT έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται διάφορα ετερογενή quasispecies (Mansky *et al.*, 1995), από τα οποία επικρατούν αυτά που διαφεύγουν την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος και αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Η HIV-RT πραγματοποιεί 1 λάθος για κάθε 1700 νουκλεοτίδια που προσθέτει. Ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος του HIV-1 θεωρούνται ως hotspots με ρυθμό λάθους 1/70 νουκλεοτίδια. Η ποικιλότητα του HIV-1 στο γονιδιακό επίπεδο αποδίδεται επίσης, στην απουσία της ικανότητας επιδιόρθωσης των βάσεων με βάση το νόμο της συμπληρωματικότητας, στην απουσία

διπλοειδούς γονιδιώματος, στο γρήγορο ρυθμό αναπαραγωγής του ιού *in vivo*, στην ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, στην πίεση από θεραπευτικές αγωγές και σε διάφορα γεγονότα ανασυνδυασμού που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή (Blackard *et al.*, 2002, Kandathil *et al.*, 2005).

Ο ιός HIV παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια τόσο μεταξύ των ατόμων που έχουν μολυνθεί, όσο και μέσα σε κάθε οροθετικό άτομο (Lukashov *et al.*, 1998). Επιπλέον, ο HIV-1 παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα σε διαφορετικά ανατομικά διαμερίσματα στον οργανισμό κάθε οροθετικού ατόμου. Τύποι κυττάρων ή ιστοί που έχουν μια περιορισμένη κυκλοφορία του ιού μεταξύ τους καλούνται «ιολογικά διαμερίσματα» (virologic compartments), τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα «ιολογικά απόθέματα» (virologic reservoirs) που υποδηλώνουν τους τύπους των κυττάρων ή τους ιστούς στους οποίους υπάρχει μια σχετική καταστολή του ιικού αναδιπλασιασμού (Nickle *et al.*, 2003a, Nickle *et al.*, 2003b).

## Κεφάλαιο 3. Παθογένεια του ιού HIV-1 και Αντιρετροϊκή Θεραπεία

### 3.1 Κλινική πορεία της HIV-1 λοίμωξης

Ο ιός HIV-1 είναι ο τύπος που έδωσε την πανδημία του AIDS (Barrett, 1984). Η τυπική κλινική πορεία της HIV λοίμωξης χαρακτηρίζεται από τρεις ξεχωριστές φάσεις: 1) την πρώτη φάση της λοίμωξης (primary infection), 2) την κλινικά ασυμπτωματική φάση (clinical latency) και 3) τη συμπτωματική φάση, όπου εκδηλώνεται η νόσος (clinically apparent disease).

#### 3.1.1 Πρώτη φάση της λοίμωξης

Όταν ο HIV-1 εισαχθεί στο σώμα μολύνει ένα μεγάλο αριθμό CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων, αντιγράφεται πολύ γρήγορα και διασπείρεται σε διάφορα όργανα, αλλά κυρίως σε όργανα του λεμφικού ιστού. Η πρωτολοίμωξη σχετίζεται με ένα οξύ κλινικό σύνδρομο που φέρει ομοιότητες με τη λοιμώδη μονοπυρήνωση και εκδηλώνεται κατά προσέγγιση μία έως και αρκετές βδομάδες μετά τη μόλυνση με τον ιό (Tindall *et al.*, 1991). Κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, η συγκέντρωση του ιού στο πλάσμα αυξάνεται απότομα, συχνά σε επίπεδα που ξεπερνούν το  $1 \times 10^6$  μόρια RNA/ ml. Ακολουθεί μια σημαντική ελάττωση στη συγκέντρωση του ιού στο πλάσμα, η οποία σταθεροποιείται σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο ικού αναδιπλασιασμού (Clark *et al.*, 1991, Daar *et al.*, 1991, Piatak *et al.*, 1993). Η μέγιστη τιμή του ικού φορτίου σχετίζεται με πτώση των τιμών των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων τις πρώτες 2-8 βδομάδες μετά τη λοίμωξη (Gaines *et al.*, 1990). Στη συνέχεια, οι τιμές των CD4<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων συνήθως επανακάμπτουν προς τα φυσιολογικά επίπεδα, αλλά σπάνια επανέρχονται στα επίπεδα που βρισκόνταν πριν τη λοίμωξη.

Η ελάττωση του ικού φορτίου μετά την οξεία φάση της λοίμωξης οφείλεται κυρίως στις ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του ιού, οι οποίες περιορίζουν τον αναδιπλασιασμό του (Cooper *et al.*, 1988). Ωστόσο, και άλλοι παράγοντες συντελούν στην ελάττωση αυτή του ικού φορτίου, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας, της έκκρισης κατασταλτικών για τον ιό κυτοκινών (Cocchi *et al.*, 1995), αλλά και της πιθανής εξάντλησης των κατάλληλων λεμφοκυτταρικών στόχων (Phillips, 1996). Πριν την ορομετατροπή, ενεργοποιούνται τα ειδικά κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα (CTL), τα οποία, μέσω ποικίλων μηχανισμών προκαλούν την ική αναστολή. Υπάρχει μια ισχυρή χρονικά σχέση μεταξύ της εμφάνισης των ειδικών για τον HIV-1 CTL και της εντυπωσιακής ελάττωσης της συγκέντρωσης του ιού στο πλάσμα (Musey *et al.*, 1997). Η

συχνότητα των ειδικών για τον HIV κυτταροτοξικών απαντήσεων κατά την πρωτολοίμωξη εκτιμάται ότι πλησιάζει το 5% των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος (McMichael *et al.*, 1998). Όσο οι κυτταροτοξικές απαντήσεις μεγιστοποιούνται, η συγκέντρωση του ιού στο πλάσμα αρχίζει να μειώνεται και οι εκτεταμένοι πληθυσμοί των T-κυττάρων ελαττώνονται δευτερευόντως μέσω αποπτωτικών μηχανισμών, ενώ ένας μικρός αριθμός επιβιώνει ως μνημονικά κύτταρα (Sierra *et al.*, 2005). Οι κυτταροτοξικές απαντήσεις, οι οποίες σχετίζονται αντιστρόφως με το ιικό φορτίο, στη συνέχεια σταθεροποιούνται σε ένα χαμηλότερο επίπεδο (Ogg *et al.*, 1998). Τα πιο πάνω συμβαίνουν πριν την ανίχνευση αντισωμάτων εξουδετέρωσης, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να παρεμποδίζουν ή να εξουδετερώνουν το ιό (Musey *et al.*, 1997). Παρόλο που τα αντισώματα που προσδένονται στο φάκελο του ιού HIV-1 είναι ανιχνεύσιμα στον ορό δυο με τρεις βδομάδες μετά τη λοίμωξη, τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη μόλυνση με τον ιό. Τα αντισώματα εξουδετέρωσης μπορούν να ανιχνευτούν αρκετές βδομάδες αφότου έχει ελαττωθεί η αρχική υψηλή συγκέντρωση του ιού στο πλάσμα (Koup *et al.*, 1994). Τα παραπάνω αντισώματα εξουδετερώνουν το μολυσματικό ιό, αλλά συχνά παρουσιάζουν χαμηλή ή και καθόλου δραστηριότητα έναντι άλλων ιικών στελεχών. Γενικά θεωρείται, ότι η πρωτολοίμωξη περιορίζεται κυρίως από τις ειδικές για τον ιό κυτταροτοξικές απαντήσεις. Στις πρώτες 3-4 βδομάδες της μόλυνσης όπου ο ασθενής δεν αναπτύσσει αντισώματα κατά του ιού, η περίοδος αυτή καλείται "σιωπηλό παράθυρο" και είναι η πιο επικίνδυνη περίοδος από την άποψη ότι ο φορέας μπορεί να μολύνει άλλους εν αγνοία του, ακόμα και αν έχει κάνει μια τυπική εξέταση αίματος.

### 3.1.2 Ασυμπτωματική φάση

Μετά την πρωτολοίμωξη συνήθως ακολουθεί μια σχετικά μακρά περίοδος, η οποία χαρακτηρίζεται από περιορισμένες κλινικές εκδηλώσεις. Ο μέσος χρόνος μεταξύ της μόλυνσης από τον ιό και της εκδήλωσης του AIDS σε ενήλικες είναι περίπου 10 χρόνια. Υπάρχουν περιπτώσεις που το AIDS εμφανίζεται σύντομα, στα πέντε χρόνια και άλλοτε μετά τα 15 χρόνια (Buchbinder *et al.*, 1994, Munoz *et al.*, 1995). Στην τελευταία περίπτωση, η κλινική κατάσταση των ασθενών περιγράφεται ως «μακροχρόνια μη εξελισσόμενοι φορείς του ιού» χωρίς να φέρουν συμπτώματα της νόσου και δεν υπάρχει καμία ένδειξη ελάττωσης των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων (Buchbinder *et al.*, 1994), παρά την συνεχόμενη αντιγραφή του ιού (Ho *et al.*, 1989). Παρά τη μακροχρόνια ασυμπτωματική φάση της λοίμωξης, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο ιικός

αναδιπλασιασμός συνεχίζεται σ' όλη τη διάρκεια αυτής της μακράς περιόδου. Οι σχετικοί αριθμοί των μολυσμένων κυττάρων στη φάση αυτή εκτιμάται ότι είναι 1 στα 400 κύτταρα κατά την συμπτωματική φάση και 1 στα 50.000 κύτταρα κατά τη ασυμπτωματική φάση της λοίμωξης (Ho *et al.*, 1989). Ιστολογικές μελέτες βιοψιών από τους λεμφαδένες με χρήση υβριδισμού *in situ* έδειξαν ότι τα επίπεδα του ιικού RNA ήταν υψηλά σε όλα τα στάδια της HIV-1 λοίμωξης (Pantaleo *et al.*, 1993).

Οι περισσότεροι ιοί που παράγονται στους λεμφαδένες παγιδεύονται σ' έναν εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο, ο οποίος είναι γνωστός ως θυλακικό δενδριτικό κύτταρο (FDC) (Pantaleo *et al.*, 1993). Τα κύτταρα FDC εντοπίζονται στα βλαστικά κέντρα των δευτερευόντων λεμφικών οργάνων και η λειτουργία τους έγκειται στην πρόσδεση ακέραιων αντιγόνων στα T-λεμφοκύτταρα και στη παγίδευση ανοσολογικών συμπλόκων, συμπεριλαμβανομένων και ικών σωματιδίων που έχουν αντιδράσει με αντισώματα. Παρόλο που τα παραπάνω κύτταρα δεν μολύνονται άμεσα από τον HIV-1, ενδεχομένως να διευκολύνουν τη μόλυνση σχετικών CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων. Μέσα σε τρεις μήνες μετά την οξεία φάση της λοίμωξης, η παρουσία του ιού γίνεται κυρίως αισθητή σε μεμονωμένα κύτταρα που εκφράζουν τον ιό με ελάχιστη ή και καμία παγίδευση των ικών σωματιδίων στο δίκτυο των κυττάρων FDC. Αυτή η παγίδευση είναι πιο εμφανής κατά τη συμπτωματική λοίμωξη (4-20 μήνες μετά την πρωτολοίμωξη) και κατά τη χρόνια λοίμωξη (2-3 χρόνια μετά την πρωτολοίμωξη) (Pantaleo *et al.*, 1998). Όμως, κατά τη χρόνια λοίμωξη, οι αριθμοί των κυττάρων που εκφράζουν HIV-1 σε λεμφικούς ιστούς είναι σημαντικά μικρότεροι σε σχέση με τους αντίστοιχους αριθμούς κατά τα αρχικά στάδια της νόσου (Pantaleo *et al.*, 1998).

Εφαρμόζοντας νέες τεχνικές για την ποσοτική μέτρηση του ιικού φορτίου, βρέθηκε ότι τα ικά σωματίδια του ιού ανιχνεύονται στο ελεύθερο από κύτταρα πλάσμα σε όλα τα στάδια της λοίμωξης (Piatak *et al.*, 1993). Κατά την κλινικά ασυμπτωματική φάση της λοίμωξης, τα επίπεδα του HIV-1 RNA στο πλάσμα είναι αρκετά σταθερά, αντανακλώντας μια σχεδόν σταθερή κατάσταση, κατά την οποία ο ρυθμός παραγωγής του ιού βρέθηκε να είναι ίσος με το ρυθμό απώλειας του (Perelson *et al.*, 1996, Ho *et al.*, 1995). Διαταράσσοντας αυτήν την ισορροπία του ιού με ισχυρά αντιρετροϊκά φάρμακα, συλλέχθηκαν πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους ρυθμούς απώλειάς του ελεύθερου ιού και των παραγωγικά μολυσμένων κυττάρων (Ho *et al.*, 1995). Οι πιο πάνω μελέτες έδειξαν ένα υπερβολικά υψηλό ρυθμό ιικού αναδιπλασιασμού, με ρυθμό παραγωγής ικών σωματιδίων που εκτιμάται ότι ξεπερνά τον αριθμό των 10<sup>10</sup> ανά ημέρα (Ho *et al.*, 1995, Perelson *et al.*, 1996).



### 3.1.3 Συμπτωματική φάση

Η σταθερή κατάσταση που περιγράφηκε παραπάνω τελικά διακόπτεται, με αποτέλεσμα να ελαττώνονται οι τιμές των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και να αυξάνεται το ιικό φορτίο, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την εκδήλωση του AIDS. Οι τιμές των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων μειώνονται από το φυσιολογικό εύρος των 600-1200 σε κάτω από 500 CD4 λεμφοκύτταρα/ μl (Lang *et al.*, 1989). Παράλληλα, εμφανίζονται αρκετές κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με το HIV, δηλαδή ειδικές ευκαιριακές λοιμώξεις, όπως, μολύνσεις των πνευμόνων, του γαστρικού σωλήνα, των γεννητικών οργάνων και άλλων οργάνων και διάφορες κακοήθειες, όπως σάρκωμα Kaposi και διάφοροι τύποι λυμφωμάτων. Επίσης, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν σημαντική απώλεια βάρους, κεφαλαλγία, πυρετούς, διάρροιες, λεμφαδενοπάθειες, εφίδρωση και νευρολογικά προβλήματα.

Η έναρξη της εκδήλωσης των προαναφερθέντων καταστάσεων σχετίζεται με τα επίπεδα των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων (Crowe *et al.*, 1991). Απουσία αντιρετροϊκής θεραπείας, η πτώση των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων συνεχίζεται μέχρι να εξαλειφθούν όλα αυτά τα κύτταρα. Κατά το τελικό στάδιο της νόσου, τα επίπεδα του ιικού φορτίου αυξάνονται παρά το μικρό αριθμό των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων. Ο πιο σημαντικός, ίσως, παράγοντας που επηρεάζει την εξέλιξη προς το AIDS, προτού παρατηρηθεί ουσιαστική ανοσολογική καταστροφή, είναι το σημείο αναφοράς, στο οποίο γίνεται σταθεροποίηση του ιικού φορτίου κατά το τέλος της φάσης της πρωτολοίμωξης (Mellors *et al.*, 1997). Ωστόσο, οι παράμετροι που καθορίζουν αυτό το σημείο αναφοράς του ιικού φορτίου και συνεπώς και την κλινική πρόγνωση, είναι περίπλοκες και εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και που αφορούν τον ξενιστή και τον ιό (Touloumi *et al.*, 2000, Anastassopoulou *et al.*, 2005, Anastassopoulou *et al.*, 2003). Διάφοροι παράγοντες όπως είναι η ηλικία, οι γενετικές διαφορές ανάμεσα στα άτομα φορείς, η συν-μόλυνση με άλλους μικροοργανισμούς και το ποσό της ιαιμίας του κάθε στελέχους ίσως να επηρεάζουν το ρυθμό και τη σοβαρότητα της προόδου της ασθένειας (Crowe *et al.*, 1991).

## 3.2 HIV-1 Αντιρετροϊκή θεραπεία και ανθεκτικότητα

### 3.2.1 HIV-1 Αντιρετροϊκή θεραπεία

Η φαρμακευτική αγωγή που δίνεται στους ασθενείς με HIV-1 ονομάζεται αντιρετροϊκή θεραπεία και καταπολεμά τις παθήσεις τις σχετιζόμενες με το AIDS. Η

χορηγία αυτού του είδους θεραπείας άρχισε το 1996 και μετέτρεψε το AIDS από μια θανατηφόρο νόσο σε μια χρόνια πάθηση. Τα φάρμακα που δίνονται έχουν παρατείνει και βελτιώσει κατά πολύ την ζωή των οροθετικών προλαμβάνοντας και θεραπεύοντας ασθένειες, όπως η πνευμονία *Pneumocystis carinii*, η μόλυνση με Cytomegalovirus και μυκητιάσεις. Ο στόχος της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι να μειώσει και να διατηρήσει το HIV-RNA φορτίο σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (<50 copies/ml) (Yeni *et al.*, 2004), καθώς έχει παρατηρηθεί ότι όταν το HIV-RNA φορτίο είναι χαμηλό το ποσό των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων φτάνει τα φυσιολογικά επίπεδα. Εάν η θεραπεία σταματήσει, οι παράμετροι αντιστρέφονται και γι' αυτό το λόγο η χορήγηση της θεραπείας διαρκεί για όλη τη ζωή των ασθενών (Yeni, 2006).

Μέχρι σήμερα οι τρεις κύριες ομάδες αντιρετροϊκών φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πρακτική είναι οι δύο κατηγορίες αναστολέων του ενζύμου RT, οι νουκλεοσιδικοί αναστολείς (NRTIs) και οι μη-νουκλεοσιδικοί αναστολείς (NNRTIs) και οι αναστολείς της PR (PIs). Πρόσφατα, ακόμη τρεις νέες κατηγορίες φαρμάκων προστέθηκαν στην αντιρετροϊκή θεραπεία και άρχισαν να χρησιμοποιούνται κλινικά, ένας αναστολέας της σύντηξης μεμβρανών (FI), δύο αναστολείς της IN (Is) και ένας αναστολέας του CCR5 (P5I) (Shafer *et al.*, 2008) (Διαγρ. 1). Η μέχρι τώρα αντιρετροϊκή θεραπεία που χορηγείται, διατυπώνεται με τον όρο HAART (Highly active antiretroviral combination therapy) και είναι συνδυασμός αντιρετροϊκών φαρμάκων από δύο διαφορετικές κατηγορίες αναστολέων (Yeni *et al.*, 2004). Στη HAART χορηγούνται συνήθως, δύο NRTIs μαζί με ένα PI/ritonavir ή με ένα NNRTI. Τα NNRTIs χρησιμοποιούνται πιο συχνά από ότι τα PIs, λόγω του ότι είναι πιο βολικά στη δοσολογία (Yeni, 2006). Έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός δύο NRTIs με ένα τρίτο είναι λιγότερο ενεργός από τους άλλους συνδυασμούς (Gulick *et al.*, 2004) και για το λόγο αυτό ένας τέτοιος συνδυασμός δεν συνιστάται από τους κλινικούς γιατρούς (Yeni, 2006).

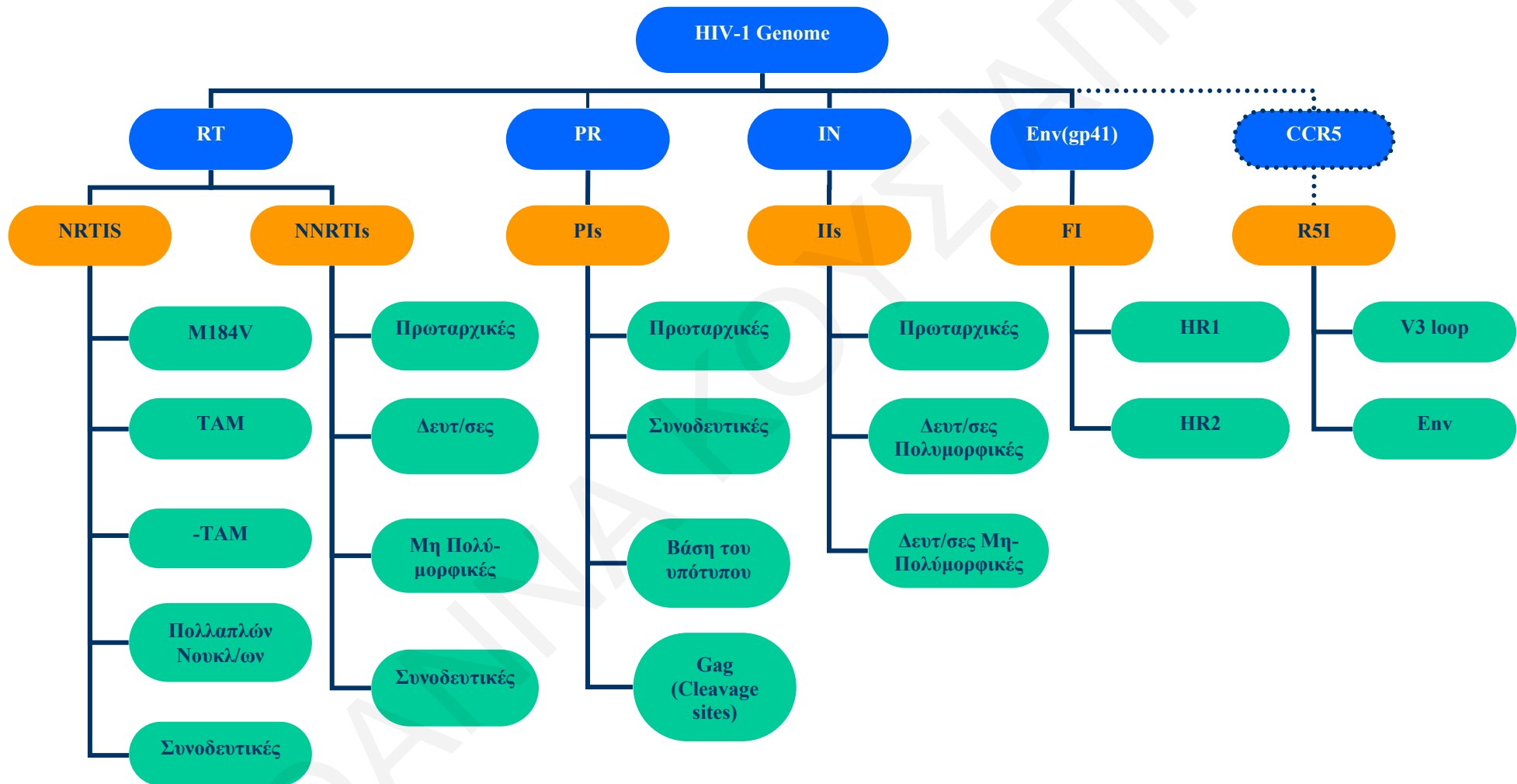
Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη εάν η πρώιμη HIV λοίμωξη πρέπει να υποστηρίζεται από φαρμακευτική αγωγή, εκτός και αν έχει σοβαρή μορφή με νευρολογικά συμπτώματα και χαμηλή τιμή CD4 κυττάρων/ μλ. Οι χρόνιοι ασθενείς που παρουσιάζουν λίγα, σχετικά με το HIV συμπτώματα, πρέπει να παίρνουν φαρμακευτική αγωγή διότι ο κίνδυνος για γρήγορη ανάπτυξη προς AIDS είναι μεγάλος. Στους ασυμπτωματικούς χρόνιους ασθενείς, η απόφαση για την έναρξη της αντιρετροϊκής θεραπείας βασίζεται στην τιμή των CD4 κυττάρων/ μλ, αλλά δεν υπάρχει ένα καθορισμένο όριο CD4 κυττάρων/ μλ όπου η θεραπεία θα αρχίσει σε όλους τους ασθενείς (Yeni *et al.*, 2004). Λαμβάνοντας υπόψη τον κίνδυνο της επικράτησης σοβαρών λοιμώξεων, όλοι οι ασθενείς με τιμή CD4 < 200 κύτταρα/ μλ

πρέπει να ξεκινούν θεραπεία, αντιθέτως, ασθενείς με  $> 350$  κύτταρα/  $\mu\text{l}$  πρέπει να εξετάζονται χωρίς να λαμβάνουν θεραπεία. Στο εύρος 200-350 κύτταρα/  $\mu\text{l}$ , η απόφαση εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η μείωση της τιμής των CD4 κυττάρων, το επίπεδο του HIV-RNA στο πλάσμα και η θέληση του ασθενή να αρχίσει μια μακροχρόνια θεραπευτική αγωγή (Yeni, 2006). Στην πλειοψηφία των HIV-1 μολυσμένων ατόμων η HAART επιτυγχάνει την αύξηση της τιμής των CD4 κυττάρων/  $\text{ml}$  και τη μείωση της αιμίας του πλάσματος σε ελάχιστα επίπεδα που μπορεί να διατηρηθούν για πολύ καιρό (Yerly *et al.*, 2000). Παρόλη την επιτυχή μακρόχρονη ιολογική μείωση που προκαλεί η HAART, κλινικοί παράγοντες, όπως, η τοξικότητα, οι σοβαρές παρενέργειες των φαρμάκων και οι φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις, ανοσολογικοί παράγοντες, όπως, η αποτυχία της αύξησης της τιμής των CD4 κυττάρων/  $\mu\text{l}$  παρά την ιική καταστολή και ιολογικοί παράγοντες, όπως, η μη κατασταλμένη αιμία μετά από θεραπεία 12-24 εβδομάδων ή η ανίχνευση του ιού μετά από μια περίοδο μη ανίχνευσης, μπορούν να αντιστρέψουν την επιτυχή πορεία. Παράγοντες που συνεισφέρουν επιπλέον στην ιολογική αποτυχία είναι η προηγούμενη χρήση ενός ή δύο αντιρετροϊκών φαρμάκων, η συνεχής χρήση των ίδιων σκευασμάτων, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας και οι προσωπικές επιλογές των ασθενών (Hughes *et al.*, 2008). Οι αλλαγές στη θεραπεία είναι συχνό φαινόμενο κατά το διάστημα χορήγησης της θεραπευτικής αγωγής και συμβαίνει για διάφορους λόγους πχ. λόγω παρενεργειών, αλληλεπίδρασης φαρμάκων, αποτυχία στη μείωση του ιικού φορτίου, εγκυμοσύνης, χειρουργικής επέμβασης, διαθεσιμότητα καταλληλότερων φαρμάκων ή άλλων παραγόντων (Yeni, 2006). Τα HIV-1 αντιρετροϊκά φάρμακα, όπως και τα διαγνωστικά τεστ και τα εμβόλια για τον ιό HIV-1 έχουν σχεδιαστεί και αναπτυχθεί κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, όπου επικρατεί ο υπότυπος B. Τόσο τα φάρμακα, όσο και τα τεστ και εμβόλια που παρασκευάζονται με βάση τα δεδομένα ερευνών σε στελέχη του υπότυπου B μπορεί να μην είναι βέλτιστα για πληθυσμούς όπου επικρατούν μη-B υπότυποι, κάτι που ισχύει σε πολλές περιοχές του πλανήτη που έχουν το κυριότερο πρόβλημα, όπως την υποσαχάρια Αφρική, την Ασία και την Νότιο Αμερική (Janssens *et al.*, 1997).

### 3.2.2 Δημιουργία ανθεκτικότητας

Η επιτυχία της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι περιορισμένη και ο λόγος είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των στελεχών του ιού HIV-1 στα φάρμακα. Το 30-50% των ασθενών που παίρνουν θεραπεία επηρεάζεται (Perrin *et al.*, 1998, Beerenwinkel *et al.*, 2005a). Η ανθεκτικότητα μπορεί να αναπτυχθεί ως ένα τυχαίο φαινόμενο θετικής

**Διάγραμμα 1.** Απεικόνιση των διαφόρων αντιρετροϊκών στόχων του HIV-1 γονιδιώματος (μπλε χρώμα) και των κατηγοριών αντιρετροϊκών φαρμάκων του ιού HIV-1 (με πορτοκαλί χρώμα). Κάτω από κάθε κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων ενδεικνύονται οι διάφορες ομάδες μεταλλάξεων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας προς τους αναστολείς της κάθε κατηγορίας (πράσινο χρώμα) και παρουσιάζονται αναλυτικά στο Κεφ. 3.



επιλογής, καθώς το HIV αντιγράφεται γρήγορα, με ένα υψηλό ρυθμό μεταλλακτικότητας και χωρίς μηχανισμό επιδιόρθωσης των λαθών. Η δημιουργία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος του ιού που αποτελούν στόχο των αντιρετροϊκών φαρμάκων πχ. στις περιοχές που κωδικοποιούν για την πρωτεάση, την αντίστροφη μεταγραφάση, την ιντεγκράση και την gp41 περιοχή του γονιδίου *env*, οδηγούν στη σύνθεση πρωτεϊνών στις οποίες τα αντιρετροϊκά φάρμακα δεν επιδρούν με τον επιθυμητό τρόπο, με αποτέλεσμα η θεραπεία να μην πραγματοποιείται σωστά και τα ιικά στελέχη να ξεφεύγουν από την επιλεκτική πίεση των φαρμάκων (Sebastian *et al.*, 2004). Η αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας του HIV-1 δεν είναι κάτι απλό και αυτό οφείλεται σε φαινόμενα, όπως τα HIV-1 quasispecies, την εμφάνιση ανθεκτικότητας ενός στελέχους σε περισσότερα από ένα φάρμακα της ίδιας κατηγορίας (cross-resistance), την ύπαρξη ιικών DNA αντιγράφων που αντιπροσωπεύουν όλα τα στελέχη που έτυχαν προηγουμένως θεραπείας και ανθεκτικών στελεχών που δεν εκτέθηκαν ακόμη στα φάρμακα (Perrin *et al.*, 1998).

Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του ιού HIV είναι οι μεταλλάξεις που μειώνουν την ιική αντίδραση ως προς ένα φάρμακο. Οι αλλαγές αυτές εμφανίζονται ως αλλαγές στα αμινοξικά κατάλοιπα. Ένα μικρό μέρος των μεταλλάξεων ανήκει στους πολυμορφισμούς, που από μόνοι τους δεν αντιπροσωπεύουν μεταλλάξεις ανθεκτικότητας πρωτίστης σημασίας και δε μειώνουν την ευαισθησία στα φάρμακα (Johnson *et al.*, 2006). Υπάρχουν περιπτώσεις όπου μία μόνο μετάλλαξη στο γονίδιο της RT μπορεί να φέρει σε μεγάλο βαθμό ανθεκτικότητα στα διάφορα φάρμακα των κατηγοριών NRTIs και NNRTIs. Αντιθέτως, στο γονίδιο της PR χρειάζονται πολλές μεταλλάξεις ώστε να δημιουργηθεί ανθεκτικότητα σε φάρμακα αυτής της κατηγορίας (Perrin *et al.*, 1998). Οι μεταλλάξεις που έχουν ανευρεθεί μέχρι σήμερα αναγνωρίστηκαν με ένα ή και περισσότερα από τα πιο κάτω κριτήρια: τεστ ευαισθησίας σε κλινικά ή εργαστηριακά δείγματα, *in vitro* πειράματα που να δείχνουν τη συνεισφορά τους στην ανθεκτικότητα με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, γενετική αλληλούχιση στελεχών από ασθενείς που η θεραπεία τους ήταν αποτυχημένη, μελέτες συσχετισμού μεταξύ του γενότυπου και φαινοτυπικές αντιδράσεις σε ασθενείς που τους έχει χορηγηθεί ένα φάρμακο (Johnson *et al.*, 2006). Η αναγνώριση συγκεκριμένων μεταλλάξεων ανθεκτικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποφευχθεί η χρήση αντιρετροϊκών φαρμάκων που διατηρούν την ελάχιστη ενεργότητα σε σχέση με νεότερα φάρμακα που έχουν πλήρη ή σχεδόν πλήρη ενεργότητα (Shafer *et al.*, 2008). Πιο κάτω,

περιγράφονται αναλυτικά οι διάφορες κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων και οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αυτούς (Διαγρ. 1).

### 3.2.3 *NRTIs Αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης*

Το ένζυμο RT ήταν ένας από τους πρώτους στόχους ανάπτυξης αντιρετροϊκών φαρμάκων. Οι NRTIs ήταν η πρώτη κατηγορία φαρμάκων που αναπτύχθηκε για τη θεραπεία του HIV. Το zidovudine (AZT ή ZDV) ήταν το πρώτο διαθέσιμο φάρμακο για τη θεραπεία του HIV. Πολλά άλλα NRTIs έχουν αναπτυχθεί, αλλά το φαινόμενο του cross resistance μεταξύ τους και η σύγκλιση των μονοπατιών ανθεκτικότητας περιορίζουν τη χρήση τους μετά την ιολογική αποτυχία ενός αρχικού φαρμάκου (Hughes *et al.*, 2008). Τα υπόλοιπα φάρμακα της κατηγορίας αυτής, που είναι εγκεκριμένα από το FDA είναι τα ακόλουθα: didanosine (ddI), zalcitabine (ddC), lamivudine (3TC), stavudine (d4T), abacavir (ABC), tenofovir (TDF) και emtricitabine (FTC). Τα NRTIs είναι σύνθετα νουκλεοσίδια. Το φάρμακο εισέρχεται στο κύτταρο και φωσφορυλιώνεται από κυτταρικά ένζυμα του ξενιστή. Τα φωσφορυλιωμένα NRTIs συναγωνίζονται με τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) για την ενσωμάτωσή τους στη νεοσχηματιζόμενη DNA αλυσίδα από την αντίστροφη μεταγραφάση. Από τα NRTIs λείπει η τελική υδροξυλομάδα (3'-OH), η οποία είναι αναγκαία για την ενσωμάτωση στη νέα αλυσίδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ενσωμάτωση ενός NRTI στην DNA αλυσίδα να σημαίνει και τη λήξη του πολυμερισμού της αλυσίδας (Hughes *et al.*, 2008).

Οι ανθεκτικές μεταλλάξεις ως προς τα NRTIs περιλαμβάνουν τη μετάλλαξη M184V, τις μεταλλάξεις αναλόγων θυμιδίνης (TAM), μεταλλάξεις που επιλέγονται εν απουσία φαρμάκων αναλόγων θυμίνης, μεταλλάξεις πολλαπλών νουκλεοσιδίων και διάφορες μη-πολυμορφικές συνοδευτικές μεταλλάξεις. Υπάρχουν δύο βιοχημικοί μηχανισμοί δημιουργίας ανθεκτικότητας προς τα NRTIs: ο πρώτος μηχανισμός αφορά την ενισχυμένη μη επιλογή και τη μειωμένη ενσωμάτωση των NRTIs σε σχέση με τα φυσικά νουκλεοσίδια. Ο διαχωρισμός συμβαίνει όταν η αντίστροφη μεταγραφάση διατηρήσει την ικανότητα της να αναγνωρίζει τα φυσικά νουκλεοσίδια ως υποστρώματα και να τα διαχωρίζει από τα NRTI, με την αποφυγή της δέσμευσης του φαρμάκου (Hughes *et al.*, 2008, Shafer *et al.*, 2008). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η ενισχυμένη απομάκρυνση των ενσωματωμένων NRTIs μέσω της προώθησης μιας φωσφορολυτικής αντίδρασης που οδηγεί στο ξεμπλοκάρισμα του εκκινήτη της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής (Shafer *et al.*, 2008). Η μετάλλαξη M184V, οι μεταλλάξεις των μη-θυμιδικών αναλόγων K65R και L74V και η πολλαπλά νουκλεοσιδική ανθεκτική μετάλλαξη Q151M δρουν με

τον πρώτο μηχανισμό (Deval *et al.*, 2002, Deval *et al.*, 2004). Αντιθέτως οι TAM, οι μεταλλάξεις ένθεσης στη θέση T69 που σχετίζονται με τις πολλαπλές νουκλεοσιδικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας και πολλές συνοδευτικές μεταλλάξεις δρουν με το δεύτερο μηχανισμό (Arion *et al.*, 1998, Boyer *et al.*, 2001).

### 3.2.3.1 Μετάλλαξη M184V

Η μετάλλαξη M184V είναι η πιο κοινή μετάλλαξη ανθεκτικότητας. *In vitro* προκαλεί υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο 3TC και στο FTC, χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο ddI και στο ABC και αυξημένη στο ZDV, στο d4T και στο TDF (Whitcomb *et al.*, 2003). Αν και η ύπαρξη της μετάλλαξης M184V σε HIV-1 στελέχη προκαλεί υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο 3TC, έχει προταθεί από κάποιες αρχικές έρευνες στην μονοθεραπεία με 3TC, ότι τα επίπεδα του HIV-1 RNA πλάσματος παραμένουν στα 0.5log αντίγραφα κάτω από το όριο σε ασθενείς που λαμβάνουν 3TC για 6-12 μήνες, παρά την ανάπτυξη της μετάλλαξης M184V και του υψηλού επιπέδου φαινοτυπικής ανθεκτικότητας προς το 3TC (Pluda *et al.*, 1995). Επιπλέον στοιχεία από διπλά σκευάσματα που περιέχουν 3TC και ακόμη ένα NRTI, πρότειναν ότι το 3TC έχει αντική δράση ακόμα και σε ασθενείς που τα ιικά τους στελέχη περιέχουν τη μετάλλαξη M184V (Diallo *et al.*, 2003). Η μετάλλαξη M184V προκαλεί μία μέση μείωση στην ευαισθησία του φαρμάκου της τάξης του 1.5 και 3.0, αντίστοιχα στα ddI και ABC, στη τεχνική PhenoSenseGT™. Αυτά τα επίπεδα μείωσης είναι πάνω από το όριο του φυσιολογικού, αλλά κάτω από το επίπεδο όπου τα συγκεκριμένα NRTI είναι ανενεργά. (Petroopoulos *et al.*, 2000). Διάφορες κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι τα ddI και ABC διατήρησαν την ενεργότητα τους στην παρουσία της μετάλλαξης M184V (Brun-Vezinet *et al.*, 2003, Marcelin *et al.*, 2005, Eron *et al.*, 2007). Η φαινοτυπική και κλινική σημασία της μετάλλαξης M184V επηρεάζεται από τη παρουσία ή την απουσία άλλων NRTI ανθεκτικών μεταλλάξεων. Για παράδειγμα η παρουσία της K65R ή της L74V σε συνδυασμό με την M184V είναι αρκετά για τη δημιουργία υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στο ABC και στο ddI. Αντιθέτως, τρία ή περισσότερα TAMs μαζί με την M184V είναι απαραίτητα για την υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στα ABC και ddI (Rhee *et al.*, 2004).

### 3.2.3.2 Μεταλλάξεις αναλόγων θυμιδίνης

Ένας άλλος μηχανισμός ανθεκτικότητας στην κατηγορία NRTIs είναι οι μεταλλάξεις TAM που επιλέγονται από τα θυμιδικά ανάλογα ZDV και d4T και μειώνουν

την ευαισθησία σε αυτά τα NRTIs και σε μικρότερο βαθμό στα ABC, ddI και TDF (Whitcomb *et al.*, 2003). Οι μεταλλάξεις TAM είναι κοινές σε χώρες με χαμηλό βιοτικό επίπεδο, όπου οι φαρμακευτικοί συνδυασμοί που περιέχουν θυμιδικά ανάλογα είναι η κύρια θεραπεία που λαμβάνουν οι ασθενείς. Επίσης, οι TAM είναι κοινές σε ιούς από άτομα που άρχισαν θεραπεία την περίοδο πριν την έναρξη της HAART με τις ημιτελείς κατασταλτικές συνταγές θυμιδικών αναλόγων, αλλά γίνονται λιγότερο κοινές σε περιοχές που η NRTI συνδυασμοί TDF/FTC και ABC/3TC είναι η κύρια θεραπεία (Shafer *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις TAM διαχωρίζονται σε δύο διακριτά, αλλά επικαλυπτόμενα πρότυπα (Marcelin *et al.*, 2004). Το πρώτο πρότυπο περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις M41L, L210W και T215Y, ενώ το δεύτερο πρότυπο τις D67N, K70R, T215F και K219Q/E. Η μετάλλαξη D67N μπορεί να βρίσκεται και με TAM του πρώτου προτύπου (De Luca *et al.*, 2006). Ωστόσο, οι K70R και L210W σπάνια ανευρίσκονται μαζί (Yahi *et al.*, 2000). Οι TAM του πρώτου προτύπου προκαλούν υψηλά επίπεδα φαινοτυπικής και κλινικής ανθεκτικότητας στα θυμιδικά ανάλογα ZDV και d4T και cross resistance στα ABC, ddI και TDF, σε σχέση με τις μεταλλάξεις TAM του δεύτερου προτύπου (Cozzi-Lepri *et al.*, 2005). Η κλινική σημασία των TAM του δεύτερου προτύπου δεν είναι καλά χαρακτηρισμένη. Άλλες κοινές μεταλλάξεις σε διάφορες θέσεις TAM είναι οι μεταλλάξεις της θέσης T215 (T215C/D/E/I/S/V) (Yerly *et al.*, 1998), οι οποίες προέρχονται από την επαναμετάλλαξη της ανθεκτικής μετάλλαξης T215Y/F για να αυξήσουν την HIV-1 καταλληλότητα στην απουσία της επιλεκτικής φαρμακευτικής πίεσης. Οι διάφορες επαναμεταλλάξεις της θέσης T215 είναι συχνότερες από την επαναφορά στον άγριο τύπο T διότι για τις περισσότερες επαναμεταλλάξεις χρειάζεται μόνο μια νουκλεοτιδική μετάλλαξη σε αντίθεση με την επαναφορά από το Y ή το F όπου χρειάζονται δύο νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις. Οι T215 επαναμεταλλάξεις δεν μειώνουν την φαρμακευτική ευαισθησία από μόνες τους, αλλά η παρουσία τους σε ασθενείς που δεν έχουν πάρει προηγουμένως θεραπεία υποδεικνύει ότι οι ασθενείς αυτοί ίσως να μολύνθηκαν από ένα ιικό στέλεχος που είχε ήδη τη μετάλλαξη T215Y ή F (Rhee *et al.*, 2007). Παράλληλα, άλλες μεταλλάξεις που υπάρχουν σε θέσεις TAM είναι στη θέση K219, όπου οι μεταλλάξεις K219N/R σε αντίθεση με τις K219Q/E βρίσκονται στο πρώτο πρότυπο των TAM, αντί του δεύτερου (Rhee *et al.*, 2007) και στη θέση 70, οι μεταλλάξεις K70E/G μειώνουν την ευαισθησία των ABC, ddI, TDF, 3TC, and FTC και αυξάνουν την ευαισθησία του ZDV (Shafer *et al.*, 2008).



### 3.2.3.3 Μεταλλάξεις που επικρατούν στην απουσία θυμιδικού αναλόγου

Οι πιο κοινές μεταλλάξεις σε ασθενείς που αναπτύσσουν ιολογική αποτυχία, ενώ λαμβάνουν ένα μη θυμιδικό ανάλογο NRTI περιλαμβάνουν τη μετάλλαξη M184V μόνη της ή σε συνδυασμό με τη K65R ή τη L74V (Shafer *et al.*, 2008). Η K65R προκαλεί ενδιάμεση ανθεκτικότητα στα TDF, ABC, ddI, 3TC και FTC, χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο d4T και αυξημένη ευαισθησία στο ZDV (Antinori *et al.*, 2007). Η L74V προκαλεί ενδιάμεση ανθεκτικότητα στο ddI και στο ABC και μικρή αύξηση στην ευαισθησία στο ZDV και το TDF (Rhee *et al.*, 2006b). Οι μεταλλάξεις K65R και L74V σπάνια βρίσκονται μαζί στα ίδια ιικά στελέχη, αλλά μερικοί ασθενείς που ανέπτυξαν ιολογική αποτυχία λόγω της μετάλλαξης L74V, ενώ λάμβαναν ABC ή ddI, βρέθηκαν να φέρουν και λίγα στελέχη με την επιπλέον μετάλλαξη K65R (Descamps *et al.*, 2006). Υπάρχει ένας αμφίδρομος ανταγωνισμός μεταξύ των μεταλλάξεων K65R και TAM ως προς το μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε *in vitro* πειράματα (Parikh *et al.*, 2006a), και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ιικά στελέχη που περιέχουν τη μετάλλαξη K65R σπάνια να εμφανίζουν TAM μεταλλάξεις (Parikh *et al.*, 2006b). Η μετάλλαξη K65R επικρατεί περισσότερο σε στελέχη των μη-B υπότυπων από ότι σε στελέχη του B υπότυπου (Brenner *et al.*, 2006). Άλλες κοινές μεταλλάξεις που επικρατούν κατά την ιολογική αποτυχία με φάρμακα μη-θυμιδικών αναλόγων περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις K65N, K70E/G και Y115F (Shafer *et al.*, 2008).

### 3.2.3.4 Μεταλλάξεις ανθεκτικότητας πολλαπλών νουκλεοσιδίων

Οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας πολλαπλών νουκλεοσιδίων αφορούν τις μεταλλάξεις στις θέσεις Q151 και T69. Οι αμινοξικές ενθέσεις στο κωδικόνιο 69 επικρατούν στην παρουσία πολλαπλών TAM και σχετίζονται με ενδιάμεση ανθεκτικότητα ως προς τα 3TC και FTC και υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο κάθε ένα από τα υπόλοιπα NRTI (Masquelier *et al.*, 2001). Η μετάλλαξη Q151M συνοδεύεται συνήθως από δύο ή περισσότερες μεταλλάξεις, όπως οι A62V, V75I, F77L και F116Y και το σύμπλοκο αυτό προκαλεί υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στα ZDV, d4T, ddI και ABC και ενδιάμεση ανθεκτικότητα στα TDF, 3TC και FTC (Rhee *et al.*, 2006b).

### 3.2.3.5 Συνοδευτικές μεταλλάξεις

Οι συνοδευτικές μεταλλάξεις K43E/Q/N, E203D/K, H208Y, D218E, H221Y, K223Q και L228H/R είναι μη-πολυμορφικές NRTI-επιλεγμένες μεταλλάξεις οι οποίες ακολουθούν τις μεταλλάξεις TAM και έχουν δυσδιάκριτες επιδράσεις στην ευαισθησία

των HIV-1 NRTIs και στην αντιγραφή (Rhee *et al.*, 2006b). Διάφορες μεταλλάξεις της δομής RNaseH της HIV-1 RT έχουν επίσης συνοδευτικό ρόλο στη μείωση της ευαισθησίας του HIV-1 προς τα NRTIs σε συνδυασμό με τις μεταλλάξεις TAM, πιθανότερο με τη μείωση της ενεργότητας της RNaseH, δίνοντας περισσότερο χρόνο για τη δράση των μεταλλάξεων TAM που ακολουθούν το μηχανισμό πρόκλησης ανθεκτικότητας με το ξεμπλοκάρισμα του εκκινητή της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής (Nikolenko *et al.*, 2005). Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις είναι οι N348I, G333E/D, A360T και A371V που ανευρίσκονται σε ποσοστό 10% ανάμεσα σε ασθενείς που τους χορηγούνται NRTIs (Shafer *et al.*, 2008).

### 3.2.4 NNRTIs Αναστολείς αντίστροφης μεταγραφής

Οι NNRTIs είναι η δεύτερη κατηγορία αναστολέων του ενζύμου RT. Οι αναστολείς αυτοί προσδένονται σε μία υδροφοβική αλλοστερική θέση κοντά, αλλά όχι παρακείμενα του ενεργού κέντρου του ενζύμου RT, που σχηματίζεται στη δομή της πολυμεράσης της υπομονάδας p66. Η δέσμευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση τριών αλυσίδων β-πτυχωτού της p66 υπομονάδας που περιέχουν αμινοξικά κατάλοιπα Asp. Αυτή η αλλαγή στη στερεοδιάταξη δίνει στην p66 υπομονάδα την ίδια μορφή με την ανενεργή μορφή της υπομονάδας p51 με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Gulick, 2003, Kohlstaedt *et al.*, 1992). Μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί από το FDA τέσσερα φάρμακα αυτής της κατηγορίας, το Nevirapine (NVP), το Delavirdine (DLV), το Efavirenz (EFV) και το Etravirine (ETR) (Shafer *et al.*, 2008).

Σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα NNRTIs βρίσκονται στη θέση δέσμευσης των φαρμάκων ή σε γειτονικά κατάλοιπα της θέσης (Ren *et al.*, 2008). Ο μεγαλύτερος περιορισμός των NNRTIs είναι ο χαμηλός γενετικός φραγμός στην ανθεκτικότητα. Αρκεί μια μοναδική μετάλλαξη θέσης σε μια θέση δέσμευσης NNRTI για να προκαλέσει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και cross-resistance σε άλλα NNRTIs (Hughes *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας των NNRTI ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες, τις πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI, τις δευτερεύουσες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI, τις δευτερεύουσες μη-πολυμορφικές μεταλλάξεις και τις πολυμορφικές συνοδευτικές μεταλλάξεις.

#### 3.2.4.1 Πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI

Οι πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας προκαλούν υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα NNRTI. Αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της

θεραπείας με NNRTIs. Κάθε μια από τις πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI, K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H, και G190A/S/E προκαλεί υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο NVP και ποικίλη ανθεκτικότητα στο EFV, που κυμαίνεται από περίπου δύο φορές για τις V106A και Y181C, έξι φορές για τη G190A, 20 φορές για τη K103N, και περισσότερες από 50 φορές για τις Y188L και G190S (Rhee *et al.*, 2006b). Αντίθετα, οι ασθενείς με οποιαδήποτε από πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI μπορούν να ωφεληθούν από τη θεραπεία με το ETR, αν και οι μεταλλάξεις στη θέση 181 και σε μικρότερη έκταση στη θέση 190 μειώνουν την ευαισθησία στο ETR και μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη του υψηλού επιπέδου ETR ανθεκτικότητα (Lazzarin *et al.*, 2007). Το τελευταίο φάρμακο που αναπτύχθηκε αυτής της κατηγορίας, το ETR, είναι πολύ ευέλικτο δομικά με αποτέλεσμα να δεσμεύεται κατάλληλα στη θέση δέσμευσης, ακόμη και στην παρουσία πρωταρχικών μεταλλάξεων σχετικών με την ανθεκτικότητα ως προς τα NNRTIs (Udier-Blagonic *et al.*, 2003). Αυτή του η ιδιότητα δημιουργεί ένα υψηλό γενετικό φραγμό στην ανθεκτικότητα από ότι άλλα NNRTIs (Hughes *et al.*, 2008). Το ETR είναι ιδανικό για ασθενείς που φέρουν την μετάλλαξη K130N, αλλά η εμφάνιση οποιασδήποτε άλλης μετάλλαξης σχετικής με την ανθεκτικότητα του ETR, θα μειώσει την καταλληλότητά του (Hughes *et al.*, 2008)

#### 3.2.4.2 Κύριες δευτερεύουσες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI

Οι δευτερογενής μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI εμφανίζονται συνήθως σε συνδυασμό με τις πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI, αλλά έχουν επίσης κλινικά σημαντικές επιπτώσεις για την επιλογή ενός NNRTI. Οι L100I και K101P που εμφανίζονται σε συνδυασμό με τη K103N, μειώνουν περαιτέρω την ευαισθησία στο NVP και EFV από 20 φορές όταν η K103N είναι μόνη της σε 100 φορές περισσότερο (Rhee *et al.*, 2006b). Αν και οι ιοί με K103N είναι πλήρως ευαίσθητοι στο ETR, στελέχη ιών με τις μεταλλάξεις L100I και K103N επιδεικνύουν περίπου 10 φορές μειωμένη ευαισθησία (Vingerhoets *et al.*, 2005). Οι μεταλλάξεις P225H και K238T/N εμφανίζεται σε συνδυασμό με τη K103N και συνεργικά μειώνουν την ευαισθησία στα NVP και EFV (Parkin *et al.*, 2006). Η μετάλλαξη F227L σχεδόν πάντα εμφανίζεται με τη V106A, οδηγώντας σε μείωση στην ευαισθησία του NVP (Balzarini *et al.*, 1998). Η μετάλλαξη M230L που μπορεί να εμφανιστεί μόνη της, μειώνει την ευαισθησία όλων των NNRTIs συμπεριλαμβανομένου και του ETR 20 φορές ή και περισσότερο (Vingerhoets *et al.*, 2005). Οι V179F, F227C, L234I και L318F είναι σπάνιες μεταλλάξεις μεγάλης σπουδαιότητας μετά τη έγκριση κυκλοφορίας του ETR από το FDA (Shafer *et al.*, 2008).

#### 3.2.4.3 Δευτερεύουσες μη-πολυμορφικές μεταλλάξεις των NNRTI

Οι δευτερεύουσες μη-πολυμορφικές μεταλλάξεις των NNRTI μπορούν να εμφανιστούν μόνες ή σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας NNRTI και προκαλούν χαμηλής έντασης μείωση στην ευαισθησία των NNRTI. Οι A98G, K101E, V108I και V179D/E είναι κοινές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας που μειώνουν ευαισθησία στο NVP και EFV περίπου 2 με 5 φορές (Rhee *et al.*, 2003). Αν και η μετάλλαξη K103R εμφανίζεται μόνη της στο 1% περίπου των οροθετικών ατόμων που δεν πήραν θεραπεία και δεν έχει καμία επίδραση στην ευαισθησία των NNRTIs, ο συνδυασμός της K103R με τη V179D μειώνει την ευαισθησία των NVP και EFV μέχρι και 15 φορές (Parkin *et al.*, 2006). Η μετάλλαξη V179D και σπάνια οι A98G και V108I, παρατηρούνται σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει ποτέ NNRTI (Shafer *et al.*, 2007).

#### 3.2.5.1 Συνοδευτικές μεταλλάξεις NNRTI

Οι πολυμορφικές συνοδευτικές μεταλλάξεις του ενζύμου RT, όπως K101Q, I135T/M, V179I και L283I, μειώνουν την ευαισθησία στο NVP και EFV μέχρι και δύο φορές και δρουν συνεργιστικά με τις πρωταρχικές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας (Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2007). Άλλες μεταλλάξεις όπως οι L74V, H221Y, K223E/Q, L228H/R και N348I που επιλέγονται πρώτιστα από τα NRTI, μπορούν να προκαλέσουν μειώσεις στην ευαισθησία των NNRTI (Saracino *et al.*, 2006, Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2007).

#### 3.2.5 Αναστολείς πρωτεάσης

Οι αναστολείς της πρωτεάσης, PIs, μιμούνται τα φυσικά υποστρώματα του ενζύμου πρωτεάσης του HIV και δεσμεύονται στο ένζυμο, αναστέλλοντας την πρωτεόλυση των μετα-μεταφρασμένων πρωτεϊνών και με αυτόν τον τρόπο αποτρέπουν τη συγκρότηση ενός νέου ιού (Hughes *et al.*, 2008). Δεδομένου ότι η κατηγορία PI έχει επεκταθεί σε εννέα εγκεκριμένα από το FDA φάρμακα, οι μεμονωμένοι PIs έχουν όλο και περισσότερο συγκεκριμένους ρόλους. Το Ritonavir (r) χρησιμοποιείται απλώς για τη φαρμακοκινητική ώθηση πολλών PIs μέσω της χορήγησης μικρών δόσεων (Yeni, 2006). Οι PI αναστολείς lopinavir/r, atazanavir/r, fosamprenavir/r και λιγότερο συνήθως το saquinavir/r χρησιμοποιούνται για την θεραπεία πρώτης γραμμής, ενώ τα lopinavir/r, tipranavir/r, και darunavir/r χρησιμοποιούνται για την τελική θεραπεία (Hammer *et al.*, 2008). Το Nelfinavir, το οποίο δεν μπορεί να βελτιωθεί από το ritonavir, και τα atazanavir και fosamprenavir είναι εναλλακτικές αλλά μη-προτιμητέες επιλογές για τη θεραπεία

πρώτης-γραμμής λόγω του υψηλού κινδύνου ιολογικής αποτυχίας λόγω ανθεκτικότητας σε σχέση με βελτιωμένα PIs. Αν και το indinavir/r μπορεί να είναι αποτελεσματικό για την θεραπεία πρώτης-γραμμής ή την τελική θεραπεία, δεν συστήνεται λόγω του υψηλού κινδύνου νεφρολιθίασης (Shafer *et al.*, 2008).

Τα PIs έχουν υψηλό γενετικό φραγμό στην ανθεκτικότητα. Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται μέσα ή παρακείμενα στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος και η δημιουργία επιπλέον μεταλλάξεων στο γονίδιο κατά τους διάφορους κύκλους αντιγραφής αυξάνουν την προσαρμοστικότητα του ιού έναντι των PIs και οδηγούν σε ανθεκτικότητα (Sebastian *et al.*, 2004). Τα PIs επιλέγουν ανθεκτικές μεταλλάξεις περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη κατηγορία αντιρετροϊκής θεραπείας και το φαινόμενο του cross-resistance είναι πολύ έντονο σε αυτή την κατηγορία. Διαχωρίζονται σε πρωταρχικές μεταλλάξεις που συχνά έχουν μικρή κλινική επίδραση και σε δευτερεύουσες συνοδευτικές μεταλλάξεις (Hughes *et al.*, 2008). Αν και πολλές μεταλλάξεις της πρωτεάσης απαιτούνται συχνά για να αναπτύξει ένα HIV-1 στέλεχος σημαντική ανθεκτικότητα σ' ένα ritonavir βελτιωμένο PI φάρμακο, μερικές μεταλλάξεις δείχνουν ότι ένα συγκεκριμένο PI, ακόμα και βελτιωμένο, δεν είναι αποτελεσματικό. Πολλές μεταλλάξεις της πρωτεάσης είναι συνοδευτικές, αντισταθμίζοντας την εξασθένιση του αναδιπλασιασμού από άλλες PI ανθεκτικές μεταλλάξεις ή μειώνουν την ευαισθησία των PI μόνο σε συνδυασμό με άλλες PI μεταλλάξεις ανθεκτικότητας. Η επίδραση των PI μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στην ευαισθησία των φαρμάκων μπορεί επίσης να διαμορφωθεί από τις μεταλλάξεις στην περιοχή gag cleavage site και ενδεχομένως σε άλλα μέρη του γονιδίου gag που επηρεάζουν την επεξεργασία της Gag-Pol πολυπρωτεΐνης (Shafer *et al.*, 2008).

### 3.2.5.1 Πρωταρχικές ανθεκτικές μεταλλάξεις πρωτεάσης

Οι πρωταρχικές PI ανθεκτικές μεταλλάξεις έχουν μεγάλη κλινική σημασία και αριθμούν 17 μεταλλάξεις. Για τις μεταλλάξεις σε 13 θέσεις από τις 17 έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την ευαισθησία σε ένα ή περισσότερα PI. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν τις θέσεις 23, 30, 32, 47, 48, 50, 82, και 84 στη σχισμή που δεσμεύεται το υπόστρωμα, τις θέσεις 46 και 54 στα πτυχωτά του ενζύμου και τις εσωτερικές ενζυμικές θέσεις 76, 88, και 90. Οι υπόλοιπες τέσσερις μεταλλάξεις στις θέσεις 24, 33, 53 και 73 συμπεριλαμβάνονται επειδή είναι μη-πολυμορφικές, εμφανίζονται συχνά και έχουν ανόμοια αποτελέσματα σε διαφορετικά PIs (Rhee *et al.*, 2006b). Εκτιμώντας ότι πολλές μεταλλάξεις μειώνουν την ευαισθησία του nelfinavir, οι L23I, D30N, M46I/L, G48V/M, I84V, N88D/S και L90M είναι σχετικές αντενδείξεις στη χρήση του nelfinavir δεδομένου ότι μια κατώτερη ιολογική

απάντηση στη θεραπεία θα ήταν αναμενόμενη σε σχέση με άλλα PI (Shafer *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις I50L και N88S και ενδεχομένως η I84V, είναι σχετικές αντενδείξεις για τη χρήση του atazanavir/r (Rhee *et al.*, 2006b). Οι G48V/M, I84V και L90M είναι σχετικές αντενδείξεις στη χρήση του saquinavir/r (Shafer *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις στις θέσεις V32I, I47V/A, I54L/M, και I84V είναι σχετικές αντενδείξεις στη χρήση του fosamprenavir/r (Shafer *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις στη θέση 82, καθώς επίσης και η I84V μπορούν να είναι σχετικές αντενδείξεις στη χρήση του indinavir/r (Shafer *et al.*, 2008). Σε έξι από τις 17 πρωταρχικές μεταλλάξεις PI ανθεκτικότητας, μόνο μια μετάλλαξη αποδείχθηκε να συνδέεται με ανθεκτικότητα σε PI και είναι οι εξής: L23I, L24I, D30N, V32I, L76V και L90M. Στις υπόλοιπες 11 θέσεις, διαφορετικές μεταλλάξεις συνδέονται με την PI ανθεκτικότητα. Οι μεταλλάξεις L33F και M46I/L, αν και μη-πολυμορφικές στους περισσότερους υπότυπους, εμφανίζονται με μια επικράτηση περίπου 0.5-1% σε στελέχη του υπότυπου A και της CRF01\_AE (Shafer *et al.*, 2007). Διάφορες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας συνδέονται με την αυξημένη ευαισθησία σε ένα ή περισσότερα PI, συμπεριλαμβανομένης της I50L η οποία αυξάνει την ευαισθησία σε όλα τα PI εκτός από το atazanavir, τις I50V και I54L που αυξάνουν την ευαισθησία του tipranavir, τη N88S που αυξάνει την ευαισθησία του fosamprenavir και την L76V που αυξάνει την ευαισθησία στα atazanavir, saquinavir, και tipranavir (Vermeiren *et al.*, 2007).

### 3.2.5.2 Συνοδευτικές ανθεκτικές μεταλλάξεις πρωτεάσης

Οι συνοδευτικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στις θέσεις 10, 20, 36, 63, και 71 οι οποίες ρυθμίζουν την δραστηριότητα των πρωτεάσεων για να αντισταθμίσουν τη μειωμένη ικανότητα που συνδέεται με τις πρωταρχικές PI μεταλλάξεις ανθεκτικότητας (Shafer *et al.*, 2008). Οι θέσεις 20, 36, και 63 είναι ιδιαίτερα πολυμορφικές. Αντιθέτως, οι μεταλλάξεις L10I/V και A71V/T εμφανίζονται στο 5 και 10%, αντίστοιχα, των ασθενών που δεν πήραν ποτέ PI φάρμακα και σε ένα πολύ μεγαλύτερο μέρος στους ασθενείς που λαμβάνουν PI φάρμακα (Rhee *et al.*, 2003). Σε μια αναδρομική μελέτη, οι μεταλλαγές στις θέσεις 10 και 36 συνδέθηκαν με έναν αυξανόμενο κίνδυνο ιολογικής αποτυχίας στους ασθενείς που λαμβάνουν τις παλαιότερες PI- βασισμένες θεραπευτικές αγωγές που περιέχουν nelfinavir ή οποιοδήποτε μη βελτιωμένο με ritonavir PI (Perno *et al.*, 2004). Επιπρόσθετες PI-επιλεγμένες συνοδευτικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν τις ιδιαίτερα πολυμορφικές μεταλλάξεις I13V, D60E, I62V, V77I και I93L, και πολλές ασυνήθιστες μη-πολυμορφικές μεταλλάξεις συμπεριλαμβανομένου των V11I, E34Q, E35G, K43T, K45I,

K55R, Q58E, T74P/A/S, V75I, N83D, P79A/S, I85V, L89V, T91S, Q92K και C95F (Vermeiren *et al.*, 2007).

### 3.2.5.3 Μεταλλάξεις του Gag(cleavage sites)

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με PI προκύπτουν μεταλλάξεις που βελτιώνουν τις κινητικές των PI-ανθεκτικών πρωτεασών σε διάφορες θέσεις της περιοχής τομής (cleavage sites) της πρωτεάσης (Cote *et al.*, 2001). Οι περισσότερες μεταλλάξεις της περιοχής gag(cleavage sites) εμφανίζονται στις θέσεις NC/p1 και p1/p6 (Cote *et al.*, 2001, Malet *et al.*, 2007), σημεία όπου η κοπή είναι καθοριστική για την επεξεργασία των Gag και Gag-Pol πολύ-πρωτεϊνών (Pettit *et al.*, 2005). Η μετάλλαξη A431V, στη θέση NC/p1, συνδέεται με τις μεταλλάξεις στις θέσεις 24, 46 και 82 των πρωτεάσεων (Verheyen *et al.*, 2006). Η μετάλλαξη L449F, στη θέση p1/p6, συνδέεται με το ζευγάρι μεταλλάξεων στη πρωτεάση D30N/N88D και με τη I84 V (Verheyen *et al.*, 2006). Η μετάλλαξη P453L στη περιοχή p1/p6, συνδέεται με τις μεταλλάξεις της πρωτεάσης 32, 47, 50, 84, και 90 (Verheyen *et al.*, 2006, Maguire *et al.*, 2002, Carrillo *et al.*, 1998). Ένα σύνολο τριών μεταλλάξεων τη περιοχής NC/p1 (A431V, K436E, και I437T/V) που αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια *in vitro* επιλογής με το υπο διερεύνηση PI RO033-4649, βρέθηκε να προκαλεί μια μείωση της ευαισθησίας σε διάφορα PI κατά δύο φορές, ακόμη και στην απουσία μεταλλάξεων στην πρωτεάση (Nijhuis *et al.*, 2007). Διάφορες μεταλλάξεις της περιοχής του πεπτιδίου p6, συμπεριλαμβανομένων και ενθέσεων σε μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, που περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο PTAP, εμφανίζονται συχνότερα σε ιούς με PI ανθεκτικές μεταλλάξεις από ότι σε φυσιολογικά ιικά στελέχη (Gatanaga *et al.*, 2002).

### 3.2.5.4 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των PI με βάση των υπότυπο

Οι φυσικοί πολυμορφισμοί στους διαφορετικούς υπότυπους πρωτεασών εμφανίζονται συχνά σε θέσεις των PI συνοδευτικών μεταλλάξεων ανθεκτικότητας σε στελέχη του υπότυπου B (Parkin *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, οι συνοδευτικές PI μεταλλάξεις ανθεκτικότητας I13V, K20I, M36I και I93L αντιπροσωπεύουν την ποικιλότητα αναφοράς σε ένα ή περισσότερους μη-B υπότυπους (Rhee *et al.*, 2006a). Οι γενετικοί μηχανισμοί της PI ανθεκτικότητας είναι ιδιαίτερα παρόμοιοι ανάμεσα στους διαφορετικούς υπότυπους (Kantor *et al.*, 2005). Παρόλο που και οι δύο μεταλλάξεις D30N και L90M εμφανίζονται σε στελέχη μη-B υπότυπων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με nelfinavir, η μετάλλαξη D30N εμφανίζεται συχνότερα στους ιούς του υπότυπου B και η μετάλλαξη L90M εμφανίζεται συχνότερα στους υπότυπους C, F, G και CRF01\_AE

(Abecasis *et al.*, 2005, Calazans *et al.*, 2005, Grossman *et al.*, 2004). Παρομοίως, ο πολυμορφισμός T74S που εμφανίζεται στο 8% των αλληλουχιών του υπότυπου C, αλλά σπάνια σε άλλους υπότυπους, συνδέεται με μειωμένη ευαισθησία στο nelfinavir (Rhee *et al.*, 2006b).

### 3.2.6 Αναστολείς Ιντεγκράσης

Μία νέα κατηγορία φαρμάκων, οι αναστολείς του ενζύμου ιντεγκράση (INs) αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια. Οι αναστολείς αυτοί έχουν σκοπό να μην αφήσουν το ένζυμο να ενσωματώσει το ιικό DNA στο DNA του ξενιστή. Ένας σημαντικός αριθμός αναστολέων ιντεγκράσης έχει αναφερθεί, αλλά πολλοί από αυτούς αποδείχθηκε ότι ανέστειλλαν άλλες διαδικασίες εκτός της ενσωμάτωσης του ιικού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή, όπως την είσοδο του ιού στα κύτταρα με παράδειγμα τα ολιγονουκλεοτίδια G-quartets (Cherapanov *et al.*, 1997) και το L-chicoric acid ή παράγωγά του. Ένα άλλο παράδειγμα είναι οι συνθετικές ενώσεις styrylquinolines (SQLs), που εκτός την αναστολή του 3'-processing και του strand transfer, εμποδίζουν την πυρηνική μεταφορά ανασυνδυασμένης ιντεγκράσης (Vandegraaff *et al.*, 2007). Επίσης, παράγωγα της κουμαρίνης αναστέλλουν την HIV-1 PR με την ίδια συγκέντρωση που αναστέλλουν την IN. Μια άλλη κατηγορία ενώσεων οι πυρανοδιπυριμιδίνες (PDPs) είναι ενώσεις που δεσμεύονται στην IN και έδειξαν ότι αναστέλλουν, τόσο το στάδιο του 3'-processing, όσο και το strand transfer (Pannecouque *et al.*, 2002). Προς το παρόν έχουν αναγνωρισθεί μόνο τα δικετοξέα (DKAs) ως αυθεντικοί αναστολείς της IN. Η γενική δομή περιλαμβάνει μια δικετόξυ ομάδα συνδεδεμένη με μια όξινη ομάδα και μια αρωματική ομάδα. Δρουν ως αναστολείς του σταδίου strand transfer με το να δεσμεύονται στην επιφάνεια που σχηματίζει το σύμπλοκο του ιικού DNA με την IN και τα δισθενή μέταλλα, ακριβώς μετά το στάδιο του 3'-processing (Hazuda *et al.*, 2000). Οι DKAs είναι οι μόνοι αναστολείς για τους οποίους υπάρχει δομική πληροφορία σε σχέση με την IN, όπως τον αναστολέα 5CITEP που έχει μελετηθεί από τους Goldgur *et al.* 1999 για τη δέσμευσή του με την CCD δομή της IN (Goldgur *et al.*, 1999). Ο αναστολέας τοποθετείται ανάμεσα στα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου και σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το E152. Τα κατάλοιπα D64 και D116 αλληλεπιδρούν το καθένα με ένα ιόν  $Mg^{2+}$ . Η δικετόξυ ομάδα των DKAs είναι υπεύθυνη για τη συμπλοκοποίηση του δισθενούς μετάλλου. Στην αρωματική ομάδα έχει αιτιολογηθεί η επιλεκτικότητα των DKAs ως προς την αναστολή της αντίδρασης strand transfer. Οι μέχρι στιγμής γνωστοί λειτουργικοί αναστολείς της ιντεγκράσης είναι τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, elvitegravir (GS9137) και raltegravir (MK-0518), τα οποία



μπλοκάρουν το ένζυμο με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται η διαδικασία strand transfer (Shafer *et al.*, 2008). Το raltegravir χορηγείται σε συνδυασμό με άλλους αναστολείς για τη θεραπεία της HIV-1 λοίμωξης μόνο σε ενήλικους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αντιρετροϊκή θεραπεία, αλλά φέρουν αυξημένο ιικό φορτίο και στελέχη ανθεκτικά σε πολλούς αντιϊκούς αναστολείς και βρίσκονται στα τελευταία στάδια της θεραπείας τους (FDA, 2009).

*In vitro* δεδομένα από μελέτες ευαισθησίας σε φάρμακα και της αλληλουχίας της IN από HIV-1 ασθενείς που προηγουμένως τους είχαν χορηγηθεί αντιρετροϊκά φάρμακα άλλων κατηγοριών ή που δεν πήραν ποτέ φάρμακα, έδειξαν ότι δεν υπάρχει το φαινόμενο του cross-resistance μεταξύ των INI και των άλλων αναστολέων του HIV-1 (Shimura *et al.*, 2008). Οι περισσότερες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας των INI βρίσκονται στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Μερικές από τις μεταλλάξεις ανθεκτικότητας των INI μειώνουν την ευαισθησία στο φάρμακο από μόνες τους, ενώ άλλες αντισταθμίζουν τη μειωμένη ικανότητα του ενζύμου σε συνδυασμό με άλλες ανθεκτικές μεταλλάξεις των INI (Lataillade *et al.*, 2007). Υπάρχει ένα υψηλού επιπέδου cross-resistance μεταξύ των raltegravir και elvitegravir, καθώς επίσης και μεταξύ αυτών των INI και της πρώτης γενιάς ανασταλτικών παραγόντων του σταδίου strand-transfer (Shimura *et al.*, 2008, Shafer *et al.*, 2008). Πολλές μεταλλάξεις της IN που βρέθηκαν σε στελέχη του υποτύπου B και παίζουν ρόλο στην ανθεκτικότητα του ιού έναντι των Is, παρουσιάζονται ως φυσικοί πολυμορφισμοί σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει αναστολείς IN (Lataillade *et al.*, 2007). Οι μεταλλάξεις της IN που μειώνουν την ευαισθησία του raltegravir σε μια ομάδα 38 ατόμων που παρουσίαζαν αποτυχία στη φαρμακευτική αγωγή του raltegravir είναι οι τρεις πρωτογενείς μεταλλάξεις ανθεκτικότητας N155H ή Q148H/R/K ή Y143H, κάθε μια από τις οποίες μειώνει την ευαισθησία του φαρμάκου κατά 10 με 25 φορές (Shafer *et al.*, 2008). Τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας ως προς το raltegravir εμφανίστηκαν με τη συσσώρευση επιπρόσθετων μεταλλάξεων. Η μετάλλαξη E92Q και οι δύο πολυμορφικές μεταλλάξεις L74M και G163R εμφανίστηκαν με την επικεφαλής μετάλλαξη N155H, ενώ η G140A/S εμφανίστηκε με την επικεφαλής Q148H/R/K (Shafer *et al.*, 2008). Όλες οι πρωτογενείς μεταλλάξεις ανθεκτικότητας προσδίδουν μειωμένη ενέργεια στην IN για τις αντιδράσεις του 3'-processing και του strand transfer (Malet *et al.*, 2008). Επιπρόσθετες μεταλλάξεις που αναφέρονται στο FDA ως επιλεγμένες από το raltegravir είτε *in vitro* είτε *in vivo* περιλαμβάνουν τις μη-πολυμορφικές μεταλλάξεις L74R, E138A/K, Y143R/C, N155S, H183P, Y226D/F/H, S230R, D232N και τις πολυμορφικές μεταλλάξεις T97A, V151I (Malet *et al.*, 2008). Μεταξύ 30 ασθενών που ανέπτυξαν ιολογική αποτυχία ενώ

λάμβαναν το elvitegravir, οι 28 ανέπτυξαν INI μεταλλάξεις ανθεκτικότητας συμπεριλαμβανομένου των E92Q, E138K, Q148H/R/K, ή N155H σε 11 ασθενείς, και S147G ή T66I/A/K σε εννέα και πέντε ασθενείς, αντίστοιχα (Shafer *et al.*, 2008). Επιπρόσθετες μεταλλάξεις που επιλέχθηκαν *in vitro* από το elvitegravir περιλαμβάνουν τις μη-πολυμορφικές μεταλλάξεις H51Y, Q95K, F121Y, Q146P, S153Y και R263K, και την ελαφρώς πολυμορφική μετάλλαξη E157Q (Shimura *et al.*, 2008). Και για το raltegravir και για το elvitegravir, η ιολογική αποτυχία συνοδεύεται από μια μείωση μέχρι και 100 φορές ή και περισσότερο στην ευαισθησία των φαρμάκων και ανάπτυξη δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στους INI (Shafer *et al.*, 2008).

### 3.2.7 Αναστολείς της σύντηξης των μεμβρανών

Οι αναστολείς της εισόδου του ιικού σωματιδίου στο CD4<sup>+</sup> T-κύτταρο ή αναστολείς σύντηξης (FIs), διαταράσσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή και της διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης του ιού (gp41). Το μόνο φάρμακο αυτού του είδους που έχει εγκριθεί μέχρι σήμερα από το FDA είναι το enfuvirtide (T20). Το T20 δεσμεύεται στην περιοχή HR1 (heptad repeat domain) της ιικής περιοχής gp41 και αναστέλλει την αλληλεπίδραση των δομών HR1 και HR2 της gp41 με το να μιμείται ένα μέρος του HR2 (127-162 aa) το οποίο δεσμεύεται σε μια συντηρημένη περιοχή του HR1. Η αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης καταστέλλει τη δημιουργία μιας θερμοδυναμικής δομής που αποτελείται από μια δέσμη έξι α-ελικών, κρίσιμη για την ική και κυτταρική μεμβρανική σύντηξη, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της διαδικασίας αυτής (Briz *et al.*, 2006).

Το T20 όπως και τα NNRTIs, έχει χαμηλό γενετικό φορτίο ως προς την ανθεκτικότητα και μοναδικές αμινοξικές μεταλλάξεις οδηγούν σε υψηλή ανθεκτικότητα (Briz *et al.*, 2006), έτσι το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα ενεργά φάρμακα σε μια αγωγή. Το μειονέκτημα του T20 είναι η προσβασιμότητα του προς τον ασθενή, αφού δεν μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα, αλλά με ένεση (Hughes *et al.*, 2008). Η περιοχή του gp41 είναι η πιο συντηρημένη περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου του HIV-1 και υπάρχει πολύ μικρή φυσική ετερογένεια στη θέση HR1 ανάμεσα στους διαφορετικούς υπότυπους της ομάδας M (Xu *et al.*, 2002). Ωστόσο, βρέθηκε να υπάρχει μια ετερογένεια στην ευαισθησία του T20 ανάμεσα σε στελέχη από άτομα που δεν τους χορηγήθηκε T20 και πιθανόν προέρχονται από πολυμορφισμούς έξω από την περιοχή του HR1 (Reeves *et al.*, 2002, Labrosse *et al.*, 2006). Παρόλο που το T20 έχει πλατύ εύρος στην ευαισθησία του από ότι άλλα αντιρετροϊκά φάρμακα, δεν υπάρχουν στοιχεία που να

δείχνουν ότι οι ασθενείς που δεν τους χορηγήθηκε προηγουμένως T20 και έχουν μολυνθεί με στελέχη με χαμηλή ευαισθησία στο T20 αντιδρούν λιγότερο καλά στο T20 (Melby *et al.*, 2006). Οι μεταλλάξεις στην περιοχή των κωδικών 36 με 45 του gp41, της περιοχής όπου προσδέεται το T20, είναι οι κύριες υπεύθυνοι για τη ανθεκτικότητα προς το T20 (Melby *et al.*, 2006, Sista *et al.*, 2004). Μια μόνο μετάλλαξη συσχετίζεται με περίπου 10 φορές μειωμένη ευαισθησία, ενώ διπλές μεταλλάξεις μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία κατά 100 φορές (Shafer *et al.*, 2008). Διάφορες συνοδευτικές μεταλλάξεις της περιοχής HR2 που αντιστοιχούν στην πεπτιδική αλληλουχία του T20, συμπεριλαμβανομένων των N126K, N137K και S138A, φαίνεται να βελτιώνουν την ανθεκτικότητα σε συνδυασμό με τις ειδικές μεταλλάξεις στις θέσεις 36-45 (Xu *et al.*, 2005, Su *et al.*, 2006, Tolstrup *et al.*, 2007). Οι T20 ανθεκτικές μεταλλάξεις εμφανίζονται οι ίδιες σε στελέχη του υπότυπου B και μη-B (Cilliers *et al.*, 2005).

### 3.2.8 Νέες κατηγορίες αναστολέων υπό διερεύνηση

Μια νέα ομάδα αναστολέων που διερευνώνται είναι τα αντι-TAR φάρμακα τα οποία στοχεύουν ένα νέο θεραπευτικό στόχο, το TAR RNA. Η θηλιά του TAR RNA δεν φέρει γενετική ετερογένεια και μεταλλάξεις στην περιοχή της αλληλουχίας αυτής επηρεάζουν την λειτουργία της Tat και κατά συνέπεια και την HIV αντιγραφή. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται υβριδικά μικρά μόρια, τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια και γονιδιακή θεραπεία που βασίζεται στα ριβοζύμα, τα RNA decoys και τα siRNAs (Bannwarth *et al.*, 2005). Με την τεχνική σάρωσης αναγνωρίστηκαν μερικά υβριδικά μικρά μόρια των κατηγοριών πεπτίδια, αργιναμίδια, αμινοκουινολόνες, παράγωγα τρεαλόζης, τα οποία δεσμεύονται στο TAR ή αναστέλλουν την αλληλεπίδραση Tat-TAR, όπως το τριπεπτίδιο TR87 που έδειξε μια δυναμική καταστολή της HIV-1 παραγωγής σε καλλιέργειες κυττάρων σε διάστημα 24 ημερών χωρίς κυτταρική τοξικότητα (Hwang *et al.*, 2003). Παράγωγα των μη-κωδικών ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία επάγουν τα μπλοκάρισμα της μεταφραστικής μηχανής με τη στόχευση 5' RNAs είναι δυναμικοί αναστολείς, συνδυάζοντας μία υψηλή ανθεκτικότητα στη νουκλεάση με μια υψηλή δέσμευση στο μονόκλωνο RNA που αναστέλλει επαρκώς την πρωτεϊνική σύνθεση. Τα αντι-TAR ολιγονουκλεοτίδια έχουν σχεδιαστεί ή απομονωθεί σε μεγάλου εύρους σαρώσεις και μπλοκάρουν επιτυχώς την TAR RNA δομή και την Tat trans-ενεργοποίηση *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες. Η ενεργότητα τους έναντι της ιικής αντιγραφής δεν έχει ακόμη εξεταστεί (Bannwarth *et al.*, 2005), εκτός από ένα σύνθετο 15μερές πολυαμιδικό ανάλογο νουκλεοτιδίου (PNA), το οποίο με την δέσμευσή του σ' ένα

πεπτιδικό φορέα που του επιτρέπει να διαπεράσει την μεμβράνη, έχει δείξει ότι μπλοκάρει την Tat trans-ενεργοποίηση *in vitro* και σε κυτταροκαλλιέργειες και αναστέλλει την HIV-1 αντιγραφή (Kaushik *et al.*, 2002). Τα ριβοένζυμα είναι καταλυτικά RNA μόρια, τα οποία είναι συμπληρωματικά προς στοχευόμενα RNA και έχουν ενζυμική ενεργότητα που κόβει ειδικά τα στοχευόμενα RNA. Ριβοένζυμα που στοχεύουν άμεσα τη δομή TAR του HIV-1, έδειξαν χαμηλή ενεργότητα λόγω της μη προσβασιμότητας στην υψηλά πτυχωμένη δομή (Weerasinghe *et al.*, 1991). Σε μια νέα προσέγγιση, προστέθηκε στα ριβοένζυμα μια RNA δομή η οποία ενεργοποιεί τις RNA ελικάσες, οι οποίες ξεδιπλώνουν το RNA, βελτιώνοντας την ενεργότητα των ριβοενζύμων που στοχεύουν τα υψηλά πτυχωμένα RNAs. Ένα ένζυμο που συντέθηκε με αυτές τις ιδιότητες είναι το maxizyme που κόβει το TAR *in vivo* (Kuwabara *et al.*, 2002). Τα TAR decoys είναι μικρά RNA νουλεοτίδια που μιμούνται τη δομή TAR, αναστέλλοντας την Tat trans-ενεργοποίηση της HIV-1 αντιγραφής στα λεμφοκύτταρα (Lee *et al.*, 1995). Σε μια μελέτη το TAR συμμεταγράφηκε από τον υποκινητή U6 χρησιμοποιώντας το U16snoRNA για να στοχεύσει το U16TAR decoy στον πυρήνα, το οποίο θα βρίσκεται εκεί με το σύμπλοκο Tat-EGFP/CycT1. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της Tat trans-ενεργοποίησης και εν συνεχεία της ιικής αντιγραφής στα λεμφοβλαστικά κύτταρα (Michienzi *et al.*, 2002). Η μεταγραφική γονιδιακή έκφραση του κυττάρου, όπως και του HIV-1 ρυθμίζεται από μικρά μη-κωδικά παρεμβατικά δίκλωνα RNA μόρια (dsRNAs) όπως τα siRNA, shRNA ή miRNA μέσω του μηχανισμού παρέμβασης του RNA (RNAi). Τα σύνθετα siRNAs 21-23 bp επάγουν την αποικοδόμηση του ομόλογου mRNA μέσω του RNAi στα κύτταρα των θηλαστικών. Ποικίλα siRNAs έχουν δείξει ότι μειώνουν αποτελεσματικά την ιική αντιγραφή (Bannwarth *et al.*, 2005). Παρ' όλο που τα 5' άκρα των mRNAs και η στενή δομή του TAR είναι λιγότερο προτιμότερες προς τον μηχανισμό RNAi, siRNAs που υβριδίζονται στην περιοχή TAR έδειξαν μέγιστη αναστολή 50% σε μια μέθοδο μέτρησης της έκφρασης του γονιδίου μάρτυρα λουσιφεράσης (Yoshinari *et al.*, 2004).

### 3.3 Η εύρεση ανθεκτικών μεταλλάξεων στην πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης

#### 3.3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας

Ο έλεγχος ανθεκτικότητας μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις διακριτές κατηγορίες: το γονοτυπικό έλεγχο, το φαινοτυπικό και ο έλεγχος σε μειονότητες ιικών quasispecies. Ο γονοτυπικός έλεγχος της ανθεκτικότητας στα αντιρετροϊκά φάρμακα γίνεται με την αλληλούχηση των περιοχών της PR και της RT. Ο έλεγχος αυτός βοηθά τους κλινικούς

γιατρούς να επιλέξουν μια πιο αποτελεσματική αντιρετροϊκή θεραπεία. Η διαγνωστική αυτή εξέταση κυρίως διεξάγεται όταν υπάρχει αποτυχία μείωσης του ιικού φορτίου από νέα φάρμακα ή όταν ένας φαρμακευτικός συνδυασμός που παλαιότερα λειτουργούσε δεν λειτουργεί πια. Λόγω του φαινομένου της διάδοσης στελεχών HIV-1 που ήδη φέρουν ανθεκτικές μεταλλάξεις, η γονοτυπική εξέταση συστήνεται να πραγματοποιείται σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς πριν ακόμη αρχίσουν να παίρνουν αντιρετροϊκή θεραπεία (Vandamme *et al.*, 2001, Vandamme *et al.*, 2004). Η εφαρμογή αυτού του βήματος έχει πολύ μεγάλη κλινική χρησιμότητα για την πορεία, τόσο των μακροχρόνιων ασθενών όσο και των νεοδιαγνωσθέντων (Perrin *et al.*, 1998).

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός συστημάτων ανάλυσης της γονοτυπικής ανθεκτικότητας, τα οποία διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: Στην πρώτη κατηγορία βρίσκονται εγκεκριμένα από το FDA συστήματα που παρέχονται δωρεάν σε kit γονοτυπικής ανάλυσης, όπως το ViroSeq (Celera Diagnostics) και το TruGene (Visible Genetics), τα οποία όμως δεν διατίθενται δημόσια στο διαδίκτυο. Τα συστήματα αυτά κάθε φορά που ανανεώνονται επανεξετάζονται από το FDA. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα συστήματα τα οποία πωλούνται μόνο τους πχ. το VirtualPhenotype (Tibotec-Virco) και στην τρίτη κατηγορία είναι τα συστήματα που χρησιμοποιούνται σε μεγάλα εργαστήρια αναφοράς που δεν είναι προσβάσιμα ή άλλα που είναι, όπως το Los Alamos National Laboratories-HIV Database. Τέλος, είναι και τα συστήματα που δημιουργήθηκαν από ακαδημαϊκά εργαστήρια, όπως το Stanford, το Avenir και το Retrogram 1.6 (Liu *et al.*, 2006). Τα συστήματα αυτά έχουν πολλές διαφορές. Σε μερικά περιλαμβάνονται βάσεις δεδομένων που συσχετίζουν τον γενότυπο με το φαινότυπο, το γενότυπο με κλινικές παραμέτρους και έχουν λίστες των μεταλλάξεων που είναι σχετικές με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, όπως για παράδειγμα η βάση δεδομένων του Stanford, η Avenir, η Los Alamos National Laboratories-HIV Resistance Database και η International AIDS Society-USA. Τα περισσότερα ακαδημαϊκά συστήματα έχουν ελεύθερη πρόσβαση στο διαδίκτυο, όπου και δέχονται νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στόχους (Pr, RT ή/και gp41) ή ακόμα και μεταλλάξεις, και μέσω ειδικών αλγορίθμων επεξεργάζονται οι πληροφορίες δίνοντας μια αναφορά που καταδεικνύει τα επίπεδα ανθεκτικότητας σε κάθε κατηγορία φαρμάκων. Μερικά παραδείγματα τέτοιων συστημάτων είναι το HIVdb, το Avenir, το ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le Sida), το Rega Institute (Liu *et al.*, 2006). Μερικά από αυτά τα συστήματα ανανεώνονται συνεχώς, με βάση τα πιο πρόσφατα δεδομένα για την κλινική σημασία των μεταλλάξεων ανθεκτικότητας, όπως για παράδειγμα το HIVdb (De Luca *et al.*, 2003). Σε άλλα

συστήματα η ανανέωση συμβαίνει σε πιο μεγάλα χρονικά διαστήματα πχ. το ViroSeq δεν έχει ακόμη ανανεωθεί από το 2004.

Ο φαινοτυπικός έλεγχος της ανθεκτικότητας πραγματοποιείται με κλωνοποίηση των περιοχών στόχων σε φορείς και καλλιέργεια τους σε κυτταρικές σειρές που περιέχουν αντιϊκές ουσίες. Με την προσέγγιση αυτή μπορεί να βρεθεί ο κυτταρικός τροπισμός, η ποικιλία του ρυθμού ανάπτυξης και η ποσοτικοποίηση του ιού (Perrin *et al.*, 1998, Sebastian *et al.*, 2004). Ο γενοτυπικός έλεγχος σε σχέση με το φαινοτυπικό είναι γρηγορότερος, τεχνικά πιο απλός και λιγότερο δαπανηρός. Γι' αυτούς τους λόγους ο γενοτυπικός έλεγχος χρησιμοποιείται περισσότερο από ότι ο φαινοτυπικός, του οποίου η εφαρμογή του περιορίζεται σε κεντρικές υπηρεσίες (De Luca *et al.*, 2003). Ενώ ο φαινοτυπικός έλεγχος μετράει απευθείας την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, ο γενοτυπικός έλεγχος δίνει έμμεσα στοιχεία της ανθεκτικότητας, τα οποία θα χρειαστούν ανάλυση από διάφορα συστήματα ανάλυσης, ώστε να γίνει εφικτή η χρησιμοποίηση των συμπερασμάτων τους στο σχεδιασμό κατάλληλων θεραπευτικών σχημάτων. Ένα από τα μειονεκτήματα του γενοτυπικού ελέγχου των στελεχών του HIV είναι η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ο αριθμός και ο τύπος των αμινοξικών αλλαγών, οι αλληλεπιδράσεις των μεταλλάξεων, καθώς και η χορήγηση πολλών φαρμάκων καθιστά τους κανόνες ερμηνείας των προτύπων μετάλλαξης πολύ πολύπλοκους.

Ένα σημαντικό μειονέκτημα των εμπορικών μεθόδων ανίχνευσης ανθεκτικότητας είναι ότι υποτιμούν την πραγματική ανθεκτικότητα. Οι μειονότητες των quasispecies που αποτελούν το λιγότερο από 25% του συνολικού ιικού πληθυσμού δεν ανιχνεύονται από αυτές τις μεθόδους (Derdelinckx *et al.*, 2003). Το Ultra Deep Sequencing (UDS=Αλληλούχιση εις βάθος) είναι μια νέα μέθοδος που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει την ανθεκτικότητα στις μειονότητες quasispecies. Η κλινική επίδραση της χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στη μειονότητα των quasispecies είναι αμφισβητήσιμη, καθώς η πλειοψηφία των ατόμων ανταποκρίνεται θετικά στην πρώτη γραμμή θεραπείας. Η μέθοδος UDS για ανίχνευση ανθεκτικότητας δεν χρησιμοποιείται ακόμη για στερεότυπη διαχείριση του HIV και ίσως να μην γίνει ποτέ διαθέσιμη, λόγω της χρονοβόρας φύσης της και του οικονομικού της κόστους. Παράλληλα, ο μελλοντικός αντίκτυπος των ανθεκτικών μειονοτήτων quasispecies στην ιολογική αποτυχία ακόμη να διασαφηνιστεί (Hughes *et al.*, 2008).

### 3.3.2 Μετάδοση ανθεκτικών HIV-1 στελεχών

Η HAART δεν καταστέλλει την HIV αντιγραφή στο 20-50% των ασθενών που δεν πήραν ποτέ αντιρετροϊκή θεραπεία (Bartlett *et al.*, 2001) και στο 50-70% των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία (Ledergerber *et al.*, 1999). Η πλειοψηφία των ασθενών αυτών φέρει ανθεκτικές μεταλλάξεις (Cozzi Lepri *et al.*, 2000, Young *et al.*, 1998). Τα στοιχεία αυτά κατέδειξαν την παγκόσμια μετάδοση στελεχών που είναι ήδη ανθεκτικά στα φάρμακα και δεν ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στην έναρξη της αντιρετροϊκής αγωγής, λόγω της μειωμένης ευαισθησίας στα φάρμακα, κάτι ανησυχητικό για τη μελλοντική κλινική διαχείριση των HIV-1 μολυσμένων ασθενών (Wensing *et al.*, 2003). Ο πιο μεγάλος παράγοντας κινδύνου για τη μετάδοση ανθεκτικών στελεχών φαίνεται να είναι η μεγάλης-κλίμακα διαθεσιμότητα αντιρετροϊκών φαρμάκων στην περιοχή μόλυνσης. Η μετανάστευση από περιοχές με περιορισμένη ή καθόλου πρόσβαση στην αντιρετροϊκή θεραπεία μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος του προβλήματος της μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα η μετανάστευση από την Αφρική στην Ευρώπη μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς νεοδιαγνωσθέντων ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία (van de Vijver *et al.*, 2007). Η μετάδοση ανθεκτικότητας σε διαφορετικές κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων είναι σπάνιο φαινόμενο σε όλα τα μέρη του πλανήτη. Σε επιδημιολογικές μελέτες που παρακολουθούσαν ασθενείς που άρχιζαν αντιρετροϊκή θεραπεία, έδειξαν ότι οι θεραπείες που συμβουλευόνταν το τεστ ανθεκτικότητας πριν την έναρξή είχαν πιο αποτελεσματική επίδραση στην ιολογική καταστολή του HIV-1. Για το λόγο αυτό το συστήνεται να γίνεται τεστ ανθεκτικότητας στο πιο γρήγορα διαθέσιμο δείγμα του νεοδιαγνωσθέντος ασθενούς και ιδιαίτερα σε περιοχές με συχνότητα μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας που υπερβαίνει το 5-10% (van de Vijver *et al.*, 2007).

Ο γενετικός φραγμός, που καθορίζεται ως ο αριθμός των μεταλλάξεων που χρειάζονται για να ξεπεραστεί η φαρμακευτική επιλεκτική πίεση, είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη της HIV ανθεκτικότητας (van de Vijver *et al.*, 2006). Στους ασθενείς που λαμβάνουν αντιρετροϊκή αγωγή και φέρουν ανθεκτικά στελέχη HIV-1, η διακοπή της πλήρους θεραπευτικής αγωγής έχει συνήθως μια γρήγορη επανεμφάνιση του αρχικού, ευαίσθητου στα φάρμακα άγριου τύπου. Εντούτοις, ανθεκτικά στελέχη μπορεί να μείνουν σε πολύ μικρούς πληθυσμούς στο πλάσμα και να διατηρούνται ως προϊόι στα μνημονικά κύτταρα μέσα στο λεμφικό ιστό. Μόλις επανέρθει η θεραπεία, τα ανθεκτικά στελέχη επιλέγονται ξανά. Στους ασθενείς που δε πήραν θεραπεία, εάν έχουν μολυνθεί με *quasispecies* που περιέχουν στελέχη του ιού HIV-1 του άγριου τύπου και ανθεκτικά

στελέχη, τότε ο άγριος τύπος θα είναι κυρίαρχος έναντι των ανθεκτικών στελεχών. Εάν όμως, μέσω του φαινομένου του ιδρυτού, η ποικιλομορφία των μολυσμένων quasispecies είναι περιορισμένη στα ανθεκτικά στελέχη και δεν υπάρχουν μειονότητες του άγριου τύπου, τότε, η κυριαρχία από τα στελέχη του άγριου τύπου δεν είναι δυνατή (Wensing *et al.*, 2003).

Η βασισμένη σε παγκόσμιες βιβλιογραφικές αναφορές, επικράτηση των μεταδιδόμενων ανθεκτικών HIV-1 στελεχών κυμαίνεται από 1.4% στο 28.9% (Wensing *et al.*, 2003, Wensing *et al.*, 2005, Geretti, 2007, Booth *et al.*, 2007). Μια σημαντική πρόσφατη μελέτη που έγινε σε δείγματα HIV-1 από όλη την Ευρώπη και το Ισραήλ και απομονώθηκαν το διάστημα 2002-2003 κατέδειξε ότι η επικράτηση των ατόμων που δεν έλαβαν ποτέ τους αντιρετροϊκή θεραπεία και φέρει ανθεκτικότητα σε ένα τουλάχιστον φάρμακο είναι 9.1% (SPREAD, 2008). Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με μια προηγούμενη μελέτη που έγινε και πάλι σε δείγματα από την Ευρώπη, η οποία κατέδειξε ότι τα ανθεκτικά στελέχη ανευρίσκονται και στους νέους και στους χρόνιους μολυσμένους ασθενείς που δεν λαμβάνουν θεραπεία (Wensing *et al.*, 2005). Η πλειονότητα των μολυσμένων ασθενών που δεν λαμβάνουν θεραπεία και φέρουν ανθεκτικότητα (71%) έχουν μία μόνο αμινοξική αντικατάσταση με περιορισμένη επίδραση στην προβλεπόμενη ευαισθησία του φαρμάκου. Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στους NRTIs παρατηρούνται πιο συχνά (5.4%), ακολουθούνται από μεταλλάξεις σχετικές με τους PIs (3.0%) και μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των NNRTIs (2.6%). Οι μεταδιδόμενες ανθεκτικές μεταλλάξεις είναι συχνότερες σε στελέχη του υπότυπου B σε σχέση με στελέχη από μη-B υπότυπους, 10.4 με 6.3%, αντίστοιχα (SPREAD, 2008).

Οι διάφορες έρευνες στη μετάδοση ανθεκτικότητας στα αντιρετροϊκά φάρμακα συμπεριλαμβάνουν μόνο τρεις κατηγορίες φαρμάκων, τα NRTIs, NNRTIs και PIs. Από το 2003, είναι διαθέσιμος και ο αναστολέας σύντηξης enfuvirtide στην κλινική αντιμετώπιση. Η μεταδιδόμενη ανθεκτικότητα στο enfuvirtide δεν φαίνεται μέχρι τώρα να είναι πρόβλημα, αφού μόνο δύο περιπτώσεις έχουν δημοσιευθεί. Μια πιθανή εξήγηση για την περιορισμένη ανθεκτικότητα στο enfuvirtide είναι ότι το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται από ένα μικρό αριθμό ασθενών. Η ενσωμάτωση του γενοτυπικού ελέγχου ανθεκτικότητας του enfuvirtide σε προγράμματα κλινικής αντιμετώπισης των ασθενών, προδιαθέτει την γενοτύπηση της γενετικά ποικίλης περιοχής του env, διαδικασία που ακόμη δεν έχει καθιερωθεί σαν μέρος ρουτίνας της κλινικής πρακτικής, αφού πρόκειται για ένα μικρό αριθμό ασθενών. Παρομοίως, η μετάδοση ανθεκτικότητας στα νέα φάρμακα, όπως τους



αναστολείς της IN και του CCR5 θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν όταν ένας μεγάλος αριθμός ασθενών χρησιμοποιούν αυτά τα φάρμακα. Πριν την έναρξη μεγάλου μεγέθους επιδημιολογικών μελετών, πρέπει να γίνουν ορισμένες πιλοτικές έρευνες σε συγκεκριμένες ομάδες κινδύνου για να καθορίσει η πιθανή ύπαρξη μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας στις καινούριες κατηγορίες φαρμάκων (van de Vijver *et al.*, 2007).

## Κεφάλαιο 4. Κυτταρικός τροπισμός και πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης

### 4.1 Ο βιολογικός φαινότυπος και κυτταρικός τροπισμός του ιού HIV-1

Ο ιός HIV-1 χρησιμοποιεί κυτταρικούς μεμβρανικούς υποδοχείς της οικογένειας των χυμοκινών ως συνυποδοχείς μαζί με τον υποδοχέα CD4 για την είσοδο του στο κύτταρο ξενιστή. Έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα ταξινόμησης βασισμένο στη χρήση του συνυποδοχέα. Στελέχη που χρησιμοποιούν κατά προτίμηση τον υποδοχέα α-χυμοκίνης CXCR4 ονομάζονται X4-τροπικά, αυτά που χρησιμοποιούν τον υποδοχέα β-χυμοκίνης CCR5, R5-τροπικά και στελέχη που χρησιμοποιούν και τα δύο είδη συνυποδοχέων CXCR4 και CCR5, ονομάζονται R5X4 διπλο-τροπικά (Berger *et al.*, 1998).

Η είσοδος του ιού HIV μέσω ενός ή και των δύο συνυποδοχέων σχετίζεται με δύο διαφορετικούς ιικούς φαινότυπους, που προσδιορίζονται αμέσως μετά την ανάπτυξη του HIV σε κυτταροκαλλιέργεια. Η δυνατότητα του ιού να σχηματίσει συγκύττια στη κυτταροσειρά MT-2, οδήγησε στην ονοματολογία του φαινότυπου που επάγει το σχηματισμό συγκυτίου ως SI και ο φαινότυπος που επάγει το μη σχηματισμό συγκυτίου ως NSI (Schuitemaker *et al.*, 1991). Καθώς οι NSI μορφές ανιχνεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της HIV μόλυνσης, οι SI μορφές εμφανίζονται στο 40-50% ασθενών του υπότυπου B (Schuitemaker *et al.*, 1991). Η εμφάνιση των SI στελεχών συνδέεται με μια γρήγορη πτώση στις τιμές των CD4 T-λεμφοκυττάρων, γρηγορότερη ανάπτυξη προς την ασθένεια και μειωμένο χρόνο επιβίωσης στα άτομα που δεν λαμβάνουν θεραπεία (Richman *et al.*, 1994). Οι παράγοντες που μεσολαβούν για τη μετατροπή των στελεχών με φαινότυπο NSI σε SI, κατά την πορεία της HIV μόλυνσης, δεν είναι πλήρως κατανοητοί και δεν είναι σαφές εάν είναι αιτία ή/και συνέπεια της προοδευτικής ανοσολογικής καταστροφής (Shaheen *et al.*, 2004). Με δεδομένο ότι τα MT-2 κύτταρα εκφράζουν CXCR4 υποδοχείς και όχι CCR5, ο “SI” τροπισμός, όπως καθορίζεται από την μέθοδο MT-2, είναι μια έμμεση μέτρηση της δυνατότητας του ικού στελέχους να χρησιμοποιηθεί ο συνυποδοχέας CXCR4. Για αυτό το λόγο, οι προσδιορισμοί “SI” και “NSI” θεωρούνται ισοδύναμοι με το X4-τροπικό και R5-τροπικό φαινότυπο, αντίστοιχα (Dong *et al.*, 2005).

Ένα άλλο σύστημα ταξινόμησης του φαινότυπου του ιού HIV-1 είναι ο κυτταρικός, όπου υπάρχει ο M-τροπικός φαινότυπος που μολύνει και αναδιπλασιάζεται μέσα σε καλλιέργειες μακροφάγων κυττάρων και ο T-τροπικός φαινότυπος που δεν μπορεί να επιμολύνει μακροφάγα, αλλά αναδιπλασιάζεται σε υψηλά επίπεδα μέσα σε κυτταροκαλλιέργειες T-λεμφοκυττάρων. Και τα δύο είδη ιών αναδιπλασιάζονται σε ενεργά περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs). Οι T-κυτταροκαλλιέργειες

εκφράζουν τους CXCR4 υποδοχείς και τα μακροφάγα τους CCR5, ενώ τα πρώιμα λεμφοκύτταρα και τα δύο είδη υποδοχέων (Poveda *et al.*, 2006). Για αυτό το λόγο, οι προσδιορισμοί “Μ-τροπικό” και “Τ-τροπικό” θεωρούνται ισοδύναμοι με το R5-τροπικό και X4-τροπικό φαινότυπο, αντίστοιχα.

Στην αρχή της HIV-1 μόλυνσης, το 80-90% των ασθενών φέρουν στελέχη ιών που χρησιμοποιούν CCR5 συνυποδοχείς για την είσοδο τους στο κύτταρο ξενιστή. Το ίδιο συμβαίνει και σε χρόνιους ασυμπτωματικούς ασθενείς που δεν λαμβάνουν αγωγή. Εντούτοις, περίπου τα μισά από τα άτομα που μολύνονται με στελέχη HIV-1 του υπότυπου B αναπτύσσουν ιούς που σε προχωρημένο στάδιο έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν CXCR4 συνυποδοχείς μόνο ή σε συνδυασμό με τους CCR5 (Poveda *et al.*, 2006, Moore *et al.*, 2004). Όταν οι X4 τροπικοί ιοί εμφανιστούν, συνήθως συνυπάρχουν με τους R5 τροπικούς ιούς ως μειονότητα (Brumme *et al.*, 2005). Ιικά στελέχη που είναι διπλο-τροπικά HIV-1 στελέχη μολύνουν μόνο ένα από τους δύο συνυποδοχείς ικανοποιητικά (Whitcomb *et al.*, 2007). Η εμφάνιση των X4 ιών συμβαίνει στα τελευταία στάδια της ασθένειας και στην απουσία λήψης αντιρετροϊκής αγωγής συνδέεται με αυξημένη οξύτητα, πιο επιθετική πορεία της ασθένειας, μεγάλη μείωση στον αριθμό των CD4 κυττάρων και μειωμένο χρόνο επιβίωσης (Richman *et al.*, 1994). Ο αριθμός και ο τύπος των μεταλλάξεων, με τις οποίες ένας R5 τροπικός ιός μετατρέπεται σε X4 τροπικό ιό είναι πολύπλοκος και εξαρτάται από την αλληλουχία του R5 (Jensen *et al.*, 2003b). Προκαταρκτικά δεδομένα προτείνουν ότι η συχνότητα και η γενετική βάση της αλλαγής του τροπισμού μπορεί να διαφέρει για διαφορετικούς υπότυπους (Jensen *et al.*, 2003b, Huang *et al.*, 2007).

#### 4.2 Καθορισμός τροπισμού

Η επιλογή του συνυποδοχέα καθορίζεται από τις γενετικές αλληλουχίες μέσα στη γλυκοπρωτεΐνη gp120 και ειδικά στην πολύ ετερογενή και δομικά εύκαμπτη περιοχή της V3 θηλιάς (35 aa), η οποία εμπλέκεται στη δέσμευση του συνυποδοχέα και παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του HIV-1 τροπισμού (Huang *et al.*, 2008, Jensen *et al.*, 2003b, Cann *et al.*, 1992). Η V3 θηλιά υπήρξε ένας από τους σημαντικότερους στόχους σε μελέτες εμβολίων, διότι περιέχει το κύριο καθοριστή εξουδετεροποίησης, καθώς και επιτόπια για αναγνώριση από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αναγνώρισης. Η V3 δομή τοποθετείται μεταξύ των αμινοξέων 269 και 331 της gp120 του HIV-1 και έχει μια δευτερογενής συντηρημένη δομή τύπου 2 β-στροφής, η οποία επάγεται από το συντηρημένο μοτίβο GPGR. Η χαρτογράφηση των δισουλφιδικών

δεσμών της gp120 απεκάλυψε ότι τα κατάλοιπα C στα δύο άκρα της V3 περιοχής είναι συνδεδεμένα, δίνοντας στην V3 περιοχή τη δομή της θηλιάς (Leonard *et al.*, 1990). Η V3 θηλιά εμπλέκεται στο σχηματισμό του συγκυτίου και στην ικανότητα αναδιπλασιασμού του HIV-1, αφού μεταλλάξεις στο μοτίβο GPGR και στα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης συμβάλλουν στην μετατροπή ενός στελέχους με φαινότυπο NSI σε SI και με αυξημένο ρυθμό αναδιπλασιασμού (de Jong *et al.*, 1992).

Η παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων στις θέσεις 11 και 25 στη V3 θηλιά, σε συνδυασμό με άλλα χαρακτηριστικά της V3 αλληλουχίας, έχουν μια ειδικότητα 90% και μια ευαισθησία 70-80% για την πρόγνωση του X4 τροπισμού σε κλώνους ικών στελεχών του υπότυπου B (Hartley *et al.*, 2005, Jensen *et al.*, 2003b). Σε μια πρόσφατη μελέτη, κατά την οποία σχεδιάστηκε ένα 3D μοριακό μοντέλο της V3 θηλιάς από στελέχη για τα οποία ο τροπισμός είχε καθοριστεί πειραματικά, αποκαλύφθηκε ότι μια φορτισμένη περιοχή στην επιφάνεια της V3 θηλιάς σχετίζεται με τη χρήση του συνυποδοχέα. Αυτή η περιοχή είναι θετικά φορτισμένη στους X4 τροπικούς ιούς και αρνητικά φορτισμένη ή ουδέτερη στους R5 τροπικούς ιούς και σχηματίζεται από δύο αμινοξέα στις θέσεις 11 και 24 ή 25. Τα αμινοξέα 11 και 24 ή 11 και 25 δημιουργούν μια επαφή στο 3D χώρο. Η προγνωστική αξία της αναγνώρισης των X4 ή των R5 τροπικών στελεχών έχει βελτιωθεί κατά πολύ χρησιμοποιώντας το φορτίο των αμινοξέων 11, 24 και 25, παρά μόνο το φορτίο των καταλοίπων 11 και 25. Οπότε, τα στοιχεία αυτά προτείνουν έναν νέο κανόνα “11/24/25”, κατά τον οποίο ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ στις θέσεις 11, 24, ή 25 καθορίζει το στέλεχος ως X4 με ευαισθησία 89%, αλλιώς ως R5 με 96% (Cardozo *et al.*, 2007).

Ένας άλλος γενετικός καθοριστής της χρήσης του συνυποδοχέα περιλαμβάνει την παρουσία ή όχι μεταλλάξεων στην περιοχή των αμινοξικών καταλοίπων 6-8 της V3 θηλιάς. Ενδεικτικά, απώλεια της θέσης γλυκοζυλίωσης στη θέση 6 και αυξημένη ετερογένεια της V3 θηλιάς σε σχέση με χαμηλές τιμές CD4 μετρήσεων, καθορίζει τους X4 ιούς (Low *et al.*, 2008). Παράλληλα, οι ετερογενείς περιοχές V1/V2 και η συντηρημένη περιοχή C4 της gp120 φαίνεται να επηρεάζουν τη χρήση του συνυποδοχέα (Hartley *et al.*, 2005, Jensen *et al.*, 2003b). Αν και η συνεισφορά τους στην επιλογή συνυποδοχέα είναι πολύ μικρή, φαίνεται ότι τροποποιούν την περιοχή στην επιφάνεια της V3 θηλιάς, ώστε να δεσμεύεται και στους δύο συνυποδοχείς ή μπορεί να δημιουργεί διαφορετικές επιφάνειες που επιλέγουν τον έναν ή τον άλλο από τους υποδοχείς χυμοκίνης (Cardozo *et al.*, 2007).

#### 4.3 Αναστολείς της δέσμευσης του HIV-1 με τους συνυποδοχείς χυμοκίνης

Δύο ουσίες, το εγκεκριμένο Maraviroc (UK-427, 857 Pfizer, NY, USA) και το υπό διερεύνηση Vicriviroc (SHC-D, Schering Plough, Kenilworth, NJ, USA), έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να αναστέλλουν την HIV-1 δέσμευση στον συνυποδοχέα CCR5 (Shaheen *et al.*, 2004, Moore *et al.*, 2004), ενώ ένας ειδικός ανταγωνιστής του συνυποδοχέα CXCR4 βρίσκεται υπό ανάπτυξη (Fricker *et al.*, 2006). Οι αναστολείς maraviroc και vicriviroc αναστέλλουν αλλοστερικά τη δέσμευση της HIV-1 gp120 στον CCR5 συνυποδοχέα. Ενώ η HIV-1 gp120 δεσμεύεται στην N-τελική και δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά της περιοχής του CCR5 (Hartley *et al.*, 2005), μελέτες κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και μοριακού σχεδιασμού πρότειναν ότι οι αναστολείς δεσμεύονται σε μια θήκη που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες (Westby *et al.*, 2005, Maeda *et al.*, 2006).

Η HIV-1 gp120 έχει μια πολύ ετερογενής αλληλουχία και διαφορετικά HIV-1 στελέχη παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στην αναστολή από διάφορα μόρια πρόσδεσης και μοριακούς αναστολείς (Lobritz *et al.*, 2007). Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχουν πολύ μικρές διαφορές στην ευαισθησία των στελεχών του άγριου τύπου του ιού στο maraviroc (Dorr *et al.*, 2005) και στο vicriviroc (Strizki *et al.*, 2005) στους διάφορους υπότυπους. Αυτό το στοιχείο δείχνει ότι οι αναστολείς διαταράσσουν μια πολύ συντηρημένη αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Shafer *et al.*, 2008). *In vitro* passage πειράματα έδειξαν ότι ανθεκτικότητα υψηλού επιπέδου στους CCR5 αναστολείς εμφανίζεται μόνο μετά από πολλούς μήνες ανακαλλιέργειών κυττάρων με τους αναστολείς, προτείνοντας ότι ο γενετικός φραγμός στην ανθεκτικότητα των CCR5 αναστολέων είναι υψηλός (Westby *et al.*, 2007, Marozsan *et al.*, 2005). Ωστόσο, ο ιός HIV-1 μπορεί να αποφύγει την αναστολή από τους CCR5 αναστολείς με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Shafer *et al.*, 2008) ή μέσω της χρησιμοποίησης του συνυποδοχέα CXCR4 (Moncunill *et al.*, 2008). Οι φαινοτυπικοί και γενοτυπικοί μηχανισμοί δημιουργίας ανθεκτικότητας προς τον αναστολέα του CCR5 και του cross-resistance είναι σύνθετοι και ανεπαρκώς κατανοητοί. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο φαινοτυπικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας, η ενισχυμένη δέσμευση σε αδέσμευτους CCR5 υποδοχείς και η ενισχυμένη δέσμευση στο σύμπλοκο CCR5-αναστολέα. Ιοί με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας προς τον αναστολέα CCR5 (>1,000 φορές μείωση στο IC<sub>50</sub>), έχουν αναγνωριστεί κατά τη διάρκεια *in vitro* πειραμάτων ανακαλλιέργειών με CCR5 αναστολείς (Marozsan *et al.*, 2005, Westby *et al.*, 2007, Ogert *et al.*, 2008). Οι αμινοξικές αλλαγές που αναγνωρίστηκαν σε αυτά τα πειράματα να είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα βρίσκονται εξ ολοκλήρου μέσα στη V3 θηλιά (Westby *et al.*, 2007), έξω

από τη V3 θηλιά (Marozsan *et al.*, 2005), ή προκύπτουν από τις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών αντικαταστάσεων στη V3 θηλιά και άλλων τμημάτων του env (Ogert *et al.*, 2008). Αυτές οι αμινοξικές αλλαγές περιλαμβάνουν γνωστούς πολυμορφισμούς, καθώς επίσης και νέες αντικαταστάσεις, ενθέσεις και αφαιρέσεις. Ένα στοιχείο που περιπλέκει τη γενετική βάση της ανθεκτικότητας του CCR5 είναι η παρατήρηση ότι ο ίδιος αναστολέας επιλέγει διαφορετικές μεταλλάξεις σε διαφορετικά ιικά στελέχη (Marozsan *et al.*, 2005, Westby *et al.*, 2007, Ogert *et al.*, 2008). Οι *in vivo* μηχανισμοί δημιουργίας ανθεκτικότητας στο CCR5 είναι πιο πολύπλοκοι. Ιικά στελέχη ασθενών που ανέπτυξαν ιολογική αποτυχία, ενώ λάμβαναν το maraviroc ή το vicriviroc δεν έδειξαν φαινοτυπική ανθεκτικότητα, εκτός από πολύ λίγα τα οποία είχαν μικρές μειώσεις στο μέγιστο ποσοστό αναστολής, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα *in vitro* πειράματα, όπου υπήρχαν μεγάλες μειώσεις στο μέγιστο ποσοστό αναστολής και μεγάλες αυξήσεις του IC<sub>50</sub>. Οι μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν στα *in vivo* πειράματα είναι ιδιαίτερα ποικίλες και διαφέρουν για κάθε ιικό στέλεχος.

Οι Saag *et al.* αναφέρθηκαν σε μια μελέτη που σχεδιάστηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης του Maraviroc σε ασθενείς με διπλοτροπικά HIV-1 στελέχη. Σε αυτήν την μελέτη, οι ασθενείς (μέση CD4 μέτρηση <50 cells/μl) λάμβαναν μια βελτιωμένη θεραπεία και placebo, ή 150 mg Maraviroc μια φορά τη μέρα, ή 150 mg Maraviroc δύο φορές τη μέρα, και καμία σημαντική στατιστική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων στη μείωση του ιικού φορτίου (Saag *et al.*, 2009). Η ειδικότητα αυτής της κατηγορίας φαρμάκων υπογραμμίζουν τη σημασία του έλεγχου του τροπισμού των ιικών στελεχών πριν την έναρξη της θεραπείας.

#### 4.4 Πρόγνωση κυτταρικού τροπισμού του HIV-1

##### 4.4.1 Φαινοτυπική πρόγνωση

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι χρησιμοποιούν τα αρχικά στελέχη απευθείας ή ανασυνδυασμένους ιούς σε κυτταροκαλλιέργειες που εκφράζουν είτε CCR5 είτε CXCR4, και θεωρούνται να είναι οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι (Trouplin *et al.*, 2001, Whitcomb *et al.*, 2007). Ωστόσο, είναι πολύ πολύπλοκες, ακριβές και απαιτούν ειδικές υποδομές και πείρα. Μια νέα φαινοτυπική μέθοδος έχει αναπτυχθεί πρόσφατα, για να προσδιορίσει τον τροπισμό των γονιδίων env(gp160) που πολλαπλασιάζονται από δείγματα ασθενών (Trofile™, Monogram Biosciences) (Whitcomb *et al.*, 2007). Τα πολλαπλασιασμένα γονίδια env συνδέονται σε ειδικούς φορείς έκφρασης του env (eETVs), τα οποία στη

συνέχεια επιμολύνουν HIV-1 γενομικούς φορείς που δεν φέρουν τη περιοχή *env* και χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν έναν πληθυσμό ψευδοϊών. Στη συνέχεια οι κυτταρικές σειρές CD4<sup>+</sup>/U87 που εκφράζουν CCR5 ή CXCR4 επωάζονται με αυτούς τους ψευδοϊούς και η μόλυνση κάθε κυτταρικού τύπου υπολογίζεται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα αναφοράς βασισμένο στο μάρτυρα λουσιφεράση. Με αυτή τη φαινοτυπική μέθοδο μπορούν να ανιχνευθούν X4 τροπικές μορφές του ιού HIV-1, ακόμη και αν συνιστούν το 1-5% ενός μικτού ιικού πληθυσμού (Whitcomb *et al.*, 2007). Εντούτοις, επειδή η ευαισθησία της ενίσχυσης της μεθόδου είναι αξιόπιστη μόνο όταν τα επίπεδα του HIV-1 RNA στο πλάσμα είναι >1,000 copies/ml, η πλήρης ευαισθησία της μεθόδου θα επιτευχθεί μόνο σε ασθενείς που τα επίπεδα HIV-1 RNA στο πλάσμα τους είναι >10,000 copies/ml (Whitcomb *et al.*, 2007).

#### 4.4.2 Γενοτυπική πρόγνωση

Σε πολλές περιπτώσεις, δεν είναι οικονομικά, χρονικά ή πρακτικά εφικτό να καθοριστεί ο τροπισμός του HIV-1 με *in vitro* φαινοτυπικές μεθόδους. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι βασισμένες στη χρήση αλληλουχιών για τη πρόγνωση της χρήσης του συνυποδοχέα, μια στρατηγική η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βοηθητικό εργαλείο σάρωσης κατά την κλινική διαχείριση των ασθενών και να συμβάλει στην απόφαση για τη λήψη CCR5 ανταγωνιστών. Με αυτή τη στρατηγική ο αριθμός των δειγμάτων για τα οποία θα απαιτείται στη συνέχεια περαιτέρω φαινοτυπική διάγνωση θα μειωθεί κατά πολύ. Έχει καταβληθεί σημαντική προσπάθεια για την δημιουργία γενετικών αλγορίθμων που προβλέπουν τον τροπισμό και βασίστηκαν σε αλληλουχίες για τις οποίες οι αντίστοιχοι βιολογικοί φαινότυποι είχαν καθοριστεί προηγουμένως (Jensen *et al.*, 2003b, Jensen *et al.*, 2003a). Δύο συστήματα με υψηλή ευαισθησία στην πρόγνωση του HIV-1 τροπισμού είναι οι αλγόριθμοι PSSM<sub>X4R5</sub> (Position-Specific Scoring Matrix<sub>X4R5</sub>) (Jensen *et al.*, 2003b) και Geno2pheno (Beerenwinkel *et al.*, 2005b), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες μελέτες σύγκρισης γενοτυπικών και φαινοτυπικών μεθόδων καθορισμού της χρήσης συνυποδοχέα με υψηλά ποσοστά συμφωνίας (Poveda *et al.*, 2007, Raymond *et al.*, 2008, de Mendoza *et al.*, 2008). Καθώς οι ασυμφωνίες μεταξύ των γενοτυπικών και φαινοτυπικών μεθόδων επικεντρώνονται κυρίως στην υπερεκτίμηση των X4 ιών από τα βιοπληροφοριακά συστήματα, θεωρείται απίθανο οι X4 ιοί να μην αναγνωριστούν από τις γενοτυπικές μεθόδους (Poveda *et al.*, 2007). Επιπλέον, σε όλες τις μελέτες η γενική συμφωνία μεταξύ γενοτυπικών και φαινοτυπικών μεθόδων ήταν >80% και για αυτό τα μέχρι τώρα βιοπληροφοριακά συστήματα, αν και ελλιπή, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν για την εξακρίβωση της πιθανότητας χρησιμοποίησης του CCR5 αναστολέα, όταν οι φαινοτυπικές μέθοδοι είναι δύσκολο να εφαρμοστούν (Poveda *et al.*, 2007, Raymond *et al.*, 2008). Ο αλγόριθμος PSSM είναι μια απλή, όμως αξιόπιστη μέθοδος για την πρόβλεψη ικών φαινοτύπων βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας της V3 θηλιάς. Είναι βασισμένος σε ένα μαθησιακό σύνολο από αμινοξικές αλληλουχίες V3 από στελέχη του υπότυπου B με γνωστό φαινότυπο, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη παραγωγή ενός πίνακα μήτρας με λόγους πιθανοτήτων για κάθε θέση στην αλληλουχία. Οι λόγοι για όλες τις θέσεις προστέθηκαν στη συνέχεια για να παρθεί το τελικό αποτέλεσμα (σκορ) (Jensen *et al.*, 2003b). Ο αλγόριθμος Geno2pheno βασίστηκε στην ανάλυση συσχετισμού φαινότυπου-γενότυπου σε 1100 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της περιοχής V3 για την οποία η χρήση συνυποδοχέα είχε καθοριστεί *in vitro*. Για να προσαρμοστεί και η γενετική ποικιλότητα μέσα σε αυτήν την περιοχή, οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με μια πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών που περιλάμβαναν αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες από τον κάθε υπότυπο (Sing *et al.*, 2007). Ακολούθως, έγινε σύγκριση δύο ανεξάρτητων φαινοτυπικών μεθόδων ανίχνευσης του συνυποδοχέα με το Geno2pheno και τα αποτελέσματα ήταν κατά ένα μεγάλο μέρος σύμφωνα (Skrabal *et al.*, 2007), προτείνοντας ότι τα γενοτυπικά προγνωστικά μοντέλα, καθώς επίσης και οι φαινοτυπικές μελέτες, έχουν τη δυνατότητα να καθορίσουν τη χρήση συνυποδοχέα. Άλλα γενοτυπικά συστήματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το Support Vector Machine (SVM), το PART, το Charge Rule, το C4.5 και το C4.5 με τις θέσεις 8 έως 12 (Pillai *et al.*, 2003).

#### 4.4.3 Σύγκριση μεθόδων πρόγνωσης κυτταρικού τροπισμού

Χρειάζεται μια βελτίωση στην ευαισθησία των γενοτυπικών και φαινοτυπικών μεθόδων για ανίχνευση των X4 τροπικών μορφών, ώστε να διασφαλιστεί ότι οι αναστολείς του CCR5 θα χρησιμοποιούνται καταλλήλως (de Mendoza *et al.*, 2008, Poveda *et al.*, 2007, Low *et al.*, 2007). Η φαινοτυπική μέθοδος Trofile™ είναι πιο ευαίσθητη από τις γενοτυπικούς μεθόδους για την ανίχνευση X4 τροπικών ιών σε κλινικά δείγματα. Αυτό οφείλεται στο ότι η μέθοδος χρησιμοποιεί το πλήρες ενν γονίδιο του κάθε δείγματος, με αποτέλεσμα να μπορεί να ανιχνεύσει τον X4 τροπισμό ακόμα και όταν οι αλλαγές που είναι υπεύθυνες είναι εκτός της περιοχής V3 θηλιάς (Low *et al.*, 2007). Παράλληλα, η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση X4 τροπικών μορφών που είναι <20-30%, το όριο ανίχνευσης των γενοτυπικών μεθόδων.

Χρειάζεται αρκετή βελτίωση των γενοτυπικών αλγόριθμων ως προς την εκτίμηση της χρήσης του συνυποδοχέα πριν την εφαρμογή τους στην κλινική διαχείριση (de



Mendoza *et al.*, 2008). Σε μια πρόσφατη μελέτη έγινε σύγκριση μιας φαινοτυπικής μεθόδου (Phenoscript-tropism, Eurofins) και οκτώ διαφορετικών γενοτυπικών αλγορίθμων πρόγνωσης (PSSM<sub>X4R5</sub>, PSSM<sub>sinsi</sub>, Geno2pheno, SVM, PART, Charge Rule, C4.5, C4.5 με τις θέσεις 8 έως 12) σε 115 δείγματα HIV-1 που ταξινομούνταν σε μη-B υπότυπους και 35 του υπότυπου B. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ευαισθησία της ανίχνευσης των X4 μορφών ήταν μικρότερη στα δείγματα των μη-B υπότυπων από ότι αυτά του B υπότυπου, ειδικά στους αλγόριθμους PSSM<sub>sinsi</sub>, SVM και PART (Garrido *et al.*, 2008). Τα εργαλεία βιοπληροφορικής βασίζονται στις V3 αλληλουχίες για την πρόγνωση του HIV-1 τροπισμού, εντούτοις, οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους έχουν σχεδιαστεί λαμβάνοντας υπόψιν γενετικές πληροφορίες που προέρχονται από τον υπότυπο B του HIV-1 για την εκτίμηση τους (Poveda *et al.*, 2006, Skrabal *et al.*, 2007). Καθώς οι μη-B υπότυποι δείχνουν μια μεγάλη γενετική ποικιλότητα στη περιοχή της V3 θηλιάς και αφού οι X4 ιοί ίσως είναι πιο επικρατείς σε ορισμένους υπότυπους από ότι σε άλλους, υπάρχει μια άμεση ανάγκη για αύξηση της αξιοπιστίας των γενοτυπικών μεθόδων για την πρόγνωση του HIV-1 τροπισμού σε μη-B υπότυπους και ειδικά σε μέρη που αυτές οι HIV-1 μορφές είναι επικρατείς και ίσως σύντομα θα έχουν πρόσβαση στους CCR5 ανταγωνιστές (Garrido *et al.*, 2008).

Νέες γενοτυπικές προσεγγίσεις, όπως η μέθοδος του ultra-deep pyrosequencing η οποία ταυτόχρονα αναλύει πολλαπλούς κλώνους ενός μεμονωμένου δείγματος ασθενούς (Wang *et al.*, 2007a), μαζί με ανεπτυγμένα συστήματα βιοπληροφορικής τα οποία θα αναλύουν το σύνολο των αλληλουχιών είναι αναγκαίες για να επιτύχουν τη μέγιστη ευαισθησία την οποία παίρνουμε από τις φαινοτυπικές μεθόδους. Παρόλο που η σύνθετη γενετική βάση του τροπισμού του συνυποδοχέα θέτει ένα εμπόδιο για τις γενοτυπικές προσεγγίσεις σε σχέση με τις φαινοτυπικές, αυτό το μειονέκτημα μπορεί να αντισταθμιστεί εάν οι γενοτυπικές μέθοδοι είναι ικανές να αναγνωρίσουν μεταβατικές R5 μορφές προς X4 που μπορούν να είναι υποκατάστατα της παρουσίας του χαμηλού επιπέδου εμφάνισης X4 μορφών (Shafer *et al.*, 2008).

**Ειδικό Μέρος**

## Κεφάλαιο 5. Γενετική ανάλυση του ιού HIV-1 στην Κύπρο

Η βιολογία του ιού HIV-1 του δίνει τη δυνατότητα να αναπτύσσει εύκολα προσαρμοστικότητα έναντι στις διάφορες πιέσεις που δέχεται από το περιβάλλον του ξενιστή, ένα εξελικτικό πλεονέκτημα που τον κάνει ένα από τους πιο ισχυρούς μικροοργανισμούς της έμβιας ύλης, καθιστώντας τον ικανό να μεταμορφώνεται αναλόγως. Ο κύριος μηχανισμός γένεσης της γενετικής ετερογένειας στον ιό HIV είναι κατά τη διάρκεια μετατροπής του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA από την ιική RT. Η RT δεν έχει την ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών με αποτέλεσμα να έχει ένα υψηλό ρυθμό εισαγωγής μεταλλάξεων, περίπου  $5.4 \cdot 10^{-5}$  ανά βάση ανά κύκλο αναδιπλασιασμού. Ως εκ τούτου, το μέσο ποσοστό λάθους είναι 1 μετάλλαξη ανά ιικό γονιδίωμα ανά κύκλο ζωής. Μαζί με το γρήγορο ρυθμό αναπαραγωγής του ιού *in vivo* ( $10^{10}$  ιοειδή την ημέρα), παράγονται πολλές και διαφορετικές γενετικές μορφές του ιού. Πιο συγκεκριμένα, παράγονται νέες ποικιλίες αντιγόνων για να διαφεύγει από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή ή ποικιλίες που φέρουν επιλεκτικές μεταλλάξεις για να ξεφεύγει από την πίεση των αντιρετροϊκών φαρμάκων ή ποικιλίες που αλλάζουν τη χρήση των κυτταρικών συνυποδοχέων. Η ικανότητα του ιού να εξελίσσεται τόσο γρήγορα και να προσαρμόζεται με μεγάλη ευκολία σε κάθε αλλαγή, μετατρέπει την μάχη του ξενιστή έναντι στον ιό χαμένη υπόθεση, αφού η παραγωγή αντισωμάτων και η καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων δεν μπορούν να συμβαδίσουν με την παραγωγή του νέου μεταλλαγμένου ιού.

Οι επιδράσεις της μοριακής εξέλιξης του ιού HIV-1 ως προς την φυσική του ετερογένεια και την επιλεκτική πίεση από τα αντιρετροϊκά φάρμακα αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής. Για την επίτευξη του πιο πάνω στόχου, διεξήχθησαν τρεις επιμέρους μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από HIV-1 οροθετικά άτομα που διαγνώστηκαν στην Κύπρο από το 1986 έως το 2006. Μετά το πέρας δέκα χρόνων από την πρώτη μοριακή φυλογενετική μελέτη της HIV-1 λοίμωξης στην Κύπρο, η έκταση της HIV-1 μοριακής ετερογένειας στη χώρα παρέμεινε απροσδιόριστη. Για το λόγο αυτό, η Κύπρος επιλέχθηκε ως «χώρα δότης» HIV-1 στελεχών. Η δυνατότητα εύρεσης δειγμάτων δόθηκε μέσω μιας συνεργασίας μεταξύ της Γρηγόρειου Κλινικής, της Κλινικής Αναφοράς για το AIDS του Υπουργείου Υγείας της Κύπρου και του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας και Μοριακής Ιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κύπρου.

**Στο πρώτο μέρος πραγματοποιήθηκε μια αναδρομική γενετική έρευνα για την παρακολούθηση της γενετικής διασποράς του ιού HIV-1 και τον καθορισμό της δυναμικής της HIV-1 λοίμωξης στην Κύπρο την περίοδο 1986-2006.**

Δεκαπέντε χρόνια πριν, έγινε η πρώτη μοριακή φυλογενετική μελέτη της HIV-1 λοίμωξης στην Κύπρο (Kostrikis *et al.*, 1995), όπου κατέδειξε μια υψηλή ετερογένεια HIV-1 στελεχών. Εντούτοις, η εισαγωγή νέων υποτύπων και η δυναμική εξέλιξη της γενετικής διασποράς του ιού HIV-1 παρέμειναν άγνωστα. Σε μια προσπάθεια να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα έγινε μια αναδρομική μελέτη για να διερευνηθεί η γενετική διασπορά του ιού HIV-1 και να καθοριστεί η δυναμική της επιδημίας στην Κύπρο τα τελευταία 20 χρόνια. Εξετάστηκαν HIV-1 στελέχη που απομονώθηκαν από 77 άτομα στην Κύπρο που μολύνθηκαν με τον ιό HIV-1 την περίοδο 1986-2006. Οι σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδιώματος πολλαπλασιάστηκαν για όλα τα HIV-1 δείγματα, χρησιμοποιώντας ένα νέο σχεδιασμένο πρωτόκολλο. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση στις αλληλουχίες των δειγμάτων για τη φυλογενετική ταξινόμηση των στελεχών σε γνωστούς υπότυπους και επιδημικές ανασυνδυασμένες μορφές (CRFs) της ομάδας M του ιού HIV-1. Σε δύο HIV-1 στελέχη με προέλευση τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό που δεν ταξινομήθηκαν σε οποιονδήποτε γνωστό (υπο)υπότυπο ή CRF, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανασυνδυασμού και περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση για εξακρίβωση της φυλογένειας τους.

Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από την μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας θα δώσουν μια καθαρή εικόνα της εμφάνισης και εξέλιξης της επιδημίας του HIV-1 στην Κύπρο, καθώς επίσης και πρόβλεψη για τη μελλοντική εξέλιξη της. Η ανάλυση σχεδόν ολόκληρου του γονιδιώματος των στελεχών HIV-1 που βρίσκονται στην Κύπρο, πέραν της φυλογενετικής ταξινόμησης, ίσως αναδείξει νέα ανασυνδυασμένα στελέχη που είναι μοναδικές ανασυνδυασμένες μορφές, καθώς και στελέχη HIV-1 που δεν ανήκουν σε κάποιο γνωστό υπότυπο.

**Στο δεύτερο μέρος διερευνήθηκε η γενετική ποικιλότητα και η μεταδιδόμενη ανθεκτικότητα ως προς την αντιρετροϊκή θεραπεία σε στελέχη νεοδιαγνωσθέντων HIV-1 ασθενών που δεν υποβλήθηκαν ποτέ σε αντιρετροϊκή θεραπεία κατά το διάστημα 2003-2006.**

Μετά την εφαρμογή της αντιρετροϊκής θεραπείας στα τέλη της δεκαετίας του '90 στην Κύπρο δεν διεξήχθη καμία έρευνα για τον καθορισμό της μετάδοσης ανθεκτικών στα αντιρετροϊκά φάρμακα στελεχών. Διαμέσου της δεύτερης μελέτης, διεξήχθη μια μοριακή

επιδημιολογική έρευνα, όπου διερευνήθηκε η γενετική ποικιλότητα και η μεταδιδόμενη ανθεκτικότητα ως προς την αντιρετροϊκή θεραπεία σε 37 στελέχη νεοδιαγνωσθέντων HIV-1 ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε αντιρετροϊκή θεραπεία κατά το διάστημα 2003-2006. Διεξήχθη γενοτυπική ανάλυση ανθεκτικότητας των γονιδίων Pr-RT ως προς τους αναστολείς της πρωτεάσης (PIs) και της αντίστροφης μεταγραφάσης (N/NN-RTIs) με ένα νέο σχεδιασμένο πρωτόκολλο. Επίσης, καθορίστηκε η επικράτηση μεταδιδόμενων μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στις περιοχές Gag(cleavage sites) και Env gp41(HR1, HR2) ως προς τους PIs και τους αναστολείς σύντηξης (FIs), αντίστοιχα. Παράλληλα, έγινε ανάλυση της περιοχής του Env gp120 (V3-loop) για πρόγνωση του κυτταρικού τροπισμού των HIV-1 στελεχών.

Η γενοτυπική εξέταση ανθεκτικότητας θα ρίξει φως στα μοτίβα των μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στους αναστολείς PIs, N/NN-RTIs και FIs και θα καθορίσει τη συχνότητα μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών στην Κύπρο. Τα δεδομένα που θα πάρουμε μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους κλινικούς γιατρούς ως εργαλείο για τον άμεσο σχεδιασμό της μελλοντικής θεραπείας του κάθε νεοδιαγνωσθέντος ασθενή. Επίσης, τα στοιχεία θα χρησιμοποιηθούν και για τον εμπλουτισμό της μελέτης για την μετάδοση ανθεκτικών στελεχών στην Ευρώπη, που διεξάγεται μέσω ενός μεγάλου ερευνητικού προγράμματος το EHR (European HIV Resistance), όπου η Κύπρος παίρνει μέρος ως κράτος μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι γνώσεις για την προϋπάρχουσα ανθεκτικότητα σε συνδυασμό με την γνώση του υπότυπου του κάθε στελέχους δείγματος, δίνουν το έναυσμα για σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων φαρμάκων έναντι του HIV-1 που θα είναι εξειδικευμένα για τον κάθε HIV-1 ασθενή. Η πρόγνωση του κυτταρικού τροπισμού των HIV-1 στελεχών των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων είναι πλέον αναγκαία προϋπόθεση για την κλινική αντιμετώπιση των HIV-1 οροθετικών ατόμων, αφού τα νέα υποσχόμενα φάρμακα ανταγωνιστές των συν-υποδοχέων CCR5, CXCR4 θα δίνονται σύντομα στους HIV-1 ασθενείς (Johnson *et al.*, 2007, Van Laethem *et al.*, 2005).

**Στο τρίτος μέρος εξετάστηκε η επίδραση των φυσικών πολυμορφισμών του γονιδίου της ιντεγκράσης (IN) σε HIV-1 στελέχη της ομάδας M από την Κύπρο ως προς την ενεργότητα της IN, τη δέσμευση των αναστολέων της IN (INIs) και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας ως προς τον αναστολέα raltegravir.**

Μια από τις πιο πρόσφατες κατηγορίες φαρμάκων του HIV-1 είναι οι αναστολείς της ιντεγκράσης (IN), ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους και τα πρότυπα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα στελέχη της ομάδας M είναι υπό διερεύνηση (Zeinalipour-Loizidou *et*

*al.*, 2007). Στην τρίτη μελέτη έγινε μια γενετική ανάλυση του γονιδίου της IN σε 108 HIV-1 στελέχη της ομάδας M από την Κύπρο. Εξετάστηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα της IN που συνδέονται με την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, τη δέσμευση του ενζύμου στον κυτταρικό παράγοντα LEDGF/p75, την πρωτοταγή ανθεκτικότητα και τη δευτεροταγή ανθεκτικότητα στους αναστολείς της ιντεγκράσης. Ακολούθως, με βάση τα στοιχεία της γενετικής ανάλυσης έγινε δομική ανάλυση της δέσμευσης του raltegravir στην πρωτεΐνη σε σχέση με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

## Κεφάλαιο 6. Μεθοδολογία

### 6.1 Συμμετέχοντες HIV-1 οροθετικοί

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε υλικό που προήλθε από 164 μολυσμένα με τον ιό HIV-1 άτομα, τα οποία είναι εγγεγραμμένα ως HIV-1 φορείς στις αρμόδιες υπηρεσίες του Υπουργείου Παιδείας της Κύπρου και διαγνώστηκαν ως οροθετικά το διάστημα 1986 μέχρι 2006. Η λήψη των δειγμάτων διεξήχθη σε τακτά χρονικά διαστήματα από το Δεκέμβριο του 2004 έως το Δεκέμβριο του 2006 στην Κλινική Αναφοράς για το AIDS «Γρηγόρειο Κλινική», η οποία στεγάζεται στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρνακας. Η HIV-1 ορομετατροπή αυτών των ασθενών είχε διαγνωσθεί από πριν με την εμπορικά διαθέσιμη ανοσολογική μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunoassay) και επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο western blotting από τις υπηρεσίες του Υπουργείου Υγείας. Όλοι οι ασθενείς ζούσαν μόνιμα στη Κύπρο κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Η πλειοψηφία των ατόμων που έλαβαν μέρος στη μελέτη ήταν Ελληνοκύπριοι, αν και ένας αριθμός τους ανέφερε ότι ταξίδεψαν ή έζησαν στο εξωτερικό στο παρελθόν. Οι υπόλοιποι είναι ξένοι υπήκοοι οι οποίοι μένουν μόνιμα ή για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα στην Κυπριακή Δημοκρατία.

Τα οροθετικά άτομα ενημερώθηκαν για όλη τη διαδικασία που θα ακολουθούσε από προϊστάμενο Νοσηλευτικό Λειτουργό-Σύμβουλο για το AIDS. Για τη διεξαγωγή της δειγματοληψίας ο κάθε φορέας ή κηδεμόνας έδινε γραπτή συγκατάθεση σε ειδικό έντυπο συγκατάθεσης και συμμετοχής στην έρευνα. Το έντυπο αυτό αναφέρεται στο ερευνητικό πρόγραμμα που εγκρίθηκε από το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας με τίτλο: «Γενετική Ανάλυση Στελεχών του ιού HIV-1 από Ασθενείς στην Κύπρο, Μοριακή Επιδημιολογία και Κατανομή της Αντοχής στα Αντιρετροϊκά Φάρμακα» και έχει πάρει έγκριση από την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής Κύπρου και στο οποίο συμπεριλαμβάνεται η έρευνα που παρουσιάζεται εδώ. Το έντυπο αυτό αναφέρει πληροφορίες για τους φορείς, δηλαδή το σκοπό του προγράμματος στο οποίο λαμβάνουν μέρος, τα οφέλη που θα έχουν, πληροφορίες για τη διαφύλαξη των προσωπικών τους δεδομένων, καθώς και ένα ερωτηματολόγιο με αναφορά τα δημογραφικά, κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία των ασθενών. Η εμπιστευτικότητα προς τα προσωπικά δεδομένα των ασθενών διασφαλίστηκε με τη δημιουργία ξεχωριστών εργαστηριακών αριθμών, με τους οποίους κωδικοποιήθηκαν όλα τα κλινικά δείγματα και οι πληροφορίες, χωρίς να γνωρίζουμε οποιαδήποτε στοιχεία εν σχέση με την ταυτότητα των ασθενών. Το κάθε ερωτηματολόγιο συμπληρώθηκε από τον επιβλέπων γιατρό των ασθενών και τη Σύμβουλο για το AIDS σε ξεχωριστό έντυπο,

στο οποίο αναγράφεται ο εργαστηριακός και ο κλινικός αριθμός. Υπήρχαν δύο κατηγορίες εντύπων συγκατάθεσης και ερωτηματολογίων, η μια για διαγνωσθέντες ασθενείς από το 1986 έως το 2006 και η άλλη για νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς από το 2003 μέχρι το 2006, οι οποίοι έδωσαν συγκατάθεση ότι θα λάβουν μέρος και στο πρόγραμμα EHR.

Τα υπο διερεύνηση δείγματα των HIV-1 οροθετικών ασθενών χρησιμοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές μελέτες (βλέπε Κεφ. 5). Στην πρώτη μελέτη διερευνήθηκαν δείγματα από HIV-1 οροθετικά άτομα που έχουν διαγνωσθεί κατά το διάστημα 1986 έως 2006 και είναι χρόνιοι ή νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που λαμβάνουν ή όχι αντιρετροϊκή αγωγή. Σε 77 δείγματα της ομάδας αυτής, που αντιπροσωπεύει το 38% των εν ζωή γνωστών μολυσμένων ατόμων που έχουν διαγνωσθεί κατά το διάστημα 1986 έως 2006 έγινε φυλογενετική ανάλυση στο σχεδόν πλήρες μήκος γονιδίωμα των HIV- 1 στελεχών για εύρεση της ετερογένειας τους. Στη δεύτερη ομάδα μελετήθηκαν δείγματα αίματος που λήφθηκαν από 37 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που διαγνώστηκαν μεταξύ 2003 και 2006, οι οποίοι δεν έλαβαν ποτέ αντιρετροϊκή θεραπεία. Η δειγματοληψία έγινε μέσα σε 3 μήνες από τη στιγμή της διάγνωσης, σύμφωνα με τους κανόνες του προγράμματος EHR και αναλύθηκαν φυλογενετικά στις περιοχές του γονιδιώματος *gag*, *pol*(PR-RT) και *env*(gp160). Επίσης, σε αυτή την ομάδα μελετήθηκε η διάδοση ανθεκτικών μεταλλάξεων προς τα αντιρετροϊκά φάρμακα και η γενοτυπική πρόγνωση του κυτταρικού τροπισμού. Στην τρίτη ομάδα έγινε γενοτυπική ανάλυση του γονιδίου της IN σε 108 δείγματα από HIV-1 μολυσμένα άτομα που έχουν διαγνωσθεί κατά το διάστημα 1986 έως 2006 για εύρεση φυσικών πολυμορφισμών που ίσως να επηρεάζουν την ενεργότητα της IN, τη δέσμευση των αναστολέων IN και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον αναστολέα raltegravir.

## 6.2 Συλλογή και απομόνωση δειγμάτων

### 6.2.1 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία αφορούσε δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από τα οροθετικά άτομα με τη βοήθεια του νοσηλευτικού προσωπικού της «Γρηγόρειου Κλινικής» με μια απλή φλεβοτομή. Για τη συλλογή του αίματος χρησιμοποιήθηκαν δύο σωλήνες BD Vacutainer CPT™ (Becton Dickinson, Annapolis, MD) των 8 ml με διαστάσεις 16x125 mm με τους οποίους είναι δυνατή η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το αίμα. Ο σωλήνας BD Vacutainer CPT™ είναι γυάλινος, επικαλυμμένος με σιλικόνη και το πόμα του αποτελείται από σιλικόνη. Μέσα στο σωλήνα περιέχονται τρία είδη υλικών. Το



πρώτο είναι διάλυμα κιτρικού νατρίου (1 ml) το οποίο χρησιμεύει ως αντιπηκτικό. Τα κιτρικά ιόντα δημιουργούν χημικές ενώσεις με τα ιόντα  $Ca^{2+}$ , και έτσι εμποδίζουν τους μηχανισμούς σχηματισμού θρόμβου στο αίμα με αποτέλεσμα το αίμα να διατηρείται στην υγρή του μορφή για αρκετές ώρες. Ακολουθεί το polyester gel, μια στοιβάδα 3 g, το οποίο χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού και τέλος το διάλυμα των πολυσακχαριτών/Sodium Diatrizoate περίπου 2 ml, που είναι διάλυμα διαβάθμισης πυκνότητας. Στον κάθε σωλήνα αναγραφόταν σε ειδική αυτοκόλλητη ταινία ο κλινικός αριθμός του ασθενή. Μετά τη συλλογή τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C), ακολουθούσε η μεταφορά τους στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Μοριακής Ιολογίας, του Τμήματος Βιολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κύπρου, όπου και άρχιζε σε διάστημα 2 hrs η διαδικασία απομόνωσης του πλάσματος και των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMCs).

### 6.2.2 Απομόνωση πλάσματος και PBMCs

Η διαδικασία απομόνωσης του πλάσματος και των PBMCs έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου του BD Vacutainer CPT™ (Becton Dickinson, Annapolis, MD) και πραγματοποιήθηκε στον ειδικά σχεδιασμένο θάλαμο Βιοασφάλειας Επιπέδου 3 (BL3) κάτω από αυστηρές προϋποθέσεις σε θέματα μεθοδολογίας, χειρισμού και ενδυματολογίας, παίρνοντας τα απαραίτητα μέτρα για αποφυγή οποιουδήποτε ατυχήματος.

Πιο αναλυτικά τα στάδια της απομόνωσης του πλάσματος και των PBMCs περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Προετοιμασία των σχετικών υλικών που θα χρησιμοποιηθούν στην ειδική εστία απομόνωσης, όπως πιπέτες Paster, αποστειρωμένοι σωλήνες Cryogene των 2 ml, σωλήνες erppendorf των 1.5 ml (PCR clean και safe-lock), αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρου VWR των 15 ml και 50 ml, PBS 1% (GIBCO, sterile, pH 7.4), πιπέτα 1000  $\mu$ l, tips με φίλτρα των 1000  $\mu$ l, στυλό, δοχείο/καλαθάκι αποβλήτων και ειδικά κουτιά (Cryoboxes) συλλογής των σωλήνων που θα αποθηκευτούν στους -80 °C. Στους σωλήνες Cryogene επικολλούνται ειδικές ετικέτες, στις οποίες αναγράφεται ο κλινικός αριθμός του ασθενή και η ημερομηνία στην οποία έγινε η δειγματοληψία.
- Τα δείγματα αίματος που βρίσκονται σε σωλήνες BD Vacutainer CPT™ με αναγραφόμενο τον κλινικό αριθμό του ασθενή, φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο (erppendorf 5810) για 20 min στα 1.800 *ref* ή 3.000 *rpm* με βάση τον τύπο  $RPM =$

$\sqrt{(\text{RCF}) \cdot (100000) / (1,12) \cdot (r)}$ . Μετά τη φυγοκέντρηση, η διαβάθμιση των στοιβάδων του αίματος είναι ορατή και είναι ως εξής. Τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται στον πάτο του σωλήνα με τα κοκκιοκύτταρα να σχηματίζουν μια πολύ λεπτή στοιβάδα στην επιφάνεια τους. Ακολουθεί το διάλυμα πυκνότητας (πολυσακχαρίτες/Sodium Diatrizoate) και πιο πάνω βρίσκεται η ζώνη με το polyester gel. Πάνω από το gel βρίσκεται η στοιβάδα των PBMCs και των αιμοπεταλίων, η οποία έχει μια ομιχλώδη όψη και ονομάζεται «buffy coat». Η στοιβάδα που βρίσκεται στην επιφάνεια είναι το πλάσμα.

- Το πλάσμα συλλέχθηκε από τους δύο σωλήνες που πήραμε από τον κάθε ασθενή, με πιπέτες Paster. Η ποσότητα του 1 ml μεταφέρθηκε σε 10 περίπου σωλήνες Cryogene των 2 ml. Αυτή η διαδικασία γινόταν πολύ προσεκτικά για να μην αναταραχθεί η στοιβάδα με τα PBMCs. Το πλάσμα αποθηκεύτηκε αμέσως στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε κουτιά Cryoboxes. Με μία δεύτερη πιπέτα Paster συλλέχθηκε από τον κάθε σωλήνα BD Vacutainer CPT™ η στοιβάδα των PBMCs και τοποθετήθηκε αντίστοιχα, σε σωλήνα φυγοκέντρου VWR των 15 ml. Ακολούθως, στους σωλήνες με τη στοιβάδα των PBMCs προστέθηκε μέχρι τα 15 ml PBS 1% και έγινε ανακίνηση των σωλήνων 5-10 φορές.
- Οι σωλήνες με τη στοιβάδα των PBMCs και το PBS φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο (erppendorf 5810) για 20 min στα 300 rcf, που αντιστοιχούν σε 1.200 rpm. Η διαδικασία αυτή γίνεται για να ξεπλύνουμε τα PBMCs από το πλάσμα και άλλα στοιχεία του αίματος. Το υπερκείμενο χύθηκε σε ειδικό δοχείο αποβλήτων προσπαθώντας να μην αναταραχθεί το ίζημα και προστέθηκε 1 ml PBS 1% (GIBCO, sterile, pH 7,4) για την αναδιάλυση του ιζήματος.
- Μετά την αναδιάλυση του ιζήματος το κάθε διάλυμα μεταφέρθηκε σε αντίστοιχο καθαρό σωλήνα erppendorf των 1,5 ml (PCR clean και safe-lock), στο οποίο αναγράφεται ο κλινικός αριθμός του ασθενή και η ημερομηνία στην οποία έγινε η απομόνωση. Τα δείγματα, εν συνεχεία, φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο (erppendorf 5417C) για 10 min στα 3.000 rcf που αντιστοιχούν στα 12.000 rpm.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά στο δοχείο αποβλήτων, χωρίς να αναταραχθεί το ίζημα που αποτελεί τα PBMCs. Οι σωλήνες erppendorf των 1,5 ml με τα PBMCs αποθηκεύονται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  στα κουτιά Cryoboxes, όπου φυλάχτηκαν και οι σωλήνες με το πλάσμα.

- Όλα τα σκουπίδια απομακρύνθηκαν σε ειδικό καλάθο, όπου φυλάσσονται για να αποστειρωθούν και να συμπιεστούν αργότερα σε αυτόματο κλίβανο. Ο χώρος απολυμαίνεται χρησιμοποιώντας αιθανόλη 70% και διάλυμα Virkon.

### 6.3 Εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων

Έγινε εξαγωγή των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA του ιού, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν στις παρακάτω αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

#### 6.3.1 Εξαγωγή γονιδιωματικού DNA από τα PBMCs

Το ιικό DNA του προιού είναι ενσωματωμένο στο γονιδιωματικό DNA των κυττάρων του ξενιστή. Για την απομόνωση του χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία εξαγωγής ολικού DNA από μη καλλιεργημένα PBMCs των ασθενών μέσω του QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Με το kit αυτό επιτυγχάνεται επίσης, ο καθαρισμός του ολικού γονιδιωματικού DNA για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για PCR. Η όλη διαδικασία γίνεται στην ειδικά διαμορφωμένη εστία που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του DNA και τον καθαρισμό του στον εργαστηριακό χώρο με επίπεδο βιοασφάλειας 2 (BL2), εκτός από τα πρώτα δύο στάδια όπου γίνονται στον εργαστηριακό χώρο BL3.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA από τα PBMCs περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Απόψυξη των PBMCs που βρίσκονται σε σωλήνα erpendorf 1,5 ml από το κάθε δείγμα από τους -80 °C στους 25 °C. Η ποσότητα των κυττάρων που βρίσκονται στον κάθε σωλήνα είναι σε μορφή ιζήματος και αποτελείται από περίπου  $5 \times 10^6$  κύτταρα ανά ml. Στο κάθε σωλήνα αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός που αντιστοιχεί στον κλινικό αριθμό.
- Προσθήκη 200 μl PBS 1% μέσα στο κάθε σωλήνα με το ίζημα και πολύ καλή αναδιάλυση του ιζήματος. Προσθήκη 20 μl QIAGEN πρωτεάση και 200 μl διαλύματος AL και πολύ καλή ανάδευση με vortex για 15 sec για να γίνει η λύση των κυττάρων. Το ρυθμιστικό διάλυμα AL προσφέρει τις άριστες συνθήκες για τη δέσμευση του DNA στην QIAamp μεμβράνη όταν το δείγμα φορτωθεί στην QIAamp Spin Column. Το διάλυμα AL περιέχει guanidine hydrochloride που είναι μια οργανική ουσία με χαοτροπικές ιδιότητες με αποτέλεσμα τη λύση των

κυττάρων και την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, το διάλυμα AL σταθεροποιεί το DNA αφού δρα ανασταλτικά ως προς τις νουκλεάσες. Το διάλυμα AL πριν χρησιμοποιηθεί, αναδεύεται πολύ καλά διότι μπορεί να σχηματίσει ίζημα. Στην περίπτωση ιζήματος επωάζεται στους 56 °C.

- Επώαση στους 56 °C για 10 min στο heating block για να αυξηθεί η παραγωγή του DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 10.000 rpm για 10 sec για απομάκρυνση των σταγονιδίων που μπορεί να έχουν συγκεντρωθεί στα τοιχώματα και το πάμα.
- Προσθήκη 200 μl αιθανόλης 96-100% στο κάθε δείγμα και καλή ανάδευση με vortex για 15 sec. Η αιθανόλη θα προκαλέσει τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την καθίζηση του DNA, αφού είναι λιγότερο πυκνή από το DNA. Φυγοκέντρηση των σωλήνων των 1,5 ml στις 10.000 rpm για 10 sec.
- Προετοιμασία των QIAamp Spin Columns που αποτελούνται από ένα σωληνάκι με silica-gel μεμβράνη μέσα σ' ένα σωληνάκι συλλογής των 2 ml αναγράφοντας τον εργαστηριακό αριθμό του κάθε δείγματος. Προσεκτικά, χωρίς να αγγίζεται η παρυφή, μεταφέρεται το δείγμα από το προηγούμενο βήμα στην QIAamp Spin Column. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 min. Με τη φυγοκέντρηση το DNA θα δεσμευθεί στη QIAamp silica-gel μεμβράνη. Οι κατάλληλες συνθήκες άλατος και pH στο διάλυμα συμβάλλουν στη διάχυση των πρωτεϊνών και άλλων μολυσματικών παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν το PCR που θα ακολουθήσει στη συνέχεια. Τοποθέτηση της QIAamp Spin Column σ' ένα νέο καθαρό συλλεκτικό σωληνάκι των 2ml και απομάκρυνση του προηγούμενου που περιείχε το προϊόν του φιλτραρίσματος.
- Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW1 χωρίς να αγγίζεται η παρυφή της QIAamp Spin Column. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 min και τοποθέτηση της QIAamp Spin Column σ' ένα νέο καθαρό συλλεκτικό σωληνάκι των 2 ml και απομάκρυνση του προηγούμενου που περιείχε το προϊόν του φιλτραρίσματος. Το δεσμευμένο στην QIAamp μεμβράνη DNA ξεπλένεται με το buffer AW1 για να βελτιωθεί η καθαρότητα του DNA. Το AW1 διάλυμα περιέχει επίσης guanidine hydrochloride που είναι πρωτεϊνικός αποδιατακτικός παράγοντας.
- Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW2 χωρίς να αγγίζεται η παρυφή της QIAamp Spin Column για περαιτέρω βελτίωση της καθαρότητας του δεσμευμένου DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 4 min και τοποθέτηση της QIAamp Spin Column σ' ένα καθαρό σωληνάκι των 1,5 ml (eppendorf, PCR clean-Safe

lock) στο οποίο αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός, ο κλινικός αριθμός του δείγματος, η ημερομηνία συλλογής του αίματος και η ημερομηνία διεξαγωγής του πειράματος. Το σωληνάκι συλλογής που περιέχει το προϊόν του φιλτραρίσματος απομακρύνεται.

- Προσθήκη 200 μl διαλύματος ΑΕ χωρίς να αγγίζεται η παρυφή της QIAamp Spin Column. Επώαση για 1 min στους 15-25 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1min. Το διάλυμα ΑΕ είναι πιο ανταγωνιστικό ως προς τη δέσμευση του πάνω στην QIAamp Spin Column παρά το DNA και γι' αυτό προκαλεί και την έκλυση του τελευταίου. Το buffer ΑΕ αναδεύεται πολύ καλά πριν χρησιμοποιηθεί. Η QIAamp Spin Column απομακρύνεται και το σωληνάκι των 1,5 ml αποθηκεύεται στους -20 °C. Μέσα στο σωληνάκι εμπεριέχονται 200 μl καθαρού γονιδιωματικού DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για PCR.
- Το γονιδιωματικό DNA πριν να χρησιμοποιηθεί για PCR πρέπει να μετρηθεί με το φασματοφωτόμετρο για να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με διάλυμα ΑΕ ως τυφλό. Η συγκέντρωση μετράται από την απορρόφηση στα 260 nm που ανήκει στο υπεριώδες οπτικό φάσμα της ακτινοβολίας με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) το οποίο μετρά σε ποσότητες 1-2 μl. Είναι υπολογισμένο ότι περίπου 25-50 ng DNA/μl δίνουν απορρόφηση γύρω στο 1,0 στα 260 nm. Αναμένουμε ότι από  $5 \times 10^6$  κύτταρα/ml θα πάρουμε 30-40 ng/μl DNA. Η καθαρότητα καθορίζεται υπολογίζοντας το λόγο της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm. Ένα DNA με λόγο A260/A280 γύρω στα 1,6-2,0 αντικατοπτρίζει την καθαρότητα του DNA από πρωτεΐνες, φαινόλες και άλλους μολυσματικούς παράγοντες. Επίσης, ο λόγος A260/A230 δείχνει την καθαρότητα του DNA από κατάλοιπα σακχάρων με βέλτιστη τιμή μεταξύ 0,3-0,9. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 260 nm, της συγκέντρωσης του δείγματος (ng/μl) και της σχετικής καθαρότητας του δείγματος αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό αρχείο.

### 6.3.2 Εξαγωγή RNA από το πλάσμα

Για την απομόνωση του RNA από το πλάσμα και τον καθαρισμό του χρησιμοποιήθηκε το QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen, Valencia, CA) σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον εργαστηριακό χώρο BL2 στην ειδική εστία εξαγωγής του RNA, εκτός από τα πρώτα τρία στάδια που έγιναν στο χώρο BL3.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της απομόνωσης του RNA από το πλάσμα περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Απόψυξη του πλάσματος που βρίσκεται σε σωλήνα Cryotube 2 ml από το κάθε δείγμα από τους -80 °C στους 25 °C. Μεταφορά 200 μl πλάσμα από το κάθε σωλήνα σε αντίστοιχο σωληνάκι erpendorf των 2 ml που περιέχει 800 μl PBS 1% και ανάδευση.
- Προσθήκη 800 μl διαλύματος AC στο σωλήνα και 5,6 μl διάλυμα carrier RNA μέσα στο πώμα του σωληναρίου. Το πώμα κλείνει και γίνεται αναστροφή του σωλήνα 3 φορές και ακολουθεί καλή ανάδευση με vortex για 10 sec. Η προσθήκη του διαλύματος AC στο πλάσμα απενεργοποιεί τις RNases.
- Επώαση στους 25 °C για 10 min για την αποτελεσματική ανάκτηση του HIV-1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 1.200 g για 3min και απομάκρυνση του υπερκείμενου σε ειδικό δοχείο αποβλήτων. Το συμπαγές ίζημα υφίσταται χαλάρωση με την ανάδευση σε vortex.
- Προσθήκη 300 μl διαλύματος AR ζεσταμένο στους 60 °C και 20 μl πρωτεΐνης K. Καλή ανάδευση με το vortex μέχρι το ίζημα να αναδιαλυθεί εντελώς για την εξασφάλιση της μέγιστης ανάκτησης νουκλεϊκών οξέων. Η προθέρμανση του διαλύματος AR στους 60 °C βοηθά στη διάλυση του ιζήματος και αυξάνει την ενεργότητα της πρωτεΐνης K. Το διάλυμα AR περιέχει guanidine hydrochloride για τη λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση του RNA, καθώς και τη σταθεροποίηση του.
- Επώαση στους 40 °C για 10 min σ' ένα mixer incubator στη μέγιστη ταχύτητα για να γίνει αποτελεσματική η πέψη με την πρωτεΐνη K. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση των σωληναρίων για απομάκρυνση των σταγονιδίων που μπορεί να έχουν συγκεντρωθεί στα τοιχώματα και το πώμα.
- Προσθήκη 300 μl διαλύματος AB το οποίο περιέχει αιθανόλη, πολύ καλή ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση των σωληναρίων για απομάκρυνση των σταγονιδίων που μπορεί να έχουν συγκεντρωθεί στα τοιχώματα και το πώμα. Η αιθανόλη θα προκαλέσει τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την καθίζηση του RNA, αφού είναι λιγότερο πυκνή από το RNA.
- Προετοιμασία των QIAamp Spin Columns που αποτελούνται από ένα σωληνάκι με silica-gel μεμβράνη μέσα σ' ένα σωληνάκι συλλογής των 2 ml αναγράφοντας τον εργαστηριακό αριθμό του κάθε δείγματος. Προσεκτικά, χωρίς να αγγίζεται η

παρυφή, μεταφέρονται 700 μl του δείγματος από το προηγούμενο βήμα στην QIAamp Spin Column. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5.000 g για 1 min. Με τη φυγοκέντρηση το DNA θα δεσμευθεί στη QIAamp silica-gel μεμβράνη. Οι κατάλληλες συνθήκες άλατος και pH στο διάλυμα συμβάλλουν στη διάχυση των πρωτεϊνών και άλλων μολυσματικών παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν το PCR που θα ακολουθήσει στη συνέχεια.

- Τοποθέτηση της QIAamp Spin Column σ' ένα νέο καθαρό συλλεκτικό σωληνάκι των 2ml και απομάκρυνση του προηγούμενου που περιείχε το προϊόν του φιλτραρίσματος. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW1 χωρίς να αγγίζεται η παρυφή της QIAamp Spin Column. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 g για 1 min. Το δεσμευμένο στην QIAamp μεμβράνη DNA ξεπλένεται με το buffer AW1 για να βελτιωθεί η καθαρότητα του DNA. Το AW1 διάλυμα περιέχει επίσης guanidine hydrochloride που είναι πρωτεϊνικός αποδιατακτικός παράγοντας.
- Τοποθέτηση της QIAamp Spin Column σ' ένα νέο καθαρό συλλεκτικό σωληνάκι των 2 ml και απομάκρυνση του προηγούμενου που περιείχε το προϊόν του φιλτραρίσματος. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW2 χωρίς να αγγίζεται η παρυφή της QIAamp Spin Column για περαιτέρω βελτίωση της καθαρότητας του δεσμευμένου DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 20.000 g για 3 min.
- Τοποθέτηση της QIAamp Spin Column σ' ένα καθαρό σωληνάκι των 1,5 ml (Eppendorf, PCR clean-Safe lock) στο οποίο αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός, ο κλινικός αριθμός του δείγματος, η ημερομηνία συλλογής του αίματος και η ημερομηνία διεξαγωγής του πειράματος. Το σωληνάκι συλλογής που περιέχει το προϊόν του φιλτραρίσματος απομακρύνεται. Προσθήκη 30 μl διαλύματος AVE χωρίς να αγγίζεται η παρυφή της QIAamp Spin Column. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 g για 1min. Το διάλυμα AVE είναι πιο ανταγωνιστικό ως προς τη δέσμευση του πάνω στην QIAamp Spin Column παρά το RNA και γι' αυτό προκαλεί και την έκλυση του τελευταίου.
- Επανάληψη της τελευταίας διαδικασίας για την εξασφάλιση της μέγιστης ανάκτησης του ιικού RNA. Η QIAamp Spin Column απομακρύνεται και το σωληνάκι των 1,5 ml αποθηκεύεται στους -80 °C σε ειδικά κουτιά (Cryoboxes). Μέσα στο σωληνάκι εμπεριέχονται 60 μl καθαρού RNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για RT-PCR.

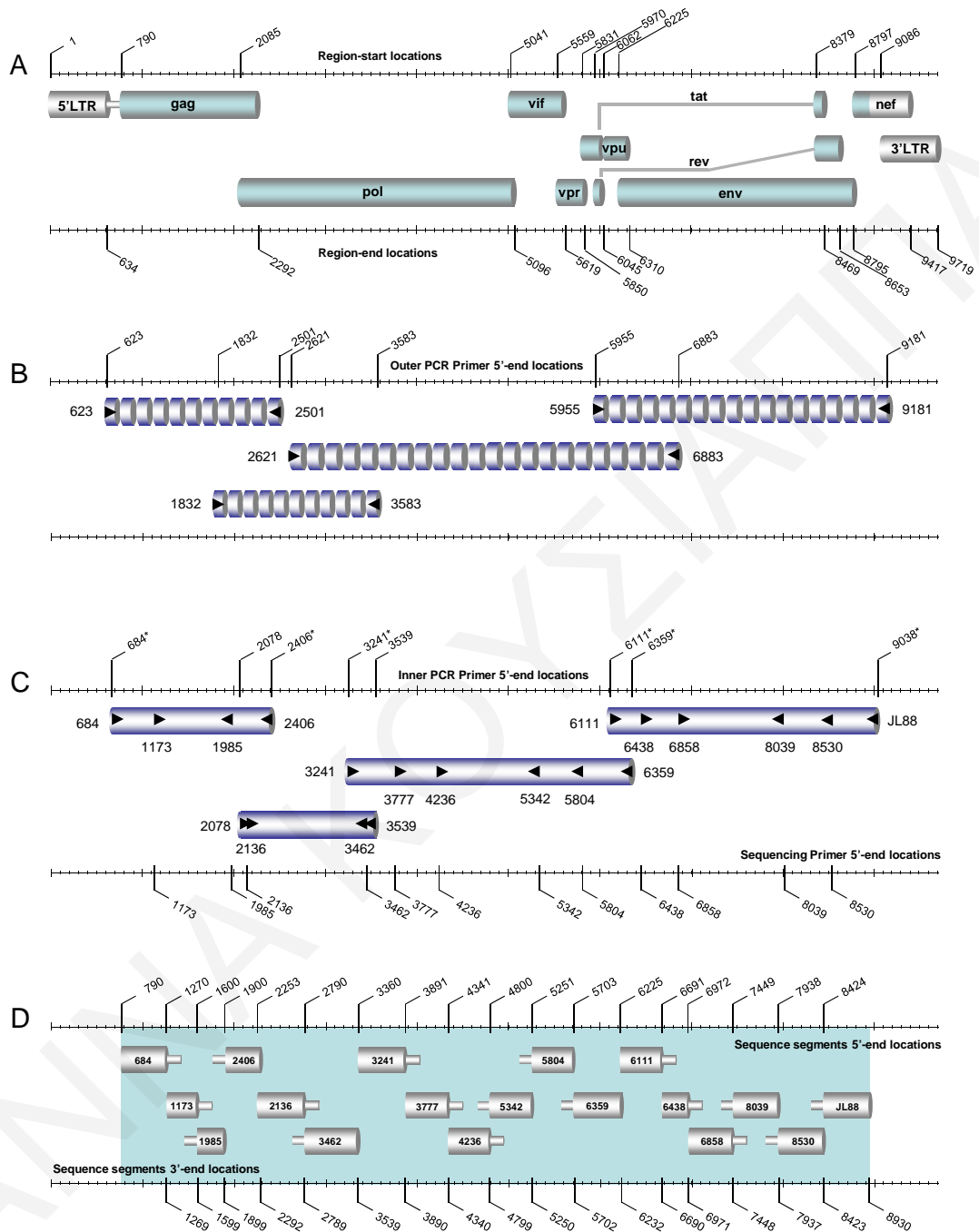
#### 6.4 Πρωτόκολλο ενίσχυσης της σχεδόν πλήρους μήκους HIV-1 αλληλουχίας

Για την ενίσχυση της σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίας του HIV-1 (790-8930 nt, αρίθμηση κατά το HXB2 στέλεχος, GeneBank accession number K03455) σχεδιάστηκε ένα νέο πρωτόκολλο PCR, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές που υβριδίζονται με όλα τα στελέχη της ομάδας M του HIV-1. Το πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε περιλαμβάνει τέσσερις επιμέρους επικαλυπτόμενες αντιδράσεις nested RT-PCR ή/και nested PCR, οι οποίες ενισχύουν 1722 bp της περιοχής *gag*, 1461 bp της περιοχής *pol*(PR-RT), 3118 bp της περιοχής *pol*(RNase H, IN) και των γονιδίων *vif*, *vpr*, *vpu* και 2927 bp της περιοχής *env*(gp160) και του 5'-end *nef* (Σχ. 1). Χρησιμοποιείται η μέθοδος nested PCR, η οποία, μειώνει τον πολλαπλασιασμό του ανεπιθύμητου DNA και ως εκ τούτου ενισχύει τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου προσδίδοντας μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR/RT-PCR (Πίν. 1) σχεδιάστηκαν με βάση το στέλεχος HXB2 και στη συνέχεια συγκρίθηκαν με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναφοράς από κάθε γνωστό υπότυπο και CRF της HIV-1 βάσης δεδομένων του Los Alamos, χρησιμοποιώντας το διαθέσιμο πρόγραμμα PrimAlign. Σε θέσεις που ήταν ετερογενής κρίθηκε αναγκαία η χρησιμοποίηση των κανόνων του International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), οπότε οι εκκινητές διαμορφώθηκαν, ώστε να υβριδίζονται με στελέχη όλου του φάσματος της ομάδας M.

Για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό του στόχου γίνεται μια αρχική αντίδραση RT-PCR ή PCR, όπου χρησιμοποιείτε το πρώτο ζευγάρι εκκινητών: 623 και 2501 για το *gag*, 1832 και 3583 για το *pol*(PR και RT), 2621 και 6883 για το *pol*(RNase H, IN) και των γονιδίων *vif*, *vpr*, *vpu* και 5955 και 9181 για το *env*(gp160)-5'-end *nef*. (Πίν. 1., Σχ. 1 A, B). Στη συνέχεια ακολουθεί μια δεύτερη αντίδραση PCR, όπου η DNA μήτρα είναι το προϊόν του πρώτου PCR με ένα δεύτερο ζευγάρι εκκινητών: 684 και 2406 για το *gag*, 2078-3539 για το *pol*(PR και RT), 3241 και 6359 για το *pol*(RNase H, IN) και των γονιδίων *vif*, *vpr*, *vpu* και 6111 και JL88 για *env*(gp160)-5'-end *nef* (Πίν. 1., Σχ. 1 A, C).

Στην πρώτη μελέτη πραγματοποιήθηκαν όλες οι αντιδράσεις nested RT-PCR, με μήτρα HIV-1 RNA που απομονώθηκε από το πλάσμα, για την ενίσχυση και των τεσσάρων περιοχών και στα 77 δείγματα για να παρθούν οι σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίες των HIV-1 στελεχών. Στη δεύτερη ομάδα μελέτης, έγιναν τρεις επιμέρους αντιδράσεις nested RT-PCR για την ενίσχυση των περιοχών *gag*, *pol*(PR και RT) και *env*(gp160) σε κάθε δείγμα από τους 37 νεοδιαγνωσθέντες HIV-1 οροθετικούς. Στην τρίτη ομάδα μελέτης, έγινε μόνο μια αντίδραση nested RT-PCR για την ενίσχυση της περιοχής της IN,





**Σχήμα 1.** Σχηματική παρουσίαση που συνοψίζει την ενίσχυση της σχεδόν-πλήρους μήκους περιοχής του γονιδιώματος σε στελέχη όλων των υπότυπων του HIV-1 της ομάδα M. (A) Το ανώτερο διάγραμμα συνοψίζει τη γενική γενετική οργάνωση του HIV-1 χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το HXB2 γονιδίωμα. Η αρχή και το τέλος κάθε κύριας γενετικής περιοχής υποδεικνύεται από έναν αντίστοιχο αριθμό πάνω από και κάτω από το διάγραμμα, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τη HXB2 αρίθμηση. Η σκιασμένη περιοχή στον HIV-1 γονιδιακό χάρτη δείχνει τις περιοχές *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env*, και 5'-end *nef* που ενισχύονται με

τη νέα μέθοδο. (B) Το δεύτερο διάγραμμα συνοψίζει την πρώτη αντίδραση του nested RT-PCR/PCR που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος σε τέσσερις επικαλυπτόμενες περιοχές. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό και τη θέση δέσμευσης του 5' άκρου των εκκινητών των αρχικών PCR εκκινητών για κάθε περιοχή με βάση το HXB2 γονιδίωμα: 623 και 2501 για το *gag*· 1832 και 3583 για τα γονίδια *PR* και *RT*· 2621 και 6883 για *RNase H*, *IN*, *vif*, *vpr*, *vpu* και τα 1<sup>α</sup> εξόνια των *tat* και *rev*· 5955 και 9181 για *gp160* και 5'-end *nef*. Οι διακεκομμένοι κύλινδροι δείχνουν το προϊόν της αρχικής αντίδρασης RT-PCR/PCR. (C) Το τρίτο διάγραμμα συνοψίζει τη δεύτερη αντίδραση PCR. Τα μαύρα βέλη παρουσιάζουν τον προσανατολισμό και τη θέση δέσμευσης του 5' άκρου των εκκινητών για κάθε περιοχή: 684 και 2406 για το *gag*· 2078 και 3539 για τα γονίδια *PR* και *RT*· 3241 και 6359 για *RNase H*, *IN*, *vif*, *vpr*, *vpu* και τα 1<sup>α</sup> εξόνια των *tat* και *rev*· 6111 και JL88 για *gp160* και 5'-end *nef* και των εκκινητών αλληλούχισης. Οι PCR εκκινητές με αστερίσκο χρησιμοποιούνται επίσης, ως εκκινητές αλληλούχισης. Οι κύλινδροι υποδεικνύουν το προϊόν του δεύτερου PCR. (D) Οι γκριζοί κύλινδροι δείχνουν τα τμήματα των αλληλουχιών που παίρνουμε από κάθε εκκινητή αλληλούχισης. Η αρχή και το τέλος κάθε τμήματος υποδεικνύονται από έναν αντίστοιχο αριθμό πάνω από και κάτω από το διάγραμμα, αντίστοιχα.

*pol*(RNase H, IN)-*vif*, *vpr*, *vpu* στα 108 δείγματα. Σε δείγματα στα οποία το PCR προϊόν του RNA ήταν προβληματικό, πραγματοποιήθηκε nested PCR που χρησιμοποιεί το γονιδιωματικό HIV-1 DNA ως μήτρα.

#### 6.4.1 Nested RT-PCR

Η προετοιμασία της αντίδρασης του nested RT-PCR για το κάθε δείγμα έγινε σε δύο εστίες που βρίσκονται στον εργαστηριακό χώρο BL2. Η αντίδραση όπου ετοιμάζεται το master mix γίνεται στην ειδικά διαμορφωμένη εστία προ-PCR, ενώ για την πρόσθεση του RNA του πλάσματος χρησιμοποιείται η εστία RNA, και στην εστία του PCR, προστίθενται τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης για το κάθε δείγμα. Οι PCR αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή eppendorf MasterCycler 5333 (96-well) (Eppendorf, Hamburg, Germany) σε 96-well plates (PCR clean) στα οποία αναγραφόταν σε επιλεγμένα πηγαδάκια ο εργαστηριακός αριθμός του δείγματος για το οποίο θα γινόταν η αντίδραση. Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιείται ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας για έλεγχο της αντίδρασης.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της αντίδρασης του nested RT-PCR κάθε περιοχής περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Στην πρώτη αντίδραση αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων και των μαρτύρων παρασκευάζεται ένα master mix σε eppendorf σωληνάκι (1.5ml, PCR clean) το οποίο συνίσταται ανά δείγμα από: 1 μl πολυμεράσης SuperScript III One Step/ Plat Taq HF (Invitrogen Corp., San Diego, CA), 25 μl 2X Reaction mix, 15 μl dH<sub>2</sub>O

Rnase free, 0.5 μl εκκινητή 20 pmol/μl (forward), 0.5 μl εκκινητή 20 pmol/μl (reverse) κάθε περιοχής, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Σχ. 1B). Γίνεται ήπια ανάδευση του μείγματος. Η όλη διαδικασία γίνεται σε πάγο.

- Προσθήκη 8 μl του πλάσμα RNA του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 50 μl και αναδεύουμε. Για τον αρνητικό μάρτυρα αντί για RNA, προσθέτουμε 8 μl dH<sub>2</sub>O (GIBCO, distilled water, DNase/RNase free).

**Πίνακας 1.** Εκκινητές της αντίδρασης nested RT-PCR/PCR και της κυκλικής αλληλούχισης

Όνομα εκκινητών <sup>a</sup>	Γονίδιο Στόχος	Αλληλουχία <sup>b</sup>	Θέση <sup>c</sup>	Αναφορά <sup>d</sup>
<b>PCR</b>				
623 (F)	gag	AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAA	623-646	1
2501 (R)	gag	GTTGACAGGTGTAGGTCCTAC	2481-2501	1
684 (F) <sup>e</sup>	gag	TCTCGACGCAGGACTCGGCTTG	684-705	2
2406 (R) <sup>e</sup>	gag	CTCCAATTCCYCCTATCATTTTTGGTTTCC	2377-2406	2
1832 (F)	pol	CAGCATGYCAGGGAGTRGGRGGACC	1832-1856	2
3583 (R)	pol	GGYTCTTGRATAAATTTGATATGTCCATTG	3555-3583	2
2078 (F)	pol	AGGCTAATTTTTAGGGAARATYTGCCCTTCC	2078-2109	2
3539 (R)	pol	CTGTATTTCTGCTAYTAAGTCTTTTGATGG	3510-3539	2
2621 (F)	int	GCCATTGACAGAAGARAAAATAAAAGCATT	2621-2650	3
6883 (R)	int	GGRGCACAATAATGTATRGGAAATTGG	6858-6883	3
3241 (F) <sup>e</sup>	int	GDTATGAACCTCCATCCTGAYAAATGGAC	3241-3268	3
6359 (R) <sup>e</sup>	int	CCACACAGGTACCCCATARTADAC	6336-6359	3
5955 (F)	env	GCTTAGGCATCTCCTATGGCA	5955-5975	2
9181 (R)	env	GTGTGTAGTTYTGCCAATCAGG	9160-9181	2
6111 (F) <sup>e</sup>	env	TMATAGCAATAGTTGTGTGGACYATAG	6111-6137	2
JL88 (R) <sup>e</sup>	env	TAAGTCATTTGGTCTTAAAGGTACCTG	9013-9038	1
<b>Αλληλούχιση</b>				
1173 (F)	gag	CAGYCAAAATTAYCCTATAGTGCA	1173-1196	2
1985 (R)	gag	CCTTCYTTGCCACARTTGAAACAY	1962-1985	2
2136 (F)	pol	YCAGARCAGACCAGAGCCAACAGCCCC	2136-2162	2
3462 (R)	pol	CTGCCARTTCTARYTCTGCTTC	3441-3462	2
3777 (F)	int	TGGATTCTGARTGGGARTTTG	3777-3798	3
4236 (F)	int	GATGGVATAGATAARGCYCAAGA	4236-4258	3
5342 (R)	int	YCAGGRTCTAYTTGTGTGCTAT	5321-5342	3
5804 (R)	int	CCTATTCTGCTATGTTGRCACCC	5782-5804	3
6438 (F)	env	CATGCCTGTGTACCCACAGA	6438-6457	2
6858 (F)	env	CCAATTCCYATACATTATTGTGCYC	6858-6882	2
8039 (R)	env	GGTGARATGWGTTTTCCAGAGC	8017-8039	2
8530 (R)	env	TGGTAGCTGAAGAGGCACAG	8511-8530	2

<sup>a</sup> Ονόματα εκκινητών πρώτης και δεύτερης αντίδρασης RT-PCR/PCR και εκκινητών αλληλούχισης.

Ο προσανατολισμός του κάθε εκκινητή υποδεικνύεται από την παρένθεση: F, forward; R, reverse.

<sup>b</sup> Y, υποδεικνύει ίσο μοριακό μίγμα C και T; R, A και G; M, A και C; W, A και T; V, A, C και G.

<sup>c</sup> Θέσεις εκκινητών που αντιστοιχούν στο στέλεχος HXB2 του HIV-1 (αριθμός GenBank K03455).

<sup>d</sup> (Salminen *et al.*, 1997)<sup>1</sup>, (Kousiappa *et al.*, 2009a)<sup>2</sup>, (Loizidou *et al.*, 2009)<sup>3</sup>

<sup>e</sup> Χρησιμοποιούνται και ως εκκινητές αλληλούχισης.

- Σύντομη φυγοκέντρηση (10 sec), έτσι ώστε όλο το υλικό να πάει στο βάθος του well και να μη μείνει στα τοιχώματα και εισαγωγή στο θερμικό κυκλοποιητή. Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή της πρώτης αντίδρασης είναι οι ακόλουθες: 1 κύκλος για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA, όπου για την περιοχή gag, pol(PR και RT) και pol(RNase H, IN)-vif, vpr, vpu είναι στους 52 °C για 1 hr, ενώ για την περιοχή env(gp160)-5'-end nef στους 54 °C. Ακολούθως, για την περιοχή gag είναι οι ακόλουθες: 1 κύκλος 94 °C για 2 min, 40 κύκλοι (94 °C για 20 sec, 53 °C για 30 sec, 68 °C για 2 min) και 1 κύκλος 68 °C για 7 min. Οι συνθήκες για το pol(PR και RT), το pol(RNase H, IN)-vif, vpr, vpu και το env(gp160)-5'-end nef είναι οι ίδιες, εκτός από τη θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή, όπου είναι 52 °C για τις δύο περιοχές του pol και 54 °C για την περιοχή env, καθώς και το χρόνο πολυμερισμού, όπου στο pol(RNase H, IN)-vif, vpr, vpu είναι 4.40 min και στο env(gp160)-5'-end nef 3.20 min. Το κάλυμμα της συσκευής PCR έχει σταθερή θερμοκρασία 105 °C.
- Στη δεύτερη αντίδραση του PCR, αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων και των μαρτύρων παρασκευάζεται ένα master mix το οποίο για το PCR συνίσταται από: 45 μl 1.1X Platinum PCR SuperMix (Invitrogen), 1 μl εκκινητή 20 pmol/μl (forward), 1 μl εκκινητή 20 pmol/μl (reverse) κάθε περιοχής, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Σχ. 1C). Γίνεται καλή ανάδευση του μείγματος. Η όλη διαδικασία γίνεται σε πάγο.
- Προσθήκη 3 μl προϊόντος της πρώτης αντίδρασης του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 50 μl και αναδεύουμε.
- Σύντομη φυγοκέντρηση (10 sec), έτσι ώστε όλο το υλικό να πάει στο βάθος του well και να μη μείνει στα τοιχώματα και εισαγωγή στο θερμικό κυκλοποιητή. Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή της δεύτερης αντίδρασης είναι οι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν για την πρώτη αντίδραση, εκτός από τις θερμοκρασίες υβριδισμού, όπου για το gag ήταν 56 °C, για το pol(PR και RT) και το env(gp160)-5'-end nef 52 °C και για το pol(RNase H, IN)-vif, vpr, vpu 50 °C, καθώς και το χρόνο πολυμερισμού, όπου για το gag είναι 2.20 min και για το pol(RNase H, IN)-vif, vpr, vpu είναι 3.40 min. Το κάλυμμα της συσκευής PCR έχει σταθερή θερμοκρασία 105 °C.
- Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης RT-PCR (47 μl) μεταφέρεται σε σωληνάκια eppendorf (1,5ml, PCR clean), όπου αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός κάθε δείγματος ο κλινικός αριθμός του δείγματος, η ημερομηνία συλλογής και η

ημερομηνία διεξαγωγής της PCR αντίδρασης. Αποθηκεύονται σε κουτιά Cryoboxes στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Το προϊόν της δεύτερης αντίδρασης PCR (50  $\mu\text{l}$ ) αποθηκεύεται προσωρινά στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέσα στο 96-well plate έως ότου χρησιμοποιηθούν για την ηλεκτροφόρηση και τον επικείμενο καθαρισμό.

#### 6.4.2 *Nested PCR*

Η διαδικασία nested PCR θα χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος στην περίπτωση που δεν πάρουμε θετικό προϊόν με τη μέθοδο nested RT-PCR. Η προετοιμασία της αντίδρασης του nested PCR για το κάθε δείγμα έγινε σε δύο εστίες που βρίσκονται στον εργαστηριακό χώρο BL2. Η αντίδραση όπου ετοιμάζεται το master mix γίνεται στην ειδικά διαμορφωμένη εστία προ-PCR, ενώ για την πρόσθεση του νουκλεϊκού οξέος χρησιμοποιείται η εστία PCR στην οποία προστίθεται το γονιδιωματικό DNA, καθώς και τα DNA προϊόντα της πρώτης αντίδρασης για το κάθε δείγμα. Οι PCR αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή eppendorf MasterCycler 5333 (96-well) (Eppendorf, Hamburg, Germany) σε 96-well plates (PCR clean) στα οποία αναγραφόταν σε επιλεγμένα πηγαδάκια ο εργαστηριακός αριθμός του δείγματος για το οποίο θα γινόταν η αντίδραση. Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιείται ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας για έλεγχο της αντίδρασης.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της αντίδρασης του nested PCR κάθε περιοχής περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Στην πρώτη αντίδραση αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων και των μαρτύρων παρασκευάζεται ένα master mix σε eppendorf σωληνάκι (1.5ml, PCR clean) το οποίο συνίσταται ανά δείγμα από: 45  $\mu\text{l}$  1.1X Platinum PCR SuperMix (Invitrogen Corp., San Diego, CA), 1  $\mu\text{l}$  εκκινητή 20 pmol/ $\mu\text{l}$  (forward), 1  $\mu\text{l}$  εκκινητή 20 pmol/ $\mu\text{l}$  (reverse) κάθε περιοχής, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Σχ. 1B). Γίνεται ήπια ανάδευση του μείγματος. Η όλη διαδικασία γίνεται σε πάγο. Το Platinum PCR SuperMix περιέχει τα εξής υλικά: 22 U/ml complexed recombinant Taq DNA polymerase with Platinum Taq Antibody, 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1,65 mM  $\text{MgCl}_2$ , 220  $\mu\text{M}$  dATP, 220  $\mu\text{M}$  dTTP, 220  $\mu\text{M}$  dCTP, 220  $\mu\text{M}$  dGTP και ρυθμιστές. Είναι ελεύθερο από DNases/RNases/exonucleases και endonucleases. Η ανασυνδυασμένη Taq DNA πολυμεράση λόγω της δέσμευσης της με το anti-Taq DNA αντίσωμα πολυμεράσης βρίσκεται σε ανενεργή μορφή και ενεργοποιείται μετά από το στάδιο αποδιάταξης στους  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η εξαρτώμενη από το αντίσωμα

έναρξη της δράσης της Taq DNA πολυμεράσης βελτιώνει την ειδικότητα στο PCR και την παραγωγή DNA.

- Προσθήκη 3 μl του γονιδιωματικού DNA (60-150 ng) του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 50 μl και αναδεύουμε. Για τον αρνητικό μάρτυρα αντί για DNA, προσθέτουμε 3 μl dH<sub>2</sub>O (GIBCO, distilled water, DNase/RNase free).
- Σύντομη φυγοκέντρηση (10 sec), έτσι ώστε όλο το υλικό να πάει στο βάθος του well και να μη μείνει στα τοιχώματα και εισαγωγή στο θερμικό κυκλοποιητή. Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή της πρώτης αντίδρασης για την κάθε περιοχή είναι ίδιες με αυτές που περιγράφονται πιο πάνω, στο 6.4.1 με τη διαφορά ότι η θερμοκρασία πολυμερισμού είναι στους 72 °C. Το κάλυμμα της συσκευής PCR έχει σταθερή θερμοκρασία 105 °C.
- Στη δεύτερη αντίδραση του PCR, αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων και των μαρτύρων παρασκευάζεται ένα master mix το οποίο για το PCR συνίσταται ανά δείγμα από: 45 μl 1.1X Platinum PCR SuperMix (Invitrogen), 1 μl εκκινητή 20 pmol/μl (forward), 1 μl εκκινητή 20 pmol/μl (reverse) κάθε περιοχής, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Σχ. 1C). Γίνεται καλή ανάδευση του μείγματος. Η όλη διαδικασία γίνεται σε πάγο.
- Προσθήκη 3 μl προϊόντος DNA της πρώτης αντίδρασης του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 50 μl και αναδεύουμε.
- Σύντομη φυγοκέντρηση (10 sec), έτσι ώστε όλο το υλικό να πάει στο βάθος του well και να μη μείνει στα τοιχώματα και εισαγωγή στο θερμικό κυκλοποιητή. Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή της δεύτερης αντίδρασης είναι οι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν για τη δεύτερη αντίδραση στο 6.4.1.
- Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR (47 μl) μεταφέρεται σε σωληνάκια eppendorf (1,5ml, PCR clean), όπου αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός κάθε δείγματος ο κλινικός αριθμός του δείγματος, η ημερομηνία συλλογής και η ημερομηνία διεξαγωγής της PCR αντίδρασης. Αποθηκεύονται σε κουτιά Cryoboxes στους -20 °C. Το προϊόν της δεύτερης αντίδρασης PCR (50 μl) αποθηκεύεται προσωρινά στους 4 °C μέσα στο 96-well plate έως ότου χρησιμοποιηθούν για την ηλεκτροφόρηση και τον επικείμενο καθαρισμό.

## 6.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested RT-PCR/PCR

Μετά την αποπεράτωση του nested RT-PCR/PCR γίνεται έλεγχος του προϊόντος της κάθε περιοχής με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στον εργαστηριακό χώρο

BL2. Με την ηλεκτροφόρηση καταδεικνύεται το μέγεθος του τμήματος του DNA που πολλαπλασιάστηκε με το nested RT-PCR /PCR και η ποιότητα του προϊόντος. Το μέγεθος του προϊόντος για την περιοχή *gag* είναι 1700 bp, για το *pol*(PR και RT) 1400 bp, για το *pol*(RNase H και IN)-*vif*, *vpr*, *vpu* 3100 bp και για την περιοχή *env*(gp160)-5'-end *nef* είναι 2927 bp.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Παρασκευή του διαλύματος του τζελ αγαρόζης συγκέντρωσης 1% από στερεά αγαρόζη (Invitrogen) και διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X. Η αγαρόζη 1% μπορεί να ξεχωρίσει DNA μεγέθους από 500 bp έως 10 kbp. Το διάλυμα TAE 1X είναι ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, αποστειρωμένο και ελεύθερο από DNase/RNase/Proteases.
- Ζέσταμα του διαλύματος του τζελ αγαρόζης 1% στο φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1:30 min, έτσι ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Καθώς το διάλυμα ζεσταίνεται, διακόπτουμε και αναδεύουμε το διάλυμα. Το ζεστό διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και να φτάσει τους 50 °C, όπου γίνεται προσθήκη 5 μl ethidium bromide συγκέντρωσης 0.5 μg/ml. Απαλή ανάδευση, ωστόσο το ethidium bromide διαλυθεί. Το ethidium bromide είναι μια φθορίζουσα χρωστική ουσία, η οποία δημιουργεί σύμπλεγμα με το σύμπλοκο DNA/χρωστικής κατά την ηλεκτροφόρηση. Με το ethidium bromide ανιχνεύεται ποσότητα DNA από 20ng-500ng.
- Προετοιμασία συσκευής ηλεκτροφόρησης βάζοντας το ειδικό δοχείο, όπου μέσα θα πήξει το τζελ αγαρόζης, σε οριζόντια θέση και τις κτένες που θα σχηματίσουν τα πηγαδάκια μέσα στο τζελ αγαρόζης. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος της αγαρόζης έως τα 0.5 cm πάχος και αφήνουμε το gel να στερεοποιηθεί για 40 min. Πρέπει να βεβαιωθούμε ότι η χτένα είναι βυθισμένη μέσα στο gel έτσι ώστε να σχηματιστούν σωστά τα πηγαδάκια.
- Μόλις το τζελ στερεοποιηθεί γίνεται αλλαγή της κατεύθυνσης του ειδικού δοχείου στις 90°, ώστε τα πηγαδάκια να βρίσκονται προς την κάθοδο. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζει με διάλυμα TAE 1X και οι κτένες αφαιρούνται, έτσι ώστε να επικαλυφθεί όλη η περιοχή του τζελ και της συσκευής (>0.5 cm).
- Ανάμιξη 9 μl δείγματος του προϊόντος του PCR με 1 μl διαλύματος 10X DNA loading buffer σε σωλήνες eppendorf των 200 μl. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 0.21% bromophenol blue, 0.21% xylene cyanol FF, 0.2 M EDTA, pH 8.0 και 50%

glycerol. Προστίθεται στα δείγματά για αύξηση της πυκνότητάς τους, ώστε να βυθιστούν στα πηγαδάκια και για να δώσει χρώμα στα δείγματα μέσω των δύο χρωστικών που περιέχει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης να είναι ορατή, καθώς μεταναστεύουν οι χρωστικές μαζί με τα δείγματα DNA από την κάθοδο στην άνοδο.

- Μεταφορά των 10 μl του δείγματος/διαλύματος 10X DNA loading buffer, του θετικού και αρνητικού μάρτυρα στα πηγαδάκια του τζελ. Παράλληλα, γίνεται προσθήκη 5 μl δείκτη μοριακού βάρους στο αρχικό και τελικό πηγαδάκι. Ο δείκτης μοριακού βάρους είναι ο μάρτυρας στον υπολογισμό του μοριακού βάρους των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε το Felix (GIBCO) ή το 500 bp (Invitrogen) που περιέχει κομμάτια DNA από 500bp-8000bp (υψηλού μοριακού βάρους).
- Θέτουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε λειτουργία με την ένωση των ηλεκτροδίων με τη συσκευή, ώστε να αρχίσει το DNA να μεταναστεύει προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο. Γίνεται ρύθμιση του μετασχηματιστή (Consort E835) στα 100V, 250mA, 150W για 1,30 hrs και τρέχουμε τα δείγματα μέχρι την μετανάστευση προς την άνοδο. Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, τα ηλεκτρόδια αφαιρούνται και το ειδικό δοχείο με το τζελ μεταφέρεται στον σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης του μηχανήματος Gene Genius Bioimaging system (SynGene). Το τζελ ακτινοβολείται με ακτίνες UV και όπου υπάρχει το σύμπλεγμα DNA/χρωστικής /ethidium bromide παρουσιάζεται ένας έντονος φθορισμός σε σχέση με το υπόλοιπο τζελ. Το μηχάνημα Gene Genius Bioimaging system είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και μέσω του ειδικού προγράμματος GeneSnap γίνεται η ρύθμιση του μηχανήματος, η λήψη της φωτογραφίας του τζελ, η αποθήκευση και η επεξεργασία της αναλυμένης φωτογραφίας στο πρόγραμμα GeneTools. Με τη λήψη της φωτογραφίας αναμένεται να δούμε ότι οι ζώνες των δειγμάτων DNA που πάρθηκαν αντιστοιχούν στο αντίστοιχο μοριακό βάρος, ανά την περιοχή που μελετήθηκε, με βάση το δείκτη μοριακού βάρους. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν φέρει καμία ζώνη πράγμα που αποδεικνύει ότι δεν υπήρχε επιμόλυνση των δειγμάτων με ξένο DNA ή RNA.



## 6.6 Αλληλούχιση PCR προϊόντων

### 6.6.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Πριν την κυκλική αλληλούχιση γίνεται καθαρισμός των PCR προϊόντων για την απομάκρυνση των dNTPs, ώστε ο λόγος dNTPs/ddNTPs να μην αλλοιώνεται από την περίσσεια dNTPs κατά την αντίδραση της κυκλικής αλληλούχισης. Επίσης, με τον καθαρισμό απομακρύνονται οι εκκινητές και οποιαδήποτε ολιγονουκλεοτίδια <40 bp, ουσιαστικό βήμα για να μην παραχθούν προϊόντα κατά την κυκλική αλληλούχιση που δεν αντιπροσωπεύουν παράγωγα του PCR προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα. Παράλληλα, απομακρύνονται τα άλατα που ανενεργοποιούν το ένζυμο της πολυμεράσης. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε το QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA), στην εστία που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή και τον καθαρισμό του DNA στον εργαστηριακό χώρο BL2.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια του καθαρισμού των PCR προϊόντων περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη και ανάμιξη 5 όγκων διαλύματος PBI (205  $\mu$ l) σε 1 όγκο δείγματος προϊόντος PCR (41  $\mu$ l) σε σωληνάκι erpendorf των 1,5 ml (PCR clean) στο οποίο αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός του κάθε δείγματος. Το διάλυμα δέσμευσης PBI προσφέρει την σωστή συγκέντρωση χαιοτροπικών αλάτων και το σωστό pH < 7,5 για τη δέσμευση του DNA του PCR προϊόντος στην μεμβράνη της QIAquick spin column και την ποσοτική απομάκρυνση των εκκινητών. Το PBI διάλυμα περιέχει guanidine hydrochloride που είναι αποδιατακτικός παράγοντας και ισοπροπανόλη που χρησιμεύει ως διαλύτης.
- Τοποθέτηση της QIAquick spin column σε συλλεκτικό σωλήνα των 2 ml και αναγραφή του εργαστηριακού αριθμού του δείγματος. Μεταφορά όλου του διαλύματος από το προηγούμενο βήμα μέσα στην αντίστοιχη QIAquick spin column. Οι QIAquick spin columns φέρουν μια μεμβράνη από silica-gel, η οποία δεσμεύει το DNA στην παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min. Οι εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια <40 bp, άλατα, ένζυμο πολυμεράσης και μη ενσωματωμένα dNTPs δεν δεσμεύονται στην silica-gel μεμβράνη, αλλά περνούν διαμέσου της. Το κλάσμα που εκλύεται με την φυγοκέντρηση απομακρύνεται σε ειδικό δοχείο αποβλήτων και η QIAquick column τοποθετείται ξανά πίσω στο συλλεκτικό σωληνάκι. Το QIAquick PCR

Purification Kit έχει μέγιστη ικανότητα δέσμευσης DNA 10μg σε εύρος 10 bp-10 Kbp.

- Προσθήκη 750 μl διαλύματος PE στην QIAquick column για ξέπλυμα. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min. Με το διάλυμα PE το οποίο περιέχει αιθανόλη απομακρύνονται αποτελεσματικά τα άλατα. Το κλάσμα που εκλύεται με την φυγοκέντρωση απομακρύνεται σε ειδικό δοχείο αποβλήτων και η QIAquick column τοποθετείται ξανά πίσω στο συλλεκτικό σωληνάκι. Φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 1 min ακόμη για να φύγει όλη η ποσότητα της αιθανόλης.
- Τοποθέτηση της QIAquick column σε σωληνάκι eppendorf 1,5 ml (PCR-clean, safe clock) στο οποίο αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός του δείγματος, ο κλινικός αριθμός, η ημερομηνία συλλογής του δείγματος και η ημερομηνία διεξαγωγής αυτού του πειραματικού σταδίου. Το συλλεκτικό σωληνάκι των 2 ml απομακρύνεται.
- Προσθήκη 50 μl διαλύματος EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης για την έκλυση του καθαρού DNA του PCR προϊόντος. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min. Η έκλυση γίνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλάτων και σε βασικές συνθήκες με pH 7.0-8.5. Ο ελάχιστος όγκος έκλυσης είναι 30 μl με 90-95% απόδοση στο εκλυόμενο DNA.
- Η ποιότητα του DNA μετά τον καθαρισμό μπορεί να καθοριστεί με ανάλυση των καθαρών προϊόντων DNA του PCR με ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αυτή που περιγράφηκε στο στάδιο 6.5.
- Η ποσοτική απόδοση του DNA του PCR μετά τον καθαρισμό προσδιορίζεται με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με διάλυμα EB ως τυφλό. Η αναμενόμενη συγκέντρωση του καθαρισμένου DNA είναι γύρω στα 50-100 ng/μl. Επίσης, καθορίζεται η καθαρότητα του κάθε δείγματος σε σχέση με πρωτεΐνες, φαινόλες και άλλους μολυσματικούς παράγοντες με βάση το λόγο  $A_{260}/A_{280}$  που για να είναι ένα δείγμα καθαρό πρέπει να είναι γύρω στο 1,6 με 2,0, ενώ ο λόγος  $A_{260}/A_{230}$  δείχνει την καθαρότητα του DNA από κατάλοιπα σακχάρων με βέλτιστη τιμή μεταξύ 0,3-0,9. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 260 nm, της συγκέντρωσης του δείγματος (ng/μl) και της σχετικής καθαρότητας του δείγματος αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό αρχείο.

### 6.6.2 Αντίδραση κυκλικής αλληλούχισης

Η DNA πολυμεράση έχει την ιδιότητα να επιμηκώνει μονόκλωνα μόρια DNA με το να προσθέτει νουκλεοτίδια σε μια αυξανόμενη αλληλουχία δημιουργώντας φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 3'-OH του προηγούμενου νουκλεοτιδίου και της 5'-φωσφορικής ομάδας του επόμενου. Το dNTP που προστίθεται επιλέγεται με βάση τη συμπληρωματικότητα του ως προς τη DNA μήτρα. Πέραν αυτού, η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέτει και ανάλογα των νουκλεοτιδίων όπως τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Όταν ενσωματωθεί ένα ddNTP στο 3' άκρο της αυξανόμενης αλυσίδας λόγω του ότι δεν έχει 3'-OH δεν μπορεί να συνεχιστεί ο πολυμερισμός. Χρησιμοποιώντας το BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) για αυτόματη αλληλούχιση φθορισμού οι φθορίζουσες χρωστικές εισάγονται στα αυξανόμενα προϊόντα χρησιμοποιώντας ddNTPs σημασμένα με χρωστική στο 3'-end. Στην αντίδραση κυκλικής αλληλούχισης το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει την DNA μήτρα, τον εκκινητή, την DNA πολυμεράση, τα dNTPs και τα ddNTPs. Με διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης σ' ένα θερμικό κυκλοποιητή επιτυγχάνεται η γραμμική ενίσχυση προϊόντων, διαφόρων μεγεθών, που έχουν πάνω τους ενσωματωμένα ddNTPs και αντιστοιχούν σε διάφορα τμήματα της αλληλουχίας στόχου.

Σε κάθε δείγμα, οι DNA αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις περιοχές *gag* (1722 bp), *pol*(PR και RT) (1461 bp), *pol*(RNase H, IN)-*vif*, *vpr*, *vpu* (3118 bp) και *env*(gp160)-5'-end *nef* (2927 bp) καθορίστηκαν με άμεση αλληλούχιση και των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων σε διαφορετικές αντιδράσεις. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το καθαρισμένο προϊόν του nested RT-PCR ή nested PCR κάθε περιοχής (Σχ. 1C) και ειδικοί σχεδιασμένοι εκκινητές αλληλούχισης που υβριδίζονται με όλα τα στελέχη της ομάδας M (Σχ. 1D, Πίν. 1), ως εξής: εκκινητές 684, 1173, 1985, 2406 για το *gag*· 2136, 3462 για το *pol*(PR και RT)· 3241, 3777, 4236, 5342, 5804, 6359 για το *pol*(RNase H, IN)-*vif*, *vpr*, *vpu* και 6111, 6438, 6858, 8039, 8530, JL88 για *env*(gp160)-5'-end *nef*.

Η διαδικασία προετοιμασίας του master mix έγινε στην ειδική εστία προ-αλληλούχισης και η προσθήκη του DNA προϊόντος στην εστία εξαγωγής του DNA στο εργαστήριο BL2. Οι αντιδράσεις κυκλικής αλληλούχισης πραγματοποιήθηκαν με το μηχάνημα MasterCycler 5333 (Eppendorf, Hamburg, Germany) σε 96-well plates (PCR clean) στα οποία αναγραφόταν σε επιλεγμένα πηγαδάκια ο εργαστηριακός αριθμός του δείγματος για το οποίο θα γινόταν η αντίδραση. Η όλη διαδικασία γίνεται σε πάγο.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της αντίδρασης της κυκλικής αλληλούχισης των PCR προϊόντων περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Στην αντίδραση αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων παρασκευάζεται ένα master mix σε σωληνάκι eppendorf (1,5 ml, PCR clean), το οποίο συνίσταται από: 2 μl Terminator ready reaction mix (ABI, Foster City, CA), 1 μl BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer 5X, 0.5 μl εκκινήτη (5 pmol/μl) κάθε περιοχής, 3,5 μl dH<sub>2</sub>O (DNase, RNase free). Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται είναι με βάση το πρωτόκολλο του BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit με το 5X Sequencing Buffer. Το Ready reaction mix περιέχει μέσα ό,τι χρειαζόμαστε για την κυκλική αλληλούχιση σε μια pre-mixed μορφή. Περιέχει την AmpliTaq DNA πολυμεράση, dNTPs και σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές ddNTPs. Η AmpliTaq DNA πολυμεράση είναι μεταλλαγμένη μορφή της *Thermus aquaticus* (Taq) DNA πολυμεράσης που περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη στο ενεργό της κέντρο. Συγκεκριμένα το κατάλοιπο φαινυλαλανίνης 667 αντικαθίσταται από τυροσίνη (F667Y). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πολυμεράση να μη διακρίνει τόσο καλά μεταξύ των ddNTPs και dNTPs και να τα προσθέτει με τον ίδιο ρυθμό. Επίσης, περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη στο αμινοτελικό της άκρο αντικαθιστώντας το κατάλοιπο γλυκίνης στη θέση 46 με ασπαρτικό (G46D), το οποίο απομακρύνει την ιδιότητα της πολυμεράσης ως 5' → 3' νουκλεάσης και αυτό ελαχιστοποιεί τα παράγωγα από τη δράση της. Στην AmpliTaq DNA πολυμεράση προστέθηκε και μια θερμικά σταθερή ανόργανη πυροφωσφατάση, η οποία σπάει το ανόργανο πυροφωσφορικό προϊόν (PPi) της αντίδρασης πολυμερισμού και αποτρέπει τη συσσώρευση του στην αντίδραση. Η συσσώρευση του PPi προκαλεί την αφαίρεση ενός μονοφωσφορικού νουκλεοσιδίου στο πολυμερές και την πρόσθεση ενός PPi για το σχηματισμό του τριφωσφορικού νουκλεοσιδίου. Κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs σημαίνεται με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική (DyeEx terminator) που απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος και συγκεκριμένα το ddATP με χρωστική που αντιστοιχεί στο πράσινο χρώμα, το ddCTP στο μπλε, το ddGTP στο κίτρινο και το ddTTP στο κόκκινο. Το Ready reaction mix (v3.1) έχει υψηλό λόγο dNTPs/ddNTPs που είναι κατάλληλο για μεγαλύτερα προϊόντα πολυμερισμού.
- Προσθήκη 3 μl των καθαρισμένων DNA προϊόντων του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 10 μl και ανάδευση.
- Για θετικό έλεγχο της αντίδρασης της κυκλικής αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά και ένα δείγμα θετικού μάρτυρα από το kit, όπου αντί για DNA δείγματος προστέθηκε 1,5 μl του DNA μάρτυρα pGEM -3Zf(+) double-stranded

DNA Control Template (0,2 µg/µl) και 2 µl του εκκινητή μάρτυρα -21 M13 Control Primer (forward), (0,8 pmol/µl). Ο θετικός μάρτυρας βοηθά στον καθορισμό της αιτίας των αποτυχημένων αντιδράσεων, δηλαδή εάν οφείλονται σε αποτέλεσμα κακής ποιότητας DNA υλικού ή σε αποτυχία της αντίδρασης αλληλούχισης.

- Σύντομη φυγοκέντρηση (10 sec), έτσι ώστε όλο το υλικό να πάει στο βάθος του well και να μη μείνει στα τοιχώματα και εισαγωγή στο θερμικό κυκλοποιητή. Οι γενικές συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή της αντίδρασης αλληλούχισης είναι οι ακόλουθες: 1 κύκλος 96 °C για 1 min και 25 κύκλοι (96 °C για 10 sec, x °C για 5 sec (Πίν. 2), 60 °C για 4 min). Το κάλυμμα της συσκευής PCR έχει σταθερή θερμοκρασία 105 °C. Η θερμοκρασία υβριδισμού για κάθε εκκινητή φαίνεται στον πίνακα 2.
- Όταν τελειώσει η αντίδραση PCR σταθεροποιείται σε μία θερμοκρασία των 4°C μέχρι τον καθαρισμό τους. Τα προϊόντα από την αντίδραση αυτή έχουν ενσωματωμένα ddNTPs και είναι διαφόρων μεγεθών που αντιστοιχούν σε διάφορα τμήματα της αλληλουχίας στόχου.

**Πίνακας 2.** Θερμοκρασίες υβριδισμού εκκινητών αλληλούχισης

Γονίδιο Στόχος	Όνομα εκκινητή (°C)					
<i>gag</i>	684 (60)	1173 (50)	1985 (52)	2406 (54)		
<i>pol</i> (Pr και RT)	2136 (60)	3462 (50)	3539 (52)			
<i>pol</i> (RNase-IN)- <i>vif</i> , <i>vpr</i> , <i>vpu</i>	3241 (52)	3777 (50)	4236 (48)	5342 (48)	5804 (52)	6359 (52)
<i>env</i> -5'-end <i>nef</i>	6111 (52)	6438 (54)	6858 (50)	8039 (54)	8530 (54)	JL88 (52)

### 6.6.3 Καθαρισμός των προϊόντων κυκλικής αλληλούχισης

Ο καθαρισμός των δειγμάτων μετά την κυκλική αλληλούχιση απομακρύνει τα μη δεσμευμένα ddNTPs, για την αποφυγή προβλημάτων ανάγνωσης της αλληλουχίας από το φθορισμό που εκπέμπουν τα μη δεσμευμένα ddNTPs κατά την μετέπειτα ηλεκτροφόρηση. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιείτε το DyeEx 2.0 Spin Kit της QIAGEN (QIAGEN, Valencia, CA), το οποίο βασίζεται στην τεχνολογία της χρωματογραφίας, όπου ένα φίλτρο ενυδατωμένου τζελ από ρητίνη (DyeEx 2.0 spin column) διαχωρίζει τα μόρια του DNA αναλόγως του μοριακού τους βάρους. Το τζελ περιέχει σφαιρίδια με ομοιόμορφους

πόρους. Με τη μεταφορά των δειγμάτων, τα αδέσμευτα ddNTPs εγκλωβίζονται μέσα στους πόρους και παραμένουν εκεί, ενώ τα θραύσματα του DNA διαφεύγουν και καταλήγουν στο κλάσμα έκλυσης. Ο καθαρισμός γίνεται στην εστία εξαγωγής και καθαρισμού του DNA που βρίσκεται στον εργαστηριακό χώρο BL2.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια του καθαρισμού των προϊόντων της κυκλικής αλληλούχισης περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Αναγραφή στις DyeEx 2.0 spin columns τον εργαστηριακό αριθμό του κάθε δείγματος και τον εκκινητή με τον οποίο έγινε η αντίδραση της κυκλικής αλληλούχισης. Ανάδευση των DyeEx 2.0 spin columns με vortex για την ανάμιξη του τζελ ρητίνης. Χαλάρωση του πώματος των DyeEx 2.0 spin columns κατά το  $\frac{1}{4}$  της στροφής, για να αποφευχθεί η δημιουργία κενού. Ακολουθεί κόψιμο της άκρης στο τέλος του σωληναρίου των DyeEx 2.0 spin columns και μεταφορά τους σε σωληνάκια συλλογής των 2 ml.
- Φυγοκέντρηση στις 2700 rpm για 3 min στη μικροφυγόκεντρο (eppendorf 5417C) έτσι ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα του φίλτρου των DyeEx 2.0 spin columns στα σωληνάκια συλλογής των 2 ml, τα οποία απομακρύνονται στη συνέχεια. Μεταφορά των DyeEx 2.0 spin columns σε καθαρά σωληνάκια των 1,5 ml (eppendorf, PCR-clean), όπου αναγράφεται ο εργαστηριακός αριθμός του κάθε δείγματος και ο εκκινητής με τον οποίο έγινε η αντίδραση της κυκλικής αλληλούχισης.
- Προσθήκη 20 μl από το προϊόν της αντίδρασης της κυκλικής αλληλούχισης στο κέντρο της επιφάνειας του συμπαγούς τζελ ρητίνης, χωρίς να αγγίζει η πιπέτα στα τοιχώματα του σωληναρίου ή την επιφάνεια του gel. Η διαδικασία πρέπει να γίνει αργά ώστε οι σταγόνες να απορροφηθούν μέσα στο gel.
- Φυγοκέντρηση στις 2700 rpm για 3 min στη μικροφυγόκεντρο (eppendorf 5417C) έτσι ώστε να εκλυθεί το DNA και τα μη-δεσμευμένα ddNTPs να κατακρατηθούν στο φίλτρο. Απομάκρυνση των DyeEx 2.0 spin columns από τα σωληνάκια των 1,5 ml. Το κλάσμα περιέχει 20 μl του καθαρού προϊόντος της κυκλικής αλληλούχισης όπου είναι έτοιμο για την αλληλούχιση.

#### 6.6.4 Αλληλούχιση

Για την αλληλούχιση του καθαρισμένου προϊόντος της κυκλικής αλληλούχισης χρησιμοποιείται ο αυτόματος αναλυτής 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,

Foster City, CA) στον εργαστηριακό χώρο BL2. Η συσκευή 3130 Genetic Analyzer ανιχνεύει το φθορισμό που εκπέμπεται από τέσσερις διαφορετικές χρωστικές οι οποίες είναι δεσμευμένες στα ddNTPs και αναλόγως του φθορισμού γίνεται η ανάγνωση των βάσεων (A/C/G/T) στις αυξανόμενες αλληλουχίες κατά την κυκλική αλληλούχιση. Συγκεκριμένα, τέσσερις λεπτοί τριχοειδείς σωλήνες εισάγονται κάθε φορά ανά 1 hr σε διαφορετική τετράδα του 96-well plate που φέρει τα δείγματα και λαμβάνει δείγμα του προϊόντος της κυκλικής αλληλούχισης. Το τριχοειδές εσωτερικά φέρει ένα ηλεκτρόδιο που είναι αρνητικά φορτισμένο, όπως και το DNA. Μόλις το DNA εισαχθεί μέσα στο τριχοειδές αρχίζει να μεταναστεύει προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο (άνοδος) που είναι στο άλλο άκρο του τριχοειδούς. Για τη μετανάστευση διαμέσου του τριχοειδούς και το διαχωρισμό του DNA αναλόγως του μοριακού του βάρους, το τριχοειδές είναι εμποτισμένο με ένα πολυμερές (3130 POP-7<sup>TM</sup> Performance Optimized Polymer) το οποίο διοχετεύεται αυτόματα στο τόξο 36 cm από μια αντλία. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα τριχοειδή εισάγονται στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, το οποίο αποτελείται από 16 ml 1X Buffer με EDTA (ABI). Καθώς τα μόρια του DNA μεταναστεύουν προς την άνοδο, όταν φθάσουν στο κύτταρο ανίχνευσης (Detection Cell), εκεί ακτινοβολούνται με λέιζερ που δημιουργείται από την διάσπαση ιόντων αργού. Η ακτινοβολία επιτρέπει τον ταυτόχρονο φωτισμό των τεσσάρων τριχοειδών και από τις δύο πλευρές του τόξου 36 cm στο κύτταρο ανίχνευσης. Το σήμα φθορισμού που παράγεται από τα τμήματα του DNA στο κύτταρο ανίχνευσης συλλέγονται από μία κάμερα CCD και οι πληροφορίες διοχετεύονται αυτόματα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το μηχάνημα και αποθηκεύονται. Κάθε χρωστική εκπέμπει ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος όταν διεγείρεται από το λέιζερ ιόντων αργού με αποτέλεσμα κάθε βάση να δίνει ένα ξεχωριστό χρώμα και με αυτό να αναγνωρίζεται.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της αλληλούχισης περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:

- Μεταφορά 10 μl του καθαρού προϊόντος της κυκλικής αλληλούχισης του κάθε δείγματος σε αντίστοιχο πηγαδάκι στο ABI Optical 96-well Reaction Plate και προσθήκη ίσου όγκου Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide (φορμαμίδιο). Το φορμαμίδιο είναι αποδιατακτικός παράγοντας, ο οποίος δίνει μια σχετική σταθερότητα στα προϊόντα της κυκλικής αλληλούχισης και αναστέλλει την εξάτμιση των δειγμάτων.
- Τοποθέτηση του ABI Optical 96-well Reaction Plate στην βάση του (ABI Plate Base 96-well), κλείσιμο με το κάλυμμα ABI Plate Septa 96-well και το ABI Plate Retainer 96-well. Η όλη διάταξη τοποθετείται σε ειδική θέση μέσα στο μηχάνημα.

- Γίνονται οι απαραίτητες ρυθμίσεις του μηχανήματος 3130 Genetic Analyzer μέσω του προγράμματος Data Collection v3.0 για να γίνει η ηλεκτροφόρηση αλληλούχισης. Συγκεκριμένα, γίνεται φόρτωση του τόξου (36 cm) του μηχανήματος με πολυμερές (POP7), αφαίρεση των φυσαλίδων αέρα από την αντλία, προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ανόδου και καθόδου (1X Buffer με EDTA) και του H<sub>2</sub>O (MilliQ) σε ειδικά δοχεία. Παράλληλα, σε ειδικές σελίδες του προγράμματος Data Collection v3.0, όπως το Plate Manager γίνεται η αναφορά για την ταυτότητα του δείγματος που βρίσκεται σε κάθε πηγαδάκι που θα ηλεκτροφορηθεί και με ποιες παραμέτρους γίνεται η ηλεκτροφόρηση αλληλούχισης, ενώ στο Results Group γίνεται αναφορά στο χώρο αποθήκευσης των αποτελεσμάτων της κυκλικής αλληλούχισης και τι στοιχεία θα αναγράφονται στα αποτελέσματα που θα παρθούν.
- Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης αλληλούχισης γίνεται με το πρόγραμμα Sequencing Analysis Software v5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Οι πληροφορίες που δίνονται για τα αποτελέσματα κάθε δείγματος περιλαμβάνουν: ένα ηλεκτροφερογράφημα, όπου διαγράφεται σε έγχρωμο διάγραμμα η ακολουθία των βάσεων και η ποιότητα του σήματος (QV=quality value) της κάθε βάσης που αναγνωρίζεται, μια ανάλυση για τις παραμέτρους του μηχανήματος κατά την ηλεκτροφόρηση του κάθε δείγματος (Raw και EPT data) και την υπο διερεύνηση αλληλουχία σε μορφή κειμένου. Το QV είναι ένας δείκτης [ $QV = -10^{10} \log(P_e)$ ] που όσο πιο μεγάλη τιμή έχει τόσο πιο πολύ μειώνεται η πιθανότητα να αναγνωρίστηκε μια βάση λανθασμένα ( $P_e$ ).

#### 6.6.5 Κλωνοποίηση

Δείγματα τα οποία παρουσίασαν μερικό ή εκτεταμένο πολυμορφισμό κατά την αλληλούχιση τους με ορισμένους εκκινητές, κλωνοποιήθηκαν με το TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp., San Diego, CA) και στη συνέχεια μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA επαναλήφθηκε η διαδικασία της κυκλικής αλληλούχισης, όπως περιγράφεται στα στάδια 6.6.2-6.6.4 με τη διαφορά ότι η DNA μήτρα για την αντίδραση αυτή είναι το πλασμιδιακό DNA που φέρει την κλωνοποιημένη περιοχή του HIV-1 γονιδιώματος.

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της κλωνοποίησης περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:



- Στον εργαστηριακό BL2, στην εστία RT-PCR πραγματοποιείτε η αντίδραση της κλωνοποίησης με το TOPO TA cloning kit (Invitrogen, CA), εκτός από το στάδιο της προσθήκης του καθαρού PCR προϊόν. Η προσθήκη των πιο κάτω υλικών θα γίνει με την παρακάτω διαδοχή σ' ένα σωληνάκι των 200 µl:  
1 µl διάλυμα άλατος (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>)  
1 µl pCR4-TOPO φορέα  
1 µl H<sub>2</sub>O (Invitrogen, CA)  
3 µl φρέσκο καθαρό PCR προϊόν >1000 bp  
Ακολουθεί ήπια ανάδευση της αντίδρασης (χτυπώντας με το δάχτυλο) και επώαση για 30 min στους 22-23 °C. Τοποθέτηση των σωληναρίων στο πάγο.
- Μετασχηματισμός των One Shot TOP10 Competent *E.coli* Cells με το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποίησης του καθαρού PCR προϊόντος που είναι >1000 bp. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο για κλωνοποίηση, στο Τμήμα Βιολογικών Επιστημών. Προσθήκη 2 µl του προϊόντος της αντίδρασης κλωνοποίησης του καθαρού PCR προϊόντος σ' ένα σωλήνα που φέρει One Shot Chemically Competent κύτταρα (50 µl) σε πάγο και ήπια ανάδευση με το δάχτυλο. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 min και θερμικό σοκ των κυττάρων με την τοποθέτηση τους σε υδατόλουτρο στους 42 °C για 30 sec, χωρίς να κινούνται. Στο σημείο αυτό γίνεται ο μετασχηματισμός. Ακολουθεί η άμεση μεταφορά των σωληναρίων στον πάγο και η προσθήκη 250 µl διαλύματος SOC medium που έχει θερμοκρασία δωματίου κοντά σε φωτιά. Ανακίνηση των σωληναρίων οριζοντίως στις 200 rpm στους 37 °C για 1 hr. Έπειτα, ακολουθεί επίστρωση 50 µl από το κάθε δείγμα μετασχηματισμένων κυττάρων και 20 µl διαλύματος SOC medium σ' ένα προθερμαινόμενο plate επιλογής (LB agar με ampicillin 100 µg/ml) κοντά σε φωτιά και επώαση καθ' όλη τη νύχτα στους 37 °C σε ειδική εστία επώασης.
- Επιλογή δύο αποικιών βακτηρίων (κλώνοι του PCR προϊόντος) από ένα φρέσκο plate επιλογής για το κάθε δείγμα και τοποθέτησης τους ξεχωριστά σε σωλήνα των 15 ml (VWR) που περιέχει 3 ml διάλυμα LB broth και 100 µg/ml ampicillin. Η όλη διαδικασία γίνεται κοντά σε φωτιά. Επώαση για 16 hrs στους 37 °C σε κινούμενη εστία επώασης με ταχύτητα 250 rpm. Το πόμα των σωλήνων των 15 ml μένει κλειστό κατά το ήμισυ και δένεται με ταινία.
- Μεταφορά 1 ml της καλλιέργειας του προηγούμενου βήματος σε σωληνάκι eppendorf των 1,5 ml. Φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων που

καλλιεργήθηκαν στις 8000 rpm σε φυγόκεντρο erppendorf 5417R για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σε ειδικό δοχείο αποβλήτων. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 2 φορές για να παρθεί περισσότερο βακτηριακό ίζημα.

- Το βακτηριακό ίζημα επεξεργάζεται ακολούθως με το Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Valencia, CA) το οποίο απομονώνει το πλασμιδιακό DNA των βακτηρίων *E.coli* της επιλέξιμης αποικίας που θα φέρει το επιθυμητό τμήμα HIV-1 που κλωνοποιήθηκε. Αρχικά το βακτηριακό ίζημα αναδιαλύεται πλήρως με τη βοήθεια vortex σε 250 μl P1. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 250 μl διαλύματος P2 και ανάδευση με αναστροφή 4-6 φορών. Ακολουθεί προσθήκη 350 μl διαλύματος N3 και ανάδευση με αναστροφή 4-6 φορών έως ότου το διάλυμα γίνει ομιχλώδες. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 min σε φυγόκεντρο erppendorf 5417R. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στη QIAprep spin column που βρίσκεται σε συλλεκτικό σωλήνα των 2 ml και φυγοκεντρείτε για 1 min. Το κλάσμα απομακρύνεται σε ειδικό δοχείο αποβλήτων. Η QIAprep spin column ξεπλένεται με την προσθήκη 500 μl διαλύματος PB για την απομάκρυνση νουκλεασών και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min. Το κλάσμα απομακρύνεται και η QIAprep spin column ξεπλένεται με την προσθήκη 750 μl διαλύματος PE που περιέχει αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min. Το κλάσμα απομακρύνεται και η QIAprep spin column φυγοκεντρείται για 1 min επιπλέον για να απομακρυνθεί εντελώς το διάλυμα PE. Το κλάσμα απομακρύνεται και η QIAprep spin column τοποθετείται σε σωληνάκι erppendorf των 1,5 ml. Γίνεται προσθήκη 50 μl διαλύματος EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5), αφήνεται για 1 και φυγοκεντρείτε στις 13.000 rpm για 1 min. Το κλάσμα είναι το πλασμιδιακό DNA.
- Η ποσοτική απόδοση του πλασμιδιακού DNA μετά τον καθαρισμό προσδιορίζεται με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με διάλυμα EB ως τυφλό. Η αναμενόμενη συγκέντρωση του καθαρισμένου DNA είναι γύρω στα 100-200 ng/μl. Επίσης, καθορίζεται η καθαρότητα του κάθε δείγματος σε σχέση με πρωτεΐνες, φαινόλες και άλλους μολυσματικούς παράγοντες με βάση το λόγο  $A_{260}/A_{280}$  που για να είναι ένα δείγμα καθαρό πρέπει να είναι γύρω στο 1,6 με 2,0, ενώ ο λόγος  $A_{260}/A_{230}$  δείχνει την καθαρότητα του DNA από κατάλοιπα σακχάρων με βέλτιστη τιμή μεταξύ 0,3-0,9. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα

260 nm, της συγκέντρωσης του δείγματος (ng/μl) και της σχετικής καθαρότητας του δείγματος αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό αρχείο.

- Επανάληψη της διαδικασίας της κυκλική αλληλούχισης, όπως περιγράφεται στα στάδια 6.6.2-6.6.4 χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές και ως DNA μήτρα το πλασμιδιακό DNA που φέρει την κλωνοποιημένη περιοχή του HIV-1 γονιδιώματος.

### 6.7 Επεξεργασία HIV-1 αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες που πάρθηκαν από κάθε αντίδραση αλληλούχισης από τον αυτόματο αναλυτή επεξεργάστηκαν για να πάρουμε την τελική αλληλουχία της κάθε γονιδιακής περιοχής. Οι αλληλουχίες που προήρθαν από την αντίδραση με αντίστροφους (reverse) εκκινητές τροποποιήθηκαν σε συμπληρωματικές και αντίστροφες με το πρόγραμμα Primer Premier 5 (Primer Biosoft International, Palo Alto, CA), ενώ οι αλληλουχίες που προήρθαν από την αντίδραση με τους κανονικούς εκκινητές έμειναν ως έχειν. Ακολούθως, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalX (Higgins *et al.*, 1988) έγινε στοίχιση της υπό μελέτης HIV-1 αλληλουχίας με την αντίστοιχη πρότυπο αλληλουχία του HIV-1 στελέχους HXB2 (Αριθμός GeneBank: K03455). Παράλληλα, με το πρόγραμμα Primer Premier 5 οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μετατράπηκαν σε αμινοξικές. Για κάθε δείγμα η επεξεργασία της αλληλουχίας του ανά εκκινητή περιοχής συνοψίζεται σε μια αναφορά, όπου περιλαμβάνει την πρότυπη ακολουθία του δείγματος που αντιστοιχεί για τη συγκεκριμένη περιοχή που μελετάται όπως πάρθηκε από το μηχάνημα, τη στοίχιση με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία HXB2, την τελική νουκλεοτιδική αλληλουχία μετά από τροποποιήσεις, την αμινοξική αλληλουχία και τη στοίχιση με την αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία HXB2.

Οι τελικές αλληλουχίες της κάθε αντίδρασης αλληλούχισης, ανά περιοχή, ενώνονται διαδοχικά για να παρθεί η ολική αλληλουχία της κάθε περιοχής του γονιδιώματος που μελετάται. Για παράδειγμα, η ολική αλληλουχία της περιοχής *env(gp160)* θα παρθεί με την ένωση των έξι αλληλουχιών που πάρθηκαν από τις αντιδράσεις με τους εξής εκκινητές 6111(F), 6438(F), 6858(F), 8039(R), 8530(R), JL88(R). Στην πρώτη ομάδα μελέτης, οι τελικές αλληλουχίες του σχεδόν-πλήρους μήκους του γονιδιώματος των HIV-1 στελεχών θα παρθούν από τις τέσσερεις περιοχές του γονιδιώματος που πολλαπλασιάστηκαν, με ένωση των τελικών τμημάτων των αλληλουχιών της κάθε περιοχής διαδοχικά. Τα αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα θα

αφαιρεθούν ώστε να πάρουμε την τελική αλληλουχία του σχεδόν-πλήρους μήκους του HIV-1 γονιδιώματος του κάθε δείγματος.

### 6.8 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όλες τις ομάδες των υπο διερεύνηση δειγμάτων, σε διαφορετικές περιοχές, για την αναγνώριση του υπότυπου του κάθε δείγματος. Στην πρώτη μελέτη έγινε φυλογενετική ανάλυση των σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχιών του γονιδιώματος (684 έως 8930 nt) 77 HIV-1 ασθενών, που περιλαμβάνει τα γονίδια *gag*, *pol*, *auxiliary genes* και *env-5'nef* του γονιδιώματος. Αρχικά, διαπιστώθηκε σε ποίο υπότυπο ή CRF ανήκει το δείγμα κατά προσέγγιση χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα REGA v2.0 (de Oliveira *et al.*, 2005). Ακολούθως, οι αλληλουχίες της κάθε περιοχής του HIV-1 γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκαν για πολλαπλή στοίχιση με πρότυπες αλληλουχίες αναφοράς των γνωστών HIV-1 υποτύπων και CRFs της βάσης δεδομένων Los Alamos (Leitner *et al.*, 2005). Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Bionumerics 5.0 (Bionumerics, 2008) λόγω του μεγάλου μεγέθους των αλληλουχιών. Ο υπολογισμός της απόστασης μεταξύ τους και η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA4) (Tamura *et al.*, 2007). Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε συνδυάζοντας τη μέθοδο Neighboring-Joining (NJ) με το μοντέλο υπολογισμού της εξελικτικής απόστασης Kimura-2 parameters με το λόγο της μετάθεσης/μεταστροφής στο 2.0. Η αξιοπιστία της ταξινόμησης κάθε φυλογενετικού δένδρου προσδιορίστηκε με τη στατιστική μέθοδο bootstrapping στα 1000 αντίγραφα, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Οι τιμές bootstrap >70 θεωρούνται επαρκής για την σημαντικότητα της ταξινόμησης του κάθε στελέχους. Οι αριθμοί αναφοράς του GenBank για τις αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική αυτή ανάλυση είναι οι εξής: A1-PS1044, DQ676872; A1-92UG037, AB253429; A1-94Q2317, AF004885; A1-92RW008, AB253421; A2-97CDKTB48, AF286238; A2-94CY01741, AF286237; A2-97CDKS10, AF286241; B-83HXB2.LAI.IIB.BRU, K03455; B-981058, AY331295; B-90BK132, AY173951; B-0067100T36, AY423387; B-98153841, DQ853463; C-92BR025d, U52953; C-86ETH2220, U46016; C-04SK164B1, AY772699; C-95IN21068, AF067155; D-01A280, AY253311; D-94UG114, U88824; D-83ELI, K03454; D-01CM4412HAL, AY371157; F1-93VI850, AF077336; F1-93FIN9363, AF075703; F1-9393BR020-1, AF005494; F1-96MP411, AJ249238; F2-95MP255, AJ249236; F2-95MP257, AJ249237; F2-

02CM0016BBY, AY371158; F2-97CM53657, AF377956; G-93HH8793121, AF061641; G-96DRCBL, AF084936; G-92NG083, U88826; G-PT2695,AY612637; H-93VI997, AF190128; H-90056, AF005496; H-93VI991, AF190127; J-94SE7022, AF082395; J-93SE7887,AF082394; J-97DCKTB147, EF614151; K-97EQT B11C, AJ249235; K-96MP535, AJ249239; 01AE-90CM240, U54771; 01AE-93TH051, AB220944; 02AG-IBNG, L39106; 02AG-99pBD615, AY271690; 04cpx-97PVMY, AF049337; και 04cpx-9197PVCH, AF049292.

Στην δεύτερη μελέτη, οι τελικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των HIV-1 στελεχών των 37 νεοδιαγνωσθέντων HIV-1 ασθενών που δεν λαμβάνουν αντιρετροϊκή αγωγή αναλύθηκαν φυλογενετικά. Συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση των αλληλουχιών των HIV-1 γονιδιωματικών περιοχών *gag*, *pol*(PR-RT) και *env*(gp160). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται παραπάνω, εκτός από τα ακόλουθα δύο σημεία. Πρώτον, η πολλαπλή στοίχιση των υπο ανάλυση αλληλουχιών με αντίστοιχες, από γενετικά χαρακτηρισμένα HIV-1 στελέχη που πάρθηκαν από τη βάση δεδομένων Los Alamos (Leitner *et al.*, 2005) έγινε με το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) και δεύτερον, το bootstrapping έγινε στα 100 αντίγραφα. Οι αριθμοί αναφοράς του GenBank για τις αλληλουχίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση είναι οι εξής: A1-94SE7253, AF069670; A1-98UG57136, AF484509; A2-97CDKTB48, AF286238; A2-94CY017, AF286237; B-83HXB2,K03455; B-981058, AY331295; B-90BK132, AY173951; B-00671, AY423387; C-9292BR025.8, U52953; C-86ETH2220, U46016; C-04SK164B1, AY772699; C-95IN21068, AF067155; D-01A280,AY253311; D-494UG114.1, U88824; D-83ELI, K03454; D-014412HAL, AY371157; F1-93VI850, AF077336; F1-93FIN9363,AF075703; F1-9393BR020-1, AF005494; F1-96MP411, AJ249238; F2-95MP255,AJ249236; F2-95MP257,AJ249237; F2-020016BBY, AY371158; F2-97CM53657, AF377956; G-93HH8793.1.1, AF061640; G-96DRCBL, AF084936; G-92NG083, U88826; G-93SE6165, AF061642; H-93VI997, AF190128; H-90056.1, AF005496; H-94VI991, AF190127; J-94SE9280.9, AF082394; J-93SE9173.3, AF082395; K-97EQT B11C, AJ249235; K-96MP535, AJ249239; 01AE-90CM240, U54771; and 02AG-IBNG, L39106.

Στην τρίτη μελέτη πραγματοποιήθηκε επίσης φυλογενετική ανάλυση στις αλληλουχίες της IN των 108 HIV-1 στελεχών που μελετήθηκαν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται πιο πάνω για τη δεύτερη μελέτη.

## 6.9 Ανάλυση ανασυνδυασμού

Στην πρώτη μελέτη έγινε περαιτέρω διερεύνηση των HIV-1 στελεχών για τα οποία δεν υπήρχε σαφής ομαδοποίηση της αλληλουχίας της σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιωματικής περιοχής, στο φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 6.8. Αναλύθηκαν περαιτέρω για εύρεση πιθανών σημείων ανασυνδυασμού. Για την ανακάλυψη σημείων ανασυνδυασμού στις υπό διερεύνηση αλληλουχίες πραγματοποιήσαμε μια ανάλυση bootscanning χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Simplot 3.5.1 (Lole *et al.*, 1999). Το Simplot είναι μια προσέγγιση πλαισίου ολίσθησης που επιτρέπει την αναγνώριση και την αξιολόγηση των υποθετικών δια-υποτυπικών (intersubtype) σημείων ανασυνδυασμού της υπό διερεύνησης αλληλουχίας, μέσω της γραφικής ανίχνευσης μιας αλλαγής στο φυλογενετικό σήμα. Η υπό εξέταση αλληλουχία επεξεργάζεται με ανάλυση ομοιότητας και bootscanning έναντι ενός συνόλου πρότυπων HIV-1 αλληλουχιών αναφοράς. Η ανάλυση bootscanning εκτελέστηκε με ένα ολισθαίνον πλαίσιο των 400 νουκλεοτιδίων με αλληλοεπικάλυψη 40 νουκλεοτιδίων. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης ανασυνδυασμού, πραγματοποιήθηκε μια επαληθευτική φυλογενετική ανάλυση με την κατασκευή NJ δένδρων για κάθε περιοχή μεταξύ των σημείων ανασυνδυασμού, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA (Tamura *et al.*, 2007), έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η προέλευση υπότυπου μέσα σε κάθε γονιδιακό τμήμα. Η αξιοπιστία της ταξινόμησης κάθε φυλογενετικού δένδρου προσδιορίστηκε με ανάλυση bootstrap στα 1000 αντίγραφα και τιμές  $>70$  θεωρούνταν καθοριστικές.

Για στελέχη που η φυλογενετική ανάλυση κατέδειξε ότι δεν ανήκουν σε κανένα γνωστό υπότυπο ή ανασυνδυασμένη μορφή, αναλύθηκαν με μια άλλη φυλογενετική προσέγγιση με τη μέθοδο maximum-likelihood (ML) σε συνδυασμό με το εξελικτικό μοντέλο Juke-Cantors χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

Παράλληλα, έγινε αναζήτηση μέσω του αλγοριθμικού εργαλείου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) για πιθανή σχέση των υπό διερεύνηση φερόμενων ανασυνδυασμένων αλληλουχιών με ήδη χαρακτηρισμένες HIV-1 αλληλουχίες που ήδη έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων GeneBank. Το BLAST βρίσκει περιοχές με τοπική ομοιότητα μεταξύ των ακολουθιών, συγκρίνοντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων και υπολογίζει τη στατιστική σημασία των αντιστοιχιών. Το BLAST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξάγει τις λειτουργικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών (Altschul *et al.*, 1990).

## 6.10 Γενοτυπική ανάλυση για εύρεση μεταλλάξεων ανθεκτικότητας

### 6.10.1 Πρωτόκολλο γενοτυπικής ανάλυσης *Pr* και *RT*

Η εύρεση μεταλλάξεων στις αλληλουχίες της *Pr* και της *RT* που προκαλούν ανθεκτικότητα στους αναστολείς PIs και NRTIs/NNRTIs, αντίστοιχα, έγινε σε HIV-1 στελέχη που ανήκουν στα 37 δείγματα νεοδιαγνωσθέντων ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε αντιρετροϊκή θεραπεία της δεύτερης μελέτης με ένα νέο πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο (Σχ. 2.I). Η νέα αυτή μέθοδος ενισχύει 1461 bp που περιλαμβάνουν τις κωδικές περιοχές των γονιδίων *Pr* και *RT* του *pol* σε στελέχη της ομάδας M του HIV-1. Το πρωτόκολλο του nested RT-PCR που αφορά την ενίσχυση της περιοχής αυτής περιγράφεται στην πειραματική πορεία 6.4-6.5 (Σχ. 1, 2.I). Κατά τη διαδικασία της κυκλικής αλληλούχισης για τη γονοτύπιση κάθε δείγματος πραγματοποιούνται επτά κυκλικές αντιδράσεις αλληλούχισης (Πίν. 3, Σχ. 2.II.), αντί δύο για την αλληλούχιση της περιοχής *pol* (*Pr* και *RT*) (Σχ. 1.D). Οι DNA αλληλουχίες των ενισχυμένων προϊόντων καθορίστηκαν από την άμεση αλληλούχιση χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές αλληλούχισης: 2136, 2216, 2454, 2610, 3003, 3019, 3462 (Πίν. 3, Σχ. 2II).

**Πίνακας 3.** Εκκινητές PCR και αλληλούχισης πρωτοκόλλου γενοτυπικής ανθεκτικότητας

Όνομα εκκινητών <sup>a</sup>	Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία <sup>b</sup>	Θέση <sup>c</sup>	Μήκος (nts)
<b>PCR</b>				
1832 (F)	<i>pol</i>	CAGCATGYCAGGGAGTRGGRGGACC	1832-1856	1751
3583 (R)	<i>pol</i>	GGYTCTTGRTAAATTTGATATGTCCATTG	3555-3583	
2078 (F)	<i>pol</i>	AGGCTAATTTTTTAGGGAARATYTGGCCTTCC	2078-2109	1461
3539 (R)	<i>pol</i>	CTGTATTTCTGCTAYTAAGTCTTTTGATGG	3510-3539	
<b>Sequencing</b>				
2136 (F)	<i>pol</i>	YCAGARCAGACCAGAGCCAACAGCCCC	2136-2162	
2216 (F)	<i>pol</i>	AGGAGCMGAWAGACARG	2216-2232	
2454 (F)	<i>pol</i>	GGAMAWAARGCTATAGGTACAG	2454-2475	
2610 (R)	<i>pol</i>	CYTTTGGGCCATCCATTC	2593-2610	
2650 (R)	<i>pol</i>	AATGCTTTTATTTTYTCTTCTGTCAATGGC	2621-2650	
2734 (R)	<i>pol</i>	GCAAATAYTGAGTATTRTATGGATTTTCAGG	2703-2734	
3003 (F)	<i>pol</i>	GGATGGAAAGGATCACC	3003-3019	
3019 (R)	<i>pol</i>	GGTGATCCTTTCCATCC	3003-3019	
3462 (R)	<i>pol</i>	CTGCCARTTCTARYTCTGCTTC	3441-3462	

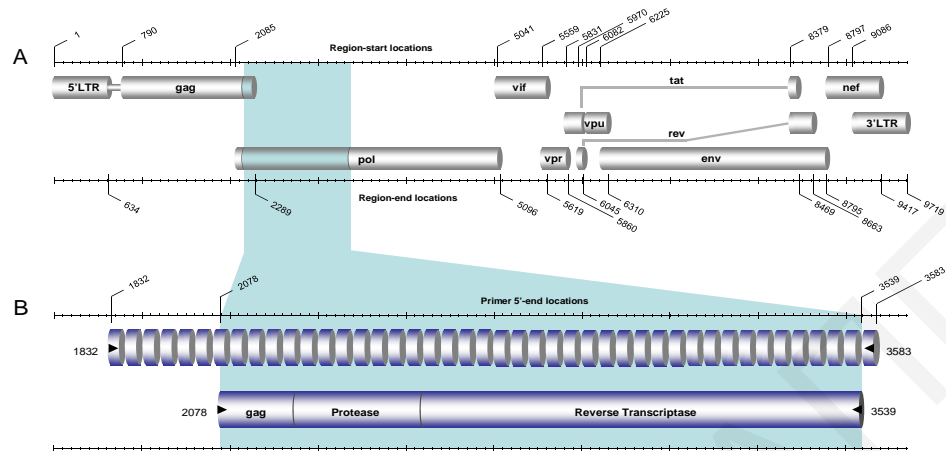
<sup>a</sup> Ονόματα εκκινητών πρώτης και δεύτερης αντίδρασης RT-PCR/PCR και εκκινητών αλληλούχισης.

Ο προσανατολισμός του κάθε εκκινητή υποδεικνύεται από την παρένθεση: F, forward· R, reverse.

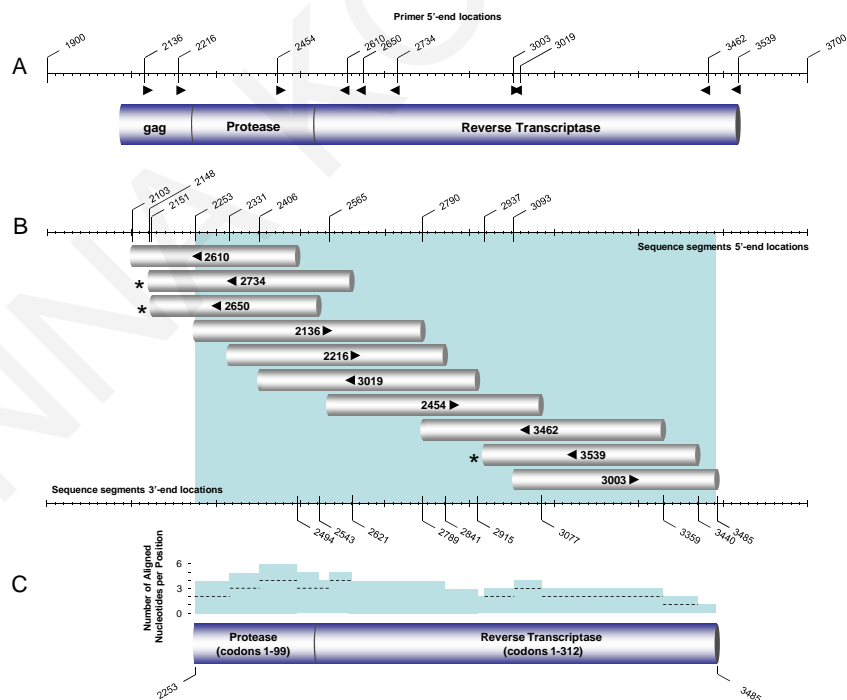
<sup>b</sup> Y, υποδεικνύει ίσο μοριακό μίγμα C και T; R, A και G; M, A και C; W, A and T.

<sup>c</sup> Θέσεις εκκινητών που αντιστοιχούν στο στέλεχος HXB2 του HIV-1 (αριθμός GenBank K03455).

I.



II.



**Σχήμα 2.** Το σχήμα συνοψίζει την ενίσχυση του 5'-end της περιοχής *pol* για τους υπότυπους της ομάδας M του HIV-1 χρησιμοποιώντας μια νέα γενετική μέθοδο εύρεσης ανθεκτικότητας στα γονίδια της πρωτεάσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης. I. (A) Το ανώτερο διάγραμμα συνοψίζει τη γενετική οργάνωση του HIV-1 χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το HXB2 γονιδίωμα. Η αρχή και το τέλος κάθε



γενετικής περιοχής υποδεικνύεται από έναν αντίστοιχο αριθμό πάνω και κάτω από το διάγραμμα, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την HXB2 αρίθμηση. Η σκιασμένη περιοχή στο HIV-1 χάρτη γονιδίων δείχνει τις περιοχές *gag*(p6) και *pol*(PR και p51RT) που ενισχύονται με τη γενοτυπική μέθοδο εύρεσης ανθεκτικότητας. (B) Το δεύτερο διάγραμμα συνοψίζει την πρώτη αντίδραση του nested RT-PCR που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση των γονιδίων PR και RT. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό και τη θέση δέσμησης του 5' άκρου των εκκινητών του αρχικού PCR, 1832 και 3583 και του δεύτερου PCR, 2078 και 3539 με βάση το HXB2 γονιδίωμα. Οι διακεκομμένοι και συμπαγείς κύλινδροι δείχνουν το προϊόν της πρώτης και δεύτερης PCR αντίδρασης, αντίστοιχα. II. Σχηματική απεικόνιση που συνοψίζει τη διαδικασία αλληλούχισης της περιοχής της PR και RT. (A) Ο στερεός κύλινδρος αντιπροσωπεύει το τελικό προϊόν που περιέχει τις περιοχές *gag*(p6) και *pol*(PR και p51 RT) που προέρχονται από τη διαδικασία nested RT-PCR. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό και τη θέση δέσμησης του 5' άκρου των εκκινητών αλληλούχισης. (B) Οι γκριζοί κύλινδροι δείχνουν τα τμήματα ακολουθίας που λαμβάνονται από κάθε εκκινητή αλληλούχισης. Η αρχή και το τέλος κάθε γενετικής περιοχής υποδεικνύεται από έναν αντίστοιχο αριθμό πάνω και κάτω από το διάγραμμα, αντίστοιχα. Τα τμήματα DNA με αστερίσκο χαρακτηρίζονται ως εναλλακτικοί εκκινητές, τα 2734 και 2650 για το 2610 και το 3539 για το 3462. (C) Ο στερεός κύλινδρος αντιπροσωπεύει την ευθυγραμμισμένη τελική αλληλουχία DNA που προέρχεται από όλα τα μερικά τμήματα (που αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια 2253 έως 3485 στο HXB2 γονιδίωμα) που περιέχουν την πλήρη PR (κωδικά 1 έως 99) και τη μερική RT (κωδικά 1 έως 312). Στο κατώτατο σημείο, το διάγραμμα δείχνει τον αριθμό των ευθυγραμμισμένων νουκλεοτιδίων ανά θέση νουκλεοτιδίου από τις πληροφορίες που προέρχονται από όλα τα μερικά τμήματα αλληλουχίας, οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το όριο των ευθυγραμμισμένων νουκλεοτιδίων ανά ευθυγραμμισμένη θέση νουκλεοτιδίου που χρησιμοποιείται στη γενοτυπική ανάλυση.

Οι εκκινητές 2650, 2734 και 3539 χρησιμοποιούνται εναλλακτικά, οι δύο πρώτοι για τον εκκινητή 2610 και το τελευταίο για το 3462, αντίστοιχα (Σχ. 2.II). Η διαδικασία κυκλικής αλληλούχισης έγινε όπως περιγράφεται στο στάδιο 6.6. Τα τμήματα DNA αλληλουχιών που θα παρθούν θα καθαριστούν και στη συνέχεια θα ταυτοποιηθούν οι αλληλουχίες τους με το γενετικό αναλυτή ABI 3130, όπως περιγράφηκε στο βήμα 6.6.

Η ανάλυση των *pol*(PR-RT) αλληλουχιών αυτών των στελεχών έγινε με το λογισμικό ViroSeq (Celera Diagnostics, Germany), με το οποίο υπάρχει ψηφιακή απεικόνιση του αρθροϊστικού σήματος των ηλεκτροφερογραφημάτων από τις επτά αντιδράσεις κυκλικής αλληλούχισης, κάτι που επιτρέπει τον έλεγχο της βάσης σε κάθε νουκλεοτιδική θέση. Στη συνέχεια, έγινε εισαγωγή των *pol* αλληλουχιών στον αλγόριθμο Genotypic Resistance Interpretation v4.3.4 του προγράμματος HIVdb της βάσης δεδομένων HIV Drug Resistance του Πανεπιστημίου Stanford (Stanford HIV Resistance Database, 2008) για επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος δίνει ένα σκορ για κάθε φάρμακο σύμφωνα με την νουκλεοτιδική μετάλλαξη ανθεκτικότητας που υπάρχει. Η γενοτυπική ανθεκτικότητα καθορίστηκε ως η παρουσία τουλάχιστον μιας

αμινοξικής αντικατάστασης που σχετίζεται με ανθεκτικότητα, όπως διευκρινίζεται από την IAS-USA (Johnson *et al.*, 2007) και τη βάση δεδομένων HIV Drug Resistance του Πανεπιστημίου Stanford (Stanford HIV Resistance Database, 2008). Η αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης της μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας στα φάρμακα στην θεραπευτική απάντηση έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Drug Resistance του Stanford (Stanford HIV Resistance Database, 2008).

### **6.10.2 Γενοτυπική ανάλυση gag(cleavage sites)**

Ο έλεγχος της ύπαρξης μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα ως προς τα αντιρετροϊκά φάρμακα PIs με το εναλλακτικό μονοπάτι της περιοχής gag(cleavage sites) έγινε σε αμινοξικές αλληλουχίες της περιοχής αυτής σε 37 HIV-1 στελέχη νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. Οι αμινοξικές αλληλουχίες της περιοχής gag(cleavage sites) έχουν παρθεί όπως επεξηγήθηκε πιο πάνω στα στάδια 6.4-6.7. Η ανάλυση στις gag(cleavage sites) αλληλουχίες θα γίνει με την πολλαπλή αλληλούχιση των αμινοξικών αλληλουχιών με πρότυπες αμινοξικές αλληλουχίες ανά υπότυπο, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalX (Higgins *et al.*, 1988). Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το εργαλείο SeqPublish της Βάσης δεδομένων του Los Alamos (Los Alamos, 2008) θα γίνει μια απλούστερη παρουσίαση της πολλαπλής αλληλούχισης των αλληλουχιών του κάθε γονιδίου, βοηθώντας περαιτέρω τη διαδικασία εύρεσης μεταλλάξεων. Θα ακολουθήσει επί χάρτου εύρεση των μεταλλάξεων K436E, I437T/V, A431V, L449F, P453L που εμπλέκονται στη εναλλακτική δημιουργία ανθεκτικότητας στους PIs σύμφωνα με τα διαγράμματα του IAS-USA 2007 (Johnson *et al.*, 2007) και τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα (Nijhuis *et al.*, 2007). Εάν στα αποτελέσματα υπάρχουν μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα από μόνες τους ή σε συνδυασμό με την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο της πρωτεάσης, τότε θα μπορεί να εκτιμηθεί ο πραγματικός κίνδυνος της ανθεκτικότητας στους PIs για τα στελέχη της Κύπρου των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών της δεύτερης μελέτης.

### **6.10.3 Γενοτυπική ανάλυση env(gp41)**

Ο έλεγχος της ύπαρξης ανθεκτικών μεταλλάξεων ως προς τα αντιρετροϊκά φάρμακα PIs έγινε σε αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου env(gp41) στις περιοχές HR1 και HR2, σε 37 HIV-1 στελέχη νεοδιαγνωσθέντων ασθενών της δεύτερης ομάδας που δεν τους έχει χορηγηθεί ποτέ κάποιο φάρμακο. Οι αμινοξικές αλληλουχίες της περιοχής env(gp41) έχουν παρθεί όπως επεξηγήθηκε πιο πάνω στα στάδια 6.4-6.7. Η ανάλυση στις gp41

αλληλουχίες θα γίνει με την πολλαπλή αλληλούχιση των αμινοξικών αλληλουχιών με πρότυπες αμινοξικές αλληλουχίες ανά υπότυπο, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalX (Higgins *et al.*, 1988). Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το εργαλείο SeqPublish της Βάσης δεδομένων του Los Alamos (Los Alamos, 2008) θα γίνει μια απλούστερη παρουσίαση της πολλαπλής αλληλούχισης των αλληλουχιών του κάθε γονιδίου, βοηθώντας περαιτέρω τη διαδικασία εύρεσης μεταλλάξεων. Θα ακολουθήσει επί χάρτου εύρεση των μεταλλάξεων 36-45 αα στην περιοχή HR1 και 126, 137, 138 αα στην περιοχή HR2 σύμφωνα με τα διαγράμματα του IAS-USA 2007 (Johnson *et al.*, 2007) και τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα (Van Laethem *et al.*, 2005) και θα αξιολογηθεί η κατάσταση, λαμβάνοντας υπόψη τη γενετική ποικιλότητα του κάθε στελέχους.

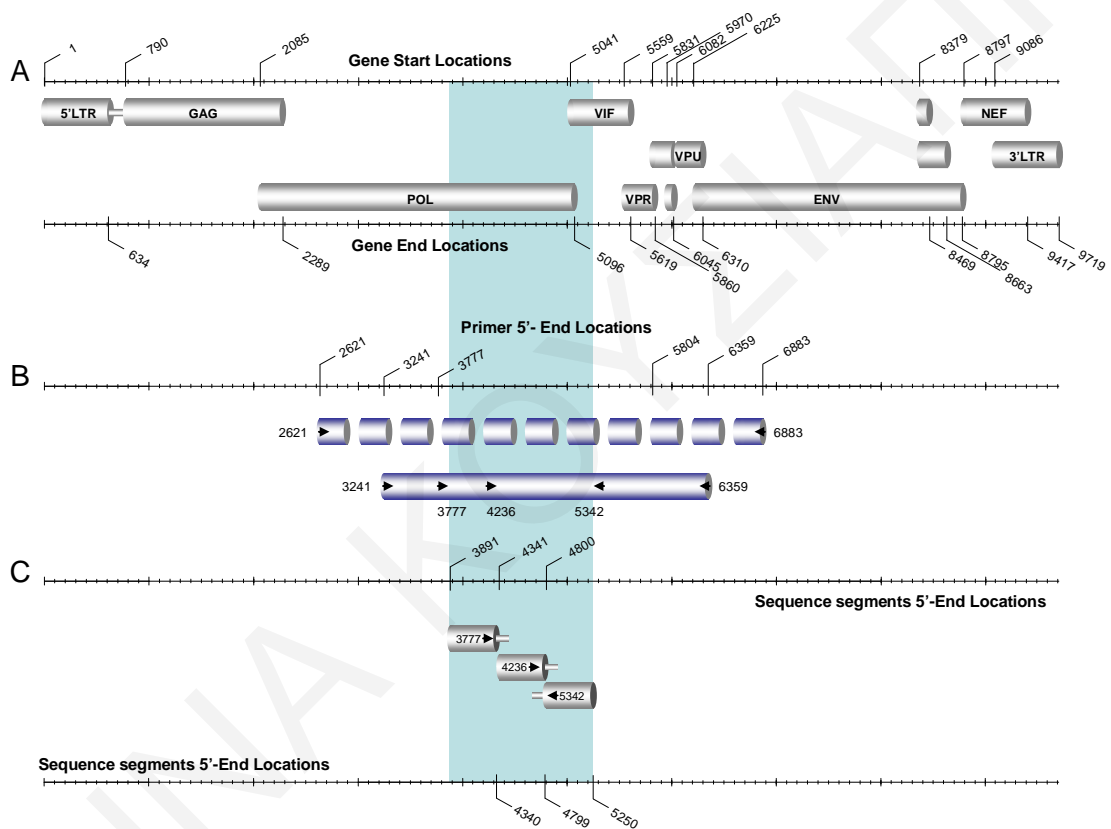
#### **6.11 Γενοτυπική μέθοδος πρόγνωσης κυτταρικού τροπισμού**

Ο έλεγχος της πρόγνωσης του κυτταρικού τροπισμού HIV-1 στελεχών έγινε σε 37 HIV-1 στελέχη νεοδιαγνωσθέντων ασθενών που διαγνώστηκαν κατά το διάστημα 2003-2006 της δεύτερης ομάδας και δεν τους έχει χορηγηθεί ποτέ αντιρετροϊκή αγωγή. Η πρόγνωση έγινε από αλληλουχίες που κωδικοποιούν την περιοχή της V3 θηλιάς του γονιδίου *env(gp120)*, χρησιμοποιώντας δύο προγνωστικούς αλγόριθμους του HIV-1 συνυποδοχέα που παρέχονται δωρεάν στο διαδίκτυο, το Geno2pheno (Beerenwinkel *et al.*, 2005b) και το PSSM (Skrabal *et al.*, 2007). Η πρώτη ανάλυση έγινε με τον αλγόριθμο Geno2pheno που επεξεργάζεται νουκλεοτιδικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας ως δείκτη ψευδο-θετικών δειγμάτων το 5% που είναι η πιθανότητα να ταξινομηθεί ένας R5 τροπικός ιός ως X4. Στη δεύτερη ανάλυση με τον αλγόριθμο PSSM χρησιμοποιήθηκαν αμινοξικές αλληλουχίες της V3 θηλιάς, οι οποίες συγκρίθηκαν με τους δύο διαθέσιμους πίνακες μήτρες του συστήματος. Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων από τα δύο διαφορετικά προγράμματα για να παρθεί ένα προσεγγιστικό αποτέλεσμα για την πρόγνωση του κυτταρικού τροπισμού του κάθε HIV-1 στελέχους. Οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες της περιοχής της V3 θηλιάς έχουν παρθεί όπως επεξηγήθηκε πιο πάνω στα στάδια 6.4-6.7.

Παράλληλα, με την πρόγνωση του κυτταρικού τροπισμού στα πιο πάνω δείγματα έγινε και επί χάρτου ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της V3 θηλιάς σε σχέση με την αλληλουχία αναφοράς του κάθε υπότυπου στον οποίο ταξινομούνται. Μελετήθηκαν τα κατάλοιπα κυστεΐνης στα δύο άκρα της αμινοξικής αλληλουχίας της V3 θηλιάς και το αντιγονικό μοτίβο GPGR.

### 6.12 Γενοτυπική ανάλυση γονιδίου IN

Στην τρίτη μελέτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος για ύπαρξη φυσικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της IN, οι οποίοι επηρεάζουν τη φυσική ενεργότητα της IN, τη δέσμευση των INIs και της ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους αναστολείς αυτούς. Σε 108 HIV-1 στελέχη νεοδιαγνωσθέντων και χρόνιων ασθενών που διαγνώστηκαν κατά το διάστημα 1986-2006 και δεν τους έχει χορηγηθεί ποτέ αναστολέας IN ενισχύθηκε η περιοχή του γονιδίου της *IN* σύμφωνα με ένα νέο πρωτόκολλο γενοτυπικής ανάλυσης που



**Σχήμα 3:** Το σχήμα συνοψίζει την ενίσχυση του γονιδίου *IN* της περιοχής *pol* για τους υπότυπους της ομάδας M του HIV-1 χρησιμοποιώντας μια νέα γενοτυπική μέθοδο. (A) Το ανώτερο διάγραμμα συνοψίζει τη γενετική οργάνωση του HIV-1 χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το HXB2 γονιδίωμα. Η αρχή και το τέλος κάθε γενετικής περιοχής υποδεικνύεται από έναν αντίστοιχο αριθμό πάνω και κάτω από το διάγραμμα, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την HXB2 αρίθμηση. Η σκιασμένη περιοχή στο HIV-1 χάρτη γονιδίων δείχνει την περιοχή *pol(IN)* που ενισχύεται με τη γενοτυπική μέθοδο. (B) Το δεύτερο διάγραμμα συνοψίζει την πρώτη αντίδραση του nested RT-PCR που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *IN*. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό και τη θέση δέσμευσης του 5' άκρου των εκκινητών του αρχικού PCR, 2621 και 6883 και του δεύτερου PCR, 3241 και 6359 με βάση το HXB2 γονιδίωμα. Οι διακεκομμένοι και συμπαγείς κύλινδροι δείχνουν το προϊόν της πρώτης και δεύτερης PCR αντίδρασης, αντίστοιχα. (A) Τα μαύρα βέλη μέσα στο στερεό κύλινδρο δείχνουν τον προσανατολισμό και τη θέση δέσμευσης του 5' άκρου των τριών εκκινητών αλληλούχισης. (C) Οι γκριζοί κύλινδροι δείχνουν τα τμήματα ακολουθίας που λαμβάνονται από κάθε εκκινητή αλληλούχισης, Η αρχή και το τέλος κάθε γενετικής περιοχής υποδεικνύεται από έναν αντίστοιχο αριθμό πάνω και κάτω από το διάγραμμα, αντίστοιχα.

σχεδιάστηκε (Σχ. 3). Η νέα αυτή μέθοδος ενισχύει 3118 bp που περιλαμβάνουν τις κωδικές περιοχές των γονιδίων *IN*, *vif*, *vpr*, *vpu*, 1<sup>ο</sup> εξώνιο του *tat* και 1<sup>ο</sup> εξώνιο *ren* σε στελέχη της ομάδας M του HIV-1. Το πρωτόκολλο του nested RT-PCR που αφορά την ενίσχυση της περιοχής αυτής περιγράφεται στην πειραματική πορεία 6.4-6.5 (Σχ. 1, 3). Κατά τη διαδικασία της κυκλικής αλληλούχισης για την ανάλυση του γονιδίου της *IN*, κάθε δείγματος, πραγματοποιήθηκαν μόνο τρεις κυκλικές αντιδράσεις αλληλούχισης με τους εκκινήτες αλληλούχισης: 3777, 4236, 5342 (Πίν. 1, Σχ. 3A-B), αντί για έξι που χρησιμοποιούνται για την αλληλούχιση της περιοχής *pol*(RNase H, *IN*) και των γονιδίων *vif*, *vpr*, *vpu* (Σχ. 1D). Η διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται στο στάδιο 6.6. Μετά την αλληλούχιση των προϊόντων της κυκλικής αλληλούχισης έγινε επεξεργασία των DNA αλληλουχιών κάθε τμήματος, όπως περιγράφεται στο 6.7 (Σχ. 3C).

Ακολούθως αναλύθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου *IN* των 108 HIV-1 στελεχών λαμβάνοντας υπόψη τη γενετική ποικιλότητα του κάθε στελέχους. Αρχικά, έγινε πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών με πρότυπες αμινοξικές αλληλουχίες ανά υπότυπο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalX (Higgins *et al.*, 1988). Στη συνέχεια, έγινε μια απλούστερη παρουσίαση της πολλαπλής αλληλούχισης των αλληλουχιών του κάθε γονιδίου χρησιμοποιώντας το εργαλείο SeqPublish της βάσης δεδομένων Los Alamos (Los Alamos, 2008). Η εύρεση των μεταλλάξεων γίνεται επί χάρτου, σύμφωνα με τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα (Zeinalipour-Loizidou *et al.*, 2007). Διερευνήθηκε η ύπαρξη πολυμορφισμών στα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας του ενεργού κέντρου της *IN* (D64 D116 E152), του μοτίβου ψευδαργύρου (C12, C16, C40, C43) στο N-άκρο της *IN* και τα κατάλοιπα που σχετίζονται με τη δέσμευση του κυτταρικού παράγοντα LEDGF/75 στην *IN* (R166, D167, A169, E170, H171). Επιπλέον, διερευνήθηκαν και τα αμινοξικά κατάλοιπα που έχει βρεθεί να εμπλέκονται σε δημιουργία πρωτοταγούς (Y143, Q148, N155) ή δευτεροταγούς ανθεκτικότητας (C65, T66, H67, V72, L74, E92, T97, N117, G118, E138, G140, I141, P142, K159, G163, Q168, D232) σε διάφορους αναστολείς της *IN* σε κλινική και προκλινική ανάπτυξη. Τέλος, εξετάστηκαν τα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία εμπλέκονται στη δέσμευση του αναστολέα raltegravir.

## Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

### 7.1 Αποτελέσματα αναδρομικής γενετικής μελέτης

#### 7.1.1 Χαρακτηριστικά HIV-1 οροθετικών ατόμων

Η πρώτη ομάδα μελέτης περιλαμβάνει 77 HIV-1 οροθετικά άτομα και κάθε άτομο αναγνωρίζεται από ένα εργαστηριακό αριθμό αναφοράς που δίνεται διαδοχικά με την άφιξη του δείγματος στο εργαστήριο μετά τη δειγματοληψία. Τα υπό μελέτη άτομα αντιπροσωπεύουν το 38% των εν ζώη HIV-1 μολυσμένων ατόμων που διαγνώστηκαν από το 1986 ως το 2006. Τα γενικά δημογραφικά, επιδημιολογικά και κλινικά γνωρίσματα των υπό μελέτη ατόμων συνοψίζονται στον Πίνακα 4. Μεταξύ των 77 υπό μελέτη ατόμων, οι 56 (72.7%) είναι άντρες και οι 21 (27.3%) γυναίκες. Η μέση ηλικία τους είναι 38 έτη με interquartile εύρος (IQR) από 32 έως 47. Η μέση τιμή μέτρησης των CD4 T-λεμφοκυττάρων ήταν 448 κύτταρα/ mm<sup>3</sup> (IQR, 232 έως 651) και η μέση τιμή του HIV ιικού φορτίου του πλάσματος ήταν 3.59 log HIV-1 RNA αντίγραφα/ ml (IQR, 1.7 έως 4.6). Πενήντα έξι HIV-1 οροθετικοί είναι Κύπριοι (72.7%), επτά είναι από την υπο-σαχάρια Αφρική (9.1%), επτά, από την ανατολική Ευρώπη (9.1%), έξι από τη δυτική Ευρώπη (7.8%) και ένας (1.3%) από τις Ηνωμένες Πολιτείες. Τριάντα επτά από τους υπό μελέτη οροθετικούς (48.0%) μολύνθηκαν μέσω ομο/αμφιφυλοφιλικής σεξουαλικής επαφής, 39 (50.6%) από ετεροφυλοφιλική επαφή και ένας (1.3%) από την ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών. Από τα 77 τα 31 άτομα (40.2%) μολύνθηκαν στη Κύπρο, 17 (22.1%) στη δυτική Ευρώπη, 4 (5.2%) στην ανατολική Ευρώπη, 11 (14.3%) στις χώρες της υπο-σαχάριας Αφρικής, 2 (2.6%) στις Ηνωμένες Πολιτείες και 1 (1.3%) στη νοτιοανατολική Ασία. Για 11 υπό μελέτη άτομα (14.3%), η χώρα στην οποία πιθανώς να έγινε η μόλυνση είναι άγνωστη. Μεταξύ των υπό μελέτη ατόμων υπάρχουν τέσσερα ετεροφυλοφιλικά ζευγάρια, ένα που μολύνθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, ένα στη Γεωργία, το άλλο στην Κύπρο και το τελευταίο με άγνωστη τη τοποθεσία της μόλυνσης (Kousiappa *et al.*, 2009b).

#### 7.1.2 PCR και αλληλούχιση των δειγμάτων

Τα μη καλλιεργημένα PBMCs και το πλάσμα όλων των ατόμων ήταν θετικά στον ιό HIV-1 κατά τον πολλαπλασιασμό των περιοχών *gag*, *pol*(protease και RT), *pol*(RNase H και IN), *vif*, *vpr*, *vpu*, *env*(gp160) και 5'end-*nef* με τις μεθόδους nested RT-PCR και nested PCR. Όλα τα HIV-1 PCR προϊόντα της δεύτερης αντίδρασης αναλύθηκαν

**Πίνακας 4.** Κλινικά και επιδημιολογικά γνωρίσματα των HIV-1 ασθενών της 1<sup>ης</sup> υπό μελέτη ομάδας

Ασθενής <sup>a</sup>	Φύλο <sup>b</sup>	Ηλικία (Ετη)	Ημερομηνία θετικού τεστ <sup>c</sup>	Χώρα προέλευσης <sup>d</sup>	Ομάδα κινδύνου <sup>e</sup>	CD4 (κύτταρα/ $mm^3$ )	HIV-1 RNA Πλάσματος (αντίγραφα $\times 10^4/ml$ )	Επιδημιολογικές πληροφορίες <sup>f</sup>
CY018	A	35	12/97	Κύπρος	MSM	570	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY020	Θ	41	01/97	Κύπρος	HSX	324	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY021	A	33	03/04	Γεωργία	HSX	309	0.1	Μολύνθηκε στη Γεωργία
CY022	A	28	05/04	Κύπρος	MSM	290	2.7	Μολύνθηκε στην Κύπρο, HBV Θετικός
CY023	Θ	22	01/05	Γεωργία	HSX	369	0.1	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY028	A	49	02/97	Κύπρος	MSM	99	60.1	Μολύνθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, HBV Θετικός
CY029	A	38	03/97	Κύπρος	MSM	512	<50	HBV Θετικός
CY030	A	45	03/98	Κύπρος	MSM	282	<50	M/Δ
CY031	A	45	05/01	Κύπρος	MSM	805	<50	Μολύνθηκε στην Ελλάδα, HBV Θετικός
CY032	A	41	04/01	Κύπρος	MSM	987	<50	M/Δ
CY033	A	44	04/01	Κύπρος	MSM	606	0.1	M/Δ
CY035	A	30	04/05	Κύπρος	MSM	191	54.6	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY036	Θ	49	03/97	Κύπρος	HSX	764	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο, HCV Θετική
CY037	Θ	35	07/99	H.B.	HSX	N/A	N/A	Μολύνθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, Ετ/λη σύντροφος CY038
CY038	A	46	07/99	Κύπρος	HSX	426	0.1	Μολύνθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, Ετ/λος σύντροφος CY037
CY040	A	63	06/00	Κύπρος	HSX	482	0.3	Μολύνθηκε στη Νότια Αφρική
CY048	A	33	05/05	Μπουρκίνα Φάσο	MSM	181	27.4	Μολύνθηκε στην Μπουρκίνα Φάσο
CY051	Θ	N/A	03/02	Κύπρος	HSX	500	<50	M/Δ
CY055	A	41	03/02	Κύπρος	MSM	845	0.1	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY056	A	51	06/02	Κύπρος	MSM	470	1.0	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY057	Θ	31	06/05	Γεωργία	HSX	N/A	2.8	Μολύνθηκε στη Γεωργία, Ετ/λη σύντροφος CY058; HCV Θετικός
CY058	A	37	06/05	Γεωργία	HSX	N/A	3.2	Μολύνθηκε στη Γεωργία, Ετ/λος σύντροφος CY057; HCV Θετικός
CY063	A	40	04/95	DRC	HSX	7	0.1	Μολύνθηκε στο DRC
CY064	A	53	02/96	Κύπρος	HSX	448	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY065	Θ	50	07/00	Ελλάδα	HSX	263	10.6	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY067	A	40	02/98	Κύπρος	MSM	1200	<50	Μολύνθηκε στην Ουκρανία

Συνεχίζεται

Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

CY068	A	57	02/97	Κύπρος	MSM	240	0.1	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY069	A	84	10/99	Κύπρος	HSX	191	0.4	Μολύνθηκε στη Νότιο Αφρική
CY070	A	47	02/00	Κύπρος	MSM	1103	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY072	Θ	36	04/03	Ρωσία	HSX	1276	0.4	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY074	A	40	08/98	Κύπρος	MSM	163	<50	M/Δ
CY075	Θ	32	10/95	Λευκορωσία	HSX	636	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY077	A	53	10/86	Κύπρος	MSM	490	4.0	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY081	A	49	05/89	Κύπρος	IVDU	446	1.3	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY082	A	67	10/94	Κύπρος	MSM	473	0.6	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY087	A	38	08/97	Κύπρος	MSM	792	0.3	M/Δ
CY088	A	28	08/05	Κύπρος	HSX	77	12.4	Μολύνθηκε στην Κύπρο, Ετ/λος σύντροφος CY089
CY089	Θ	23	08/05	Κύπρος	HSX	262	5.6	Μολύνθηκε στην Κύπρο, Ετ/λη σύντροφος CY088
CY090	Θ	47	-/93	Κύπρος	HSX	545	0.1	Μολύνθηκε στο DRC, Ήπια Νοητική Καθυστέρηση
CY092	A	47	03/94	Κύπρος	HSX	894	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY093	Θ	49	03/98	Κύπρος	HSX	284	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY096	A	35	01/97	Κύπρος	MSM	100	0.1	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY097	A	42	08/02	Κύπρος	MSM	640	<50	M/Δ
CY100	Θ	74	03/97	Κύπρος	HSX	812	<50	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY106	Θ	55	05/99	Κύπρος	HSX	183	1.3	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY107	A	29	06/99	Κύπρος	MSM	341	1.5	Μολύνθηκε στην Αυστρία
CY110	Θ	35	-/94	ΗΠΑ	HSX	739	<50	Μολύνθηκε στις ΗΠΑ, Διάγνωση Herpes genital; HCV Θετικός
CY111	Θ	40	10/05	Σουηδία	HSX	32	200.0	Ετ/λη σύντροφος CY112; CMV Θετική
CY112	A	N/A	10/05	Η.Β.	HSX	292	6.0	Ετ/λος σύντροφος CY111; HCV Θετικός
CY113	A	49	12/93	Κύπρος	HSX	910	<50	Μολύνθηκε στις ΗΠΑ
CY120	A	33	03/99	Ελλάδα	HSX	277	<50	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY121	A	46	06/02	Κύπρος	MSM	233	2.6	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY122	A	43	-/88	Νότιος Αφρική	OHPC	298	3.9	Μολύνθηκε στη Νότιο Αφρική
CY124	A	65	-/86	Γερμανία	MSM	N/A	N/A	Μολύνθηκε στην Ελβετία
CY130	A	N/A	02/05	Κύπρος	MSM	671	1.7	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY131	A	62	02/05	Κύπρος	HSX	202	17.5	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY132	A	41	-/90	Κύπρος	MSM	652	2.6	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY137	A	37	02/91	Κύπρος	MSM	893	0.4	Μολύνθηκε στην Αυστρία

Συνεχίζεται



Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

CY140	A	33	11/04	Κύπρος	MSM	461	33.4	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY141	A	57	01/05	Κύπρος	MSM	79	128.0	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY142	A	56	11/05	Κύπρος	MSM	32	31.2	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY149	A	42	07/01	Κύπρος	MSM	599	0.1	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY150	A	36	12/97	Κύπρος	MSM	738	<50	Μολύνθηκε στη Γερμανία
CY153	A	23	12/05	Κύπρος	MSM	223	5.9	Μολύνθηκε στην Ελλάδα
CY154	Θ	36	-/95	Ζιμπάμπουε	HSX	172	0.1	Μολύνθηκε στο DRC
CY158	A	39	01/06	Μπουρκίνα Φάσο	OHPC	78	6.5	Μολύνθηκε στη Μπουρκίνα Φάσο; Πολιτικός Πρόσφυγας
CY163	A	40	02/04	Κύπρος	MSM	842	1.2	Μολύνθηκε στο Καμερούν
CY164	Θ	40	03/04	Νότιος Αφρική	HSX	556	0.2	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY165	Θ	54	04/93	Κύπρος	HSX	230	18.7	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY166	A	59	03/06	Κύπρος	HSX	134	>100	Μολύνθηκε στη Νότιο Αφρική
CY168	A	49	05/06	Κύπρος	MSM	386	0.1	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY171	A	49	06/06	Κύπρος	HSX	447	10.7	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY173	Θ	29	06/06	Ουκρανία	HSX	598	1.9	Μολύνθηκε στην Κύπρο
CY176	Θ	26	08/06	Αιθιοπία	HSX	595	2.1	Μολύνθηκε στην Αιθιοπία
CY178	A	44	10/06	Κύπρος	MSM	785	0.1	M/Δ
CY179	A	38	11/06	Κύπρος	HSX	498	10.2	Μολύνθηκε στη Ταϊλάνδη
CY180	A	52	12/06	Κύπρος	HSX	650	0.8	Μολύνθηκε στην Κύπρο

<sup>a</sup> Υποδεικνύει τον εργαστηριακό κωδικό των υπό μελέτη ασθενών.

<sup>b</sup> Θ, θήλυ· Α, άρρεν.

<sup>c</sup> Υποδεικνύει την ημερομηνία (μήνα/έτος· -, άγνωστος μήνας) του πρώτου θετικού τεστ HIV αντισώματος.

<sup>d</sup> Χώρα γεννήσεως των υπο μελέτη ατόμων.

<sup>e</sup> MSM, άντρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άντρες· HSX, ετεροφυλοφιλική επαφή· OHPC, προέλευση από χώρα υψηλού κινδύνου· IVDU, χρήστης ενδοφλέβιων ουσιών.

<sup>f</sup> Οι πληροφορίες δόθηκαν από τα υπό μελέτη άτομα. M/Δ, Μη Διαθέσιμο· CMV, Cytomegavirus· HBV, Ιός Ηπατίτιδας Β· HCV, Ιός Ηπατίτιδας C.

περαιτέρω με νουκλεοτιδική ανάλυση αλληλούχισης χρησιμοποιώντας εκκινητές αλληλουχίας για κάθε περιοχή (Πίν. 1, Σχ.1D). Το σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώμα των HIV-1 στελεχών συγκροτήθηκε από τα αλληλοεπικαλυπτόμενα και διαδοχικά τμήματα που πάρθηκαν από την αλληλούχιση. Οι συμπληρωμένες σχεδόν-πλήρους μήκους DNA αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα αναμενόμενα εννέα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης για το *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env(gp160)* και 5'end-*nef* (Σχ. 1A) πάρθηκαν επιτυχώς και από τα 77 δείγματα. Το θετικό αποτέλεσμα του PCR σε συνδυασμό με την εκτενή γενετική ποικιλομορφία των HIV-1 στελεχών, όπως περιγράφεται στη φυλογενετική ανάλυση (Σχ. 4), καταδεικνύουν ότι οι σχεδιασμένοι PCR εκκινητές (Πίν.1) είναι κατάλληλοι για διάφορα στελέχη της ομάδας M (Kousiappa *et al.*, 2009b).

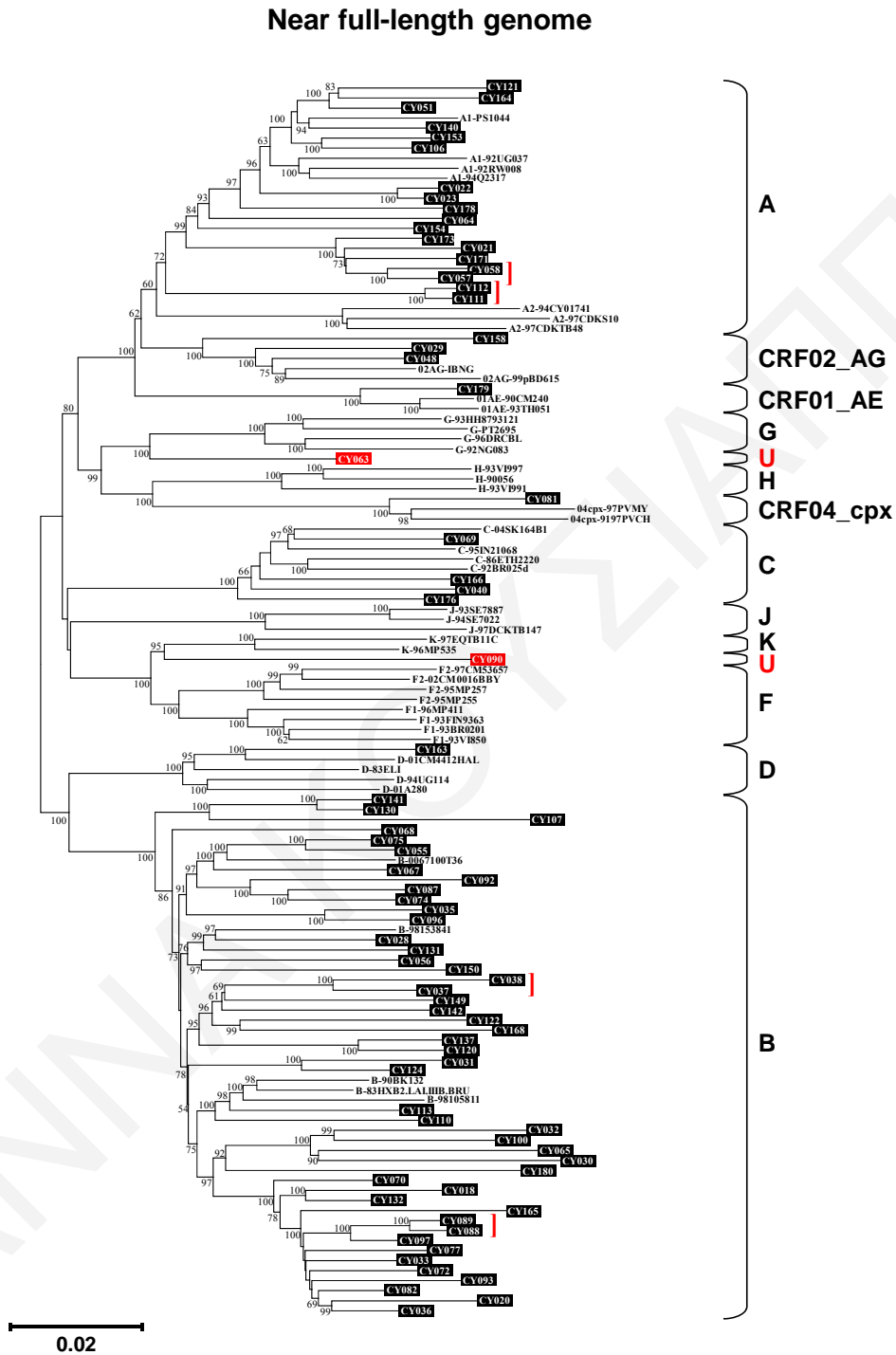
### 7.1.3 Φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων

Οι μοριακές επιδημιολογικές σχέσεις μεταξύ των DNA αλληλουχιών που κωδικοποιούν το σχεδόν πλήρες μήκος του γονιδιώματος (790 έως 8930 nt, Σχ. 1A, D) αναλύθηκαν με νουκλεοτιδική φυλογενετική ανάλυση. Κατασκευάστηκε ένα NJ φυλογενετικό δέντρο για τα 77 υπό μελέτη άτομα με βάση τις 77 παραγόμενες σχεδόν πλήρους μήκους DNA αλληλουχίες τους (Σχ. 4). Εκτός από τις υπό μελέτη αλληλουχίες, συμπεριλήφθηκαν 46 αλληλουχίες που έχουν ήδη αλληλουχηθεί από HIV-1 στελέχη και προέρχονται από διάφορα μέρη ανά το παγκόσμιο, και καλύπτουν τους εννέα γνωστούς υπότυπους (A-K) και τρεις CRFs (CRF01\_AE, CRF02\_AG και CRF04\_crx). Σύμφωνα με το κατασκευασμένο NJ φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζεται στο Σχ. 4, προσδιορίστηκαν τέσσερις ευδιάκριτοι υπότυποι, οι A, B, C και D και τρεις CRFs, οι CRF01\_AE, CRF02\_AG και CRF04\_crx της ομάδας M για τις αλληλουχίες από την Κύπρο. Στον υπότυπο A, ταξινομούνται 18 αλληλουχίες (23.3%), στον υπότυπο B (61.0%) 47 αλληλουχίες, στον υπότυπο C 4 αλληλουχίες (5.2%), στον υπότυπο D 1 αλληλουχία (1.3%), στην CRF01\_AE 1 αλληλουχία (1.3%), στην CRF02\_AG 3 αλληλουχίες (3.9%) και στην CRF04\_crx 1 αλληλουχία (1.3%). Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι οι αλληλουχίες από την Κύπρο στους υπότυπους A, B, C και CRF02\_AG έχουν μια σχετικά υψηλή μέση ενδο-υποτυπική (intrasubtype) γενετική ποικιλομορφία. Η μέση (εύρος) ενδο-υποτυπική νουκλεοτιδική απόκλιση μεταξύ των αλληλουχιών του *gag* μέσα στον υπότυπο A είναι 11.0% (1.4-14.8%), μέσα στον υπότυπο B, 10.3% (4.4-19.4%), μέσα στον υπότυπο C 10.3% (0.9-10.8%) και μέσα στη CRF02\_AG, 11.6% (8.5-13.5%). Αυτή η ποικιλότητα τιμών βρίσκεται μέσα στο εύρος της ενδο-υποτυπικής απόκλισης και προτείνει ότι οι υπότυποι A, B, C και CRF02\_AG μεταδόθηκαν στην Κύπρο κατά τη

διάρκεια της περιόδου που εξετάζουμε (1986 έως 2006) από πολλαπλές πηγές, κάτι που είναι σύμφωνο με τα επιδημιολογικά στοιχεία των υπό μελέτη ατόμων που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Η ομάδα μελέτης περιλαμβάνει τέσσερα ζευγάρια ετεροφυλόφιλων: ένα ζεύγος από τη Γεωργία (CY057 και CY058) που μολύνθηκε στη Γεωργία, ένα ζεύγος όπου ο άνδρας κατάγεται από το Ηνωμένο Βασίλειο (CY112) και η γυναίκα από Σουηδία (CY111), με την περιοχή της μόλυνσης να είναι άγνωστη και δύο ζευγάρια από τη Κύπρο, το ένα (CY088 και CY089) μολύνθηκε στην Κύπρο και το άλλο (CY037 και CY038) στο Ηνωμένο Βασίλειο. Στο φυλογενετικό δέντρο οι αλληλουχίες των τριών από τα ζευγάρια βρίσκονται πολύ κοντά ομαδοποιημένα: τα CY057-CY058 και CY111-CY112 στον υπότυπο A και το CY088-CY089 στον υπότυπο B, με τιμές bootstrap 100%. Οι τοπολογίες των κλάδων του φυλογενετικού δένδρου (Σχ. 4) επιβεβαιώνουν αυτή τη σχέση. Η μέση ενδο-υποτυπική μεταξύ των gag αλληλουχιών CY111-CY112 είναι 1.5%, για τις αλληλουχίες CY057-CY058 είναι 0.7% και για τις ακολουθίες CY088-CY089 είναι 1.9%. Η σχετικά χαμηλή γενετική ποικιλομορφία μεταξύ αυτών των αλληλουχιών στον υπότυπο A και υπότυπο B, σε σύγκριση με την ολική ενδο-υποτυπική ποικιλομορφία στον υπότυπο A (11.0%) και B (10.3%), αντίστοιχα, επιβεβαιώνει ότι τα στελέχη προήλθαν από επιδημιολογικά συνδεδεμένα άτομα. Η μέση ενδο-υποτυπική ποικιλομορφία μεταξύ των αλληλουχιών gag του ζεύγους CY037-CY038 που ανήκουν στον υπότυπο B είναι 11.0% και τα μήκη των κλάδων τους στο δέντρο δείχνουν ότι, αν και συνδέονται επιδημιολογικά δεν ομαδοποιούνται πολύ κοντά.

Δύο αλληλουχίες (2.6%), που απομονώθηκαν από τους HIV-1 οροθετικούς CY063 και CY090, δεν ομαδοποιούνται μέσα στους γνωστούς υπότυπους ή CRFs. Όπως υποδεικνύεται στο Σχ. 4, η αλληλουχία του στελέχους CY063 βρίσκεται κοντά στις αλληλουχίες αναφοράς του υπότυπου G με τιμή bootstrap 100% και η γενετική απόσταση της αλληλουχίας του στελέχους CY090 είναι μικρή από τις αλληλουχίες του υπότυπου K με τιμή bootstrap 95%. Ο HIV-1 ασθενής CY063 που κατάγεται από το DRC μολύνθηκε πριν από το 1995 στο DRC με ετεροφυλοφιλική επαφή. Με ανάλυση της αλληλουχίας του CY063 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο REGA, υποδείχτηκε ένα ανασυνδυασμένο πρότυπο μεταξύ των υποτύπων G και D. Η ασθενής CY090 με χώρα προέλευσης την Κύπρο μολύνθηκε πριν το 1993 στο DRC, με ετεροφυλοφιλική επαφή. Οι αλληλουχίες από αυτά τα δύο στελέχη φαίνεται να είναι μοναδικές περιπτώσεις (Kousiappa *et al.*, 2009b).



**Σχήμα 4.** Φυλογενετικό δέντρο NJ για τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος HIV-1 στελεχών που λήφθηκαν από 77 HIV-1 οροθετικά άτομα στην Κύπρο, βασισμένο στην μέθοδο εκτίμησης απόστασης Kimura-2 parameters. Το δέντρο περιλαμβάνει αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες αναφοράς των υποτύπων του HIV-1 (A-K) και των CRF01\_AE, CRF02\_AG και CRF04\_cpx (παρουσιάζονται με μαύρα γράμματα). Οι αριθμοί που υποδεικνύονται σε διάφορους κόμβους του δέντρου είναι bootstrap τιμές αναφοράς μετά από 1000 επαναλήψεις (σημειώνονται μόνο οι τιμές bootstrap  $\geq 50\%$ ). Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται σε μαύρα κουτιά με το πρόθεμα CY για

Κύπρο και τους αριθμούς που ακολουθούν να δείχνουν τον εργαστηριακό αριθμό του κάθε δείγματος. Οι μη ταξινομημένες αλληλουχίες παρουσιάζονται σε κόκκινα κουτιά. Οι επιδημιολογικά συνδεδεμένοι ασθενείς υποδεικνύονται με κόκκινες παρενθέσεις. Η απόκλιση μεταξύ οποιονδήποτε δύο αλληλουχιών υπολογίζεται με το άθροισμα του οριζόντιου μήκους των κλάδων, χρησιμοποιώντας την κλίμακα κάτω αριστερά, η οποία αντιπροσωπεύει 2% γενετική απόσταση (0.02 αντικαταστάσεις ανά θέση). Οι παρενθέσεις στη δεξιά πλευρά του δέντρου δείχνουν τους καθορισμένους υπότυπους, όπως περιγράφονται στα Αποτελέσματα: U, για μη ταξινομημένη άγνωστη αλληλουχία.

#### 7.1.4 Εύρεση νέων HIV-1 μορφών

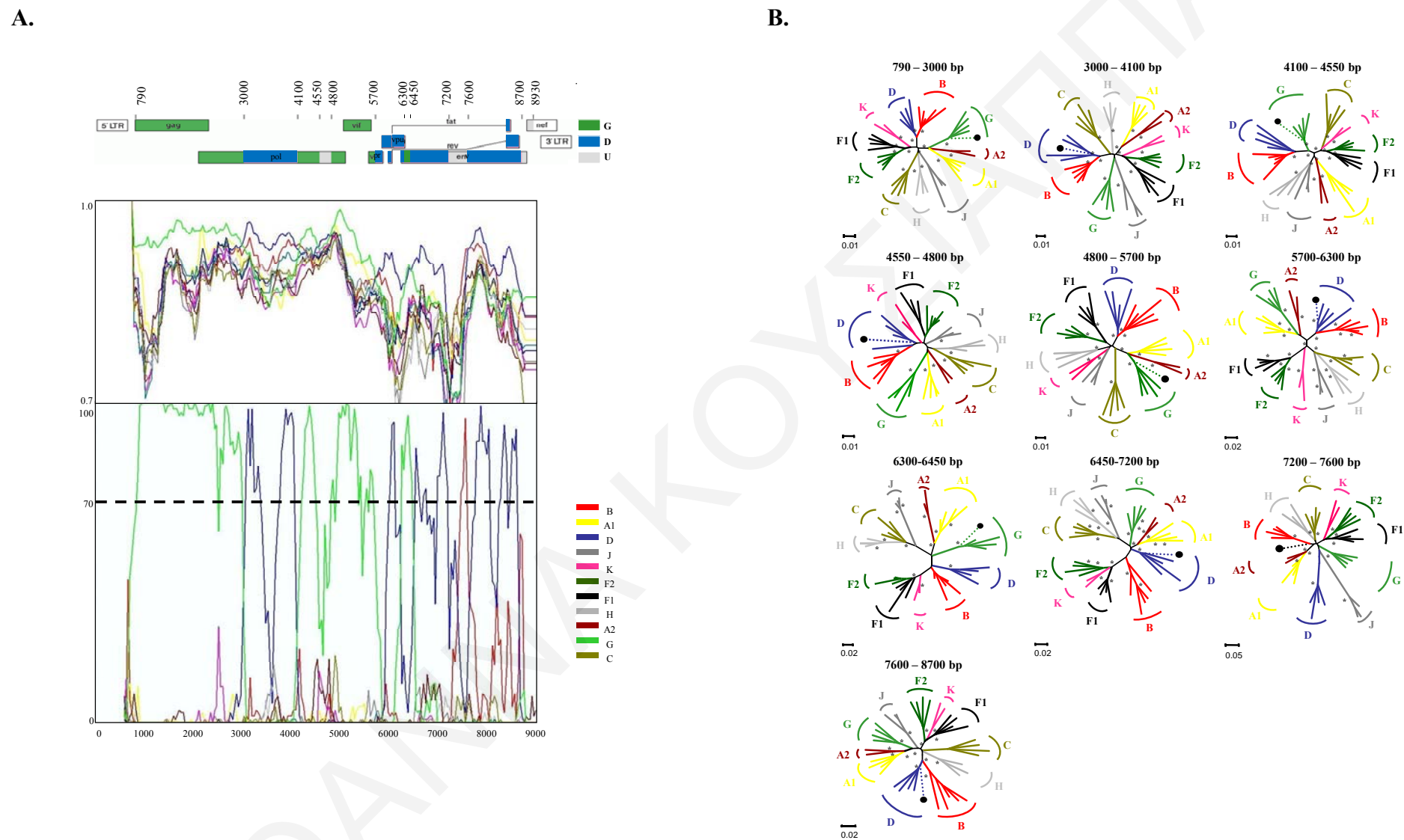
Για μια πιο λεπτομερή σύγκριση με άλλους υπότυπους του HIV-1, οι δύο μη ταξινομημένες αλληλουχίες CY063 και CY090 αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω της ανάλυσης ανασυνδυασμο, η οποία συμπεριλαμβάνει τις αναλύσεις σύγκρισης ομοιότητας και bootscan σάρωσης. Το διάγραμμα ομοιότητας και η ανάλυση bootscan έδειξαν ότι το γονιδίωμα της αλληλουχίας CY063 αποτελείται από τμήματα που ομαδοποιούνται εναλλακτικά με τις αλληλουχίες αναφοράς του υπότυπου G και D (Σχ. 5.A). Στην ανάλυση bootscan οι τιμές bootstrap ήταν υψηλές ( $\geq 70\%$ ) σχεδόν σε όλες τις περιοχές του γονιδιώματος, υποστηρίζοντας την ταξινόμηση του στελέχους CY063 ως ανασυνδυασμένο στέλεχος. Ο προσδιορισμός του υπότυπου για κάθε τμήμα που προέκυψε από την ανάλυση bootscan επιβεβαιώθηκε με φυλογενετική ανάλυση NJ-Kimura 2-parameters. Τα NJ δέντρα που κατασκευάστηκαν για κάθε τμήμα υποστήριζαν τη σχέση με τις αλληλουχίες αναφοράς του υπότυπου (Σχ. 5.B) με bootstrap τιμές  $>70\%$ .

Η αλληλουχία CY063 περιέχει 10 σημεία ανασυνδυασμού (Σχ. 5.A). Στην πρώτη περιοχή της αλληλουχίας, τα νουκλεοτίδια (nt) 790 έως 3000 (αρίθμηση κατά το στέλεχος HXB2) ανήκουν στον υπότυπο G με τιμή bootstrap 100% και αμέσως μετά υπάρχει μια μετατόπιση στον υπότυπο D, με πιο χαμηλή τιμή bootstrap (60%), στην περιοχή του 3'-end της RT έως το 5'-end της RNase H του *pol* (3000-4100 nt). Η τρίτη περιοχή περιλαμβάνει το 3'-end της RNase H και το 5'-end της IN του *pol* (4100-4550 nt) και ομαδοποιείται στον υπότυπο G με τιμή bootstrap 89%, ενώ ακολουθείται από ένα μικρό τμήμα μέσα στην IN (250 nt) το οποίο είναι περιοχή χαμηλής ευκρίνειας μεταξύ των υπότυπων D και του G (Σχ. 5.A). Αυτή η περιοχή ομαδοποιείται με αλληλουχίες του υπότυπου D με πολύ χαμηλή τιμή bootstrap 11% στο NJ δέντρο και θεωρήθηκε ως μη ταξινομημένη. Από το 3'-end της IN έως το 3'-end του *vpr* (4800-5700 nt) το γονιδίωμα ανήκει στον υπότυπο G με τιμή bootstrap 97%. Ακολούθως, το γονιδίωμα μετατοπίστηκε πίσω στον υπότυπο D (5700-6300 nt) με τιμή bootstrap 81% και το επόμενο σημείο ανασυνδυασμού βρίσκεται στην αρχή του *env*(gp120). Το ακόλουθο μικρό τμήμα των 150 nt ομαδοποιείται με τις αλληλουχίες αναφοράς του υπότυπου G με bootstrap τιμή 86%. Το όγδοο τμήμα (6450-7200 nt) ομαδοποιείται στον υπότυπο D σύμφωνα με το NJ δέντρο και

με τιμή bootstrap 93%, ενώ η επόμενη περιοχή (7200-7600 nt) του *env(gp120)* καθορίστηκε ως μη ταξινομημένη καθώς υπήρχε μικρή ευκρίνεια μεταξύ των υποτύπων D και B, αν και ομαδοποιείται στο NJ δέντρο με τον υπότυπο B με τιμή bootstrap 65%. Το δέκατο τμήμα (7600-8700 nt) που αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή των 2<sup>ov</sup> εξωνίων του *rev* και *tat*, ενδιάμεσα του *env(gp41)* ανήκει στον υπότυπο D με τιμή bootstrap 95%. Η τελευταία περιοχή (8700-8930 nt) είναι μη ταξινομημένη για το λόγο ότι είχε πολύ χαμηλό σήμα στην ανάλυση bootscan και δεν ομαδοποιήθηκε καθαρά στο NJ δέντρο (δεν παρουσιάζεται στο Σχ. 5.B). Η αλληλουχία CY063 είχε σχεδόν ίσα ποσοστά των υποτύπων G και D. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα σημεία αλλαγής του ανασυνδυασμένου στελέχους CY063 αντιστοιχούν στις γονιδιωματικές περιοχές του HIV-1 (5'-end RT, 3'-end RNase H και IN του *pol*, *vpr*, 5'-end gp120, 3'-end gp120 και 3'-end gp41 του *env*), οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως hot spots ανασυνδυασμού (Magiorkinis *et al.*, 2003, Magiorkinis *et al.*, 2008, Fan *et al.*, 2007).

Παράλληλα, έγινε αναζήτηση με το εργαλείο BLAST για πραγματοποίηση μιας συγκριτικής φυλογενετικής ανάλυσης με HIV-1 αλληλουχίες από την HIV βάση δεδομένων Los Alamos. Δεν βρέθηκαν παρόμοια ανασυνδυασμένα στελέχη στα δείγματα από τη βάση δεδομένων, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι αυτή η ανασυνδυασμένη αλληλουχία είναι μια μοναδική ανασυνδυασμένη μορφή. Μια προηγούμενη μελέτη αναφέρθηκε στην ύπαρξη μιας ανασυνδυασμένης αλληλουχίας D/G/D στην περιοχή της πρωτεάσης και του RT (2042-4261 nt) του *pol* από ένα στέλεχος από το Καμερούν (Vergne *et al.*, 2000), αλλά δεν είχε το ίδιο πρότυπο ανασυνδυασμού, όπως αυτό που βρέθηκε σε αυτήν την μελέτη, αφού το στέλεχος CY063 έχει το πρότυπο G/D/G για την ίδια περιοχή. Επιπλέον, ένα στέλεχος από την Πορτογαλία βρέθηκε να έχει τη γενετική δομή *envG-nefD/G* (Parreira *et al.*, 2005), αλλά δεν ταιριάζει με τη δομή *envD/U-nefD/U* του ανασυνδυασμένου στελέχους CY063, όπου U αντιπροσωπεύει μη ταξινομημένη περιοχή (Kousiappa *et al.*, 2009b).

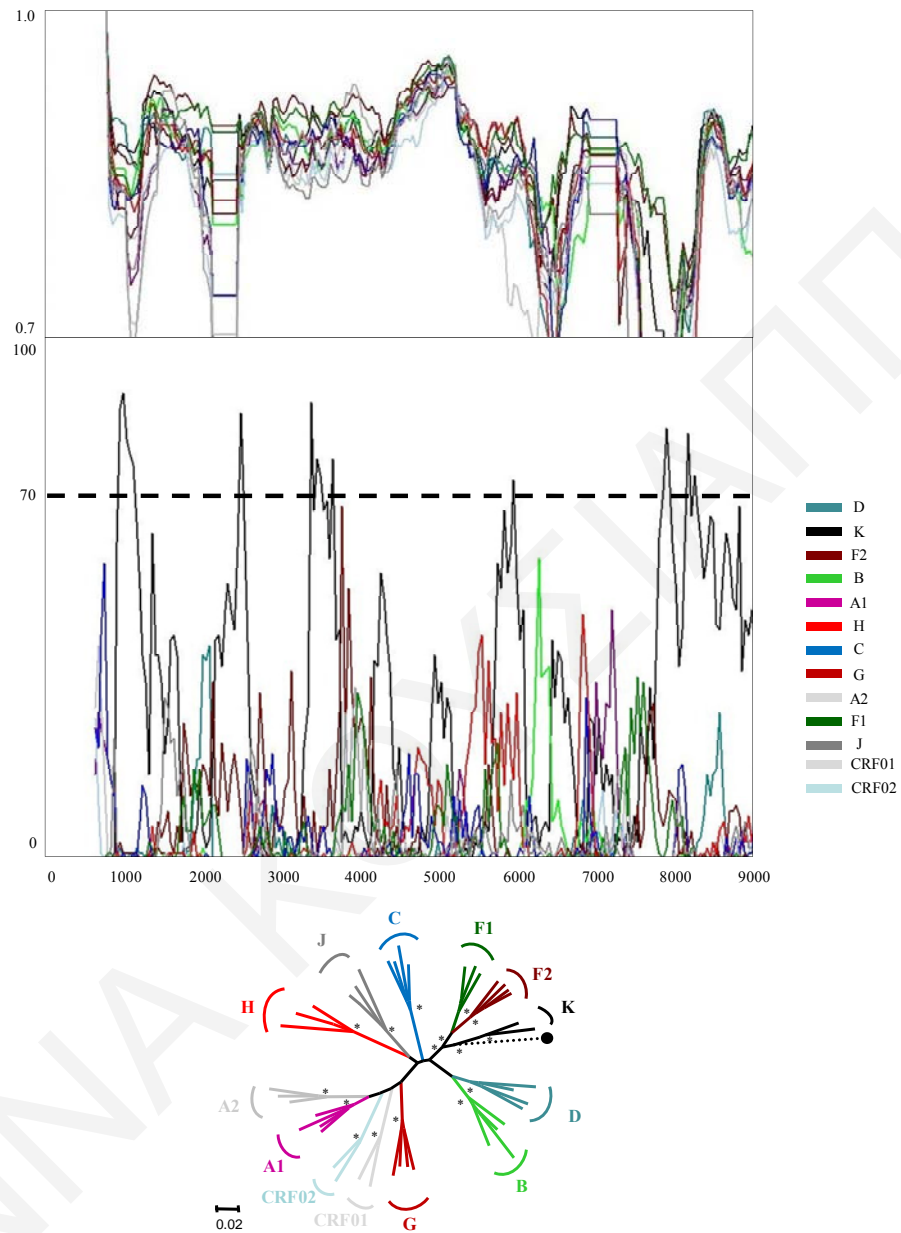
Η ανάλυση ανασυνδυασμού της αλληλουχίας του σχεδόν πλήρους γονιδιώματος του CY090 έδειξε στο διάγραμμα σύγκρισης ομοιότητας (Σχ. 6), να υπάρχουν πολλές περιοχές με ομοιότητα στους υπο-υπότυπους F2 ή F1 κατά μήκος της αλληλουχίας CY090. Η ομοιότητα, όμως με αυτούς τους υπο-υπότυπους δεν είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την ομοιότητα με άλλους υπότυπους. Περαιτέρω ανάλυση της αλληλουχίας CY090 με την bootscan σάρωση κατέδειξε ότι υπάρχει ομαδοποίηση κοντά στον υπότυπο K σε μερικές μικρές γενετικές περιοχές με τιμές bootstrap μεγαλύτερες του



**Σχήμα 5.** Α. Ανάλυση ανασυνδυασμού του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος του στελέχους CY063 σε σύγκριση με στελέχη αναφοράς από όλους τους γνωστούς υπότυπους του HIV-1 της ομάδας M. Το πάνω διάγραμμα δείχνει τις γονιδιακές περιοχές και τα σημεία ανασυνδυασμού του στελέχους CY063 όπως καθορίστηκαν στην ανάλυση. Η απεικόνιση δημιουργήθηκε σύμφωνα με την αρίθμηση κατά το στέλεχος HXB2, χρησιμοποιώντας το εργαλείο Recombination Drawing που είναι διαθέσιμο στην HIV βάση δεδομένων του Los Alamos (Los Alamos HIV and SIV Nomenclature, 2009). Το μεσαίο διάγραμμα παρουσιάζει το διάγραμμα ομοιότητας και το κατώτερο την ανάλυση bootscan, που διενεργήθηκαν όπως περιγράφηκε στη Μεθοδολογία. Ο γ-άξονας στο διάγραμμα ομοιότητας δείχνει την ποσοστιαία ομοιότητα της υπό διερεύνηση αλληλουχίας σε ένα σύνολο αλληλουχιών αναφοράς και στο διάγραμμα bootscan την τιμή bootstrap. Ο x-άξονας παρουσιάζει τη νουκλεοτιδική θέση του HXB2 γονιδιώματος. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει 70% τιμή bootstrap. Β. Φυλογενετική ανάλυση των τμημάτων μεταξύ των σημείων ανασυνδυασμού που αποτελούν το στέλεχος CY063, όπως καθορίστηκε από την ανάλυση ομοιότητας και τη bootscan ανάλυση. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο NJ σε συνδυασμό με την εξελικτική μέθοδο εκτίμησης απόστασης Kimura's 2-parameters και με bootstrap ανάλυση (1000 επαναλήψεις). Όλοι οι γνωστοί HIV-1 (υπο)υπότυποι της ομάδας M χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή δέντρων και παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα. \*, τιμή bootstrap  $\geq 70\%$ . ●, υπό διερεύνηση αλληλουχία του CY063. Η αρίθμηση των τμημάτων του γονιδιώματος είναι βασισμένη στην HXB2 αρίθμηση. Η απόκλιση μεταξύ οποιονδήποτε δύο αλληλουχιών υπολογίζεται με το άθροισμα του οριζόντιου μήκους των κλάδων, χρησιμοποιώντας την κλίμακα κάτω αριστερά.

70%, αλλά στο υπόλοιπο μέρος της ακολουθίας οι bootstrap τιμές σε αυτό τον κλάδο ήταν <70%. Έγινε μια λεπτομερής ανάλυση ομοιότητας και μια bootscan ανάλυση συμπεριλαμβάνοντας τις σχεδόν-πλήρες μήκους αλληλουχίες όλων των γνωστών υπότυπων και CRFs, αλλά δεν υπήρξε καμιά διαφορά (τα στοιχεία αυτά δεν παρουσιάζονται). Το περιορισμένο μέγεθος των λίγων περιοχών που ομαδοποιούνται με τον υπότυπο K στην ανάλυση bootscan και η μπερδεμένη ένδειξη στο διάγραμμα ομοιότητας προτείνει ότι η νέα αλληλουχία δεν ομαδοποιείται με κανένα γνωστό υπότυπο ή CRF. Θέλοντας να μελετήσουμε επιπλέον την αλληλουχία του CY090 κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δέντρο ML, από την σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχία του CY090 και όλων των αλληλουχιών αναφοράς των γνωστών υπότυπων του HIV-1 για να καθοριστεί εάν υπήρχε κάποια ομαδοποίηση (Σχ. 6). Το ML δέντρο επιβεβαίωσε την προηγούμενη ανάλυση, δηλ. ότι βρίσκεται κοντά στον υπότυπο K, αλλά δεν ομαδοποιείται μέσα στον κλάδο αυτό. Ένα HIV-1 στέλεχος που ανήκει στην ομάδα M, και φέρει περιορισμένη ομοιότητα με τον υπότυπο K σε μικρά τμήματα του γονιδιώματος του, ενώ το υπόλοιπο του γονιδιώματος του δεν σχετίζεται με οποιαδήποτε καθιερωμένο HIV-1 υπότυπο, βρέθηκε σε έναν HIV-1 μολυσμένο άντρα ασθενή που ζει στην Ολλανδία ο οποίος πιθανότατα μολύνθηκε με τον ιό στην Αφρική πριν το 1989 μέσω ετεροφυλοφιλικής επαφής (van der Hoek *et al.*, 2007). Εντούτοις, μια φυλογενετική ανάλυση που διεξήχθη χρησιμοποιώντας τις σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδιώματος από τα δύο άγνωστα "K-like" στελέχη, το CY090 από την Κύπρο και το H10986 από την Ολλανδία κατέδειξε ότι δεν είναι συγγενικές HIV-1 αλληλουχίες (Kousiappa *et al.*, 2009b).

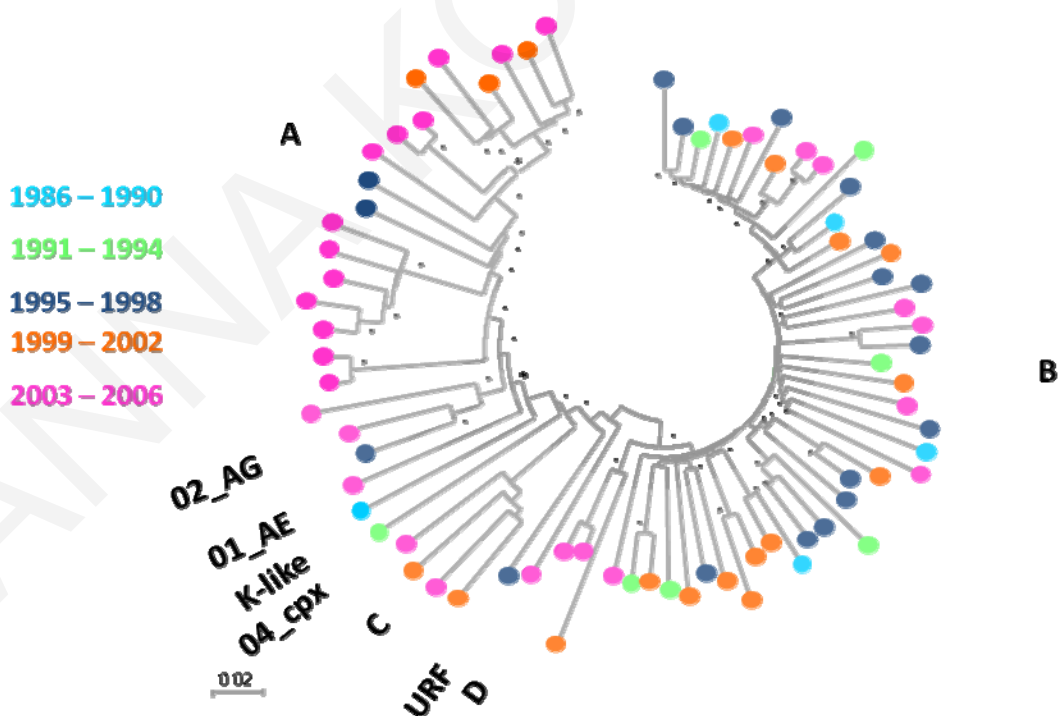




**Σχήμα 6.** Η ανάλυση ανασυνδυασμού του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος του στελέχους CY090 σε σύγκριση με στελέχη αναφοράς από όλους τους γνωστούς υπότυπους του HIV-1 της ομάδας M. Το πάνω διάγραμμα παρουσιάζει το διάγραμμα ομοιότητας του στελέχους CY090 και στη μέση την ανάλυση bootscan, που διενεργήθηκαν όπως περιγράφηκε στη Μεθοδολογία. Ο y-άξονας στο διάγραμμα ομοιότητας δείχνει την ποσοστιαία ομοιότητα της υπό διερεύνηση αλληλουχίας σε ένα σύνολο αλληλουχιών αναφοράς και στο διάγραμμα bootscan την τιμή bootstrap. Ο x-άξονας παρουσιάζει τη νουκλεοτιδική θέση του HXB2 γονιδιώματος. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει 70% τιμή bootstrap. Στο κατώτερο σημείο του σχήματος παρουσιάζεται ένα ML δέντρο της σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίας του CY090 και αλληλουχιών από όλους τους γνωστούς υπότυπους του HIV-1 και δύο CRFs με bootstrap ανάλυση (1000 επαναλήψεις). Όλοι οι γνωστοί HIV-1 (υπο)υπότυποι της ομάδας M που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δέντρου παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα. \*, τιμή bootstrap  $\geq 70\%$ ; •, υπό διερεύνηση αλληλουχία του CY090.

### 7.1.5 Δυναμική της HIV-1 λοίμωξης στην Κύπρο το διάστημα 1986-2006

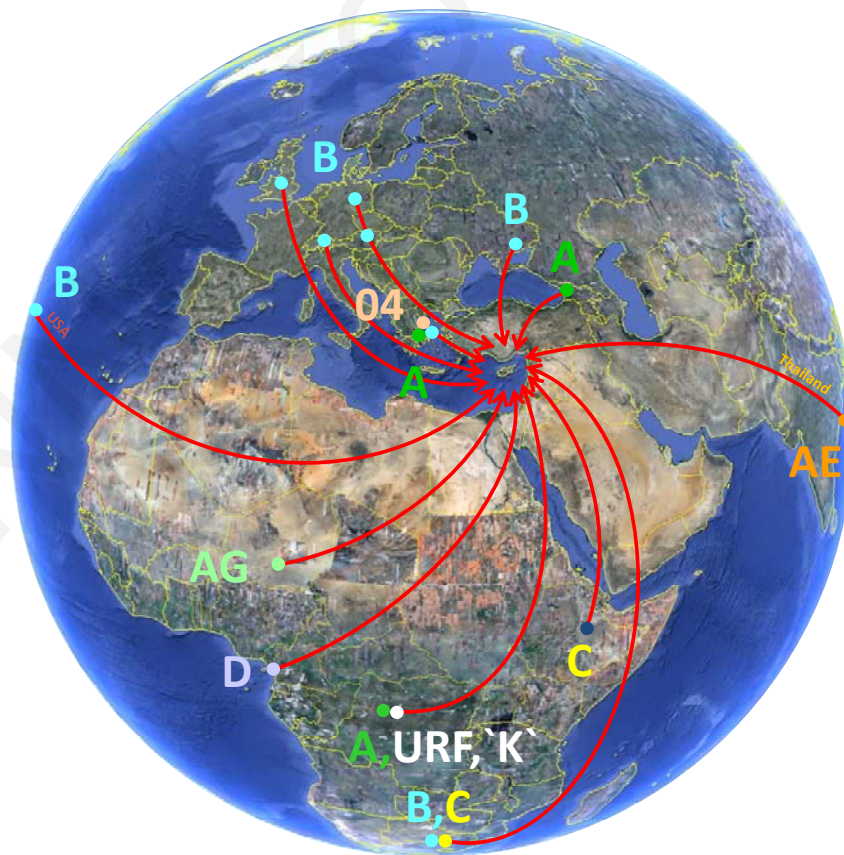
Θέλοντας να παρακολουθήσουμε τη χρονική κατανομή των HIV-1 στελεχών στην Κύπρο τα τελευταία 20 χρόνια κατασκευάσαμε ένα NJ δέντρο χρησιμοποιώντας μόνο τις τελικές αλληλουχίες του σχεδόν-πλήρους γονιδιώματος των 77 HIV-1 στελεχών (Σχ. 7) που αναλύσαμε φυλογενετικά προηγουμένως (Σχ. 4). Ακολούθως παρουσιάσαμε τα διάφορα HIV-1 στελέχη, που διαγνώστηκαν σε μολυσμένους ασθενείς το διάστημα 1986-2006, με διαφορετικό χρώμα ανά τετραετία. Τις πρώτες 3 τετραετίες 1986-1990 που βλέπουμε με γαλάζιο, 1991-1994 με πράσινο και 1995-1998 με μπλε, παρατηρούμε ότι ο υπότυπος B ήταν ο κυρίαρχος υπότυπος, ενώ υπήρξαν και σποραδικά στελέχη του CRF04\_cpx, του άγνωστου K-like στελέχους, του URF G/D, στελέχη του A και του CRF02\_AG. Το διάστημα 1999-2002, που παρουσιάζεται με πορτοκαλί, η εισαγωγή B στελεχών μειώνεται και εμφανίζονται δείγματα των υπότυπων C και A. Την τελευταία τετραετία μελέτης, 2003-2006, που φαίνεται με ροζ, η μείωση στην εισαγωγή B στελεχών είναι κατακόρυφη και υπάρχει σημαντική αύξηση στην εισαγωγή στελεχών του υπότυπου A, ενώ παρατηρείται εισαγωγή στελεχών C, D, CRF02\_AG και CRF01\_AE (Σχ. 7).



**Σχήμα 7.** Φυλογενετικό δέντρο NJ για τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος HIV-1 στελεχών που λήφθηκαν από 77 HIV-1 οροθετικά άτομα στην Κύπρο, βασισμένο στην μέθοδο εκτίμησης απόστασης Kimura-2 parameters. Με μαύρα γράμματα παρουσιάζονται οι καθορισμένοι υπότυποι, όπως περιγράφονται στα Αποτελέσματα. Η απόκλιση μεταξύ οποιονδήποτε δύο αλληλουχιών υπολογίζεται με το άθροισμα του οριζώντιου μήκους των κλάδων, χρησιμοποιώντας την κλίμακα κάτω αριστερά, η οποία αντιπροσωπεύει 2% γενετική απόσταση (0.02 αντικαταστάσεις ανά θέση). Οι αστερίσκοι που υποδεικνύονται σε διάφορους κόμβους του δέντρου είναι bootstrap τιμές αναφοράς μετά από 1000

επαναλήψεις (σημειώνονται μόνο οι τιμές bootstrap  $\geq 50\%$ ). Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται ανά τετραετία, με γαλάζιο το διάστημα 1986-1990, με πράσινο το 1991-1994, με μπλε το 1995-1998, με πορτοκαλί το 1999-2002 και με ροζ το 2003-2006.

Με βάση τα στοιχεία της φυλογενετικής ανάλυσης (Σχ.4) και τα επιδημιολογικά στοιχεία των 77 HIV-1 μολυσμένων ασθενών (Πιν. 4), ένας μεγάλος αριθμός, 35 από τους 77 ασθενείς μολύνθηκαν σε άλλες χώρες και μετέφεραν τον ιό στην Κύπρο τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Στο γεωγραφικό χάρτη (Σχ. 8) παρατηρούμε ότι είχαμε εισαγωγές του υπότυπου B από τις ΗΠΑ και χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Από την Ελλάδα επίσης, εισήρθαν στελέχη του υπότυπου A και CRF04\_crx. Από χώρες της Ανατολικής Ευρώπης εισήρθαν στελέχη του υπότυπου B και A, ενώ από την Θαϊλάνδη εισήρθε το στέλεχος CRF01\_AE. Από την Αφρικανική ήπειρο εισήρθαν στελέχη των υπότυπων C, B, A, το URF, το άγνωστο K-like, D και CRF02\_AG. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό οικονομικών μεταναστών και πολιτικών προσφύγων από την Αφρική και τις Ανατολικο-Ευρωπαϊκές χώρες όπου οι μη-B υπότυποι είναι κυρίαρχοι. Οι υπόλοιπες εισαγωγές προήρθαν από άτομα που ζούσαν ή ταξίδεψαν το παρελθόν στο εξωτερικό.



Σχήμα 8. Γεωγραφικός χάρτης που ενδεικνύει τις διάφορες εισαγωγές HIV-1 στελεχών στην Κύπρο.

## 7.2 Αποτελέσματα μοριακής επιδημιολογικής μελέτης

### 7.2.1 Χαρακτηριστικά HIV-1 οροθετικών

Η δεύτερη ομάδα μελέτης αποτελείται από 37 HIV-1 οροθετικούς ασθενείς και κάθε άτομο αναγνωρίζεται από ένα εργαστηριακό αριθμό αναφοράς που δίνεται διαδοχικά με την άφιξη του δείγματος στο εργαστήριο μετά τη δειγματοληψία, τον κλινικό αριθμό του και την ημερομηνία δειγματοληψίας. Τα υπό μελέτη άτομα αντιπροσωπεύουν το 72% του ολικού αριθμού των νεοδιαγνωσθέντων HIV-1 ατόμων που παρακολουθούνται στη «Γρηγόρειο Κλινική» από το 2003 ως το 2006 στην Κύπρο. Τα γενικά δημογραφικά, επιδημιολογικά και κλινικά γνωρίσματα των υπό μελέτη ατόμων συνοψίζονται στους Πίνακες 5, 6. Μεταξύ των 37 υπό μελέτη ατόμων, οι 29 είναι άντρες και οι 8 γυναίκες, με μέση ηλικία τα 34 έτη. Είκοσι οχτώ ασθενείς έχουν ασυμπτωματική λοίμωξη, ενώ εννέα έχουν συμπτωματική. Δύο ασθενείς έχουν συνλοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και τρία με τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV). Η μέση τιμή μέτρησης των CD4 T-λεμφοκυττάρων ήταν 363 κύτταρα/mm<sup>3</sup> (IQR, 232 έως 651) και η μέση τιμή του HIV ικού φορτίου του πλάσματος ήταν 4.75 log HIV-1 RNA αντίγραφα/ml (IQR, 1.7 έως 4.6). Εικοσιτέσσερις οροθετικοί είναι Κύπριοι, πέντε είναι από την υπο-Σαχάρια Αφρική, πέντε από την Ανατολική Ευρώπη, δύο από τη δυτική Ευρώπη και ένας από την Ασία. Δεκαοκτώ από τους υπό μελέτη οροθετικούς μολύνθηκαν μέσω ομο/αμφιφυλοφιλικής σεξουαλικής επαφής, 17 από ετεροφυλοφιλική επαφή, ένας μολύνθηκε με HIV-1 σε χώρα υψηλής επικράτησης (Μπουρκίνα Φάσο) και για άλλο ένα ο τρόπος μετάδοσης είναι άγνωστος. Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα ποικίλουν μεταξύ των 37 HIV-1 οροθετικών. Από τα 37 άτομα, 16 μολύνθηκαν στην Κύπρο, τέσσερα στην Ελλάδα, ένα στη Γερμανία, ένα στο Η.Β., ένα στις ΗΠΑ, δύο στο Καμερούν, ένα στη Νότιο Αφρική, δύο στο Μπουρκίνα Φάσο, ένα στην Ταϊλάνδη και δύο σε άγνωστο μέρος. Μεταξύ των υπό μελέτη ατόμων υπάρχουν τρία ετεροφυλοφιλικά ζευγάρια, ένα που μολύνθηκε στη Γεωργία, ένα στην Αιθιοπία και ένα, όπου ο άνδρας είναι από το Η.Β. και η γυναίκα από τη Σουηδία, που μένουν μόνιμα στην Κύπρο και το μέρος που έγινε η μόλυνση είναι άγνωστο (Kousiappa *et al.*, 2009a).

**Πίνακας 5.** Κλινικά και επιδημιολογικά γνωρίσματα των HIV-1 ασθενών της 2<sup>ης</sup> υπό μελέτη ομάδας

Ασθενής <sup>a</sup>	Φύλο <sup>b</sup>	Ηλικία (Ετη)	Εβδομάδες από τη διάγνωση <sup>c</sup>	Χώρα προέλευσης <sup>d</sup>	Ομάδα κινδύνου <sup>e</sup>	CD4 (κύτταρα/mm <sup>3</sup> )	HIV-1 RNA Πλάσματος (αντίγραφα x 10 <sup>4</sup> /ml)	Επιδημιολογικές πληροφορίες <sup>f</sup>
CY004	A	47	1	Κύπρος	MSM	363	1.3	M/Δ
CY005	A	32	1	Κύπρος	MSM	357	2.0	M/Δ
CY006	A	33	1	Κύπρος	MSM	593	2.9	M/Δ
CY007	A	36	1	Καμερούν	MSM	842	1.2	Πολιτικός πρόσφυγας από το Καμερούν
CY008	Θ	36	1	Κύπρος	HSX	556	0.2	M/Δ
CY009	A	24	1	Κύπρος	MSM	290	2.7	HBV Θετικός
CY010	A	45	1	Κύπρος	MSM	442	12.0	M/Δ
CY012	A	30	8	Κύπρος	MSM	461	30.0	M/Δ
CY013	A	54	1	Κύπρος	MSM	79	100.3	M/Δ
CY014	A	M/Δ	1	Κύπρος	MSM	671	1.7	M/Δ
CY015	Θ	19	4	Γεωργία	HSX	369	7.7	Πιθανώς μολύνθηκε από τον ετ/λικό σύντροφο CY009
CY016	A	59	3	Κύπρος	HSX	202	17.0	M/Δ
CY035	A	27	2	Κύπρος	MSM	191	55.0	Διάγνωση με <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia
CY048	A	30	1	Μπουρκ.Φάσο	MSM	181	27.0	Πολιτικός πρόσφυγας από το Μπουρκίνα Φάσο
CY057	Θ	28	1	Γεωργία	HSX	M/Δ	2.8	Ετ/κή σύντροφος CY058, HCV Θετικός
CY058	A	34	1	Γεωργία	HSX	M/Δ	3.2	Ετ/κός σύντροφος CY057, HCV Θετικός
CY066	A	28	1	Κύπρος	MSM	M/Δ	0.6	M/Δ
CY073	A	26	1	Πακιστάν	Άγνωστο	425	6.4	Διάγνωση με Tuberculosis lymphadenopathy
CY089	Θ	20	1	Κύπρος	HSX	262	5.6	Πιθανώς μολύνθηκε από τον ετ/λικό σύντροφο CY088
CY109	A	36	12	Κύπρος	MSM	339	2.3	Πιθανώς μολύνθηκε από ομο/λική επαφή στη Γερμανία
CY111	Θ	37	1	Σουηδία	HSX	32	200.0	Ετ/κή σύντροφος CY112
CY112	A	M/Δ	1	H.B.	HSX	292	6.0	Ετ/κός σύντροφος CY111, HCV Θετικός
CY142	A	53	1	Κύπρος	MSM	32	31.0	Διάγνωση με <i>Pneumonia recurrent</i>
CY153	A	20	2	Κύπρος	MSM	223	5.9	Διάγνωση με <i>Pneumonia recurrent</i>
CY158	A	37	1	Μπουρκ.Φάσο	OHPC	78	6.5	Πολιτικός πρόσφυγας από το Μπουρκίνα Φάσο
CY159	A	34	4	Κύπρος	MSM	1390	0.2	M/Δ

Συνεχίζεται

Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

CY166	M	57	4	Κύπρος	HSX	134	100.0	Διάγνωση με Non-Hodgkin's lymphoma
CY169	Θ	33	1	Γεωργία	HSX	72	12.0	Ετ/κή σύντροφος CY171, Σε θεραπεία για λύμφωμα
CY170	A	36	2	Κύπρος	HSX	473	13.0	Διάγνωση με Infectious Mononucleosis and Herpes genital
CY171	A	47	2	Κύπρος	HSX	447	11.0	Ετ/κός σύντροφος CY169, Διάγνωση με Γονόρροια
CY172	A	24	12	Καμερούν	HSX	363	8.8	Πολιτικός πρόσφυγας από το Καμερούν
CY173	Θ	27	4	Ουκρανία	HSX	598	1.8	Μολύνθηκε από τον ετ/λικό σύντροφο CY170, 6 μήνες πριν
CY175	A	30	8	Κύπρος	HSX	320	1.2	Ετ/κός σύντροφος CY176
CY176	Θ	24	4	Αιθιοπία	HSX	595	2.1	Ετ/κή σύντροφος CY175
CY177	A	47	8	Κύπρος	MSM	641	4.7	HBV Θετικός
CY178	A	42	1	Κύπρος	MSM	785	0.1	M/Δ
CY179	A	36	2	Κύπρος	HSX	498	3.3	M/Δ

<sup>a</sup> Υποδεικνύει τον εργαστηριακό κωδικό των υπό μελέτη ασθενών.

<sup>b</sup> Θ, θήλυ· A, άρρεν.

<sup>c</sup> Υποδεικνύει το διάστημα μεταξύ του πρώτου γνωστού θετικού HIV τεστ αντισώματος και της δειγματοληψίας.

<sup>d</sup> Χώρα γεννήσεως των υπο μελέτη ατόμων.

<sup>e</sup> MSM, άντρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άντρες· HSX, ετεροφυλοφιλική επαφή· OHPC, προέλευση από χώρα υψηλού κινδύνου.

<sup>f</sup> Οι πληροφορίες δόθηκαν από τα υπό μελέτη άτομα. M/Δ, Μη Διαθέσιμο· HBV, Ιός Ηπατίτιδας Β· HCV, Ιός Ηπατίτιδας C.

**Πίνακας 6.** Χαρακτηριστικά των δειγμάτων της 2<sup>ης</sup> υπό μελέτη ομάδας

<i>Χαρακτηριστικά<sup>a</sup></i>	<i>Ασθενείς (N = 37)</i>
<b>Φύλο (%)</b>	
Άρρεν	29 (78)
Θήλυ	8 (22)
<b>Ηλικία (έτη)<sup>b</sup></b>	
Μέση (IQR)	34 (27-42)
<b>Περιοχή Προέλευσης (%)</b>	
Κύπρος	24 (65)
Δυτική Ευρώπη	2 (5)
Ανατολική Ευρώπη	5 (14)
Υπο-Σαχάρια Αφρική	5 (14)
Ασία	1 (3)
<b>Τρόπος μόλυνσης (%)</b>	
MSM	18 (49)
HSX	17 (46)
OHPC	1 (3)
M/Δ	1 (3)
<b>CDC αριθμός (%)</b>	
A	28 (76)
B	3 (8)
C	6 (16)
<b>HIV-RNA πλάσματος (log copies/ml)</b>	
Μέση (IQR)	4,75 (4.3-5.1)
<b>CD4 μέτρηση (κύτταρα/ml)<sup>c</sup></b>	
Μέση (IQR)	363 (199-565)
<b>Υπότυπος (%)</b>	
A	14 (38)
B	13 (35)
C	5 (13)
D	1 (3)
CRF01_AE	1 (3)
CRF02_AG	3 (8)
<b>Συνλοίμωξη (%)</b>	
HBV	2 (5.4)
HCV	3 (8.1)

<sup>a</sup> IQR, interquartile εύρος

<sup>b</sup> Πληροφορίες διαθέσιμες για 35 ασθενείς.

<sup>c</sup> Πληροφορίες διαθέσιμες για 34 ασθενείς.

### 7.2.2 PCR και αλληλούχιση των δειγμάτων

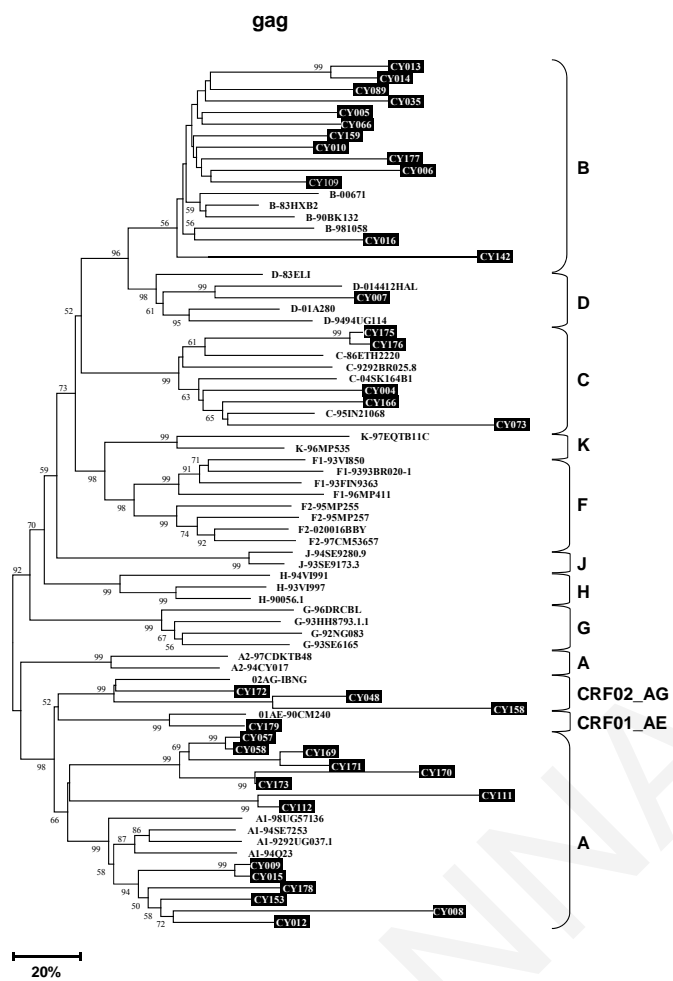
Τα μη καλλιεργημένα PBMCs και το πλάσμα όλων των ατόμων ήταν θετικά στον ιό HIV-1 κατά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού των περιοχών *gag*, *pol*(PR και RT) και *env*(*gp160*) με τις μεθόδους nested PCR και nested RT-PCR. Το θετικό αποτέλεσμα του PCR σε συνδυασμό με την εκτενή γενετική ποικιλομορφία των HIV-1 στελεχών, όπως περιγράφεται στη φυλογενετική ανάλυση (Σχ. 9), καταδεικνύουν ότι οι σχεδιασμένοι PCR εκκινητές (Πίν. 1) είναι κατάλληλοι για διάφορα στελέχη της ομάδας M. Σε όλα τα HIV-1 PCR προϊόντα της δεύτερης αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις κυκλικής αλληλούχισης χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές αλληλουχίας για την κάθε περιοχή (Πίν. 1, Σχ. 1D). Η τελική DNA αλληλουχία από το *gag* και το *pol*(PR και RT) πάρθηκαν από άμεση αλληλούχιση. Η περιοχή *env*(*gp160*) σε 10 ασθενείς πάρθηκε από άμεση αλληλούχιση και σε 15 ασθενείς από αλληλούχιση κλωνοποιημένων *env*(*gp160*) PCR προϊόντων. Σε επτά ασθενείς δεν πάρθηκαν *env*(*gp160*) αλληλουχίες λόγω της αποτυχίας των εκκινητών να δεσμεύσουν τη DNA μήτρα (Kousiappa *et al.*, 2009a).

### 7.2.3 Φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων

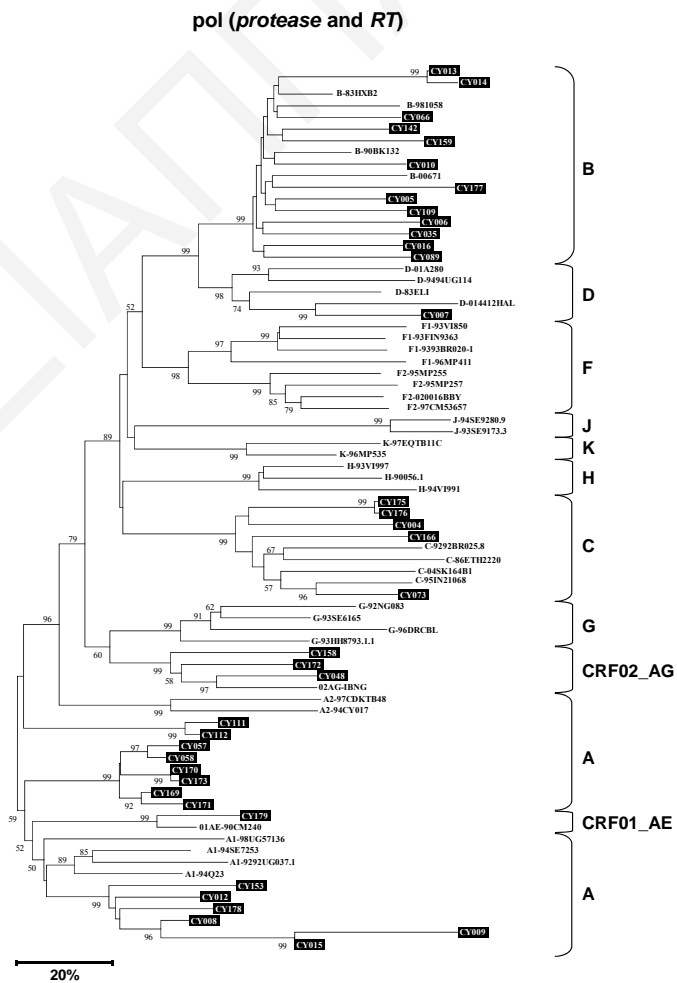
Η μοριακή επιδημιολογική σχέση μεταξύ των DNA αλληλουχιών που κωδικοποιούν τις περιοχές *gag*, *pol*(PR και RT) και *env* αναλύθηκε με νουκλεοτιδική φυλογενετική ανάλυση. Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, αντίστοιχα για κάθε ιική περιοχή για τα 37 υπό μελέτη δείγματα, με βάση τις 37 DNA *gag* και *pol*(PR και RT) αλληλουχίες και τις 30 *env*(*gp160*) αλληλουχίες (Σχ. 9. Α, Β, και Γ, αντίστοιχα). Εκτός από τις υπό ανάλυση αλληλουχίες, 37 αλληλουχίες που έχουν ήδη αλληλουχηθεί από HIV-1 στελέχη και προέρχονται από διάφορα μέρη ανά το παγκόσμιο, και καλύπτουν τους εννέα γνωστούς υπότυπους (Α-Κ) και δύο CRFs (CRF01\_AE, CRF02\_AG) συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Σύμφωνα με τα κατασκευασμένα NJ φυλογενετικά δέντρα που παρουσιάζονται στο Σχ. 9, προσδιορίστηκαν τέσσερις ευδιάκριτοι υπότυποι (Α, Β, C και D) και δύο CRFs (CRF01\_AE και CRF02\_AG) της ομάδας M για τις αλληλουχίες από την Κύπρο: στον υπότυπο Α ταξινομούνται 14 αλληλουχίες· στον υπότυπο Β, 13 αλληλουχίες· στον υπότυπο C, 5 αλληλουχίες· στον υπότυπο D και CRF01\_AE από μία αλληλουχία και στη CRF02\_AG, τρεις αλληλουχίες. Στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με βάση τις *env*(*gp160*) αλληλουχίες (Σχ. 9C), υπολείπονται επτά αλληλουχίες οι οποίες ταξινομήθηκαν στα δέντρα για τις αλληλουχίες του *gag* και του *pol* ως εξής: μία αλληλουχία στον υπότυπο Α, πέντε αλληλουχίες στον υπότυπο Β και μια στη CRF02\_AG (Kousiappa *et al.*, 2009a).

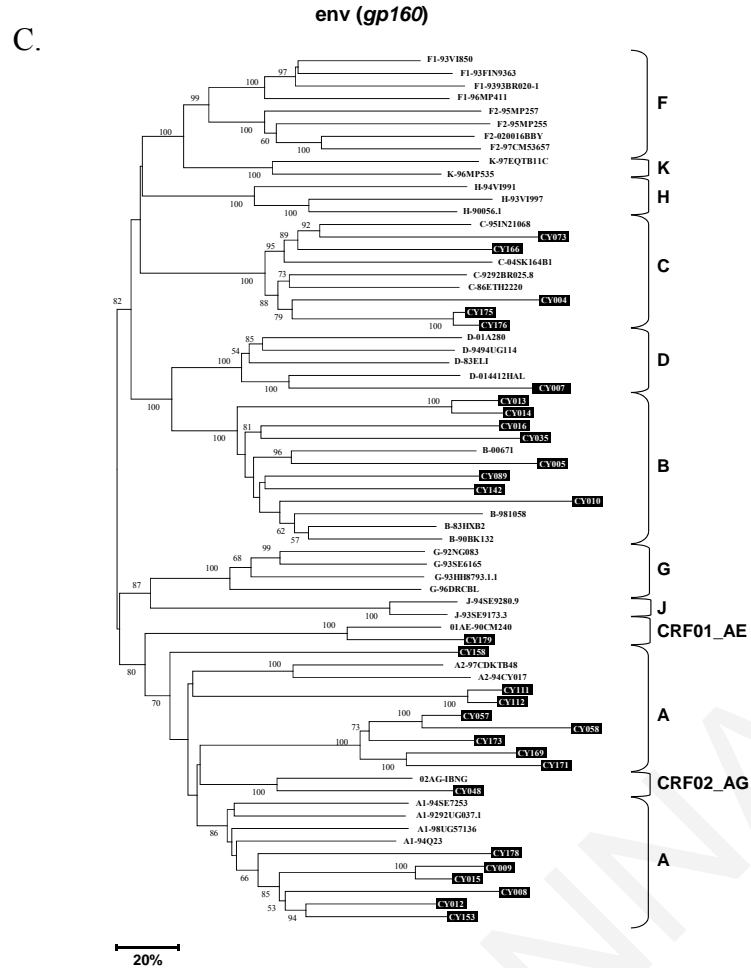


A.



B.





**Σχήμα 9.** NJ φυλογενετικά δέντρα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της περιοχής *gag* (A), *pol*(PR και RT) (B) και *env*(gp160) (C) των HIV-1 στελεχών που λήφθηκαν από νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που δεν παίρνουν αντιρετροϊκή θεραπεία στην Κύπρο, βασισμένο στην μέθοδο εκτίμησης απόστασης Kimura-2 parameters. Τα δέντρα περιλαμβάνουν αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες αναφοράς των υποτύπων του HIV-1 (A-K) και των CRF01\_AE και CRF02\_AG (φαίνονται με μαύρα γράμματα). Οι αριθμοί που υποδεικνύονται σε διάφορους κόμβους του δέντρου είναι bootstrap τιμές αναφοράς μετά από 100 επαναλήψεις (σημειώνονται μόνο οι τιμές bootstrap  $\geq 50\%$ ). Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται σε μαύρα κουτιά με το πρόθεμα CY για Κύπρο και τους αριθμούς που ακολουθούν να δείχνουν τον εργαστηριακό αριθμό του κάθε δείγματος. Η απόκλιση μεταξύ οποιονδήποτε δύο αλληλουχιών υπολογίζεται με το άθροισμα του οριζόντιου μήκους των κλάδων, χρησιμοποιώντας την κλίμακα κάτω αριστερά. Οι παρενθέσεις στη δεξιά πλευρά των δέντρων δείχνουν τους καθορισμένες υπότυπους, όπως περιγράφονται στα Αποτελέσματα.

Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι οι υπο μελέτη αλληλουχίες έχουν μια σχετικά υψηλή μέση ενδο-υποτυπική (intrasubtype) γενετική ποικιλομορφία στους υπότυπους A (38%), B(35%), C(13%) και CRF02\_AG(8%). Η μέση (εύρος) ενδο-υποτυπική νουκλεοτιδική απόκλιση μεταξύ των αλληλουχιών του gag μέσα στον υπότυπο A είναι 11.0% (0.6-27.9%), μέσα στον υπότυπο B, 10.0% (3.2-16.2%)· 10.3% (1.0-14.0%) μέσα στον υπότυπο C και μέσα στη CRF02\_AG, 12.6% (8.1-14.9%). Αυτά τα στοιχεία προτείνουν ότι οι υπότυποι A, B, C και CRF02\_AG μεταδόθηκαν στη Κύπρο κατά τη διάρκεια της περιόδου που μελετούμε (2003 ως 2006) από πολλαπλές πηγές, το οποίο είναι σύμφωνο με τα επιδημιολογικά στοιχεία των υπό μελέτη ατόμων που παρουσιάζονται στον πίνακα 5 (Kousiappa *et al.*, 2009a).

#### 7.2.4 Γενοτυπική ανθεκτικότητα στα αντιρετροϊκά φάρμακα

Δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις που να σχετίζονται με πρωτοταγή ανθεκτικότητα στους PI αναστολείς στον υπο μελέτη πληθυσμό των 37 HIV-1 οροθετικών ατόμων οι οποίοι δεν υποβλήθηκαν ποτέ σε αντιρετροϊκή αγωγή. Όμως, σε 36 άτομα (97%) παρατηρήθηκε ένας μικρός αριθμός PI-συσχετιζόμενων μεταλλάξεων, όπως L10I, K20M/R, M36I, L63P/F/S/A/V, A71V/T και V77I. Η αμινοξική αντικατάσταση M36I βρέθηκε μέσα σε όλα τα δείγματα που ανήκουν σε μη-B υπότυπους, ενώ οι αμινοξικές αντικαταστάσεις K20R και L10I παρατηρήθηκαν στο 14% και 9%, αντίστοιχα, των αλληλουχιών του υπότυπου A. Επιπλέον, οι αμινοξικές αντικαταστάσεις L63P και A71V βρέθηκαν σε 17 αλληλουχίες (46%) του υπότυπου B και η αλλαγή V77I σε 12 αλληλουχίες (31%) (Kousiappa *et al.*, 2009a).

Μεταλλάξεις που σχετίζονται με τους νουκλεοσιδικούς αναστολείς της RT (NRTIs) βρέθηκαν σε μια αλληλουχία του υπότυπου B (μετάλλαξη M41L/M στον ασθενή CY010) και σε μια αλληλουχία του υπότυπου A (μετάλλαξη M184V στον ασθενή CY169) (Kousiappa *et al.*, 2009a). Η μετάλλαξη M41L συσχετίζεται με πιθανή χαμηλή ανθεκτικότητα (PLR) στο didanosine, abacavir και tenofovir και χαμηλή ανθεκτικότητα (LR) στο zidovudine και stavudine, ενώ η μετάλλαξη M184V συνδέεται με υψηλή ανθεκτικότητα (HR) στο lamivudine και το emtricitabine και PLR για το abacavir (Johnson *et al.*, 2007). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία μετάλλαξη που σχετίζεται με ανθεκτικότητα στους μη-νουκλεοτιδικούς αναστολείς της RT (NNRTI) σε μια αλληλουχία του υπότυπου C (μετάλλαξη V179D στο στέλεχος CY004). Η μετάλλαξη V179D συνδέεται με χαμηλό επίπεδο ανθεκτικότητας (περίπου 2-φορές) στα nevirapine,

delavirdine και efavirenz και ασκεί επίδραση στην ευαισθησία του etravirine όταν συνυπάρχει με άλλες μεταλλάξεις (Johnson *et al.*, 2007, Parkin *et al.*, 2006).

Οι μεταλλάξεις της περιοχής gag(cleavage sites) αναλύθηκαν σε 37 gag αλληλουχίες, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Maguire *et al.*, 2002, Nijhuis *et al.*, 2007). Η γενετική ανάλυση των gag αλληλουχιών αποκάλυψε ότι δύο αλληλουχίες του υπότυπου B (CY013 και CY014) και μια αλληλουχία του υπότυπου A (CY178) είχαν την αμινοξική αλλαγή P453L (cleavage site p1/p6) (Kousiappa *et al.*, 2009a). Αυτή η αλλαγή συνδέεται με ανθεκτικότητα στους PI αναστολείς όταν συνυπάρχει με τις μεταλλάξεις της PR στις θέσεις 32, 47, 50, 84 και 90 (Verheyen *et al.*, 2006, Maguire *et al.*, 2002, Carrillo *et al.*, 1998). Σε κανένα δείγμα δεν υπήρχαν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις της PR.

Η ανάλυση για εύρεση ανθεκτικών μεταλλάξεων στον αναστολέα σύντηξης πραγματοποιήθηκε σε 33 αλληλουχίες ενν, όπως περιγράφεται προηγουμένως (Johnson *et al.*, 2007, Van Laethem *et al.*, 2005). Οι ενν αλληλουχίες τεσσάρων ασθενών (CY006, CY066, CY109 και CY177) αποκλείστηκαν λόγω της ελλιπούς τους αλληλουχίσης. Η γενετική ανάλυση της δομής HR1 της gp41 αποκάλυψε ότι μια αλληλουχία του υπότυπο B (CY005) είχε την αμινοξική αντικατάσταση L44M (Kousiappa *et al.*, 2009a), η οποία συνδέεται με ανθεκτικότητα στον αναστολέα σύντηξης enfuvirtide (T20) (Johnson *et al.*, 2007, Van Laethem *et al.*, 2005). Η συγκεκριμένη αντικατάσταση θέσης προκαλεί μείωση κατά δύο φορές στην ευαισθησία στο T20 (Greenberg *et al.*, 2004).

#### 7.2.4 Ανάλυση αλληλουχίας της V3 θηλιάς

Διενεργήθηκε στοίχιση των προβλεπόμενων αμινοξικών αλληλουχιών της V3 θηλιάς της περιοχής ενν(gp120) 36 δειγμάτων που προέρχονταν από νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς Κύπρο που δεν υποβλήθηκαν προηγουμένως σε αντιρετροϊκή θεραπεία. Για τη σύγκριση, οι υπο ανάλυση αλληλουχίες στοιχίστηκαν επίσης, με την αλληλουχία αναφοράς κάθε υπότυπου. Οι θέσεις των δύο καταλοίπων κυστεΐνης στην αρχή και το τέλος της V3 θηλιάς (που αντιστοιχούν στις αμινοξικές θέσεις 296 και 331 της gp120 του στελέχους HXB2) ήταν συντηρημένες, προτείνοντας ένα παρόμοιο δίπλωμα αυτής της περιοχής της πρωτεΐνη του φακέλου. Οι τριάντα μια από τις V3 αλληλουχίες φέρουν 35 αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ πέντε αλληλουχίες (CY111, CY112, CY016, CY089 και CY166) φέρουν 34 κατάλοιπα λόγω έλλειψης της γλυκίνης (G) στη θέση 24. Όλες οι αλληλουχίες είχαν μια N-συνδεμένη περιοχή γλυκοζυλίωσης στο N-τελικό άκρο της V3 θηλιάς.

Σε εννέα από τις 13 αλληλουχίες του υπότυπου B υπήρχε το τετραπεπτιδικό μοτίβο GPGR στην κορυφή της V3 θηλιάς, το οποίο είναι το πιο κοινό μοτίβο που βρίσκεται

ανάμεσα στις αλληλουχίες του υπότυπου B. Εντούτοις, σε δύο αλληλουχίες του υπότυπου B (CY005 και CY089), το πρώτο G στο μοτίβο GPGR αντικαταστάθηκε από την αλανίνη (A), ένα άλλο μη πολικό αμινοξύ μετατρέποντας το στο μοτίβο APGR. Σε άλλες τρεις αλληλουχίες B (CY010, CY016 και CY035) η αργινίνη (R) στο μοτίβο GPGR αντικαταστάθηκε από σερίνη (S), ένα πολικό αμινοξύ· αλανίνη (A), ένα μη πολικό αμινοξύ και λυσίνη (K), ένα βασικό αμινοξύ, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ακολουθία CY159 του υπότυπου B είχε το μοτίβο RPRK. Τα τετραπεπτιδικά μοτίβα στην κορυφή της θηλιάς των 14 ακολουθιών του υπότυπου A ήταν ιδιαίτερα ετερογενείς, περιέχοντας 10 GPGQ, ένα RPGQ και δύο GPRK. Οι πέντε αλληλουχίες του υπότυπου C είχαν το μοτίβο GPGQ, όπως και η αλληλουχία του υπότυπου D και οι αλληλουχίες CRF01\_AE και CRF02\_AG (Kousiappa *et al.*, 2009a).

Η πρόγνωση του κυτταρικού τροπισμού χρησιμοποιώντας την αλληλουχία της V3 θηλιάς με τον αλγόριθμο PSSM ανίχνευσε όλους τα ιικά στελέχη ως R5 τροπικά. Ο αλγόριθμος Geno2rheno πρόβλεψε 34 ιικά στελέχη ως R5 και δύο (CY035 και CY111) ως διπλο-τροπικά ή X4, δηλαδή που χρησιμοποιούν το συνυποδοχέα CXCR4. Και οι δύο αλγόριθμοι ήταν σε συμφωνία στην ικανότητά τους να ανιχνεύσουν ή να μην ανιχνεύσουν τους R5 ιούς σε 34 από τις 36 περιπτώσεις (94.5%). Τα δύο δείγματα που ανιχνεύθηκαν ως διπλο-τροπικά ή X4 είχαν μια χαμηλή μέτρηση CD4 κυττάρων και ένα υψηλό ιικό φορτίο, αντίστοιχα (Πίν. 4) (Kousiappa *et al.*, 2009a). Είναι σημαντικό, εντούτοις, να σημειωθεί ότι και οι δύο οι αλγόριθμοι πρόγνωσης του κυτταρικού τροπισμού μπορεί να μην είναι πλήρως συμβατοί με τις αλληλουχίες των μη-B στελεχών (Garrido *et al.*, 2008).

### 7.3 Γενετική ανάλυση γονιδίου IN

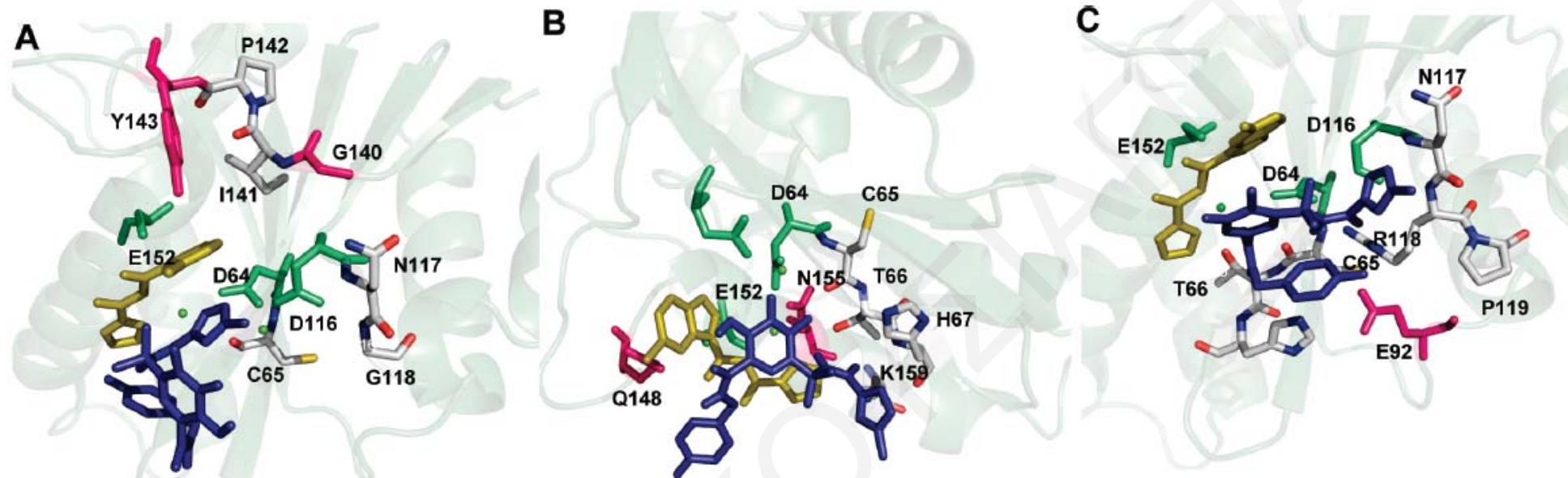
Οι αμινοξικές αλλαγές της πρωτεΐνης IN μελετήθηκαν σε 108 δείγματα, για τα οποία είναι γνωστή η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου της IN και ο υπότυπος. Από τους 108 ασθενείς, οι 28 είναι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί αντιρετροϊκή αγωγή και οι υπόλοιποι 80 είναι χρόνιοι ασθενείς που λάμβαναν ή όχι αγωγή. Κανένας από τους ασθενείς δεν υποβλήθηκε σε θεραπεία με INI. Οι αλληλουχίες των ασθενών ανήκουν σε επτά υπότυπους: 19 στον υπότυπο A, 72 στον υπότυπο B, 11 στον υπότυπο C, μία στον υπότυπο F1, τρεις στον υπότυπο G, μία στη CRF02\_AG και μία στη CRF04\_cpx. Οι αμινοξικές αλληλουχίες της IN των υπότυπων A και C συγκρίθηκαν με την πρότυπη αλληλουχία αναφοράς του υπότυπου B (Loizidou *et al.*, 2009).

Στις αλληλουχίες του υπότυπου A αναγνωρίστηκαν 47 αντικαταστάσεις σε 42 θέσεις και στις αλληλουχίες του υπότυπου C, 32 αντικαταστάσεις σε 29 θέσεις. Το πρότυπο DDE της καταλυτικής δομής και το μοτίβο ψευδάργυρου στη δομή NTD είναι φυλογενετικά συντηρημένα, στοιχεία που συμφωνούν με άλλες μελέτες (Richard & Myers, 2008) και είναι αναμενόμενο από το γεγονός ότι αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα είναι συντηρημένα σε όλα τις ρετροϊκές ιντεγκράσες. Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις με παράγοντες του κυττάρου ξενιστή, τα αμινοξικά κατάλοιπα της CCD δομής της IN που αλληλεπιδρούν με το LEDGF/p75 έχουν χαρτογραφηθεί στις θέσεις R166, D167, Q168, A169, E170 και H171. Τα κατάλοιπα αυτά είναι συντηρημένα στους HIV-1 ασθενείς που μελετήθηκαν, εκτός της θέσης H171. Στο 10% των στελεχών, υπήρχε η αμινοξική αλλαγή H171Y που αναγνωρίστηκε ως φυσικός πολυμορφισμός της IN του υπότυπου A. Αυτή η αλλαγή αντιπροσωπεύει μια μη συντηρημένη αλλαγή από ένα βασικό σε ένα πολικό αμινοξύ, η επίδραση του οποίου πρέπει να καθοριστεί πειραματικά σε στελέχη του υπότυπου A. Από τα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής CTD που είναι σημαντικά για τη δέσμευση του DNA, η αμινοξική αλλαγή L234I εμφανίστηκε ως φυσικός πολυμορφισμός σε όλους τους υπότυπους και η επίδραση της φαίνεται να είναι ελάχιστη (Loizidou *et al.*, 2009).

Η ανθεκτικότητα προς το raltegravir δημιουργείται μέσω τριών διαφορετικών μονοπατιών, τα Q148H/K/R και N155H (Johnson *et al.*, 2007), και το λιγότερο συχνό Y143H (Hazuda *et al.*, 2007). Οι δευτερεύουσες μεταλλάξεις που συσχετίζονται με τα μονοπάτια ανθεκτικότητας είναι οι L74M, E138A, E138K, G140S, E92Q, T97A, G163K/R, V151I, D232N και E157Q (Malet *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας που αναγνωρίστηκαν για άλλους Ήs κατά την κλινική και προκλινική τους ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένου και του elvitegravir, είναι οι T66I/A/K, V72I, F121Y, T125K, G140C, S147G, Q148H, V151I, S153Y, M154I και S230R (Hazuda *et al.*, 2000, Fikkert *et al.*, 2003, Hazuda *et al.*, 2004). Δεν παρατηρήθηκε καμία από τις μεταλλάξεις που συνδέονται με την πρωταρχική ανθεκτικότητα, όπως οι N155H, Q148H/K/R, Y143, T66 και E92. Η ποικιλομορφία ήταν μεγαλύτερη στα αμινοξικά κατάλοιπα που λαμβάνουν μέρος στη δημιουργία δευτερεύουσας ανθεκτικότητας. Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις V72I, L74I, T125A και M154I προσδιορίστηκαν ως φυσικοί πολυμορφισμοί του υπότυπου A με το 16% να φέρει την αλλαγή V72I, το 45% την L74I, το 100% την T125A και το 0.5% τη M154I, ενώ στον υπότυπο C το 64% έφερε την αλλαγή V72I και το 91% την T125A. Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις V72I και T125A βρίσκονταν επίσης στις αλληλουχίες των υπότυπων F1, G, CRF02\_AG και επιπρόσθετα η T125A στο CRF04.

Επίσης, παρουσιάστηκε ποικιλομορφία στη θέση G140 σε μια αλληλουχία του υπότυπου C και στη θέση E157 σε δύο αλληλουχίες του υπότυπου B (Loizidou *et al.*, 2009).

Σε μια δομική υπολογιστική ανάλυση της δέσμευσης του raltegravir στην IN, εντοπίστηκαν δύο διαφορετικές μορφές του τρόπου δέσμευσης του raltegravir στο ενεργό κέντρο της IN και η διαφορά έγκειται στη φύση των καταλοίπων με τα οποία αλληλεπιδρά (Σχ. 10.A, B). Στην πρώτη μορφή το raltegravir τοποθετείται στην περιοχή της καταλυτικής τριάδας DDE, τη θέση Y143 που συνδέεται με πρωτοταγή ανθεκτικότητα, τη G140 που συνδέεται με δευτεροταγή και επιπλέον τα κατάλοιπα στις θέσεις P142, I141, G118, N117 και C65 (Σχ. 10.A). Στην δεύτερη μορφή το raltegravir τοποθετείται στην περιοχή της καταλυτικής τριάδας DDE, στις θέσεις N155, Q148 που συνδέονται με πρωτοταγή ανθεκτικότητα και επιπλέον τα κατάλοιπα στις θέσεις K159, H67, T66 και C65 (Σχ. 10.B). Η ύπαρξη δύο τρόπων δέσμευσης του raltegravir μπορεί να δώσει μια εξήγηση της ύπαρξης διαφορετικών οδών ανθεκτικότητας. Γνωρίζοντας τα δεδομένα αυτά, διερευνήσαμε ανά υπότυπο τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην περιοχή δέσμευσης του raltegravir για το ενδεχόμενο ύπαρξης μεταλλάξεων στις 108 αλληλουχίες της IN που μελετήσαμε. Βρέθηκαν δύο αντικαταστάσεις σε μία αλληλουχία του υπότυπου C, η G118R και η G140R. Με βάση τα τελευταία δεδομένα της γενετικής ανάλυσης, έγινε μια δεύτερη δομική υπολογιστική ανάλυση. Εξετάστηκαν οι πιθανές επιπτώσεις από αυτές τις αντικαταστάσεις ως προς τη σύνδεση του raltegravir. Δημιουργήθηκε ένα *in silico* μοντέλο της μεταλλαγμένης IN-DNA που περιλαμβάνει τα πολυμορφικά κατάλοιπα I60V, F100Y, L101I, T112V, G118R, S119P, K136Q, G140R, E198D, και V201I του συγκεκριμένου στελέχους του υπότυπου C και δεσμεύθηκε το raltegravir. Το raltegravir αλληλεπίδρασε με τις θέσεις N155, P119, R118, N117, E92, H67, T66, και C65 και την τριάδα DDE (Σχ. 10.C). Αυτή η παρατήρηση δηλώνει ότι τα στελέχη με μεταλλάξεις σε βασικά αμινοξέα της IN μπορεί να οδηγήσουν σ' ένα μοναδικό τρόπο δέσμευσης του RAL (Loizidou *et al.*, 2009).



**Σχήμα 10.** Δομικές δεσμεύσεις του raltegravir στο ενεργό κέντρο της IN του HIV-1. Ενδεικνύονται, η καταλυτική τριάδα DDE (πράσινο χρώμα), τα αμινοξέα που σχετίζονται με τη δημιουργία ανθεκτικότητας στο raltegravir (κόκκινο χρώμα), τα υπόλοιπα αμινοξέα με 15 Å απόσταση από τη βάση του raltegravir (γκρίζο χρώμα), ο αναστολέας 5CITEP (πορτοκαλί χρώμα) και το raltegravir (μπλε χρώμα). Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  παρουσιάζονται ως πράσινες σφαίρες. **(Α)** Δέσμευση raltegravir στο ενεργό κέντρο IN στελέχους του υπότυπου B και αλληλεπίδραση με το κατάλοιπο στη θέση Y143. **(Β)** Δέσμευση raltegravir στο ενεργό κέντρο IN στελέχους του υπότυπου B και αλληλεπίδραση με το κατάλοιπο στη θέση N155/Q148. **(C)** Δέσμευση raltegravir στο ενεργό κέντρο IN στελέχους του υπότυπου C και αλληλεπίδραση με το μεταλλαγμένο κατάλοιπο στη θέση R118.



## Κεφάλαιο 8. Συζήτηση Αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα

Η παρούσα γενετική μελέτη παρέιχε ένα πολύ ενδιαφέρον πλαίσιο για την παρακολούθηση της εξέλιξης του ιού HIV-1 στην Κύπρο, αφού μελετήθηκε λεπτομερώς η γενετική ετερογένεια ικών στελεχών σε οροθετικούς που παρακολουθούνται στην κλινική αναφοράς για το AIDS στην Κύπρο. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τρεις ομάδες ικών στελεχών, η πρώτη περιλαμβάνει δείγματα οροθετικών που έχουν διαγνωσθεί από το 1986 μέχρι το 2006, που λαμβάνουν ή όχι αντιρετροϊκή θεραπεία και η δεύτερη περιλαμβάνει δείγματα νεοδιαγνωσθέντων οροθετικών που διαγνώστηκαν το διάστημα 2003-2006 και δεν λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία κατά τη λήψη του δείγματος. Οι δύο ομάδες ικών στελεχών που μελετήθηκαν είναι ενδεικτικές της γενετικής διασποράς του ιού HIV-1 στην Κύπρο και του καθορισμού της δυναμικής της επιδημίας, ενώ επίσης είναι αντιπροσωπευτικές για τη διερεύνηση της μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών στα αντιρετροϊκά φάρμακα και τη γενοτυπική πρόγνωση τροπισμού. Οι προερχόμενες από μη καλλιεργημένα PBMCs προϊκές DNA αλληλουχίες ή από το πλάσμα RNA αλληλουχίες, που αναλύθηκαν στο διάστημα 2004-2006 από μία μόνο δειγματοληψία, είναι αντιπροσωπευτικές των ενεργά αναδιπλασιαζόμενων ικών πληθυσμών. Με τη διατριβή αυτή εγκαθιδρύεται μια βάση δεδομένων για την παρακολούθηση της HIV-1 λοίμωξης στην Κύπρο που περιλαμβάνει δεδομένα για τα HIV-1 στελέχη που ανιχνεύθηκαν στην Κύπρο τα τελευταία είκοσι χρόνια και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για τη διενέργεια άλλων μελετών.

### 8.1 Ιική ετερογένεια στην Κύπρο – Αναδρομή είκοσι χρόνων

Στην περίοδο 1986 ως 2006, 287 άτομα αναφέρθηκαν ως μολυσμένοι με HIV-1 στη Κύπρο. Σε αυτήν την μελέτη, ένας γενετικός χαρακτηρισμός και μια φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας τις σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδιώματος 77 HIV-1 οροθετικών που αποτελούν το 38% του γνωστού μολυσμένου πληθυσμού των HIV-1 οροθετικών για να προσδιοριστεί το γενετικό προφίλ των HIV-1 στελεχών που υπάρχουν στην Κύπρο τις προηγούμενες δύο δεκαετίες. Σε σύγκριση με τα στοιχεία που δημοσιεύθηκαν ήδη από τους Kostrikis *et al.*, (Kostrikis *et al.*, 1995) η παρούσα μελέτη προσφέρει περισσότερο αναλυτικές πληροφορίες για τη μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 μόλυνσης στην Κύπρο. Η φυλογενετική ανάλυση του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος των εξεταζόμενων HIV-1 δειγμάτων έδειξε σαφέστατα ότι ο υπότυπος B είναι ο κυρίαρχος υπότυπος και ακολουθείται από του υπότυπους A, C, και

CRF02\_AG, στελέχη που έχουν σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια επιδημία (McCutchan, 2006). Αντιπροσωπευτικά στελέχη από άλλους υπότυπους έχουν επίσης παρατηρηθεί, όπως από τον υπότυπο D και τις μορφές CRF01\_AE και CRF04\_cpx.

Δύο στελέχη που προέρχονται από διαφορετικά HIV-1 οροθετικά άτομα, τα CY063 και CY090, δεν ταξινομήθηκαν σε κάποιο γνωστό υπότυπο και αναλύθηκαν φυλογενετικά περαιτέρω. Το στέλεχος CY063 είχε ένα μοναδικό μωσαϊκό πρότυπο, περιλαμβάνοντας τμήματα από τους υπότυπους D και G, καθώς και μικρές άγνωστες περιοχές. Η καινούρια μορφή URF που βρέθηκε, δημιουργήθηκε πιθανώς από ένα γεγονός ανασυνδυασμού μεταξύ δύο πατρικών ιών: έναν που ανήκει στον υπότυπο G και έναν στον υπότυπο D, στη DRC όπου σημειώθηκε η μόλυνση. Το προφίλ της επιδημίας του HIV-1 στη DRC χαρακτηρίζεται από υψηλή HIV-1 γενετική ποικιλομορφία με ένα μεγάλο αριθμό υποτύπων HIV-1, ανασυνδυαζόμενων μορφών του ιού και στελέχη που ακόμη να ταξινομηθούν (Kita *et al.*, 2004, Vidal *et al.*, 2005, Bikandou *et al.*, 2000, Mokili *et al.*, 1999). Οι υπότυποι D και G υπάρχουν στην DRC, με μια τοπική διακύμανση 5.1-17.4% το 2002 και 6.7-13.1% το 1997 για τον υπότυπο D και 2.3-21.7% το 2002 και 3.3-9.7% το 1997 για τον υπότυπο G (Vidal *et al.*, 2005). Αυτή η νέα και μοναδική ανασυνδυασμένη μορφή του HIV-1 επιδεικνύει μια ανασυνδυασμένη δομή διαφορετική από οποιοδήποτε άλλο CRFs ή URFs έχει αναφερθεί μέχρι τώρα.

Η λεπτομερής φυλογενετική ανάλυση της σχεδόν πλήρους μήκους αλληλουχίας του στελέχους CY090, έδειξε ότι βρίσκεται κοντά στον υπότυπο K, αλλά δεν ομαδοποιείται εντελώς μέσα στον κλάδο αυτό. Το διάγραμμα ομοιότητας και η ανάλυση bootscan αποκάλυψαν ότι το μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας του γονιδιώματος του στελέχους CY090 δεν συνδέεται στενά με τις αλληλουχίες του υπότυπου K ή οποιασδήποτε άλλης γνωστής ακολουθίας HIV (Σχ. 6). Σε μια προηγούμενη μελέτη των Kostrikis *et al.*, (Kostrikis *et al.*, 1995) ένα στέλεχος του ασθενή CY090 (H044) συλλέχθηκε, πολλαπλασιάστηκε στην περιοχή env (C2-V3) και αναλύθηκε με την τεχνική κινητικότητας ετερόδιπλων μορίων (HMA), αλλά δεν μπορούσε να ταξινομηθεί σε οποιοδήποτε HIV-1 γνωστό υπότυπο (A-F) εκείνης της περιόδου. Στη φυλογενετική ανάλυση με HIV-1 υπότυπους αναφοράς (A-F) έδειξε μια σχέση με τις αλληλουχίες του υπότυπου F, την προγονική γενιά του υπότυπου K (Triques *et al.*, 2000), αλλά δεν ομαδοποιήθηκε μέσα στον κλάδο του F. Λόγω του ότι δεν ήταν σαφές εάν εκείνη η αλληλουχία άνηκε σε ένα νέο υπότυπο ή ήταν ανασυνδυασμένη, αναφέρθηκε ως F<sub>CY</sub>. Εντούτοις, στην υποφαινόμενη μελέτη εάν και αναλύθηκε η σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχία του στελέχους, δεν έγινε καμία διευκρίνιση για τη φυλογένεια της. Το

στέλεχος CY090 μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα νέο υπότυπο ή ένα υπο-υπότυπο του υπότυπου K. Χρειάζονται τουλάχιστον τρεις επιδημιολογικά ανεξάρτητοι ασθενείς με μια HIV-1 μορφή που να είναι παρόμοια με το CY090 στέλεχος για να υποδείξουν επισήμως αυτήν την μορφή ως νέο HIV-1 υπότυπο ή υπο-υπότυπο.

Η παρουσία μιας νέας URF και ενός HIV-1 στελέχους που δεν ταξινομείται αυξάνει τη γενετική πολυπλοκότητα της HIV-1 επιδημίας στη Κύπρο. Αυτό δεν είναι σύμφωνο με τη μικρή έκταση της χώρας, το μέγεθος του πληθυσμού και τον τύπο μετάδοσης, αλλά μπορεί να εξηγηθεί από τη μετακίνηση πολλών ανθρώπων προς την Κύπρο, όπως πολλοί ξένοι τουρίστες, ταξιδιώτες, μετανάστες και πολιτικοί πρόσφυγες από αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς επίσης και επαναπατρισθέντες Κυπρίους. Η πλειοψηφία των μη-B υπότυπων που εισέρχονται στην Κύπρο τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οφείλεται σε έναν μεγάλο αριθμό μεταναστών από την Αφρική και τις Ανατολικο-Ευρωπαϊκές χώρες, όπου οι μη-B υπότυποι είναι κυρίαρχοι (McCutchan, 2006). Είναι πολύ γνωστό ότι η Αφρική έχει τη μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία του ιού HIV-1, (Janssens *et al.*, 1997, Parathanasopoulos *et al.*, 2003) και σε αυτήν την μελέτη 12.9% των HIV-1 μολύνσεων συνδέονται με την Αφρική, συμπεριλαμβανομένων και των στελεχών CY063 και CY090. Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί επίσης, σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Alaeus *et al.*, 1997, Palma *et al.*, 2007, Chaix *et al.*, 2003, Maljkovic *et al.*, 2003, Deroo *et al.*, 2002, Esteves *et al.*, 2002, Snoeck *et al.*, 2004), στις χώρες της περιοχής της Μεσογείου (Bouzeghoub *et al.*, 2006, Grossman *et al.*, 2005) και στις Ηνωμένες Πολιτείες (Bennett, 2005). Η παρατήρηση αυτή προτείνει τη διαφοροποίηση των στρατηγικών σχεδιασμών πρόληψης της HIV λοίμωξης που ως τώρα απευθύνονταν προς μερικές ομάδες σε εθνικό επίπεδο, όπως οι ομοφυλόφιλοι, οι ιερόδουλες, οι στρατιώτες, οι μαθητές. Τα προληπτικά μέτρα πρέπει να απευθύνονται επίσης, σε μετανάστες, ταξιδιώτες, τουρίστες και πολιτικούς πρόσφυγες, οι οποίοι αποτελούν μεταναστευτικούς δότες-φυλογενετικών HIV-1 στελεχών στην Κύπρο. Η συνεχής επιτήρηση της γενετικής ετερογένειας την HIV-1 επιδημίας στη Κύπρο, ίσως έχει σημαντικές επιπτώσεις στην διερεύνηση της γενετικής ετερογένειας της HIV-1 λοίμωξης και στην παρακολούθηση της προέλευσης και μετάδοσης HIV-1 στελεχών σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές και πληθυσμούς, ενώ μπορεί να παρέχει στοιχεία για την εξελικτική ιστορία του HIV-1. Παράλληλα, η μελέτη της γενετικής ετερογένειας του ιού HIV-1 θα συμβάλει στη μελλοντική ανάπτυξη εμβολίων έναντι του HIV-1 και στο σχεδιασμό καινούριων φαρμάκων.

Οι μέχρι τώρα μέθοδοι εύρεσης υπότυπων, ίσως δεν είναι αρκετά αποτελεσματικές για να αναδείξουν την αυξανόμενη πολυπλοκότητα των ανασυνδυασμένων γονιδιωμάτων ή των νέων μορφών. Στη μέθοδο που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη εφαρμόσαμε τον χαρακτηρισμό του σχεδόν-πλήρους μήκους γονιδιώματος του HIV-1, μια πολύ ακριβής μέθοδος που μας επιτρέπει να καθορίσουμε τον προσδιορισμό των υποτύπων της ομάδας Μ του ιού HIV-1. Εντούτοις, η μέθοδος πρέπει να βελτιστοποιείται και να αξιολογείται συνεχώς, σε σχέση με τα νέα HIV-1 γενετικά στελέχη ή ανασυνδυασμένες μορφές που κυκλοφορούν στη Κύπρο και στο παγκόσμιο.

## 8.2 Η ιική ετερογένεια ανάμεσα στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς

Στην περίοδο μεταξύ Ιανουαρίου 2003 και Δεκεμβρίου 2006, 52 άτομα αναφέρθηκαν ότι μολύνθηκαν με HIV-1 στη Κύπρο, από τους οποίους το 65% ήταν Κύπριοι και οι υπόλοιποι αλλοδαποί. Σε σύγκριση με τα δεδομένα που δημοσιεύθηκαν ήδη από τους Kostrikis *et al.*, όπου τα δείγματα μελετήθηκαν με τη μέθοδο HMA στην περιοχή ενν(C2-V3), (Kostrikis *et al.*, 1995) η παρούσα μελέτη δίνει περισσότερες και πιο λεπτομερείς πληροφορίες για την επιδημιολογική κατάσταση της HIV μόλυνσης στη Κύπρο αφού μελετά το 72% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών στο χρονικό διάστημα 2003-2006. Η υψηλή γενετική ποικιλομορφία των υποτύπων και των CRFs στις αλληλουχίες των περιοχών που μελετήθηκαν, gag, pol(πρωτεάση και RT) και env(gp160) δεικνύει τις πολλαπλές εισαγωγές των διαφόρων ικών μορφών. Σαφώς, οι υπότυποι A και B είναι οι κυρίαρχοι υπότυποι που ακολουθούνται από τους υπότυπους C, CRF02\_AG, D και CRF01\_AE, ποικιλίες του HIV-1 που εξουσιάζουν την παγκόσμια επιδημία. Η συχνότητα των μη-B υποτύπων που εισήρθαν στη Κύπρο (65%) την περίοδο μελέτης είναι υψηλότερη από αυτή που αναφέρεται μια δεκαετία πριν (40%) (Kostrikis *et al.*, 1995). Το εύρημα αυτό ενισχύει την τάση της αυξανόμενης επικράτησης των μη-B HIV-1 υποτύπων που παρατηρείται ανάμεσα στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς στην Ευρώπη (Wensing *et al.*, 2005). Αυτό το φαινόμενο πιθανόν να οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό μεταναστών από χώρες της Αφρικής και της Ανατολικής Ευρώπης, όπου οι μη-B υπότυποι είναι κυρίαρχοι, κάτι που παρατηρείται επίσης και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Paraskevis *et al.*, 2005, Palma *et al.*, 2007, Alaeus *et al.*, 1997, Chaix *et al.*, 2003, Jorgensen *et al.*, 2003, Maljkovic *et al.*, 2003, Deroo *et al.*, 2002, Esteves *et al.*, 2002, Fleury *et al.*, 2003, Snoeck *et al.*, 2004), χώρες της περιοχής της Μεσογείου (Bouzeghoub *et al.*, 2006, Grossman *et al.*, 2004) και στις Ηνωμένες Πολιτείες (Bennett, 2005, Brodine *et al.*, 1999). Η παρούσα μελέτη αντιπροσωπεύει μια σημαντική συμβολή στη μοριακή επιδημιολογία της HIV-1

μόλυνσης στην Ευρώπη και στην περιοχή της Μεσογείου και στην αξιολόγηση της μετακίνησης ποικίλων στελεχών διαμέσου των γεωγραφικών περιοχών.

### 8.3 Μετάδοση ανθεκτικών μεταλλάξεων και πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης

Σε αυτή τη μελέτη εκτιμήθηκε για πρώτη φορά η επικράτηση και τα πρότυπα των μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα HIV-1 αντιρετροϊκά φάρμακα ανάμεσα στους HIV-1 νεοδιαγνωσθέντες οροθετικούς ασθενείς της Κύπρου, που διαγνώστηκαν κατά την περίοδο 2003-2006 και δεν έλαβαν ποτέ αντιρετροϊκή θεραπεία. Μια νέα μέθοδος που εφαρμόζεται σε στελέχη των υπότυπων B και μη-B, έχει καθιερωθεί επιτυχώς και έχει χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τη μεταδιδόμενη ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Η Κύπρος έχει ένα από τα χαμηλότερα επίπεδα μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας στα φάρμακα (5.4%) ανά το παγκόσμιο (Booth *et al.*, 2007), παρόμοια με τη Βραζιλία, τη Χιλή, την Ιαπωνία, τη Δανία, τη Σλοβενία, και τη Γεωργία (Rios *et al.*, 2007, Jorgensen *et al.*, 2003) (Babic *et al.*, 2006, Gatanaga *et al.*, 2007, Rodrigues *et al.*, 2006, Zarandia *et al.*, 2006) και σε αντίθεση με την Ελλάδα, την Ολλανδία, και την Πορτογαλία (Palma *et al.*, 2007, Paraskevis *et al.*, 2005, Wensing *et al.*, 2003). Δεν παρατηρήθηκε καμία πρωταρχική μετάλλαξη που να προσδίδει ανθεκτικότητα ως προς τους PIs ή NNRTIs στα στελέχη της Κύπρου, αλλά ένα υψηλό ποσοστό δευτερευουσών μεταλλάξεων ήταν υπαρκτό. Δύο ασθενείς (5.4%) είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *RT* που σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία στους NRTIs. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποστηρίζουν την ανάγκη για τον τυπικό έλεγχο ανθεκτικότητας πριν από την έναρξη της αντιρετροϊκής θεραπείας για τους HIV ασθενείς στην Κύπρο, ακολουθώντας τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του IAS-USA, οι οποίες συστήνουν έλεγχο ανθεκτικότητας σε χρόνια μολυσμένους ασθενείς που δεν έλαβαν ποτέ φάρμακα, όταν η τοπική επικράτηση της ανθεκτικότητας είναι 10% και 5%, αντίστοιχα (Hirsch *et al.*, 2003, Vandamme *et al.*, 2004). Η άποψη αυτή υποστηρίζεται επίσης, από την αύξηση στους νεοδιαγνωσθέντες HIV-1 μολυσμένους ασθενείς το 2007 σε σχέση με το συνολικό αριθμό των νεοδιαγνωσθέντων HIV-1 οροθετικών το 2006. Επομένως, πρέπει να υπάρξει μια πιο ενεργός παρακολούθηση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα άτομα που δεν λαμβάνουν θεραπεία, προκειμένου να αναγνωριστεί το συντομότερο δυνατόν, οποιαδήποτε σημαντική αλλαγή που μπορεί να έχει επιπτώσεις στη μελλοντική τους κλινική διαχείριση, καθώς επίσης και για να προγραμματιστεί και να βελτιστοποιηθεί η πρώτη θεραπευτική αγωγή τους και να εκτιμηθεί η διάδοση της ανθεκτικότητας με την πάροδο του χρόνου.

Η γενική συχνότητα εμφάνισης των γενοτυπικών αλλαγών στα αμινοξέα 36-45 της περιοχής της HR1 δομής της gp41 μεταξύ του πληθυσμού των ασθενών που δεν λαμβάνουν T20 είναι χαμηλή, δεικνύοντας μια φυσική συντήρηση του μοτίβου (Greenberg *et al.*, 2004, Roman *et al.*, 2003). Στη μελέτη αυτή τα αμινοξέα της HR1 δομής είναι συντηρημένα σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν στη μελέτη αυτή. Ωστόσο, ένας νεοδιαγνωσθέντας ασθενής από τους 33 (3%) που έλαβαν μέρος, είχε μια από τις γνωστές μεταλλάξεις στην HR1 περιοχή που συσχετίζεται με ανθεκτικότητα στον αναστολέα T20. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ενισχύουν την πρόταση για γενοτυπικό έλεγχο της περιοχής της HR1 δομής του gp41 πριν αρχίσει ο ασθενής τη θεραπεία με T20 και παράλληλα, αποκαλύπτουν ότι οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς της περιόδου 2003-2006 έχουν ένα πολύ ετερογενές γενετικό προφίλ το οποίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πριν την έναρξη της συνδυαστικής αντιρετροϊκής θεραπείας.

#### **8.4 Γενοτυπικός τροπισμός και πρόγνωση της HIV-1 λοίμωξης**

Η πρόγνωση του τροπισμού στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς ήταν σύμφωνη με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου είναι καλά γνωστό ότι οι R5 μορφές είναι υπεύθυνες για την καθιέρωση της αρχικής μόλυνσης (Van Baelen *et al.*, 2007, de Mendoza *et al.*, 2008). Για να ελεγχθεί αποτελεσματικά η αντίδραση των ασθενών στους νέους αναστολείς του συνυποδοχέα, όπως το maraviroc, μια γενοτυπική μέθοδος πρόγνωσης της χρήσης του συνυποδοχέα είναι αναγκαίο να πραγματοποιείται πριν και μετά τη χορήγηση των αναστολέων αυτών σε συνάρτηση με τις μετρήσεις των CD4 κυττάρων και το ιικό φορτίο (Soulie *et al.*, 2008, Van Baelen *et al.*, 2007).

#### **8.5 Σημαντικότητα γενετικών πολυμορφισμών της IN**

Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί για κάθε υπότυπο έχουν συσχετισθεί με μεταλλάξεις ανθεκτικότητας σε φάρμακα και την πρόωρη ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Clemente, 2006, Coman, 2008). Στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην καταλυτική ενεργότητα της IN και αυτά που παίζουν ρόλο στη δέσμευση της IN με τον κυτταρικό παράγοντα LEDGF/p75. Επίσης, εξετάστηκε η ύπαρξη συγκεκριμένων πολυμορφισμών ανά υπότυπο στο γονίδιο της IN της ομάδας M και έγινε σύγκριση με ερευνητικές εργασίες οι οποίες αναφέρουν τις μεταλλάξεις που δίδουν ανθεκτικότητα στον αναστολέα raltegravir και σε DKAs αναστολείς. Οι αλληλουχίες που μελετήθηκαν αφορούσαν 108 HIV-1 οροθετικούς που διαγνώστηκαν κατά το διάστημα 1986-2006 στην Κύπρο και καλύπτουν μια ποικιλία υπότυπων. Οι αλληλουχίες μη-B υπότυπων

συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους αναφοράς του υπότυπου B για να είναι σε συμφωνία με τις αλλαγές σε αμινοξέα που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία. Για ορισμένους υπότυπους μόνο ένας μικρός αριθμός αλληλουχιών ήταν διαθέσιμος και θα ήταν προτιμότερο περισσότερα συμπεράσματα να λαμβάνονταν από ένα μεγαλύτερο σύνολο δειγμάτων, αν και η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών της IN δεικνύει ότι οι αλληλουχίες από την Κύπρο είναι γενετικά ποικίλες.

Η λειτουργία της IN έχει συνδεθεί με βασικά μοτίβα, πρωτίστως με το μοτίβο DDE στην περιοχή CCD και κατά δεύτερον με το μοτίβο δέσμευσης ψευδαργύρου HHCC στην περιοχή NTD. Οι σημειακές μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα οδηγούν στην απώλεια δραστηριότητας της IN (Burke, 1992, Engelman, 1992, Kulkosky, 1992). Το μοτίβο DDE καταλύει τα βήματα του 3'-processing και του strand transfer με το σχηματισμό ενός χηλικής συμπλόκου με  $Mg^{2+}$  (Loizidou, 2007). Το μοτίβο ψευδάργυρου δεν συσχετίζεται άμεσα με τις καταλυτικές διαδικασίες της IN, αλλά έχει ένα έμμεσο ρόλο στον πολυμερισμό της IN (Marchand, 2006, Lee, 1997). Και τα δύο πιο πάνω μοτίβα είναι φυλογενετικά συντηρημένα σε όλες τις ρετροϊκές INs (Loizidou, 2007). Όπως ήταν αναμενόμενο τα μοτίβα DDE και HHCC ήταν συντηρημένα και στις 108 υπό μελέτη αλληλουχίες του γονιδίου της IN. Το CTD, η λιγότερη συντηρημένη περιοχή της IN είναι υπεύθυνο για τη μη-ειδική δέσμευση του DNA και τον πολυμερισμό του ενζύμου. Από τα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής CTD που είναι σημαντικά για τη δέσμευση του DNA, η αμινοξική αλλαγή L234I εμφανίστηκε ως φυσικός πολυμορφισμός σε όλους τους υπότυπους και η επίδραση της φαίνεται να είναι ελάχιστη. Διάφοροι παράγοντες του ξενιστή έχουν εμπλακεί στη διαδικασία ενσωμάτωσης μέσω του PIC. Ο παράγοντας LEDGF/p75 είναι ο πιο πρόσφατα προσδιορισμένος κυτταρικός συνεργάτης της HIV-1 IN, για τον οποίο υπάρχουν δομικές πληροφορίες σε σχέση με την IN. Τα αμινοξικά κατάλοιπα της IN που αλληλεπιδρούν με τον LEDGF/p75 έχουν χαρτογραφηθεί στις θέσεις R166, D167, Q168, A169, E170 και H171. Η αμινοξική αλλαγή H171Y προσδιορίστηκε ως φυσικός πολυμορφισμός του υπότυπου A. Αυτή η αντικατάσταση αντιπροσωπεύει μια μη-συντηρητική αλλαγή από ένα βασικό σε ένα πολικό αμινοξύ. Εντούτοις, μία έρευνα έδειξε το αμίδιο της κύριας αλυσίδας και όχι η πλευρική αλυσίδα του H171 εμπλέκεται στη δέσμευση του υδρογόνου του D366 του LEDGF/p75 (Cherapanov, 2005). Για να καθοριστεί σαφώς η επίδραση της αντικατάστασης H171Y πρέπει να γίνει περισσότερη πειραματική δουλειά σε δείγματα IN που ανήκουν στον υπότυπο A.

Οι αναστολείς έχουν σχεδιαστεί πρωτογενώς έναντι του υπότυπου B, εντούτοις οι πολυμορφισμοί των διαφόρων υπότυπων έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ταυτίζονται με μεταλλάξεις ανθεκτικότητας. Πρόσφατα έχει εγκριθεί από το FDA ο πρώτος αναστολέας έναντι της IN, το raltegravir, ως η τελευταία αγωγή σε ασθενείς με ποικίλη ανθεκτικότητα σε αντιρετροϊκά φάρμακα. Δυστυχώς υπάρχει μικρή γενετική ανθεκτικότητα της IN έναντι του raltegravir και παρατηρούνται μεταλλάξεις αντοχής. Η λειτουργία του raltegravir σε στελέχη που δεν ανήκουν στον υπότυπο B όπως και μεταλλάξεις σε στελέχη άλλων υπότυπων εκτός του B παραμένει ασαφής. Ίσως ο μηχανισμός δράσης των αναστολέων να διαφέρει ανά υπότυπο λόγω και της παρουσίας πολυμορφισμών σε σημαντικές αμινοξικές θέσεις. Στην μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε καμία από τις αμινοξικές αντικαταστάσεις που συνδέονται με πρωτοταγή ανθεκτικότητα στο raltegravir. Από τις αμινοξικές αντικαταστάσεις που σχετίζονται με τη δευτερεύουσα ανθεκτικότητα στο raltegravir, οι V72I, L74I, T125A και M154I προσδιορίστηκαν ως φυσικοί πολυμορφισμοί στον υπότυπο A και οι V72I, T125A και G140R στον υπότυπο C. Η αμινοξική αλλαγή L74I αντιπροσωπεύει μια συντηρημένη αλλαγή αμινοξέος που δεν είναι πιθανό να προκαλέσει ευαισθησία στο raltegravir σε ασθενείς που είναι μολυσμένοι με τον υπότυπο A του HIV-1. Η αμινοξική αντικατάσταση G140R μπορεί να έχει μια εντονότερη επίδραση στην ανθεκτικότητα του raltegravir δεδομένου ότι η μη πολική γλυκίνη αντικαθίσταται από την ογκώδη και βασική αργινίνη. Από τις αμινοξικές αντικαταστάσεις που συνδέονται με την ανθεκτικότητα στα DKAs και τα ανάλογα τους, οι V72I και T125A αναγνωρίστηκαν σε όλους τους υπότυπους. Ακόμα, κι αν η παρουσία αυτών των αντικαταστάσεων είναι εμφανής, δεν εμπλέκονται στη μειωμένη ευαισθησία των DKAs και των παραγώγων του (Van Baelen, 2007). Η εύρεση ευαίσθητων στελεχών στον αναστολέα raltegravir είναι σημαντικό επίτευγμα, αφού δίνει ένα ακόμη έναυσμα για την καταστολή του ιού με τη χρήση του συγκεκριμένου αναστολέα.

Η ύπαρξη δύο τρόπων δέσμευσης του raltegravir φαίνεται να μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη διαφορετικών οδών ανθεκτικότητας. Μεταλλάξεις σε βασικά αμινοξέα της IN σε διάφορα στελέχη της ομάδας M του ιού HIV-1 μπορεί να οδηγήσουν σ' ένα μοναδικό τρόπο δέσμευσης του raltegravir, που είτε να αυξάνει την πρόσδεση του φαρμάκου (Loizidou *et al.*, 2009), είτε να την μειώνει.



### 8.6 Γενικά συμπεράσματα-Μελλοντική κατεύθυνση

Η διατριβή αυτή είχε πολλά ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Η αναδρομική γενετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε προσδιόρισε το γενετικό προφίλ των HIV-1 στελεχών που υπάρχουν στην Κύπρο τις τελευταίες δύο δεκαετίες και κατέδειξε ότι υπάρχει μια εκτεταμένη ετερογένεια της HIV-1 επιδημίας στην Κύπρο, η οποία ενισχύεται από μια συνεχή εισαγωγή νέων καθώς και μοναδικών στελεχών από άλλες χώρες δημιουργώντας μια εξελισσόμενη πολυφυλετική μόλυνση. Η νέα μέθοδος ανάλυσης του HIV-1 near-full length genome που αναπτύχθηκε είναι μια ακριβής μέθοδος που μας επιτρέπει να καθορίσουμε την κατανομή των διαφόρων υποτύπων της ομάδας M. Η γενετική μοριακή επιδημιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε προσδιόρισε τη γενετική ποικιλότητα των HIV-1 νεοδιαγνωσθέντων στελεχών που δεν υποβλήθηκαν ποτέ σε θεραπεία στο διάστημα 2003-2006. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει χαμηλή επικράτηση της μεταδιδόμενης ανθεκτικότητας στα αντιρετροϊκά φάρμακα μέσα στην ομάδα μελέτης σε αντίθεση με τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης που είναι υψηλότερη. Η νέα μέθοδος γενοτυπικής ανάλυσης ανθεκτικότητας στα αντιρετροϊκά φάρμακα N/NN-RTIs, που αναπτύχθηκε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς. Η ύπαρξη δύο τρόπων δέσμευσης του raltegravir είναι σε συσχέτιση με τις διαφορετικούς οδούς ανθεκτικότητας και δίνει μια εξήγηση για την ύπαρξή τους. Η επίδραση μη συντηρημένων μεταλλάξεων στις αλληλεπιδράσεις IN-raltegravir μπορεί να έχουν συνέπειες για το μηχανισμό δέσμευσης του raltegravir, καθώς και για μελλοντικά φάρμακα αυτής της κατηγορίας.

Ως συνέχεια αυτής της διατριβής στο μέλλον θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν πολλές μελέτες. Μια πρώτη μελέτη θα ήταν η συνέχιση της μοριακής επιδημιολογίας της HIV-1 λοίμωξης της Κύπρου και στα επόμενα χρόνια, αφού πρόκειται για ένα κεντρικό σταθμό πληθυσμιακών μετακινήσεων από χώρες με μεγάλη ποικιλότητα και επιπολασμό του ιού HIV-1, όπως η Αφρική, η Ασία. Σε μια καινούρια μελέτη της σχεδόν-πλήρους μήκους αλληλουχίας του HIV-1 γονιδιώματος θα ήταν πιθανό να ανεβρεθούν διαφορετικά ή ακόμη και νέα στελέχη του HIV-1, ανασυνδυασμένα ή όχι και θα καθοριζόταν η πολυπλοκότητα της λοίμωξης στην Κύπρο, καθώς και η μελέτη της επίδρασης αυτών των νέων περιπτώσεων στην τοπική HIV-1 επιδημία, σε διάφορες ομάδες κινδύνου.

Σε μια προσπάθεια επιλογής των νέων υποσχόμενων φαρμάκων ανταγωνιστών των συνυποδοχέων CCR5, CXCR4 που σύντομα θα δίνονται και στους ασθενείς στην Κύπρο, πχ το maraviroc, μπορούν να πραγματοποιηθούν πέραν των γενοτυπικών προγνωστικών μεθόδων του κυτταρικού τροπισμού των HIV-1 στελεχών, και φαινοτυπικές μέθοδοι σε

χρόνιους και νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς. Οι φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανεύρεση X4 ή R5/X4 HIV-1 στελεχών από ότι οι γενοτυπικές.

Η γενετική ανάλυση του γονιδίου της IN αποτέλεσε μια πρόδρομη μελέτη αναφοράς για τη μελέτη των επιδράσεων των φυσικών πολυμορφισμών διαφόρων στελεχών της ομάδας M του ιού HIV-1 στην ενεργότητα του ενζύμου της IN, στη δέσμευση του αναστολέα της και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Νέοι γονιδιακοί αντιρετροϊκοί στόχοι μπορούν να αποτελέσουν πεδία γενετικής ανάλυσης του γονιδιώματος του HIV-1, όπως είναι η περιοχή της αλληλουχίας TAR και του γονιδίου Vpr, καθώς και δομικής ανάλυσης της δέσμευσης των αναστολέων τους.

## Βιβλιογραφία

- Abecasis, A.B., Deforche, K., Snoeck, J., Bacheler, L.T., McKenna, P., Carvalho, A.P., *et al.* (2005). Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *Aids* **19**, 1799-806.
- Adojaan, M., Kivisild, T., Mannik, A., Krispin, T., Ustina, V., Zilmer, K., *et al.* (2005). Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**, 598-605.
- Alaeus, A., Leitner, T., Lidman, K. & Albert, J. (1997). Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *Aids* **11**, 199-202.
- Alaeus, A., Lidman, K., Bjorkman, A., Giesecke, J. & Albert, J. (1999). Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *Aids* **13**, 901-7.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Amornkul, P.N., Tansuphasawadikul, S., Limpakarnjanarat, K., Likanonsakul, S., Young, N., Eampokalap, B., *et al.* (1999). Clinical disease associated with HIV-1 subtype B' and E infection among 2104 patients in Thailand. *Aids* **13**, 1963-9.
- Anastassopoulou, C.G. & Kostrikis, L.G. (2003). The impact of human allelic variation on HIV-1 disease. *Curr HIV Res* **1**, 185-203.
- Anastassopoulou, C.G. & Kostrikis, L.G. (2005). Viral correlates of HIV-1 disease. *Curr HIV Res* **3**, 113-32.
- Anastassopoulou, C.G. & Kostrikis, L.G. (2006). Global genetic variation of HIV-1 infection. *Curr HIV Res* **4**, 365-73.
- Andersen, J.L. & Planelles, V. (2005). The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* **3**, 43-51.
- Anthony, N.J. (2004). HIV-1 integrase: a target for new AIDS chemotherapeutics. *Curr Top Med Chem* **4**, 979-90.
- Antinori, A., Trota, M.P., Lorenzini, P., Torti, C., Gianotti, N., Maggiolo, F., *et al.* (2007). Virological response to salvage therapy in HIV-infected persons carrying the reverse transcriptase K65R mutation. *Antivir Ther* **12**, 1175-83.
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G. & Parniak, M.A. (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **37**, 15908-17.
- Arnold, E., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Williams, R.L., Lu, X., Ding, J., *et al.* (1992). Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* **357**, 85-9.
- Ayoub, A., Souquieres, S., Njinku, B., Martin, P.M., Muller-Trutwin, M.C., Roques, P., *et al.* (2000). HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *Aids* **14**, 2623-5.
- Babic, D.Z., Poljak, M., Seme, K., Tomazic, J. & Vidmar, L. (2006). Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes based on analysis of pol sequences in Slovenia, 1996-2005. *J Med Virol* **78**, 997-1002.
- Balzarini, J., Pelemans, H., Esnouf, R. & De Clercq, E. (1998). A novel mutation (F227L) arises in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 on dose-escalating treatment of HIV type 1-infected cell cultures with the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor thiocarboxanilide UC-781. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 255-60.
- Bannwarth, S. & Gatignol, A. (2005). HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res* **3**, 61-71.

- Barrett, D.J. (1984). Characterization of the acquired immune deficiency syndrome at the cellular and molecular level. *Mol Cell Biochem* **63**, 3-11.
- Bartlett, J.A., DeMasi, R., Quinn, J., Moxham, C. & Rousseau, F. (2001). Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-1 infected adults. *Aids* **15**, 1369-77.
- Beerenwinkel, N., Daumer, M., Sing, T., Rahnenfuhrer, J., Lengauer, T., Selbig, J., *et al.* (2005a). Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance. *J Infect Dis* **191**, 1953-60.
- Beerenwinkel, N., Sing, T., Lengauer, T., Rahnenfuhrer, J., Roomp, K., Savenkov, I., *et al.* (2005b). Computational methods for the design of effective therapies against drug resistant HIV strains. *Bioinformatics* **21**, 3943-50.
- Bell, C.M., Connell, B.J., Capovilla, A., Venter, W.D., Stevens, W.S. & Papathanasopoulos, M.A. (2007). Molecular characterization of the HIV type 1 subtype C accessory genes vif, vpr, and vpu. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 322-30.
- Bennett, D. (2005). HIV-1 genetic diversity surveillance in the United States. *Journal Of Infectious Diseases* **192**, 4-9.
- Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Korber, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., *et al.* (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240.
- Berthoux, L., Sebastian, S., Muesing, M.A. & Luban, J. (2007). The role of lysine 186 in HIV-1 integrase multimerization. *Virology* **364**, 227-36.
- Beyrer, C., Razak, M.H., Lisam, K., Chen, J., Lui, W. & Yu, X.F. (2000). Overland heroin trafficking routes and HIV-1 spread in south and south-east Asia. *Aids* **14**, 75-83.
- Bhanja, P., Mandal, D.K., Jana, S., Bhattacharya, S.K. & Chakrabarti, S. (2004). Detection and characterization of HIV type 2 in Calcutta, India. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 101-4.
- Bhanja, P., Sengupta, S., Banerjee, D., Sarkar, K., Jana, S., Chakrabarti, S., *et al.* (2007). Detection of intersubtype recombinants with respect to env and nef genes of HIV-1 among female sex workers in Calcutta, India. *Virus Res* **130**, 310-4.
- Bhanja, P., Sengupta, S., Singh, N.Y., Sarkar, K., Bhattacharya, S.K. & Chakrabarti, S. (2005). Determination of gag and env subtypes of HIV-1 detected among injecting drug users (IDUs) in Manipur, India: evidence for intersubtype recombination. *Virus Res* **114**, 149-53.
- Bikandou, B., Takehisa, J., Mboudjeka, I., Ido, E., Kuwata, T., Miyazaki, Y., *et al.* (2000). Genetic subtypes of HIV type 1 in Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 613-9.
- Bionumerics (2008). Available at [www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm](http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm); 2008 Applied Maths NV
- Blackard, J.T., Cohen, D.E. & Mayer, K.H. (2002). Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* **34**, 1108-14.
- Blackard, J.T., Renjifo, B., Fawzi, W., Hertzmark, E., Msamanga, G., Mwakagile, D., *et al.* (2001). HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. *Virology* **287**, 261-5.
- Booth, C.L. & Geretti, A.M. (2007). Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* **59**, 1047-56.
- Bouzeghoub, S., Jauvin, V., Recordon-Pinson, P., Garrigue, I., Amrane, A., Belabbes, E.H. & Fleury, H.J. (2006). High diversity of HIV type 1 in Algeria. *Aids Research And Human Retroviruses* **22**, 367-72.

- Boyer, P.L., Sarafianos, S.G., Arnold, E. & Hughes, S.H. (2001). Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **75**, 4832-42.
- Brenner, B.G., Oliveira, M., Doualla-Bell, F., Moisi, D.D., Ntemgwa, M., Frankel, F., *et al.* (2006). HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *Aids* **20**, F9-13.
- Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G. & Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* **22**, 1707-15.
- Briz, V., Poveda, E. & Soriano, V. (2006). HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother* **57**, 619-27.
- Brodine, S.K., Shaffer, R.A., Starkey, M.J., Tasker, S.A., Gilcrest, J.L., Louder, M.K., *et al.* (1999). Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion. *Ann Intern Med* **131**, 502-6.
- Brumme, Z.L., Goodrich, J., Mayer, H.B., Brumme, C.J., Henrick, B.M., Wynhoven, B., *et al.* (2005). Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J Infect Dis* **192**, 466-74.
- Brun-Vezinet, F., Descamps, D., Ruffault, A., Masquelier, B., Calvez, V., Peytavin, G., *et al.* (2003). Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *Aids* **17**, 1795-802.
- Buchbinder, S.P., Katz, M.H., Hessel, N.A., O'Malley, P.M. & Holmberg, S.D. (1994). Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* **8**, 1123-8.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. & Stevenson, M. (1998). Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* **188**, 2113-25.
- Bukrinsky, M. (2004). A hard way to the nucleus. *Mol Med* **10**, 1-5.
- Burke, C.J., Sanyal G, Bruner MW, Ryan JA, LaFemina RL, Robbins HL, Zeff AS, Middaugh CR, Cordingley MG (1992). Structural implications of spectroscopic characterization of a putative zinc finger peptide from HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **267**, 9639-44.
- Calazans, A., Brindeiro, R., Brindeiro, P., Verli, H., Arruda, M.B., Gonzalez, L.M., *et al.* (2005). Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis* **191**, 1961-70.
- Cann, A.J., Churcher, M.J., Boyd, M., O'Brien, W., Zhao, J.Q., Zack, J. & Chen, I.S. (1992). The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J Virol* **66**, 305-9.
- Cardozo, T., Kimura, T., Philpott, S., Weiser, B., Burger, H. & Zolla-Pazner, S. (2007). Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 415-26.
- Carr, J.K., Salminen, M.O., Albert, J., Sanders-Buell, E., Gotte, D., Birx, D.L. & McCutchan, F.E. (1998). Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* **247**, 22-31.
- Carrillo, A., Stewart, K.D., Sham, H.L., Norbeck, D.W., Kohlbrenner, W.E., Leonard, J.M., *et al.* (1998). In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-378, a novel protease inhibitor. *J Virol* **72**, 7532-41.
- Casado, G., Thomson, M.M., Sierra, M. & Najera, R. (2005). Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19\_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**, 532-7.

- Ceccherini-Silberstein, F., Svicher, V., Sing, T., Artese, A., Santoro, M.M., Forbici, F., *et al.* (2007). Characterization and structural analysis of novel mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the regulation of resistance to nonnucleoside inhibitors. *J Virol* **81**, 11507-19.
- Chaix, M.L., Descamps, D., Harzic, M., Schneider, V., Deveau, C., Tamalet, C., *et al.* (2003). Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *Aids* **17**, 2635-43.
- Chang, S.Y., Sheng, W.H., Lee, C.N., Sun, H.Y., Kao, C.L., Chang, S.F., *et al.* (2006). Molecular epidemiology of HIV type 1 subtypes in Taiwan: Outbreak of HIV type 1 CRF07\_BC infection in intravenous drug users. *Aids Research And Human Retroviruses* **22**, 1055-66.
- Cherepanov, P., Ambrosio ALB, Rahman S, Ellenberger T, Engelman A (2005). Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17308-13.
- Cherepanov, P., Este, J.A., Rando, R.F., Ojwang, J.O., Reekmans, G., Steinfeld, R., *et al.* (1997). Mode of interaction of G-quartets with the integrase of human immunodeficiency virus type 1. *Mol Pharmacol* **52**, 771-80.
- Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother* **32**, 48-53.
- Chiu, T.K. & Davies, D.R. (2004). Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem* **4**, 965-77.
- Cilla, G., Rodes, B., Perez-Trallero, E., Arrizabalaga, J. & Soriano, V. (2001). Molecular evidence of homosexual transmission of HIV type 2 in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 417-22.
- Cilliers, T., Moore, P., Coetzer, M. & Morris, L. (2005). In vitro generation of HIV type 1 subtype C isolates resistant to enfuvirtide. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 776-83.
- Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D., Campbell-Hill, S., Roberson, J.L., Veldkamp, P.J., *et al.* (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* **324**, 954-60.
- Clemente, J.C., Coman RM, Thiaville MM, Janka LK, Jeung JA, Nukoolkarn S, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, McKenna R, Leelamanit W, Goodnow MM, Dunn BM (2006). Analysis of HIV-1 CRF\_01\_A/E protease inhibitor resistance: Structural determinants for maintaining sensitivity and developing resistance to atazanavir. *Biochemistry* **45**, 5468-77.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. & Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-5.
- Coman, R.M., Robbins AH, Fernandez MA, Gilliland CT, Sochet AA, Goodnow MM, McKenna R, Dunn BM (2008). The contribution of naturally occurring polymorphisms in altering the biochemical and structural characteristics of HIV-1 subtype C protease. *Biochemistry* **47**, 731-43.
- Cooper, D.A., Tindall, B., Wilson, E.J., Imrie, A.A. & Penny, R. (1988). Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **157**, 889-96.
- Cote, H.C., Brumme, Z.L. & Harrigan, P.R. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir. *J Virol* **75**, 589-94.
- Cozzi-Lepri, A., Ruiz, L., Loveday, C., Phillips, A.N., Clotet, B., Reiss, P., *et al.* (2005). Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific

- profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther* **10**, 791-802.
- Cozzi Lepri, A., Sabin, C.A., Staszewski, S., Hertogs, K., Muller, A., Rabenau, H., *et al.* (2000). Resistance profiles in patients with viral rebound on potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **181**, 1143-7.
- Crowe, S.M., Carlin, J.B., Stewart, K.I., Lucas, C.R. & Hoy, J.F. (1991). Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**, 770-6.
- Daar, E.S., Moudgil, T., Meyer, R.D. & Ho, D.D. (1991). Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **324**, 961-4.
- Damond, F., Worobey, M., Campa, P., Farfara, I., Colin, G., Matheron, S., *et al.* (2004). Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 666-72.
- Das, S.R. & Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res* **121**, 315-32.
- de Jong, J.J., Goudsmit, J., Keulen, W., Klaver, B., Krone, W., Tersmette, M. & de Ronde, A. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* **66**, 757-65.
- De Luca, A., Cingolani, A., Di Giambenedetto, S., Trotta, M.P., Baldini, F., Rizzo, M.G., *et al.* (2003). Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis* **187**, 1934-43.
- De Luca, A., Di Giambenedetto, S., Romano, L., Gonnelli, A., Corsi, P., Baldari, M., *et al.* (2006). Frequency and treatment-related predictors of thymidine-analogue mutation patterns in HIV-1 isolates after unsuccessful antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **193**, 1219-22.
- de Mendoza, C., Van Baelen, K., Poveda, E., Rondelez, E., Zahonero, N., Stuyver, L., *et al.* (2008). Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr* **48**, 241-4.
- de Oliveira, T., Deforche, K., Cassol, S., Salminen, M., Paraskevis, D., Seebregts, C., *et al.* (2005). An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* **21**, 3797-800.
- Delgado, E., Thomson, M.M., Villahermosa, M.L., Sierra, M., Ocampo, A., Miralles, C., *et al.* (2002). Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 536-43.
- Derdelinckx, I., Van Laethem, K., Maes, B., Schrooten, Y., De Schouwer, K., De Wit, S., *et al.* (2003). Performance of the VERSANT HIV-1 resistance assays (LiPA) for detecting drug resistance in therapy-naive patients infected with different HIV-1 subtypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**, 119-24.
- Derdowski, A., Ding, L. & Spearman, P. (2004). A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* **78**, 1230-42.
- Deroo, S., Robert, I., Fontaine, E., Lambert, C., Plessier, J.M., Arendt, V., *et al.* (2002). HIV-1 subtypes in Luxembourg, 1983-2000. *Aids* **16**, 2461-7.
- Descamps, D., Ait-Khaled, M., Craig, C., Delarue, S., Damond, F., Collin, G. & Brun-Vezinet, F. (2006). Rare selection of the K65R mutation in antiretroviral-naive

- patients failing a first-line abacavir/ lamivudine-containing HAART regimen. *Antivir Ther* **11**, 701-5.
- Deval, J., Selmi, B., Boretto, J., Egloff, M.P., Guerreiro, C., Sarfati, S. & Canard, B. (2002). The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using alpha-boranophosphate nucleotide analogues. *J Biol Chem* **277**, 42097-104.
- Deval, J., White, K.L., Miller, M.D., Parkin, N.T., Courcambek, J., Halfon, P., *et al.* (2004). Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. *J Biol Chem* **279**, 509-16.
- di Marzo Veronese, F., Copeland, T.D., DeVico, A.L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R.C. & Sarngadharan, M.G. (1986). Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* **231**, 1289-91.
- Diallo, K., Gotte, M. & Wainberg, M.A. (2003). Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3377-83.
- Dong, X.N., Chen, X., Chen, Y., Ablimit, A., Ye, Z., Wu, Y. & Chen, Y.H. (2005). Short communication: HIV type 1 phenotype, tropism, and sequence patterns: association and preference. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 234-8.
- Dorfman, T., Bukovsky, A., Ohagen, A., Hoglund, S. & Gottlinger, H.G. (1994). Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 8180-7.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., *et al.* (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4721-32.
- Dumitrescu, O., Kalish, M.L., Kliks, S.C., Bandea, C.I. & Levy, J.A. (1994). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from children in Romania: identification of a new envelope subtype. *J Infect Dis* **169**, 281-8.
- Elswood, B.F. & Stricker, R.B. (1994). Polio vaccines and the origin of AIDS. *Med Hypotheses* **42**, 347-54.
- Engelman, A., Craigie R (1992). Identification of conserved amino-acid residues critical for human-immunodeficiency-virus type-1 integrase function *in vitro*. *J Virol* **66**, 6361-69.
- Eron, J.J., Jr., Bosch, R.J., Bettendorf, D., Petch, L., Fiscus, S. & Frank, I. (2007). The effect of lamivudine therapy and M184V on the antiretroviral activity of didanosine. *J Acquir Immune Defic Syndr* **45**, 249-51.
- Esteves, A., Parreira, R., Venenno, T., Franco, M., Piedade, J., De Sousa, J.G. & Canas-Ferreira, W.F. (2002). Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: High prevalence of non-B subtypes. *Aids Research And Human Retroviruses* **18**, 313-25.
- Ewart, G.D., Sutherland, T., Gage, P.W. & Cox, G.B. (1996). The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol* **70**, 7108-15.
- Fan, J., Negroni, M. & Robertson, D.L. (2007). The distribution of HIV-1 recombination breakpoints. *Infect Genet Evol* **7**, 717-23.
- FDA (2009). Available at: <http://www.fda.gov/>.
- Fikkert, V., Van Maele, B., Vercammen, J., Hantson, A., Van Remoortel, B., Michiels, M., *et al.* (2003). Development of resistance against diketo derivatives of human



- immunodeficiency virus type 1 by progressive accumulation of integrase mutations. *J Virol* **77**, 11459-70.
- Fleury, H., Recordon-Pinson, P., Caumont, A., Faure, M., Roques, P., Plantier, J.C., *et al.* (2003). HIV type 1 diversity in France, 1999-2001: molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 41-7.
- Freed, E.O. (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15.
- Freed, E.O. (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 13-33.
- Fricker, S.P., Anastassov, V., Cox, J., Darkes, M.C., Grujic, O., Idzan, S.R., *et al.* (2006). Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochem Pharmacol* **72**, 588-96.
- Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V., Biberfeld, G., Bottiger, B., Hansson, L.O., *et al.* (1990). Immunological changes in primary HIV-1 infection. *Aids* **4**, 995-9.
- Galetto, R. & Negroni, M. (2005). Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS Rev* **7**, 92-102.
- Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., *et al.* (1997). Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**, 849-53.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., *et al.* (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**, 436-41.
- Gao, F., Robertson, D.L., Carruthers, C.D., Li, Y., Bailes, E., Kostrikis, L.G., *et al.* (1998a). An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* **72**, 10234-41.
- Gao, F., Robertson, D.L., Carruthers, C.D., Morrison, S.G., Jian, B., Chen, Y., *et al.* (1998b). A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 5680-98.
- Gao, F., Vidal, N., Li, Y., Trask, S.A., Chen, Y., Kostrikis, L.G., *et al.* (2001). Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 675-88.
- Garrido, C., Roulet, V., Chueca, N., Poveda, E., Aguilera, A., Skrabal, K., *et al.* (2008). Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol* **46**, 887-91.
- Gatanaga, H., Ibe, S., Matsuda, M., Yoshida, S., Asagi, T., Kondo, M., *et al.* (2007). Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* **75**, 75-82.
- Gatanaga, H., Suzuki, Y., Tsang, H., Yoshimura, K., Kavlick, M.F., Nagashima, K., *et al.* (2002). Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J Biol Chem* **277**, 5952-61.
- Geretti, A.M. (2007). Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naive persons. *Curr Opin Infect Dis* **20**, 22-32.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. & De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**, 103-12.

- Goel, A., Mazur, S.J., Fattah, R.J., Hartman, T.L., Turpin, J.A., Huang, M., *et al.* (2002). Benzamide-based thiolcarbamates: a new class of HIV-1 NCp7 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 767-70.
- Goldgur, Y., Craigie, R., Cohen, G.H., Fujiwara, T., Yoshinaga, T., Fujishita, T., *et al.* (1999). Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13040-3.
- Gottlieb, G.S., Sow, P.S., Hawes, S.E., Ndoye, I., Coll-Seck, A.M., Curlin, M.E., *et al.* (2003). Molecular epidemiology of dual HIV-1/HIV-2 seropositive adults from Senegal, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 575-84.
- Greenberg, M.L. & Cammack, N. (2004). Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* **54**, 333-40.
- Grossman, Z., Lorber, M., Maayan, S., Bar-Yacov, N., Levy, I., Averbuch, D., *et al.* (2005). Drug-resistant HIV infection among drug-naive patients in Israel. *Clin Infect Dis* **40**, 294-302.
- Grossman, Z., Paxinos, E.E., Averbuch, D., Maayan, S., Parkin, N.T., Engelhard, D., *et al.* (2004). Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2159-65.
- Gulick, R.M. (2003). New antiretroviral drugs. *Clin Microbiol Infect* **9**, 186-93.
- Gulick, R.M., Ribaud, H.J., Shikuma, C.M., Lustgarten, S., Squires, K.E., Meyer, W.A., 3rd, *et al.* (2004). Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* **350**, 1850-61.
- Gurtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., *et al.* (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**, 1581-5.
- Haffar, O. & Bukrinsky, M. (2005). Nuclear translocation as a novel target for anti-HIV drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3**, 41-50.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M. & Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-14.
- Hammer, S.M., Eron, J.J., Jr., Reiss, P., Schooley, R.T., Thompson, M.A., Walmsley, S., *et al.* (2008). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *Jama* **300**, 555-70.
- Harrich, D. & Hooker, B. (2002). Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation. *Rev Med Virol* **12**, 31-45.
- Hartley, O., Klasse, P.J., Sattentau, Q.J. & Moore, J.P. (2005). V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 171-89.
- Hazuda, D.J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., *et al.* (2000). Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **287**, 646-50.
- Hazuda, D.J., Miller, M.D., Nguyen, B.Y. & Zhao, J. (2007). Resistance to the HIV-integrase Inhibitor raltegravir: analysis of protocol 005, a Phase II study in patients with triple-class resistant HIV-1 infection. *Antivir Ther* **12**, S10.
- Hazuda, D.J., Young, S.D., Guare, J.P., Anthony, N.J., Gomez, R.P., Wai, J.S., *et al.* (2004). Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* **305**, 528-32.
- Higgins, D.G. & Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-44.
- Hill, M., Tachedjian, G. & Mak, J. (2005). The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* **3**, 73-85.

- Hirsch, M.S., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Conway, B., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., *et al.* (2003). Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* **37**, 113-28.
- Ho, D.D., Moudgil, T. & Alam, M. (1989). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med* **321**, 1621-5.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M. & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-6.
- Hoelscher, M., Kim, B., Maboko, L., Mhalu, F., von Sonnenburg, F., Birx, D.L. & McCutchan, F.E. (2001). High proportion of unrelated HIV-1 intersubtype recombinants in the Mbeya region of southwest Tanzania. *Aids* **15**, 1461-70.
- Holguin, A., Alvarez, A. & Soriano, V. (2005). Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *Journal Of Medical Virology* **75**, 374-80.
- Howard, T.M., Olayele, D.O. & Rasheed, S. (1994). Sequence analysis of the glycoprotein 120 coding region of a new HIV type 1 subtype A strain (HIV-1IbNg) from Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1755-7.
- Howard, T.M. & Rasheed, S. (1996). Genomic structure and nucleotide sequence analysis of a new HIV type 1 subtype A strain from Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 1413-25.
- Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A. & Freed, E.O. (1995). p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**, 6810-8.
- Huang, W., Eshleman, S.H., Toma, J., Fransen, S., Stawiski, E., Paxinos, E.E., *et al.* (2007). Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J Virol* **81**, 7885-93.
- Huang, W., Toma, J., Fransen, S., Stawiski, E., Reeves, J.D., Whitcomb, J.M., *et al.* (2008). Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **82**, 5584-93.
- Hughes, A., Barber, T. & Nelson, M. (2008). New treatment options for HIV salvage patients: an overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. *J Infect* **57**, 1-10.
- Hwang, S., Tamilarasu, N., Kibler, K., Cao, H., Ali, A., Ping, Y.H., *et al.* (2003). Discovery of a small molecule Tat-trans-activation-responsive RNA antagonist that potently inhibits human immunodeficiency virus-1 replication. *J Biol Chem* **278**, 39092-103.
- Ingr, M., Uhlikova, T., Strisovsky, K., Majerova, E. & Konvalinka, J. (2003). Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: the "fireman's grip" and dimerization. *Protein Sci* **12**, 2173-82.
- Iwatani, Y., Song, S.K., Wang, L., Planas, J., Sakai, H., Ishimoto, A. & Cloyd, M.W. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu modifies viral cytopathic effect through augmented virus release. *J Gen Virol* **78** ( Pt 4), 841-6.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. & Varmus, H.E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280-3.
- Janssens, W., Buve, A. & Nkengasong, J.N. (1997). The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *Aids* **11**, 705-12.
- Janssens, W., Laukkanen, T., Salminen, M.O., Carr, J.K., Van der Auwera, G., Heyndrickx, L., *et al.* (2000). HIV-1 subtype H near-full length genome reference

- strains and analysis of subtype-H-containing inter-subtype recombinants. *Aids* **14**, 1533-43.
- Jensen, M.A., Li, F.S., van 't Wout, A.B., Nickle, D.C., Shriner, D., He, H.X., *et al.* (2003a). Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* **77**, 13376-88.
- Jensen, M.A. & van 't Wout, A.B. (2003b). Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev* **5**, 104-12.
- Jetzt, A.E., Yu, H., Klarmann, G.J., Ron, Y., Preston, B.D. & Dougherty, J.P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **74**, 1234-40.
- Johnson, V.A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Gunthard, H.F., Kuritzkes, D.R., Pillay, D., *et al.* (2007). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. *Top HIV Med* **15**, 119-25.
- Johnson, V.A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Kuritzkes, D.R., Pillay, D., Schapiro, J.M. & Richman, D.D. (2006). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. *Top HIV Med* **14**, 125-30.
- Jorgensen, L.B., Christensen, M.B., Gerstoft, J., Mathiesen, L.R., Obel, N., Pedersen, C., *et al.* (2003). Prevalence of drug resistance mutations and non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 patients in Denmark. *Scand J Infect Dis* **35**, 800-7.
- Joseph, A.M., Kumar, M. & Mitra, D. (2005). Nef: "necessary and enforcing factor" in HIV infection. *Curr HIV Res* **3**, 87-94.
- Kaleebu, P., French, N., Mahe, C., Yirrell, D., Watera, C., Lyagoba, F., *et al.* (2002). Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* **185**, 1244-50.
- Kaleebu, P., Whitworth, J., Hamilton, L., Rutebemberwa, A., Lyagoba, F., Morgan, D., *et al.* (2000). Molecular epidemiology of HIV type 1 in a rural community in southwest Uganda. *Aids Research And Human Retroviruses* **16**, 393-401.
- Kandathil, A.J., Ramalingam, S., Kannangai, R., David, S. & Sridharan, G. (2005). Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res* **121**, 333-44.
- Kanki, P.J., Hamel, D.J., Sankale, J.L., Hsieh, C., Thior, I., Barin, F., *et al.* (1999). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* **179**, 68-73.
- Kanki, P.J., Travers, K.U., S, M.B., Hsieh, C.C., Marlink, R.G., Gueye, N.A., *et al.* (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* **343**, 943-6.
- Kantor, R., Katzenstein, D.A., Efron, B., Carvalho, A.P., Wynhoven, B., Cane, P., *et al.* (2005). Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* **2**, e112.
- Kao, S., Khan, M.A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A. & Strebel, K. (2003). The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**, 11398-407.
- Kaushik, N., Basu, A., Palumbo, P., Myers, R.L. & Pandey, V.N. (2002). Anti-TAR polyamide nucleotide analog conjugated with a membrane-permeating peptide inhibits human immunodeficiency virus type 1 production. *J Virol* **76**, 3881-91.
- Kilmarx, P.H., Limpakarnjanarat, K., Kaewkungwal, J., Srismith, R., Saisorn, S., Uthairoravit, W., *et al.* (2000). Disease progression and survival with human immunodeficiency virus type 1 subtype E infection among female sex workers in Thailand. *J Infect Dis* **181**, 1598-606.

- Kita, K., Ndembi, N., Ekwilanga, M., Ido, E., Kazadi, R., Bikandou, B., *et al.* (2004). Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 1352-7.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. & Steitz, T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783-90.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., *et al.* (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-96.
- Kostrikis, L.G., Bagdades, E., Cao, Y., Zhang, L., Dimitriou, D. & Ho, D.D. (1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* **69**, 6122-30.
- Kotler, M., Simm, M., Zhao, Y.S., Sova, P., Chao, W., Ohnona, S.F., *et al.* (1997). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protein Vif inhibits the activity of HIV-1 protease in bacteria and in vitro. *J Virol* **71**, 5774-81.
- Koulinska, I.N., Ndung'u, T., Mwakagile, D., Msamanga, G., Kagoma, C., Fawzi, W., *et al.* (2001). A new human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form from Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 423-31.
- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., *et al.* (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**, 4650-5.
- Kousiappa, I., van de Vijver, D.A., Demetriades, I. & Kostrikis, L.G. (2009a). Genetic analysis of HIV type 1 strains from newly infected untreated patients in cyprus: high genetic diversity and low prevalence of drug resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**, 23-35.
- Kousiappa, I., Van De Vijver, D.A. & Kostrikis, L.G. (2009b). Near full-length genetic analysis of HIV sequences derived from cyprus: evidence of a highly polyphyletic and evolving infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**, 727-40.
- Kuiken, C., Foley, B., Hahn, B., Korber, B., McCutchan, F., Marx, P., *et al.* (1999). *The Human Retroviruses and AIDS Compendium*, Theoretical Biology and Biophysics Group T-10, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, Los Alamos, NM, chapter Land-marks of the Genome.
- Kulkosky, J., Katz RS, Mack JP, Skalka AM (1992). Residues critical for for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral retrotransposon integrases and bacterial insertion-sequence transposases. *Mol Cell Biol* **12**, 2331-38.
- Kuwabara, T., Warashina, M. & Taira, K. (2002). Cleavage of an inaccessible site by the maxizyme with two independent binding arms: an alternative approach to the recruitment of RNA helicases. *J Biochem* **132**, 149-55.
- Labrosse, B., Morand-Joubert, L., Goubard, A., Rochas, S., Labernardiere, J.L., Pacanowski, J., *et al.* (2006). Role of the envelope genetic context in the development of enfuvirtide resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Virol* **80**, 8807-19.
- Laeyendecker, O., Zhang, G.W., Quinn, T.C., Garten, R., Ray, S.C., Lai, S., *et al.* (2005). Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes in southern China. *J Acquir Immune Defic Syndr* **38**, 356-62.
- Lang, W., Perkins, H., Anderson, R.E., Royce, R., Jewell, N. & Winkelstein, W., Jr. (1989). Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**, 63-9.

- Lataillade, M., Chiarella, J. & Kozal, M.J. (2007). Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther* **12**, 563-70.
- Laukkanen, T., Albert, J., Liitsola, K., Green, S.D., Carr, J.K., Leitner, T., *et al.* (1999). Virtually full-length sequences of HIV type 1 subtype J reference strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 293-7.
- Laukkanen, T., Carr, J.K., Janssens, W., Liitsola, K., Gotte, D., McCutchan, F.E., *et al.* (2000). Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. *Virology* **269**, 95-104.
- Lazzarin, A., Campbell, T., Clotet, B., Johnson, M., Katlama, C., Moll, A., *et al.* (2007). Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-2: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **370**, 39-48.
- Le Grice, S.F., Naas, T., Wohlgensinger, B. & Schatz, O. (1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *Embo J* **10**, 3905-11.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C. & Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* **277**, 45091-8.
- Ledergerber, B., Egger, M., Opravil, M., Telenti, A., Hirschel, B., Battegay, M., *et al.* (1999). Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* **353**, 863-8.
- Lee, S.P., Xiao J, Knutson JR, Lewis MS, Han MK (1997). Zn<sup>2+</sup> promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase *in vitro*. *Biochemistry* **36**, 173-80.
- Lee, S.W., Gallardo, H.F., Gaspar, O., Smith, C. & Gilboa, E. (1995). Inhibition of HIV-1 in CEM cells by a potent TAR decoy. *Gene Ther* **2**, 377-84.
- Leitner, T., Korber, B., Daniels, M., Calef, C. & Foley, B. (2005). HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2005.
- Leon, O. & Roth, M. (2000). Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. *Biol Res* **33**, 21-30.
- Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N. & Gregory, T.J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**, 10373-82.
- Leschonsky, B., Ludwig, C., Bieler, K. & Wagner, R. (2007). Capsid stability and replication of human immunodeficiency virus type 1 are influenced critically by charge and size of Gag residue 183. *J Gen Virol* **88**, 207-16.
- Li, X.J., Kusagawa, S., Xia, X., Yang, C., Wang, Q., Yokota, Y., *et al.* (2005). Molecular epidemiology of the heterosexual HIV-1 transmission in Kunming, Yunnan Province of China suggests origin from the local IDU epidemic. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 977-80.
- Liang, C. & Wainberg, M.A. (2002). The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev* **4**, 41-9.
- Liitsola, K., Holm, K., Bobkov, A., Pokrovsky, V., Smolskaya, T., Leinikki, P., *et al.* (2000). An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1047-53.

- Liitsola, K., Tashkinova, I., Laukkanen, T., Korovina, G., Smolskaja, T., Momot, O., *et al.* (1998). HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *Aids* **12**, 1907-19.
- Lim, W.L., Xing, H., Wong, K.H., Wong, M.C., Shao, Y.M., Ng, M.H. & Lee, S.S. (2004). The lack of epidemiological link between the HIV type 1 infections in Hong Kong and Mainland China. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 259-62.
- Lin, H.H., Shih, Y.L., Liu, Y.C., Lee, S.S., Huang, C.K., Chen, Y.L., *et al.* (2006). An epidemic of HIV type I CRF07\_BC infection among injection drug users in Taiwan. *J Acquir Immune Defic Syndr* **42**, 248-55.
- Liu, T.F. & Shafer, R.W. (2006). Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* **42**, 1608-18.
- Lobritz, M.A., Marozsan, A.J., Troyer, R.M. & Arts, E.J. (2007). Natural variation in the V3 crown of human immunodeficiency virus type 1 affects replicative fitness and entry inhibitor sensitivity. *J Virol* **81**, 8258-69.
- Loizidou, E.Z., Kousiappa, I., Zeinalipour-Yazdi, C.D., Van de Vijver, D.A. & Kostrikis, L.G. (2009). Implications of HIV-1 M group polymorphisms on integrase inhibitor efficacy and resistance: genetic and structural in silico analyses. *Biochemistry* **48**, 4-6.
- Loizidou, E.Z., Nicolaou C, Nicolaidis A, Kostrikis LG (2007). HIV-1 integrase: From biology to chemotherapeutics. *Curr HIV Res* **5**, 365-88.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., *et al.* (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* **73**, 152-60.
- Los Alamos (2008). Available at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/HIVTools.html>.
- Los Alamos HIV and SIV Nomenclature (2009). Available at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html>
- Los Alamos. Database Available at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
- Low, A.J., Dong, W., Chan, D., Sing, T., Swanstrom, R., Jensen, M., *et al.* (2007). Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *Aids* **21**, F17-24.
- Low, A.J., Marchant, D., Brumme, C.J., Brumme, Z.L., Dong, W., Sing, T., *et al.* (2008). CD4-dependent characteristics of coreceptor use and HIV type 1 V3 sequence in a large population of therapy-naive individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**, 219-28.
- Lukashov, V.V. & Goudsmit, J. (1998). HIV heterogeneity and disease progression in AIDS: a model of continuous virus adaptation. *Aids* **12 Suppl A**, S43-52.
- Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Tojo, Y., *et al.* (2006). Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem* **281**, 12688-98.
- Magiorkinis, G., Paraskevis, D. & Hatzakis, A. (2008). Comments on "the distribution of HIV-1 recombination breakpoints" by Jun Fan, Matteo Negroni, David L. Robertson. *Infect Genet Evol* **8**, 527-8.
- Magiorkinis, G., Paraskevis, D., Vandamme, A.M., Magiorkinis, E., Sypsa, V. & Hatzakis, A. (2003). In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol* **84**, 2715-22.
- Maguire, M.F., Guinea, R., Griffin, P., Macmanus, S., Elston, R.C., Wolfram, J., *et al.* (2002). Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449

- and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro. *J Virol* **76**, 7398-406.
- Malet, I., Delelis, O., Valantin, M.A., Montes, B., Soulie, C., Wirden, M., *et al.* (2008). Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1351-8.
- Malet, I., Roquebert, B., Dalban, C., Wirden, M., Amellal, B., Agher, R., *et al.* (2007). Association of Gag cleavage sites to protease mutations and to virological response in HIV-1 treated patients. *J Infect* **54**, 367-74.
- Maljkovic, I., Wilbe, K., Solver, E., Alaeus, A. & Leitner, T. (2003). Limited transmission of drug-resistant HIV type 1 in 100 Swedish newly detected and drug-naive patients infected with subtypes A, B, C, D, G, U, and CRF01\_AE. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 989-97.
- Mansky, L.M. & Temin, H.M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-94.
- Marcelin, A.G., Delaugerre, C., Wirden, M., Viegas, P., Simon, A., Katlama, C. & Calvez, V. (2004). Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol* **72**, 162-5.
- Marcelin, A.G., Flandre, P., Pavie, J., Schmidely, N., Wirden, M., Lada, O., *et al.* (2005). Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1739-44.
- Marchand, C., Johnson, A.A., Semenova, E. & Pommier, Y. (2006). *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. **3**, 253-60.
- Marchand, C., Johnson AA, Semenova E, Pommier Y (2006). Mechanisms and inhibition of HIV integration. *Drug Discov Today: Disease mechanisms* **3**, 253-60.
- Marozsan, A.J., Kuhmann, S.E., Morgan, T., Herrera, C., Rivera-Troche, E., Xu, S., *et al.* (2005). Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule CCR5 inhibitor, SCH-417690 (SCH-D). *Virology* **338**, 182-99.
- Marquina, S., Leitner, T., Rabinovich, R.D., Benetucci, J., Libonatti, O. & Albert, J. (1996). Coexistence of subtypes B, F, and as B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 1651-4.
- Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., *et al.* (2001). Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1836-42.
- McCutchan, F.E. (2000). Understanding the genetic diversity of HIV-1. *Aids* **14 Suppl 3**, S31-44.
- McCutchan, F.E. (2006). Global epidemiology of HIV. *Journal Of Medical Virology* **78**, S7-S12.
- McCutchan, F.E., Carr, J.K., Murphy, D., Piyasirisilp, S., Gao, F., Hahn, B., *et al.* (2002). Precise mapping of recombination breakpoints suggests a common parent of two BC recombinant HIV type 1 strains circulating in China. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 1135-40.
- McCutchan, F.E., Sankale, J.L., M'Boup, S., Kim, B., Tovanabutra, S., Hamel, D.J., *et al.* (2004). HIV type 1 circulating recombinant form CRF09\_cpx from west Africa combines subtypes A, F, G, and may share ancestors with CRF02\_AG and Z321. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 819-26.



- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. & Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* **159**, 441-52.
- McMichael, A.J. & O'Callaghan, C.A. (1998). A new look at T cells. *J Exp Med* **187**, 1367-71.
- Melby, T., Sista, P., DeMasi, R., Kirkland, T., Roberts, N., Salgo, M., *et al.* (2006). Characterization of envelope glycoprotein gp41 genotype and phenotypic susceptibility to enfuvirtide at baseline and on treatment in the phase III clinical trials TORO-1 and TORO-2. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 375-85.
- Melikyan, G.B. (2008). Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**, 111.
- Mellors, J.W., Munoz, A., Giorgi, J.V., Margolick, J.B., Tassoni, C.J., Gupta, P., *et al.* (1997). Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* **126**, 946-54.
- Meloni, S.T., Kim, B., Sankale, J.L., Hamel, D.J., Tovanabutra, S., Mboup, S., *et al.* (2004). Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol* **78**, 12438-45.
- Michienzi, A., Li, S., Zaia, J.A. & Rossi, J.J. (2002). A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14047-52.
- Miele, G., Moulard, A., Harrison, G.P., Cohen, E. & Lever, A.M. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J Virol* **70**, 944-51.
- Miller, M.D., Farnet, C.M. & Bushman, F.D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**, 5382-90.
- Mokili, J.L., Wade, C.M., Burns, S.M., Cutting, W.A., Bopopi, J.M., Green, S.D., *et al.* (1999). Genetic heterogeneity of HIV type 1 subtypes in Kimpese, rural Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 655-64.
- Moncunill, G., Armand-Ugon, M., Pauls, E., Clotet, B. & Este, J.A. (2008). HIV-1 escape to CCR5 coreceptor antagonism through selection of CXCR4-using variants in vitro. *Aids* **22**, 23-31.
- Montano, M.A., Nixon, C.P., Ndung'u, T., Bussmann, H., Novitsky, V.A., Dickman, D. & Essex, M. (2000). Elevated tumor necrosis factor-alpha activation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Southern Africa is associated with an NF-kappaB enhancer gain-of-function. *J Infect Dis* **181**, 76-81.
- Montavon, C., Bibollet-Ruche, F., Robertson, D., Koumare, B., Mulanga, C., Esu-Williams, E., *et al.* (1999). The identification of a complex A/G/I/J recombinant HIV type 1 virus in various West African countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 1707-12.
- Montavon, C., Toure-Kane, C., Nkengasong, J.N., Vergne, L., Hertogs, K., Mboup, S., *et al.* (2002a). CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 522-30.
- Montavon, C., Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Malonga-Mouellet, G., Butel, C., *et al.* (2002b). Identification of a new circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11-cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01-AE, in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 231-6.
- Moore, J.P., Kitchen, S.G., Pugach, P. & Zack, J.A. (2004). The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 111-26.
- Morikawa, Y. (2003). HIV capsid assembly. *Curr HIV Res* **1**, 1-14.

- Morikawa, Y., Hockley, D.J., Nermut, M.V. & Jones, I.M. (2000). Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J Virol* **74**, 16-23.
- Munoz, A., Kirby, A.J., He, Y.D., Margolick, J.B., Visscher, B.R., Rinaldo, C.R., *et al.* (1995). Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **8**, 496-505.
- Murakami, T. & Yamamoto, N. (2000). Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int J Hematol* **72**, 412-7.
- Musey, L., Hughes, J., Schacker, T., Shea, T., Corey, L. & McElrath, M.J. (1997). Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **337**, 1267-74.
- Naderi, H.R., Tagliamonte, M., Tornesello, M.L., Ciccozzi, M., Rezza, G., Farid, R., *et al.* (2006). Molecular and phylogenetic analysis of HIV-1 variants circulating among injecting drug users in Mashhad-Iran. *Infect Agent Cancer* **1**, 4.
- Nam, J.G., Kim, G.J., Baek, J.Y., Suh, S.D., Kee, M.K., Lee, J.S. & Kim, S.S. (2006). Molecular investigation of human immunodeficiency virus type 2 subtype a cases in South Korea. *J Clin Microbiol* **44**, 1543-6.
- Navarro, F. & Landau, N.R. (2004). Recent insights into HIV-1 Vif. *Curr Opin Immunol* **16**, 477-82.
- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M., McKeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., *et al.* (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**, 615-20.
- Neilson, J.R., John, G.C., Carr, J.K., Lewis, P., Kreiss, J.K., Jackson, S., *et al.* (1999). Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *J Virol* **73**, 4393-403.
- Nicholson, L.K., Yamazaki, T., Torchia, D.A., Grzesiek, S., Bax, A., Stahl, S.J., *et al.* (1995). Flexibility and function in HIV-1 protease. *Nat Struct Biol* **2**, 274-80.
- Nickle, D.C., Jensen, M.A., Shriner, D., Brodie, S.J., Frenkel, L.M., Mittler, J.E. & Mullins, J.I. (2003a). Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol* **77**, 5540-6.
- Nickle, D.C., Shriner, D., Mittler, J.E., Frenkel, L.M. & Mullins, J.I. (2003b). Importance and detection of virus reservoirs and compartments of HIV infection. *Curr Opin Microbiol* **6**, 410-6.
- Nijhuis, M., van Maarseveen, N.M., Lastere, S., Schipper, P., Coakley, E., Glass, B., *et al.* (2007). A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med* **4**, e36.
- Nikolenko, G.N., Palmer, S., Maldarelli, F., Mellors, J.W., Coffin, J.M. & Pathak, V.K. (2005). Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2093-8.
- Nomaguchi, M., Fujita, M. & Adachi, A. (2008). Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect* **10**, 960-7.
- Oelrichs, R.B., Lawson, V.A., Coates, K.M., Chatfield, C., Deacon, N.J. & McPhee, D.A. (2000). Rapid full-length genomic sequencing of two cytopathically heterogeneous Australian primary HIV-1 isolates. *J Biomed Sci* **7**, 128-35.
- Ogert, R.A., Wojcik, L., Buontempo, C., Ba, L., Buontempo, P., Ralston, R., *et al.* (2008). Mapping resistance to the CCR5 co-receptor antagonist vicriviroc using heterologous chimeric HIV-1 envelope genes reveals key determinants in the C2-V5 domain of gp120. *Virology* **373**, 387-99.

- Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., *et al.* (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**, 2103-6.
- Ohagen, A. & Gabuzda, D. (2000). Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* **74**, 11055-66.
- Osmanov, S., Pattou, C., Walker, N., Schwardlander, B. & Esparza, J. (2002). Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 184-90.
- Paladin, F.J., Monzon, O.T., Tsuchie, H., Aplasca, M.R., Learn, G.H., Jr. & Kurimura, T. (1998). Genetic subtypes of HIV-1 in the Philippines. *Aids* **12**, 291-300.
- Palma, A.C., Araujo, F., Duque, V., Borges, F., Paixao, M.T. & Camacho, R. (2007). Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect Genet Evol* **7**, 391-8.
- Pannecouque, C., Pluymers, W., Van Maele, B., Tetz, V., Cherepanov, P., De Clercq, E., *et al.* (2002). New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr Biol* **12**, 1169-77.
- Pantaleo, G., Cohen, O.J., Schacker, T., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Rizzardi, G.P., *et al.* (1998). Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med* **4**, 341-5.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., *et al.* (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**, 355-8.
- Papathanasopoulos, M.A., Hunt, G.M. & Tiemessen, C.T. (2003). Evolution and diversity of HIV-1 in Africa--a review. *Virus Genes* **26**, 151-63.
- Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Katsoulidou, A., Hatzitheodorou, E., Antoniadou, A., Papadopoulos, A., *et al.* (2005). Prevalence of resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Greece. *Virus Res* **112**, 115-22.
- Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Magiorkinis, G., Anastassopoulou, C., Lazanas, M., Chrysos, G., *et al.* (2001a). Molecular characterization of a complex, recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate (A/G/J/K/?): evidence to support the existence of a novel HIV-1 subtype. *J Gen Virol* **82**, 2509-14.
- Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Theodoridou, M., Mostrou, G., Papaevangelou, V., Kiosses, V.G., *et al.* (1999). Molecular epidemiology of vertical human immunodeficiency virus type I transmission in Greece: Evidence of non-B subtypes. *Journal Of Human Virology* **2**, 339-43.
- Paraskevis, D., Magiorkinis, M., Vandamme, A.M., Kostrikis, L.G. & Hatzakis, A. (2001b). Re-analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Cyprus and Greece, initially designated 'subtype I', reveals a unique complex A/G/H/K/? mosaic pattern. *J Gen Virol* **82**, 575-80.
- Paraskevis, D., Pybus, O., Magiorkinis, G., Hatzakis, A., Wensing, A.M., van de Vijver, D.A., *et al.* (2009). Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach. *Retrovirology* **6**, 49.
- Parikh, U.M., Bacheler, L., Koontz, D. & Mellors, J.W. (2006a). The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. *J Virol* **80**, 4971-7.
- Parikh, U.M., Barnas, D.C., Faruki, H. & Mellors, J.W. (2006b). Antagonism between the HIV-1 reverse-transcriptase mutation K65R and thymidine-analogue mutations at the genomic level. *J Infect Dis* **194**, 651-60.
- Parkin, N.T., Gupta, S., Chappay, C. & Petropoulos, C.J. (2006). The K101P and K103R/V179D mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse

- transcriptase confer resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 351-4.
- Parkin, N.T. & Schapiro, J.M. (2004). Antiretroviral drug resistance in non-subtype B HIV-1, HIV-2 and SIV. *Antivir Ther* **9**, 3-12.
- Parreira, R., Padua, E., Piedade, J., Venenno, T., Paixao, M.T. & Esteves, A. (2005). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef in Portugal: subtyping, identification of mosaic genes, and amino acid sequence variability. *J Med Virol* **77**, 8-16.
- Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., *et al.* (1997). Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* **11**, 493-8.
- Peeters, M. & Sharp, P.M. (2000). Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *Aids* **14 Suppl 3**, S129-40.
- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J. & Deacon, N.J. (2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* **28**, 663-8.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. & Ho, D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-6.
- Perno, C.F., Cozzi-Lepri, A., Forbici, F., Bertoli, A., Violin, M., Stella Mura, M., *et al.* (2004). Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed. *J Infect Dis* **189**, 1983-7.
- Perrin, L. & Telenti, A. (1998). HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practice. *Science* **280**, 1871-3.
- Petropoulos, C.J., Parkin, N.T., Limoli, K.L., Lie, Y.S., Wrin, T., Huang, W., *et al.* (2000). A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 920-8.
- Pettit, S.C., Everitt, L.E., Choudhury, S., Dunn, B.M. & Kaplan, A.H. (2004). Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J Virol* **78**, 8477-85.
- Pettit, S.C., Lindquist, J.N., Kaplan, A.H. & Swanstrom, R. (2005). Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology* **2**, 66.
- Phillips, A.N. (1996). Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science* **271**, 497-9.
- Piatak, M., Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., *et al.* (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**, 1749-54.
- Pieniazek, D., Baggs, J., Hu, D.J., Matar, G.M., Abdelnoor, A.M., Mokhbat, J.E., *et al.* (1998). Introduction of HIV-2 and multiple HIV-1 subtypes to Lebanon. *Emerg Infect Dis* **4**, 649-56.
- Pillai, S., Good, B., Richman, D. & Corbeil, J. (2003). A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 145-9.
- Piyasirisilp, S., McCutchan, F.E., Carr, J.K., Sanders-Buell, E., Liu, W., Chen, J., *et al.* (2000). A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol* **74**, 11286-95.

- Pluda, J.M., Cooley, T.P., Montaner, J.S., Shay, L.E., Reinhalter, N.E., Warthan, S.N., *et al.* (1995). A phase I/II study of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (lamivudine) in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **171**, 1438-47.
- Pollard, V.W. & Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- Pommier, Y., Johnson, A.A. & Marchand, C. (2005). Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 236-48.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. & Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* **273**, 13347-52.
- Poveda, E., Briz, V., Quinones-Mateu, M. & Soriano, V. (2006). HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *Aids* **20**, 1359-67.
- Poveda, E., Briz, V., Roulet, V., Del Mar Gonzalez, M., Faudon, J.L., Skrabal, K. & Soriano, V. (2007). Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use. *Aids* **21**, 1487-90.
- Ptak, R.G., Fu, W., Sanders-Beer, B.E., Dickerson, J.E., Pinney, J.W., Robertson, D.L., *et al.* (2008). Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**, 1497-502.
- Puren, A.J. (2002). The HIV-1 epidemic in South Africa. *Oral Diseases* **8**, 27-31.
- Rambaut, A., Robertson, D.L., Pybus, O.G., Peeters, M. & Holmes, E.C. (2001). Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* **410**, 1047-8.
- Ramirez de Arellano, E., Soriano, V., Alcamil, J. & Holguin, A. (2006). New findings on transcription regulation across different HIV-1 subtypes. *AIDS Rev* **8**, 9-16.
- Rayfield, M., De Cock, K., Heyward, W., Goldstein, L., Krebs, J., Kwok, S., *et al.* (1988). Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **158**, 1170-6.
- Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Souyris, C., Sandres-Saune, K., *et al.* (2008). Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *Aids* **22**, F11-6.
- Reeves, J.D., Gallo, S.A., Ahmad, N., Miamidian, J.L., Harvey, P.E., Sharron, M., *et al.* (2002). Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16249-54.
- Ren, J., Chamberlain, P.P., Stamp, A., Short, S.A., Weaver, K.L., Romines, K.R., *et al.* (2008). Structural basis for the improved drug resistance profile of new generation benzophenone non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *J Med Chem* **51**, 5000-8.
- Restle, T., Muller, B. & Goody, R.S. (1990). Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *J Biol Chem* **265**, 8986-8.
- Rhee, S.Y., Gonzales, M.J., Kantor, R., Betts, B.J., Ravela, J. & Shafer, R.W. (2003). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* **31**, 298-303.
- Rhee, S.Y., Kantor, R., Katzenstein, D.A., Camacho, R., Morris, L., Sirivichayakul, S., *et al.* (2006a). HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. *Aids* **20**, 643-51.
- Rhee, S.Y., Liu, T., Ravela, J., Gonzales, M.J. & Shafer, R.W. (2004). Distribution of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase mutation

- patterns in 4,183 persons undergoing genotypic resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3122-6.
- Rhee, S.Y., Liu, T.F., Holmes, S.P. & Shafer, R.W. (2007). HIV-1 subtype B protease and reverse transcriptase amino acid covariation. *PLoS Comput Biol* **3**, e87.
- Rhee, S.Y., Taylor, J., Wadhwa, G., Ben-Hur, A., Brutlag, D.L. & Shafer, R.W. (2006b). Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17355-60.
- Richman, D.D. & Bozzette, S.A. (1994). The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* **169**, 968-74.
- Richter, S., Cao, H. & Rana, T.M. (2002a). Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 6391-7.
- Richter, S., Ping, Y.H. & Rana, T.M. (2002b). TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7928-33.
- Rios, M., Delgado, E., Perez-Alvarez, L., Fernandez, J., Galvez, P., de Parga, E.V., *et al.* (2007). Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol* **79**, 647-56.
- Robbins, K.E., Kostrikis, L.G., Brown, T.M., Anzala, O., Shin, S., Plummer, F.A. & Kalish, M.L. (1999). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kenya: a comparison using phylogenetic analysis and a combinatorial melting assay. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 329-35.
- Roberts, J.D., Bebenek, K. & Kunkel, T.A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171-3.
- Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., *et al.* (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-6.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E. & Hahn, B.H. (1995). Recombination in HIV-1. *Nature* **374**, 124-6.
- Rodenburg, C.M., Li, Y., Trask, S.A., Chen, Y., Decker, J., Robertson, D.L., *et al.* (2001). Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 161-8.
- Rodrigues, R., Scherer, L.C., Oliveira, C.M., Franco, H.M., Sperhake, R.D., Ferreira, J.L., *et al.* (2006). Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* **116**, 201-7.
- Roman, F., Gonzalez, D., Lambert, C., Deroo, S., Fischer, A., Baurith, T., *et al.* (2003). Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naïve patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* **33**, 134-9.
- Roques, P., Robertson, D.L., Souquiere, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barre-Sinoussi, F., *et al.* (2004). Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *Aids* **18**, 1371-81.
- Roques, P., Robertson, D.L., Souquiere, S., Damond, F., Ayoub, A., Farfara, I., *et al.* (2002). Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. *Virology* **302**, 259-73.
- Ryan, C.E., Elliott, J.H., Middleton, T., Mijch, A.M., Street, A.C., Hellard, M., *et al.* (2004). The molecular epidemiology of HIV type 1 among Vietnamese Australian injecting drug users in Melbourne, Australia. *Aids Research And Human Retroviruses* **20**, 1364-67.
- Saag, M., Goodrich, J., Fatkenheuer, G., Clotet, B., Clumeck, N., Sullivan, J., *et al.* (2009). A double-blind, placebo-controlled trial of maraviroc in treatment-experienced patients infected with non-R5 HIV-1. *J Infect Dis* **199**, 1638-47.

- Salminen, M.O., Carr, J.K., Robertson, D.L., Hegerich, P., Gotte, D., Koch, C., *et al.* (1997). Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* **71**, 2647-55.
- Sandefur, S., Smith, R.M., Varthakavi, V. & Spearman, P. (2000). Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol* **74**, 7238-49.
- Saracino, A., Monno, L., Scudeller, L., Cibelli, D.C., Tartaglia, A., Punzi, G., *et al.* (2006). Impact of unreported HIV-1 reverse transcriptase mutations on phenotypic resistance to nucleoside and non-nucleoside inhibitors. *J Med Virol* **78**, 9-17.
- Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark AD Jr, Ding J, Whitcomb JM, *et al.* (2001). Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J.* **20**, 1449-61.
- Sattentau, Q.J. & Moore, J.P. (1993). The role of CD4 in HIV binding and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **342**, 59-66.
- Schim van der Loeff, M.F. & Aaby, P. (1999). Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *Aids* **13 Suppl A**, S69-84.
- Schrofelbauer, B., Yu, Q. & Landau, N.R. (2004). New insights into the role of Vif in HIV-1 replication. *AIDS Rev* **6**, 34-9.
- Schuitemaker, H., Kootstra, N.A., de Goede, R.E., de Wolf, F., Miedema, F. & Tersmette, M. (1991). Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol* **65**, 356-63.
- Schwartz, O., Marechal, V., Danos, O. & Heard, J.M. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol* **69**, 4053-9.
- Sebastian, J. & Faruki, H. (2004). Update on HIV resistance and resistance testing. *Med Res Rev* **24**, 115-25.
- Shafer, R.W., Rhee, S.Y., Pillay, D., Miller, V., Sandstrom, P., Schapiro, J.M., *et al.* (2007). HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *Aids* **21**, 215-23.
- Shafer, R.W. & Schapiro, J.M. (2008). HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* **10**, 67-84.
- Shaheen, F. & Collman, R.G. (2004). Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Curr Opin Infect Dis* **17**, 7-16.
- Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., *et al.* (2008). Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol* **82**, 764-74.
- Sierra, S., Kupfer, B. & Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* **34**, 233-44.
- Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., *et al.* (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**, 1032-7.
- Simon, J.H., Fouchier, R.A., Southerling, T.E., Guerra, C.B., Grant, C.K. & Malim, M.H. (1997). The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *J Virol* **71**, 5259-67.
- Sing, T., Low, A.J., Beerenwinkel, N., Sander, O., Cheung, P.K., Domingues, F.S., *et al.* (2007). Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther* **12**, 1097-106.

- Sista, P.R., Melby, T., Davison, D., Jin, L., Mosier, S., Mink, M., *et al.* (2004). Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *Aids* **18**, 1787-94.
- Skrabal, K., Low, A.J., Dong, W., Sing, T., Cheung, P.K., Mammano, F. & Harrigan, P.R. (2007). Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol* **45**, 279-84.
- Smith, D.M., Richman, D.D. & Little, S.J. (2005). HIV superinfection. *J Infect Dis* **192**, 438-44.
- Smolskaya, T., Liitsola, K., Zetterberg, V., Golovanova, E., Kevlova, N., Konovalova, N., *et al.* (2006). HIV epidemiology in the Northwestern Federal District of Russia: dominance of HIV type 1 subtype A. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 1074-80.
- Snoeck, J., Van Laethem, K., Hermans, P., Van Wijngaerden, E., Derdelinckx, I., Schrooten, Y., *et al.* (2004). Rising prevalence of HIV-1 non-B subtypes in Belgium: 1983-2001. *J Acquir Immune Defic Syndr* **35**, 279-85.
- Soulie, C., Derache, A., Aime, C., Marcelin, A.G., Carcelain, G., Simon, A., *et al.* (2008). Comparison of two genotypic algorithms to determine HIV-1 tropism. *HIV Med* **9**, 1-5.
- SPREAD (2008). The SPREAD programme: Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *Aids* **22**, 625-35.
- Stanford HIV Resistance Database (2008). Genotypic Resistance Interpretation Algorithm (HIVdb Program: Sequence Analysis). <http://hivdb.stanford.edu>.
- Stark, L.A. & Hay, R.T. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J Virol* **72**, 3037-44.
- Stricker, R.B. & Elswood, B.F. (1997). Polio vaccines and the origin of AIDS: an update. *Med Hypotheses* **48**, 193.
- Strizki, J.M., Tremblay, C., Xu, S., Wojcik, L., Wagner, N., Gonsiorek, W., *et al.* (2005). Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4911-9.
- Su, C., Melby, T., DeMasi, R., Ravindran, P. & Heilek-Snyder, G. (2006). Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins on treatment with the fusion inhibitor enfuvirtide and their influence on changes in drug susceptibility in vitro. *J Clin Virol* **36**, 249-57.
- Su, L., Graf, M., Zhang, Y., von Briesen, H., Xing, H., Kostler, J., *et al.* (2000). Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol* **74**, 11367-76.
- Sullivan, M.T., Guido, E.A., Metler, R.P., Schable, C.A., Williams, A.E. & Stramer, S.L. (1998). Identification and characterization of an HIV-2 antibody-positive blood donor in the United States. *Transfusion* **38**, 189-93.
- Tagliamonte, M., Naderi, H.R., Tornesello, M.L., Farid, R., Buonaguro, F.M. & Buonaguro, L. (2007). HIV type 1 subtype A epidemic in injecting drug user (IDU) communities in Iran. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 1569-74.
- Takebe, E.Y., Kusagawa, S. & Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: tracking AIDS pandemic. *Pediatr Int* **46**, 236-44.
- Takebe, Y., Motomura, K., Tatsumi, M., Lwin, H.H., Zaw, M. & Kusagawa, S. (2003). High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *Aids* **17**, 2077-87.



- Takebe, Y., Uenishi, R. & Li, X. (2008). Global molecular epidemiology of HIV: understanding the genesis of AIDS pandemic. *Adv Pharmacol* **56**, 1-25.
- Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., *et al.* (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *J Virol* **73**, 6810-20.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-9.
- Tee, K.K., Li, X.J., Nohtomi, K., Ng, K.P., Kamarulzaman, A. & Takebe, Y. (2006). Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J AIDS-Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **43**, 523-29.
- Tee, K.K., Pon, C.K., Kamarulzaman, A. & Ng, K.P. (2005). Emergence of HIV-1 CRF01\_AE/B unique recombinant forms in Kuala Lumpur, Malaysia. *Aids* **19**, 119-26.
- Thomson, M.M., Casado, G., Posada, D., Sierra, M. & Najera, R. (2005). Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18\_cpx) of Central African origin in Cuba. *Aids* **19**, 1155-63.
- Thomson, M.M., Delgado, E., Manjon, N., Ocampo, A., Villahermosa, M.L., Marino, A., *et al.* (2001). HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *Aids* **15**, 509-16.
- Thomson, M.M., Villahermosa, M.L., Vazquez-de-Parga, E., Cuevas, M.T., Delgado, E., Manjon, N., *et al.* (2000). Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *Aids* **14**, 897-9.
- Tindall, B. & Cooper, D.A. (1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *Aids* **5**, 1-14.
- Tolstrup, M., Selzer-Plon, J., Laursen, A.L., Bertelsen, L., Gerstoft, J., Duch, M., *et al.* (2007). Full fusion competence rescue of the enfuvirtide resistant HIV-1 gp41 genotype (43D) by a prevalent polymorphism (137K). *Aids* **21**, 519-21.
- Touloumi, G. & Hatzakis, A. (2000). Natural history of HIV-1 infection. *Clin Dermatol* **18**, 389-99.
- Tran, T.T., Maljkovic, I., Swartling, S., Phung, D.C., Chiodi, F. & Leitner, T. (2004). HIV-1 CRF01\_AE in intravenous drug users in Hanoi, Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 341-5.
- Triques, K., Bourgeois, A., Saragosti, S., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Nzilambi, N., *et al.* (1999). High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology* **259**, 99-109.
- Triques, K., Bourgeois, A., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., *et al.* (2000). Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 139-51.
- Trouplin, V., Salvatori, F., Cappello, F., Obry, V., Brelot, A., Heveker, N., *et al.* (2001). Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* **75**, 251-9.
- Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., Mangeat, B., Klages, N., Evans, R., *et al.* (2001). Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell* **7**, 1245-54.
- Udier-Blagovic, M., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W.L. (2003). Validation of a model for the complex of HIV-1 reverse transcriptase with nonnucleoside inhibitor TMC125. *J Am Chem Soc* **125**, 6016-7.
- UNAIDS (2008). 08 Report on the global AIDS epidemic.

UNAIDS/WHO (2005). AIDS epidemic update, December 2005

UNAIDS/WHO (2007). 07 AIDS epidemic update

- Van Baelen, K., Clynhens M, Rondelez E, Van Eygen V, Van den Zegel P, Vermeiren H, Vandenbroucke I, Stuyver LJ (2007). Low level of baseline resistance to integrase inhibitors L731,988 and L870,810 in randomly selected subtype B and non-B HIV-1 strains. *Antivir Ther* **12**, S7.
- Van Baelen, K., Vandenbroucke, I., Rondelez, E., Van Eygen, V., Vermeiren, H. & Stuyver, L.J. (2007). HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods* **146**, 61-73.
- van de Vijver, D., Wensing, A. & Boucher, C. (2007). The Epidemiology of Transmission of Drug Resistant HIV-1. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
- van de Vijver, D.A., Wensing, A.M., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., *et al.* (2006). The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* **41**, 352-60.
- van der Hoek, L., Pollakis, G., Lukashov, V.V., Jebbink, M.F., Jeeninga, R.E., Bakker, M., *et al.* (2007). Characterization of an HIV-1 group M variant that is distinct from the known subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 466-70.
- van der Kuyl, A.C. & Cornelissen, M. (2007). Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology* **4**, 67.
- van Harmelen, J., Wood, R., Lambrick, M., Rybicki, E.P., Williamson, A.L. & Williamson, C. (1997). An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *Aids* **11**, 81-7.
- Van Laethem, K., Schrooten, Y., Lemey, P., Van Wijngaerden, E., De Wit, S., Van Ranst, M. & Vandamme, A.M. (2005). A genotypic resistance assay for the detection of drug resistance in the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene. *J Virol Methods* **123**, 25-34.
- Van Maele, B. & Debyser, Z. (2005). HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* **7**, 26-43.
- Vandamme, A.M., Houyez, F., Banhegyi, D., Clotet, B., De Schrijver, G., De Smet, K.A., *et al.* (2001). Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir Ther* **6**, 21-39.
- Vandamme, A.M., Sonnerborg, A., Ait-Khaled, M., Albert, J., Asjo, B., Bacheler, L., *et al.* (2004). Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir Ther* **9**, 829-48.
- Vandegraaff, N. & Engelman, A. (2007). Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Rev Mol Med* **9**, 1-19.
- Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., *et al.* (2003). Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02\_AG variant and disease stage. *Virology* **310**, 254-66.
- Vergne, L., Peeters, M., Mpoudi-Ngole, E., Bourgeois, A., Liegeois, F., Toure-Kane, C., *et al.* (2000). Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J Clin Microbiol* **38**, 3919-25.

- Verheyen, J., Litau, E., Sing, T., Daumer, M., Balduin, M., Oette, M., *et al.* (2006). Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients. *Antivir Ther* **11**, 879-87.
- Vermeiren, H., Van Craenenbroeck, E., Alen, P., Bacheler, L., Picchio, G. & Lecocq, P. (2007). Prediction of HIV-1 drug susceptibility phenotype from the viral genotype using linear regression modeling. *J Virol Methods* **145**, 47-55.
- Vidal, N., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Delaporte, E. & Peeters, M. (2000). Identification of a complex env subtype E HIV type 1 virus from the democratic republic of congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 2059-64.
- Vidal, N., Mulanga, C., Bazepeo, S.E., Mwamba, J.K., Tshimpaka, J.W., Kashi, M., *et al.* (2005). Distribution of HIV-1 variants in the Democratic Republic of Congo suggests increase of subtype C in Kinshasa between 1997 and 2002. *J AIDS-Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **40**, 456-62.
- Vingerhoets, J., Azijn, H., Franssen, E., De Baere, I., Smeulders, L., Jochmans, D., *et al.* (2005). TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments. *J Virol* **79**, 12773-82.
- Wain-Hobson, S. (1993). The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 878-83.
- Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M. & Shafer, R.W. (2007a). Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* **17**, 1195-201.
- Wang, F.X., Zhou, H., Ling, H., Zhou, H.Z., Liu, W.H., Shao, Y.M. & Zhou, J. (2007b). Subtype and sequence analysis of HIV-1 strains in Heilongjiang Province. *Chin Med J (Engl)* **120**, 2006-10.
- Wang, Z., Lyles, C.M., Beyrer, C., Celentano, D.D., Vlahov, D., Natpratan, C., *et al.* (1998). Diversification of subtype E human immunodeficiency virus type 1 env in heterosexual seroconverters from northern Thailand. *Journal Of Infectious Diseases* **178**, 1507-11.
- Weerasinghe, M., Liem, S.E., Asad, S., Read, S.E. & Joshi, S. (1991). Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human CD4+ lymphocyte-derived cell lines conferred by using retroviral vectors expressing an HIV-1 RNA-specific ribozyme. *J Virol* **65**, 5531-4.
- Wensing, A.M. & Boucher, C.A. (2003). Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* **5**, 140-55.
- Wensing, A.M., van de Vijver, D.A., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., *et al.* (2005). Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* **192**, 958-66.
- Westby, M., Smith-Burchnell, C., Mori, J., Lewis, M., Mosley, M., Stockdale, M., *et al.* (2007). 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* **81**, 2359-71.
- Westby, M. & van der Ryst, E. (2005). CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir Chem Chemother* **16**, 339-54.
- Whitcomb, J.M., Huang, W., Fransen, S., Limoli, K., Toma, J., Wrinn, T., *et al.* (2007). Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 566-75.
- Whitcomb, J.M., Parkin, N.T., Chappey, C., Hellmann, N.S. & Petropoulos, C.J. (2003). Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis* **188**, 992-1000.

- Wilbe, K., Casper, C., Albert, J. & Leitner, T. (2002). Identification of two CRF11-cpx genomes and two preliminary representatives of a new circulating recombinant form (CRF13-cpx) of HIV type 1 in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 849-56.
- Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. & Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* **66**, 7193-200.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., *et al.* (1989). Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**, 616-21.
- Worobey, M. & Holmes, E.C. (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* **80 ( Pt 10)**, 2535-43.
- Wu, Z., Alexandratos, J., Ericksen, B., Lubkowski, J., Gallo, R.C. & Lu, W. (2004). Total chemical synthesis of N-myristoylated HIV-1 matrix protein p17: structural and mechanistic implications of p17 myristoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11587-92.
- Xu, L., Hue, S., Taylor, S., Ratcliffe, D., Workman, J.A., Jackson, S., *et al.* (2002). Minimal variation in T-20 binding domain of different HIV-1 subtypes from antiretroviral-naive and -experienced patients. *Aids* **16**, 1684-6.
- Xu, L., Pozniak, A., Wildfire, A., Stanfield-Oakley, S.A., Mosier, S.M., Ratcliffe, D., *et al.* (2005). Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1113-9.
- Yahi, N., Tamalet, C., Tourres, C., Tivoli, N. & Fantini, J. (2000). Mutation L210W of HIV-1 reverse transcriptase in patients receiving combination therapy. Incidence, association with other mutations, and effects on the structure of mutated reverse transcriptase. *J Biomed Sci* **7**, 507-13.
- Yang, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Xia, X., Ben, K. & Takebe, Y. (2003). Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07\_BC and CRF08\_BC, in China. *J Virol* **77**, 685-95.
- Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K. & Takebe, Y. (2002). On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China. *Aids* **16**, 1401-7.
- Yang, X. & Gabuzda, D. (1999). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* **73**, 3460-6.
- Yeni, P. (2006). Update on HAART in HIV. *J Hepatol* **44**, S100-3.
- Yeni, P.G., Hammer, S.M., Hirsch, M.S., Saag, M.S., Schechter, M., Carpenter, C.C., *et al.* (2004). Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama* **292**, 251-65.
- Yerly, S., Kaiser, L., Perneger, T.V., Cone, R.W., Opravil, M., Chave, J.P., *et al.* (2000). Time of initiation of antiretroviral therapy: impact on HIV-1 viraemia. The Swiss HIV Cohort Study. *Aids* **14**, 243-9.
- Yerly, S., Rakik, A., De Loes, S.K., Hirschel, B., Descamps, D., Brun-Vezinet, F. & Perrin, L. (1998). Switch to unusual amino acids at codon 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene in seroconvertors infected with zidovudine-resistant variants. *J Virol* **72**, 3520-3.
- Yilmaz, A., Bolinger, C. & Boris-Lawrie, K. (2006). Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res* **4**, 131-9.
- Yoshinari, K., Miyagishi, M. & Taira, K. (2004). Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res* **32**, 691-9.

- Young, B., Johnson, S., Bahktiari, M., Shugarts, D., Young, R.K., Allen, M., *et al.* (1998). Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure. *J Infect Dis* **178**, 1497-501.
- Zarandia, M., Tsertsvadze, T., Carr, J.K., Nadai, Y., Sanchez, J.L. & Nelson, A.K. (2006). HIV-1 genetic diversity and genotypic drug susceptibility in the Republic of Georgia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 470-6.
- Zeinalipour-Loizidou, E., Nicolaou, C., Nicolaidis, A. & Kostrikis, L.G. (2007). HIV-1 integrase: from biology to chemotherapeutics. *Curr HIV Res* **5**, 365-88.
- Zetterberg, V., Ustina, V., Liitsola, K., Zilmer, K., Kalikova, N., Sevastianova, K., *et al.* (2004). Two viral strains and a possible novel recombinant are responsible for the explosive injecting drug use-associated HIV type 1 epidemic in Estonia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 1148-56.
- Zhang, Y., Lu, L., Ba, L., Liu, L., Yang, L., Jia, M.H., *et al.* (2006). Dominance of HIV-1 subtype CRF01\_AE in sexually acquired cases leads to a new epidemic in Yunnan Province of China. *Plos Medicine* **3**.
- Zheng, R., Jenkins, T.M. & Craigie, R. (1996). Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13659-64.
- Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W. & Resh, M.D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* **68**, 2556-69.
- Zhou, W. & Resh, M.D. (1996). Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Virol* **70**, 8540-8.

## Παράρτημα

### I. Συντομογραφίες

<b>AIDS,</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας)
<b>BL2/3,</b>	Biosafety Level 2/3 Room (Θάλαμος Βιοασφάλειας Επιπέδου 2/3)
<b>CA,</b>	Capsid/p24 (Πρωτεΐνη του καψιδίου)
<b>CCD,</b>	Catalytic Core Domain (Καταλυτική δομή του πυρήνα)
<b>CRFs,</b>	Circulating Recombinant Forms (Μεταδοτικές Ανασυνδυασμένες Μορφές)
<b>CTD,</b>	C-Terminal Domain (Καρβοξυτελική Περιοχή)
<b>DNA,</b>	Deoxyribonucleic Acid (Δεόξυριβοζονουκλεϊκό οξύ)
<b>DRC,</b>	Democratic Republic of Congo (Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό)
<b>eETVs,</b>	Env Expression Test Vectors (Φορείς έκφρασης του γονιδίου Env)
<b>ELISA,</b>	Enzyme-Linked Immunoassay (Ενζυμική μέθοδος ανοσοπροσδιορισμού)
<b>Env,</b>	Envelope (Πρωτεΐνη του φακέλου)
<b>FDA,</b>	Food and Drug Administration (Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων)
<b>IAS-USA,</b>	International AIDS Society of USA (Διεθνής Οργανισμός για το AIDS)
<b>IDUs,</b>	Intravenous Drugs Users (Ενδοφλέβιοι Χρήστες Ναρκωτικών Ουσιών)
<b>IN,</b>	Integrase (Ιντεγκράση)
<b>IRES,</b>	Internal Ribosomal Entry Signal (Εσωτερικό σήμα εισόδου στα ριβοσώματα)
<b>HIV-1/2,</b>	Human Immunodeficiency Virus type 1/2 (Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1/2)
<b>HMA,</b>	Heteroduplex mobility assay (Τεχνική κινητικότητας ετερόδιπλων μορίων)
<b>LTRs,</b>	Long Terminal Repeats (Μακριά Επαναλαμβανόμενα Τμήματα)
<b>MA,</b>	Matrix/p17 (Πρωτεΐνη του κελύφους)
<b>NC,</b>	Nucleocapsid/p7 (Πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου)
<b>Nef,</b>	Negative factor (Αρνητικός παράγοντας)
<b>NLS,</b>	Nuclear Localization Signal (Σήμα Πυρηνικής Μετατόπισης)
<b>NTD,</b>	N-Terminal Domain (Αμινοτελική Περιοχή)
<b>PBS,</b>	Primer Binding Site (Θέση δέσμευσης εκκινητή)
<b>PBMCs</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Περιφερικά Μονοπύρηνια Κύτταρα Αίματος)

<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
<b>PIC,</b>	Pre-Integration Complex (Σύμπλοκο Προ-Ενσωμάτωσης)
<b>PKR,</b>	Protein Kinase R (Πρωτεϊνική κινάση R)
<b>PR,</b>	Protease (Πρωτεάση)
<b>R,</b>	Repeated (Επαναλαμβανόμενη περιοχή)
<b>Rev,</b>	Regulator of viral protein expression (Ρυθμιστικός παράγοντας της πρωτεϊνικής ιικής έκφρασης)
<b>RNA,</b>	Ribonucleic Acid (Ριβοζονουκλεϊκό οξύ)
<b>RT,</b>	Reverse Transcriptase (Αντίστροφη Μεταγραφή)
<b>RTC,</b>	Reverse Transcriptase Complex (Σύμπλοκο Αντίστροφης Μεταγραφής)
<b>STDs,</b>	Sexual Transmitted Diseases (Σεξουαλικά Μεταδιδόμενες Ασθένειες)
<b>TAR,</b>	Transactivation response region (trans-ενεργοποιητική αλληλουχία)
<b>TRBP,</b>	TAR RNA Binding Protein (TAR RNA δεσμευτική πρωτεΐνη)
<b>Tat,</b>	Transcriptional transactivator protein (Μεταγραφική trans-ενεργοποιητική πρωτεΐνη)
<b>U3,</b>	Unique, 3' end (Μοναδική περιοχή 3'-άκρο)
<b>U5,</b>	Unique, 5' end (Μοναδική περιοχή 5'-άκρο)
<b>URFs,</b>	Unique Recombinant Forms (Μοναδικές Ανασυνδυασμένες Μορφές)
<b>Vif,</b>	Viral infectivity factor (Ιικός μολυσματικός παράγοντας)
<b>Vpr,</b>	Viral protein R (Ιική πρωτεΐνη R)
<b>Vpu,</b>	Viral protein U (Ιική πρωτεΐνη U)
<b>WHO,</b>	World Health Organization (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)

## II. Ανάπτυξη δημοσιευμένων εργασιών

### A. Δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά<sup>1</sup>

1. Kousiappa, I.; Van de Vijver, D. A. M. C.; Kostrikis, L. G. Near Full-Length Genetic Analysis of HIV Sequences Derived from Cyprus: Evidence of a Highly Polyphyletic and Evolving Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2009**, 25, (8), 727-40.
2. Kousiappa, I.; Van de Vijver, D. A. M. C.; Demetriades, I.; Kostrikis, L. G. Genetic Analysis of HIV Type 1 Strains from Newly Infected Untreated Patients in Cyprus: High Genetic Diversity and Low Prevalence of Drug Resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2009**, 25, (1), 23-37.
3. Loizidou, E. Z.; Kousiappa, I.; Zeinalipour-Yazdi, C. D.; Van de Vijver, D. A.; Kostrikis, L. G. Implications of HIV-1 M group polymorphisms on integrase inhibitor efficacy and resistance: genetic and structural in silico analyses. *Biochemistry* **2009**, 48, (1), 4-6.

### B. Ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια

1. Loizidou E., Kousiappa I., Zeinalipour-Yazdi C., Christophides T., Van de Vijver D.A.M.C. and Kostrikis L.G. Computational Analysis of the Binding Parameters of HIV-1 Integrase Inhibitors and Correlation to Resistance Development. *12<sup>th</sup> European AIDS Conference (EACS)*, 11-14 November, **2009**, Cologne, Germany.
2. Kousiappa I., Van de Vijver D.A.M.C. and Kostrikis L.G. Near Full-Length Genetic Analysis of HIV Sequences Derived from Cyprus: Evidence of a Highly Polyphyletic and Evolving Infection. *7<sup>th</sup> European HIV Drug Resistance Workshop*, 25-27 March, **2009**, Stockholm, Sweden.

<sup>1</sup> Τα ανάτυπα των σχετικών δημοσιευμένων εργασιών σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά επισυνάπτονται μετά το Παράρτημα



3. Kousiappa I., Van de Vijver D.A.M.C., Demetriades I. and Kostrikis L.G. Molecular Epidemiology and Drug Resistance Genotypic Analysis of Strains from Patients Infected with Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Cyprus. *15<sup>th</sup> International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases*, 28-30 May, **2008**, Toulon, France.
4. Kousiappa I., Van de Vijver D.A.M.C., Demetriades I. and Kostrikis L.G. Molecular Epidemiology and Drug Resistance in Cyprus 2003-2006. *4<sup>th</sup> European HIV Resistance Meeting*, 15-17 October, **2007**, Zaist, The Netherlands.
5. Kousiappa I., Van de Vijver D. A. M. C., Gilliland S., Demetriades I. and Kostrikis L. G. Epidemiology and Genotypic Analysis of Drug Resistant Strains from Naïve Patients Infected with Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Cyprus. *6<sup>th</sup> HIV Resistance Workshop*, 24-26 March, **2007**, Cascais, Portugal.
6. Kousiappa I., Giantsiou-Kyriakou A., Yiakoumi E., Demetriou V., Kostrikis L.G. Genetic Analysis of the *Env* Gene of HIV Isolates from Patients in Cyprus from 1994 to 2005: Evidence of a Highly Evolving Epidemic. *12<sup>th</sup> International Bioinformatics Worksop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology*, 11-15 September, **2006**, Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.
7. Kousiappa I., Giantsiou-Kyriakou A., Yiakoumi E., Demetriou V., Kostrikis L.G. Genetic Analysis of the *Env* Gene of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Strains from Patients in Cyprus from 1994 until 2005: Evidence of a Highly Evolving Epidemic. *14<sup>th</sup> International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases*, May **2006**, Tulon, France.

**Γ. Ανακοινώσεις σε εθνικά επιστημονικά συνέδρια**

1. Kousiappa I., Giantsou-Kyriacou A., Yiacoumi E. and Kostrikis L.G. Genetic Analysis of the C2-C5 region from strains of the Human Immune Difficiency Virus-1 (HIV-1) in Cypriot Patients from 1994 to to 2005. *8<sup>th</sup> Hellenic Conference on Virology*, 12-14 May, **2006**, Thesallonica, Greece.

# Near Full-Length Genetic Analysis of HIV Sequences Derived from Cyprus: Evidence of a Highly Polyphyletic and Evolving Infection

Ioanna Kousiappa,<sup>1</sup> David A.M.C. Van De Vijver,<sup>2</sup> and Leondios G. Kostrikis<sup>1</sup>

## Abstract

The molecular epidemiology of HIV-1 infection was previously studied in Cyprus but the degree of HIV-1 diversity has remained indefinable. The main objective of the present study is to examine HIV-1 strains isolated from 77 HIV-1-infected individuals representing 38% of the known infected population in Cyprus in the period 1986 to 2006. DNA of the near full-length genome encoding *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env*, and 5'-end of *nef* was amplified by nested PCR/RT-PCR from all HIV-1 seropositives and sequenced using a newly designed assay. Detailed phylogenetic and bootscanning analyses were performed to determine phylogenetic associations and subtype assignments. Phylogenetic analyses of the obtained viral sequences indicated that subtype B was the dominant subtype (61%), followed by subtype A (23.3%), subtype C (5.2%), CRF02\_AG (3.9%), and subtype D, CRF01\_AE, and CRF04\_cpx (1.3% each). Two HIV-1 isolates (2.6%), originating from the Democratic Republic of Congo (DRC), were not classified in any pure (sub)subtype or circulating recombinant form (CRF). Complete phylogenetic and bootscanning analyses revealed that one of these isolates had a new, unique recombinant pattern, comprising segments of subtypes D and G, and is distinct from any other CRFs or URFs reported so far. Detailed analyses of the sequence of the second isolate, which could not be classified, reveal that it is close to subtype K reference sequences but clusters near the root of the clade. At least two epidemiologically unrelated HIV-1 seropositives with an HIV-1 variant similar to this isolate are required to designate this variant as a novel HIV-1 subtype or subsubtype of subtype K. Analogous to results of the earlier epidemiological studies, these data exhibit the extensive heterogeneity of HIV-1 infection in Cyprus, which is being fueled by a continuous entry of new strains from other countries, creating an evolving and polyphyletic infection.

## Introduction

**H**UMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1) has the ability to develop extensive genetic diversity due to the fast turnover of virions in HIV-1 seropositives and the high error and recombination rates of the reverse transcription process.<sup>1-4</sup> Phylogenetic analysis of HIV-1 strains has revealed the complexity of the virus, with nine distinct phylogenetic subtypes (A-D, F-H, J, and K) of the major group M that are associated with the global pandemic, and at least 43 intersubtype recombinants responsible for the epidemic spread, known as circulating recombinant forms (CRFs).<sup>5-7</sup> In addition, there are various unique recombinant forms (URFs) in a population in which multiple HIV-1 strains cocirculate, which are detected either within a single individual or a single epidemiologically linked cluster in the region.<sup>8</sup> The constant

pursuit of the genetic diversity of HIV-1 infection is important for monitoring the global evolution of HIV-1 and tracking the origin and spread of HIV-1 variants to different geographic areas and populations. Furthermore, it ensures the efficacy of viral RNA quantitation methods<sup>9-14</sup> and future vaccine development.<sup>15-18</sup>

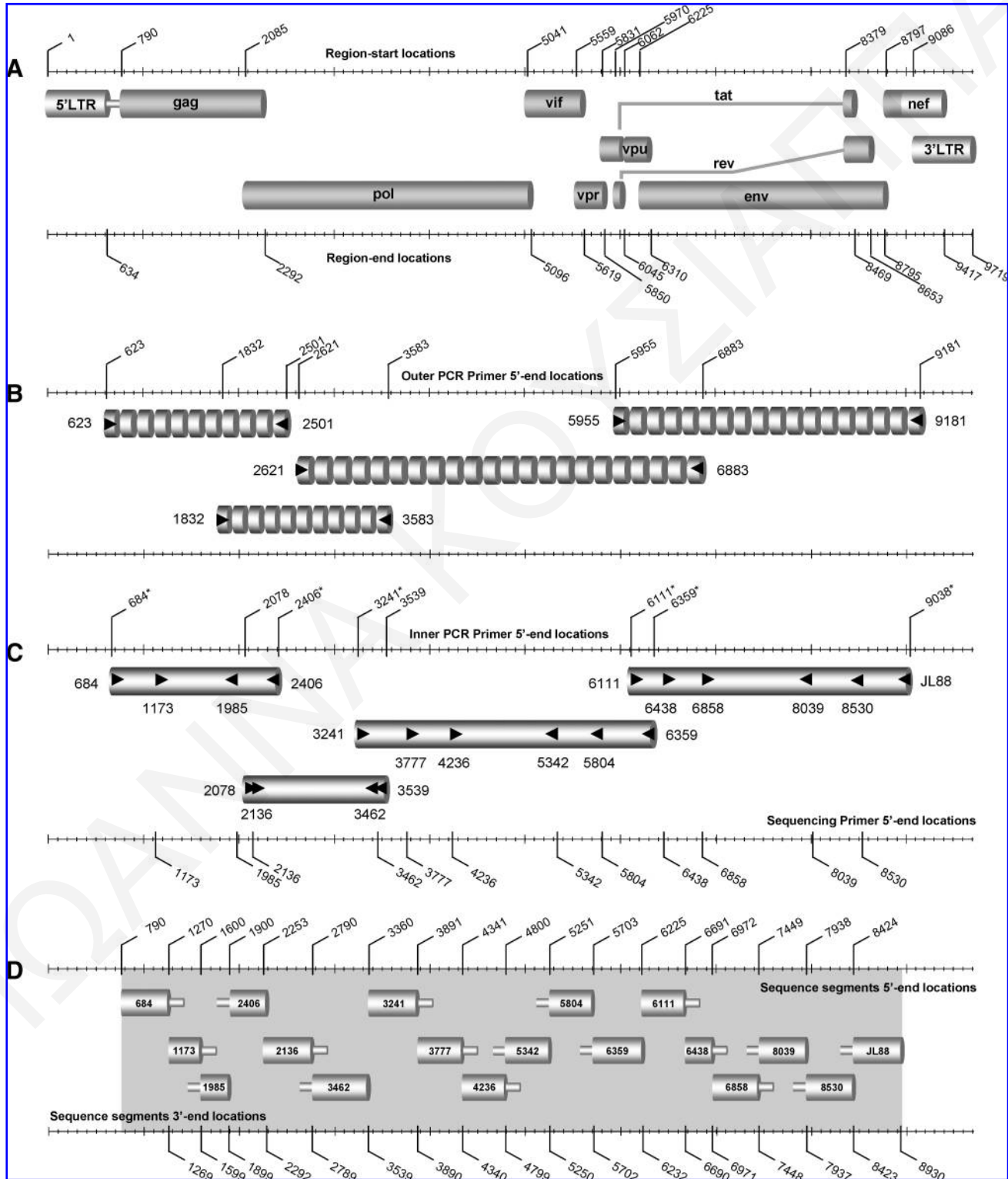
The first AIDS patient in Cyprus was reported in 1986 and in 1994 the first molecular epidemiological study of HIV-1 infection in Cyprus was carried out.<sup>19</sup> The study was based on phylogenetic analysis of viral sequences encoding the C2 to V3 *env* gp120 region from 24 patients infected from 1987 to 1994. Subtype B was found to be the dominant strain accounting for 63% of the infections, followed by subtypes C and I (later determined as CRF04\_cpx<sup>20</sup>) 4% each, and two distinct clusters in which one was related to subtype A (21%) and the other to subtype F (8%).<sup>19</sup> This subtype heterogeneity

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, University of Cyprus, 1678 Nicosia, Cyprus.

<sup>2</sup>Department of Virology, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands.

was confirmed in a subsequent study,<sup>21</sup> where HIV-1 strains from 37 newly diagnosed untreated HIV-1 patients in the period 2003 to 2006 were characterized based on phylogenetic analyses of obtained viral sequences encoding the *gag* region, the *pol* (protease and reverse transcription, RT), and the *env* (*gp160*). Subtype A was identified as the most prevalent subtype accounting for 38% of the newly diagnosed infections, followed by subtype B (35%), subtype C (13%),

CRF02\_AG (8%), and subtypes D and CRF01\_AE (3% each). The diversity of HIV-1 subtypes in Cyprus is extensive and led us to assume that HIV-1 isolates from Cyprus might be uncommonly heterogeneous, including new variants or recombinant forms. As part of a growing effort to monitor and characterize the molecular epidemiology of HIV in Cyprus, in this study we determined the genetic diversity among HIV-1 strains isolated from 77 HIV-1 seropositives diagnosed from



1986 to 2006 by means of a near full-length genome sequence analysis.

## Materials and Methods

### Study subjects

For the period 2003 to 2006 blood samples were obtained from 77 consenting HIV-1-infected individuals from the Cyprus Reference AIDS Clinic of Larnaca National Hospital. All HIV-1 study subjects were diagnosed from 1986 to 2006 and represent 38% of the living known infected population diagnosed from 1986 to 2006. The majority of study subjects were Greek-Cypriots, although a number reported traveling or living abroad in the past. All blood samples were processed at the Laboratory of Biotechnology and Molecular Virology of the University of Cyprus within the same day of sampling.

### PCR amplification of near-full genome and sequencing

Patient's blood (16 ml) was collected in CPT tubes (Becton Dickinson, Annapolis, MD); peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma were isolated using the CPT vacutainer procedure. HIV-1 RNA was extracted from 200  $\mu$ l of plasma and genomic DNA was extracted from about  $10^7$  uncultured PBMCs using the QIAamp UltraSens Virus Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), respectively. HIV-1 sequences encoding approximately 1722 bp of the *gag* region, 1461 bp of the *pol* (*protease and RT*) region, 3118 bp of the *pol* (*RNase H, integrase IN*) region and *vif*, *vpr*, and *vpu* genes, and 2927 bp of the *env* (*gp160*) and 5'-end of the *nef* region were amplified from each sample by nested polymerase chain reaction (PCR) applying PBMC-associated HIV-1 DNA (Fig. 1A, B, C). For any samples in which the PCR product of genomic DNA was problematic, reverse transcription nested PCR (RT-PCR) using plasma HIV-1 RNA was performed instead. Primers used in the PCR and/or RT-PCR reactions are described in Table 1 and their positions correspond to the HXB2 strain (accession number K03455). Reagents and thermocycling profiles for the amplification of each region have been described elsewhere.<sup>21,22</sup> Amplified products from the second-round PCR were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA). Their lengths were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the concentrations were quantified by UV absorbance spectrophotometry using the Nanodrop ND-1000 Spectro-

photometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). In each sample, the DNA sequences encoding the *gag*, *pol* (*protease and RT*), and *pol* (*RNase H and IN*) region and *vif*, *vpr*, and *vpu* genes and the *env* (*gp160*) region and 5'-end of *nef* were determined by direct sequencing in separate reactions, using second-round-amplified PCR product as the template and sequencing primers (Table 1, Fig. 1D). Reagents and thermocycling profiles used in each amplification reaction of sequencing are described elsewhere.<sup>21,22</sup> Amplicons were sequenced with the ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Samples exhibiting partial or extensive viral diversity by direct sequencing were subsequently cloned, using the TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen Corp., San Diego, CA), and sequenced as described. The sequence data were analyzed and edited using the Sequencing analysis 5.2 program (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the Primer Premier 5 application (Primer Biosoft International, Palo Alto, CA). The sequence fragments of each of the four amplified regions were assembled manually, with overlapping segments removed to acquire the near full-length sequences for each sample.

### Phylogenetic analysis

Bionumerics 5.0 program<sup>23</sup> was used for multiple DNA alignment. The Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA) software was used for distance calculation and phylogenetic tree construction.<sup>24</sup> Study subjects' DNA sequences encoding near full-length viral regions were aligned against corresponding near full-length genome sequences of genetically characterized HIV-1 strains obtained from the Los Alamos database.<sup>5</sup> Pairwise distance matrices were calculated using the Kimura two-parameter distance estimation approach with a transition/transversion ratio of 2.0 and phylogenetic trees were constructed using neighbor joining (NJ). The consistency of the phylogenetic clustering was tested using bootstrap analysis with 1000 replicates. For one isolate the phylogenetic analysis was confirmed by using the maximum-likelihood (ML) model with the Jukes-Cantor evolutionary model. Bootstrap values above 70 were considered adequate for subtype assignment. The subtype assignment was confirmed using the REGA algorithm.<sup>25</sup> GenBank accession numbers for control reference sequences in phylogenetic analyses are as follows: A1-PS1044, DQ676872; A1-92UG037, AB253429; A1-94Q2317, AF004885; A1-92RW008,

**FIG. 1.** Schematic representation summarizes the amplification of the new full-length genome region within HIV-1 M group subtypes used in an assay described in this study. (A) The upper diagram summarizes the overall HIV-1 genetic organization exemplified by the HXB2 genome (GenBank accession number K03455). The beginning and end of each major genetic region are indicated by a corresponding number above and below the diagram, respectively, using the HXB2 numbering. Shaded area in the HIV-1 gene map indicates the *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env*, and 5'-end of *nef* regions amplified in the assay. (B) The second scheme summarizes the primary reaction of the nested PCR/RT-PCR designed for the amplification of the near full-length genome in four overlapping regions. Black arrows indicate the orientation and 5'-end-primer-binding positions of the primary PCR primers for each region with respect to the HXB2 genome: 623 and 2501 for *gag*; 1832 and 3583 for *protease and RT* genes; 2621 and 6883 for *RNase H, integrase, vif, vpr, and vpu* genes and first exons of *tat* and *rev*; 5955 and 9181 for *gp160* and the 5'-end of *nef*. The intermittent cylinders indicate the product of the primary PCR/RT-PCR reaction. (C) The third diagram summarizes the secondary PCR reaction. Black arrows show the orientation and 5'-end-primer-binding positions of the secondary PCR primers for each region: 684 and 2406 for *gag*; 2078 and 3539 for *protease and RT* genes; 3241 and 6359 for *RNase H, integrase, vif, vpr, and vpu* genes and first exons of *tat* and *rev*; 6111 and JL88 for *gp160* and the 5'-end of *nef* and the sequencing primers. Secondary PCR primers marked by an asterisk (see the corresponding number above the diagram) are also used as sequencing primers. The solid cylinders indicate the product of the secondary PCR. (D) Cylinders indicate the sequence segments obtained from each sequencing primer. The beginning and end of each segment are indicated by a corresponding number above and below the diagram, respectively.

TABLE 1. PCR AND SEQUENCING PRIMERS

Designation <sup>a</sup>	Target gene	Sequence <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>	Reference <sup>d</sup>
<b>PCR primers</b>				
623 (F)	<i>gag</i>	AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAA	623–646	51
2501 (R)	<i>gag</i>	GTTGACAGGTGTAGGTCCTAC	2481–2501	51
684 (F) <sup>e</sup>	<i>gag</i>	TCTCGACGCAGGACTCGGCTTG	684–705	21
2406 (R) <sup>e</sup>	<i>gag</i>	CTCCAATTCYCCATCATTTTTGGTTTCC	2377–2406	21
1832 (F)	<i>pol</i>	CAGCATGYCAGGGAGTRGGRGGACC	1832–1856	21
3583 (R)	<i>pol</i>	GGYTCTTGRTAAATTTGATATGTCCATTG	3555–3583	21
2078 (F)	<i>pol</i>	AGGCTAATTTTTAGGGAARATYTGCCCTTCC	2078–2109	21
3539 (R)	<i>pol</i>	CTGTATTTCTGCTAYTAAGTCTTTTGTATGG	3510–3539	21
2621 (F)	<i>int</i>	GCCATTGACAGAAGARAAAATAAAAGCATT	2621–2650	22
6883 (R)	<i>int</i>	GGRGCACAATAATGTATRGGAAATTGG	6858–6883	22
3241 (F) <sup>e</sup>	<i>int</i>	GDTATGAACTCCATCCTGAYAAAATGGAC	3241–3268	22
6359 (R) <sup>e</sup>	<i>int</i>	CCACACAGGTACCCCATARTADAC	6336–6359	22
5955 (F)	<i>env</i>	GCTTAGGCATCTCCTATGGCA	5955–5975	21
9181 (R)	<i>env</i>	GTGTGTAGTYYTGCCAATCAGG	9160–9181	21
6111 (F) <sup>e</sup>	<i>env</i>	TMATAGCAATAGTTGTGTGGACYATAG	6111–6137	21
JL88 (R) <sup>e</sup>	<i>env</i>	TAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG	9013–9038	51
<b>Sequencing primers</b>				
1173 (F)	<i>gag</i>	CAGYCAAATTAYCCTATAGTGCA	1173–1196	21
1985 (R)	<i>gag</i>	CCTTCYTTGCCACARTGAAACAY	1962–1985	21
2136 (F)	<i>pol</i>	YCAGARCAGACCAGAGCCAACAGCCCC	2136–2162	21
3462 (R)	<i>pol</i>	CTGCCARTTCTARYTCTGCTTC	3441–3462	21
3777 (F)	<i>int</i>	TGGATTCCTGARTGGGARTTTG	3777–3798	22
4236 (F)	<i>int</i>	GATGGVATAGATAAARGCYCAAGA	4236–4258	22
5342 (R)	<i>int</i>	YCAGGRTCTAYTTGTGTGCTAT	5321–5342	22
5804 (R)	<i>int</i>	CCTATTCTGCTATGTTGRCACCC	5782–5804	22
6438 (F)	<i>env</i>	CATGCCTGTGTACCCACAGA	6438–6457	21
6858 (F)	<i>env</i>	CCAATTCCYATACATTATTGTGCYC	6858–6882	21
8039 (R)	<i>env</i>	GGTGCARATGWGTTTTCCAGAGC	8017–8039	21
8530 (R)	<i>env</i>	TGGTAGCTGAAGAGGCACAG	8511–8530	21

<sup>a</sup>Reverse transcriptase, primary and secondary PCR primers, and sequencing primer names as these appear in the text; the orientation of the PCR primer is indicated in parenthesis: F, forward; R, reverse.

<sup>b</sup>Y, indicates equal molar mixture of C and T; R, A, and G; M, A, and C; W, A, and T; V, A, C, and G.

<sup>c</sup>Primer positions correspond to subtype B HIV-1 HXB2 strain (accession number K03455).

<sup>d</sup>Salminen *et al.*,<sup>51</sup> Kousiappa *et al.*,<sup>21</sup> Loizidou *et al.*<sup>22</sup>

<sup>e</sup>Used also as sequencing primers as described in the text.

AB253421; A2-97CDKTB48, AF286238; A2-94CY01741, AF286237; A2-97CDKS10, AF286241; B-83HXB2.LAL.IIIB. BRU, K03455; B-981058, AY331295; B-90BK132, AY173951; B-0067100T36, AY423387; B-98153841, DQ853463; C-92BR025d, U52953; C-86ETH2220, U46016; C-04SK164B1, AY772699; C-95IN21068, AF067155; D-01A280, AY253311; D-94UG114, U88824; D-83ELI, K03454; D-01CM4412HAL, AY371157; F1-93VI850, AF077336; F1-93FIN9363, AF075703; F1-9393BR020-1, AF005494; F1-96MP411, AJ249238; F2-95MP255, AJ249236; F2-95MP257, AJ249237; F2-02CM0016BBY, AY371158; F2-97CM53657, AF377956; G-93HH8793121, AF061641; G-96DRCBL, AF084936; G-92NG083, U88826; G-PT2695, AY612637; H-93VI997, AF190128; H-90056, AF005496; H-93VI991, AF190127; J-94SE7022, AF082395; J-93SE7887, AF082394; J-97DCKTB147, EF614151; K-97EQTB11C, AJ249235; K-96MP535, AJ249239; 01AE-90CM240, U54771; 01AE-93TH051, AB220944; 02AG-IBNG, L39106; 02AG-99pBD615, AY271690; 04cpx-97PVMY, AF049337; and 04cpx-9197PVCH, AF049292.

#### Analysis of the intersubtype mosaicism

To explore putative recombination patterns in the sequences we performed a bootscanning analysis using Simplot, version 3.5.1,<sup>26</sup> which is a sliding window approach that

allows identification and evaluation of the putative intersubtype recombination breakpoints of the query sequence by the graphic detection of a change in the phylogenetic signal. For the query sequence we run similarity and bootscanning analyses against a pure subtype reference set. Bootscanning was performed with a sliding window of 400 nucleotides overlapped by 40 nucleotides to define the recombinant structure. Subregion confirmatory NJ tree analyses were carried out using MEGA software<sup>24</sup> to confirm the subtype origin within each gene fragment. Bootstrap analysis (1000 replicates) was used to estimate the reliability of the constructed trees and a bootstrap value of 70% was considered to be definitive. To look for any potential relationships between possible recombinant sequences and previously characterized HIV-1 sequences, a BLAST search was performed using the default settings in the HIV BLAST tool available at the Los Alamos HIV Sequence Database.<sup>27,28</sup>

## Results

### Clinical and epidemiological features of the study subjects

The study group consisted of 77 HIV-1 seropositives and each subject is identified by a laboratory registration number

ascending in chronological order of blood drawn. The study subjects represent 38% of the HIV-1-infected individuals diagnosed from 1986 to 2006. Blood samples from all study subjects were withdrawn in the period from 2003 to 2006. The general demographic, epidemiological, and clinical features of all study subjects are summarized in Table 2. Among the 77 study subjects, 56 (72.7%) were male and 21 (27.3%) were female. Their median age was 38 years and interquartile range (IQR) 32 to 47. The median CD4<sup>+</sup> lymphocyte count was 448 cells/mm<sup>3</sup> (IQR, 232 to 651) and the median plasma HIV load was 3.59 log HIV-1 RNA copies/ml (IQR, 1.7 to 4.6). Fifty-six HIV-1 seropositives are Cypriots (72.7%); seven are from sub-Saharan Africa (9.1%), seven, from eastern Europe (9.1%), six from western Europe (7.8%); and one (1.3%) from the United States. Thirty-seven study subjects (48.0%) were infected by homosexual/bisexual contact, 39 (50.6%) by heterosexual contact, and one (1.3%) by intravenous drug use. Thirty-one subjects (40.2%) were infected in Cyprus, 17 (22.1%) in western Europe, 4 (5.2%), in eastern Europe, 11 (14.3%), in countries of sub-Saharan Africa, 2 (2.6%) in the United States, and 1 (1.3%) in southeast Asia. For 11 study subjects (14.3%) the country in which the infection was most likely contracted is unknown. Among study subjects there are four heterosexual couples, one infected in the UK, one in Georgia, the other in Cyprus, and the last with an unknown place of infection.

#### Sequence analysis of near full-length HIV-1 genome

Uncultured PBMCs and plasma from all subjects were HIV-1 positive by nested PCR and/or RT-PCR in *gag*, *pol* (*protease* and *RT*), *pol* (*RNase H* and *IN*), and *vif*, *vpr*, and *vpu* genes, *env* (*gp160*), and the 5'-end of *nef* regions. The positive PCR combined with the extensive genetic diversity of HIV-1 strains, as described in the phylogenetic analysis (Fig. 2), demonstrates that the designed PCR primers (Table 1) are suitable or diverse M-group strains. All HIV-1 internal PCR products were further analyzed by nucleotide sequencing analysis using sequencing primers for each region (Table 1, Fig. 1D). The near full-length genome of the HIV-1 strains was assembled from the overlapping sequenced fragments. The complete near full-length DNA sequences encoding the expected nine open reading frames for *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env*, and the 5'-end of *nef* (Fig. 1A) were successfully derived from all 77 study subjects.

#### Phylogenetic analysis

The molecular epidemiological relationships among DNA sequences encoding near full-length genomes (790 to 8930 nt, Fig. 1A, D) were analyzed by nucleotide phylogenetic analysis. One phylogenetic tree was constructed for the 77 study subjects on the basis of 77 derived near full-length DNA sequences (Fig. 2). In addition to the sequences from Cyprus, 46 previously sequenced HIV-1 isolates from diverse global locations, encompassing all nine known subtypes (A through K) and three CRFs (CRF01\_AE, CRF02\_AG, and CRF04\_cpx), were also included in the analysis. According to the constructed NJ phylogenetic tree shown in Fig. 2, four distinct subtypes (A, B, C, and D) and three CRFs (CRF01\_AE, CRF02\_AG, and CRF04\_cpx) were identified for the Cypriot sequences within the M group: subtype A, 18 sequences (23.3%); subtype B (61.0%), 47 sequences; subtype C, 4 se-

quences (5.2%); subtype D, 1 sequence (1.3%); CRF01\_AE, 1 sequence (1.3%); CRF02\_AG, 3 sequences (3.9%); and CRF04\_cpx, 1 sequence (1.3%). It is important to note that the Cypriot sequences in subtypes A, B, C, and CRF02\_AG have a relatively high average intrasubtype genetic diversity. The average (range) intrasubtype nucleotide divergence among the Cypriot *gag* sequences with subtype A is 11.0% (1.4–14.8%); within subtype B, 10.3% (4.4–19.4%); within subtype C, 10.0% (0.9–10.8%); and within CRF02\_AG, 11.6% (8.5–13.5%). This variation is within the range of intrasubtype diversity and suggests that subtypes A, B, C, and CRF02\_AG were transmitted to Cyprus during the study period (1986 to 2006) by multiple sources, which is consistent with the epidemiological data of the study subjects presented in Table 2.

The study group consisted of four heterosexual couples: a couple from Georgia (CY057 and CY058) infected in Georgia; a couple, the man from UK (CY112) and the woman from Sweden (CY111), with site of infection unknown; and two couples from Cyprus, one (CY088 and CY089) infected in Cyprus and the other (CY037 and CY038) in the UK. In the phylogenetic tree the sequences of three of the couples are very closely clustered: CY057–CY058 and CY111–CY112 in subtype A and CY088–CY089 in subtype B, with bootstrap values of 100%. The branch topologies in the phylogenetic tree (Fig. 2) reconfirm this relation. The average intrasubtype diversity between the *gag* sequences of CY111–CY112 is 1.5% and for the sequences CY057–CY058 is 0.7%; for the sequences CY088–CY089 it is 1.9%. The relatively low genetic diversity between these sequences in subtype A and subtype B, in comparison with the overall intrasubtype diversity for A (11%) and B (10.3%), respectively, reconfirms that the isolates were derived from epidemiologically linked individuals. The average intrasubtype diversity between the *gag* sequences of couple CY037 and CY038 (subtype B) is 11.0% and the branch lengths of the tree indicate that although they are epidemiologically linked they do not cluster very closely.

Two sequences (2.6%), isolated from CY063 and CY090 HIV-1 seropositives, do not cluster within pure subtypes or CRFs. As indicated in Fig. 2, the sequence of the CY063 isolate is branched close to subtype G reference sequences with a considerable bootstrap value of 100%, whereas the genetic distance of the CY090 strain sequence is closest to subtype K variants with a bootstrap value of 95%. The HIV-1 patient CY063 originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) was infected before 1995 in the DRC by heterosexual contact. Running the CY063 sequence with the REGA algorithm, a recombinant pattern between subtypes G and D was indicated (data not shown). The HIV-1-infected patient CY090 originating from Cyprus was infected before 1993 in the DRC, by heterosexual contact. The sequences from these two isolates seem to be a unique case.

#### Evidence of mosaicism

For a more detailed comparison with other subtypes of HIV-1, the two unclassified sequences CY063 and CY090 were analyzed by similarity and bootscanning analysis. The similarity plot and the bootscan analysis showed that the genome of the CY063 sequence consisted of segments clustering alternately with references of subtype G and D (Fig. 3). In the bootscan analysis a high bootstrap value ( $\geq 70\%$ ) was indicated in almost all regions of the genome, supporting the

TABLE 2. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL INFORMATION FOR STUDY PATIENTS

Patient <sup>a</sup>	Sex <sup>b</sup>	Age (years)	Positive test date <sup>c</sup>	Country of origin <sup>d</sup>	Risk group <sup>e</sup>	CD4 (cells/mm <sup>3</sup> )	Plasma HIV-1 RNA (copies×10 <sup>4</sup> /ml)	Epidemiological information <sup>f</sup>
CY018	M	35	12/97	Cyprus	MSM	570	<50	Infected in Cyprus
CY020	F	41	01/97	Cyprus	HSX	324	<50	Infected in Cyprus
CY021	M	33	03/04	Georgia	HSX	309	0.1	Infected in Georgia
CY022	M	28	05/04	Cyprus	MSM	290	2.7	Infected in Cyprus; HBV positive
CY023	F	22	01/05	Georgia	HSX	369	0.1	Infected in Cyprus
CY028	M	49	02/97	Cyprus	MSM	99	60.1	Infected in United Kingdom; HBV positive
CY029	M	38	03/97	Cyprus	MSM	512	<50	HBV positive
CY030	M	45	03/98	Cyprus	MSM	282	<50	N/A
CY031	M	45	05/01	Cyprus	MSM	805	<50	Infected in Greece; HBV positive
CY032	M	41	04/01	Cyprus	MSM	987	<50	N/A
CY033	M	44	04/01	Cyprus	MSM	606	0.1	N/A
CY035	M	30	04/05	Cyprus	MSM	191	54.6	Infected in Greece
CY036	F	49	03/97	Cyprus	HSX	764	<50	Infected in Cyprus; HCV positive
CY037	F	35	07/99	U.K.	HSX	N/A	N/A	Infected in United Kingdom; heterosexual partner of CY038
CY038	M	46	07/99	Cyprus	HSX	426	0.1	Infected in United Kingdom; heterosexual partner of CY037
CY040	M	63	06/00	Cyprus	HSX	482	0.3	Infected in South Africa
CY048	M	33	05/05	Burkina-Faso	MSM	181	27.4	Infected in Burkina-Faso
CY051	F	N/A	03/02	Cyprus	HSX	500	<50	N/A
CY055	M	41	03/02	Cyprus	MSM	845	0.1	Infected in Cyprus
CY056	M	51	06/02	Cyprus	MSM	470	1.0	Infected in Cyprus
CY057	F	31	06/05	Georgia	HSX	N/A	2.8	Infected in Georgia; heterosexual partner of CY058; HCV positive
CY058	M	37	06/05	Georgia	HSX	N/A	3.2	Infected in Georgia; heterosexual partner of CY057; HCV positive
CY063	M	40	04/95	Rep. Congo	HSX	7	0.1	Infected in DRC
CY064	M	53	02/96	Cyprus	HSX	448	<50	Infected in Cyprus
CY065	F	50	07/00	Greece	HSX	263	10.6	Infected in Greece
CY067	M	40	02/98	Cyprus	MSM	1200	<50	Infected in Ukraine
CY068	M	57	02/97	Cyprus	MSM	240	0.1	Infected in Greece
CY069	M	84	10/99	Cyprus	HSX	191	0.4	Infected in South Africa
CY070	M	47	02/00	Cyprus	MSM	1103	<50	Infected in Cyprus
CY072	F	36	04/03	Russia	HSX	1276	0.4	Infected in Cyprus
CY074	M	40	08/98	Cyprus	MSM	163	<50	N/A
CY075	F	32	10/95	Belarus	HSX	636	<50	Infected in Cyprus
CY077	M	53	10/86	Cyprus	MSM	490	4.0	Infected in Greece
CY081	M	49	05/89	Cyprus	IVDU	446	1.3	Infected in Greece
CY082	M	67	10/94	Cyprus	MSM	473	0.6	Cyprus
CY087	M	38	08/97	Cyprus	MSM	792	0.3	N/A
CY088	M	28	08/05	Cyprus	HSX	77	12.4	Infected in Cyprus; heterosexual partner of CY089
CY089	F	23	08/05	Cyprus	HSX	262	5.6	Infected in Cyprus; heterosexual partner of CY088
CY090	F	47	-/93	Cyprus	HSX	545	0.1	Infected in DRC; rough mentally handicapped
CY092	M	47	03/94	Cyprus	HSX	894	<50	Infected in Cyprus
CY093	F	49	03/98	Cyprus	HSX	284	<50	Infected in Cyprus
CY096	M	35	01/97	Cyprus	MSM	100	0.1	Infected in Greece
CY097	M	42	08/02	Cyprus	MSM	640	<50	N/A
CY100	F	74	03/97	Cyprus	HSX	812	<50	Infected in Cyprus
CY106	F	55	05/99	Cyprus	HSX	183	1.3	Infected in Cyprus
CY107	M	29	06/99	Cyprus	MSM	341	1.5	Infected in Austria
CY110	F	35	-/94	United States	HSX	739	<50	Infected in United States; diagnosed with herpes genital; HCV positive

(Continued)

TABLE 2. (CONTINUED)

Patient <sup>a</sup>	Sex <sup>b</sup>	Age (years)	Positive test date <sup>c</sup>	Country of origin <sup>d</sup>	Risk group <sup>e</sup>	CD4 (cells/mm <sup>3</sup> )	Plasma HIV-1 RNA (copies × 10 <sup>4</sup> /ml)	Epidemiological information <sup>f</sup>
CY111	F	40	10/05	Sweden	HSX	32	200.0	Heterosexual partner of CY112; CMV positive
CY112	M	N/A	10/05	UK	HSX	292	6.0	Heterosexual partner of CY111; HCV positive
CY113	M	49	12/93	Cyprus	HSX	910	<50	Infected in United States
CY120	M	33	03/99	Greece	HSX	277	<50	Infected in Greece
CY121	M	46	06/02	Cyprus	MSM	233	2.6	Infected in Cyprus
CY122	M	43	-/88	South Africa	OHPC	298	3.9	Infected in South Africa
CY124	M	65	-/86	Germany	MSM	N/A	N/A	Infected in Switzerland
CY130	M	N/A	02/05	Cyprus	MSM	671	1.7	Infected in Cyprus
CY131	M	62	02/05	Cyprus	HSX	202	17.5	Infected in Cyprus
CY132	M	41	-/90	Cyprus	MSM	652	2.6	Infected in Cyprus
CY137	M	37	02/91	Cyprus	MSM	893	0.4	Infected in Austria
CY140	M	33	11/04	Cyprus	MSM	461	33.4	Infected in Cyprus
CY141	M	57	01/05	Cyprus	MSM	79	128.0	Infected in Cyprus
CY142	M	56	11/05	Cyprus	MSM	32	31.2	Infected in Greece
CY149	M	42	07/01	Cyprus	MSM	599	0.1	Infected in Cyprus
CY150	M	36	12/97	Cyprus	MSM	738	<50	Infected in Germany
CY153	M	23	12/05	Cyprus	MSM	223	5.9	Infected in Greece
CY154	F	36	-/95	Zimbabwe	HSX	172	0.1	Infected in DRC
CY158	M	39	01/06	Burkina-Faso	OHPC	78	6.5	Infected in Burkina-Faso; political refugee
CY163	M	40	02/04	Cyprus	MSM	842	1.2	Infected in Cameroon
CY164	F	40	03/04	South Africa	HSX	556	0.2	Infected in Cyprus
CY165	F	54	04/93	Cyprus	HSX	230	18.7	Infected in Cyprus
CY166	M	59	03/06	Cyprus	HSX	134	>100	Infected in South Africa
CY168	M	49	05/06	Cyprus	MSM	386	0.1	Infected in Cyprus
CY171	M	49	06/06	Cyprus	HSX	447	10.7	Infected in Cyprus
CY173	F	29	06/06	Ukraine	HSX	598	1.9	Infected in Cyprus
CY176	F	26	08/06	Ethiopia	HSX	595	2.1	Infected in Ethiopia
CY178	M	44	10/06	Cyprus	MSM	785	0.1	N/A
CY179	M	38	11/06	Cyprus	HSX	498	10.2	Infected in Thailand
CY180	M	52	12/06	Cyprus	HSX	650	0.8	Infected in Cyprus

<sup>a</sup>Indicates the laboratory code for each study subject.

<sup>b</sup>F, female; M, male.

<sup>c</sup>Indicates the date (month/year; -, unknown month) of the first known positive HIV antibody test.

<sup>d</sup>Country of birth of the study subjects.

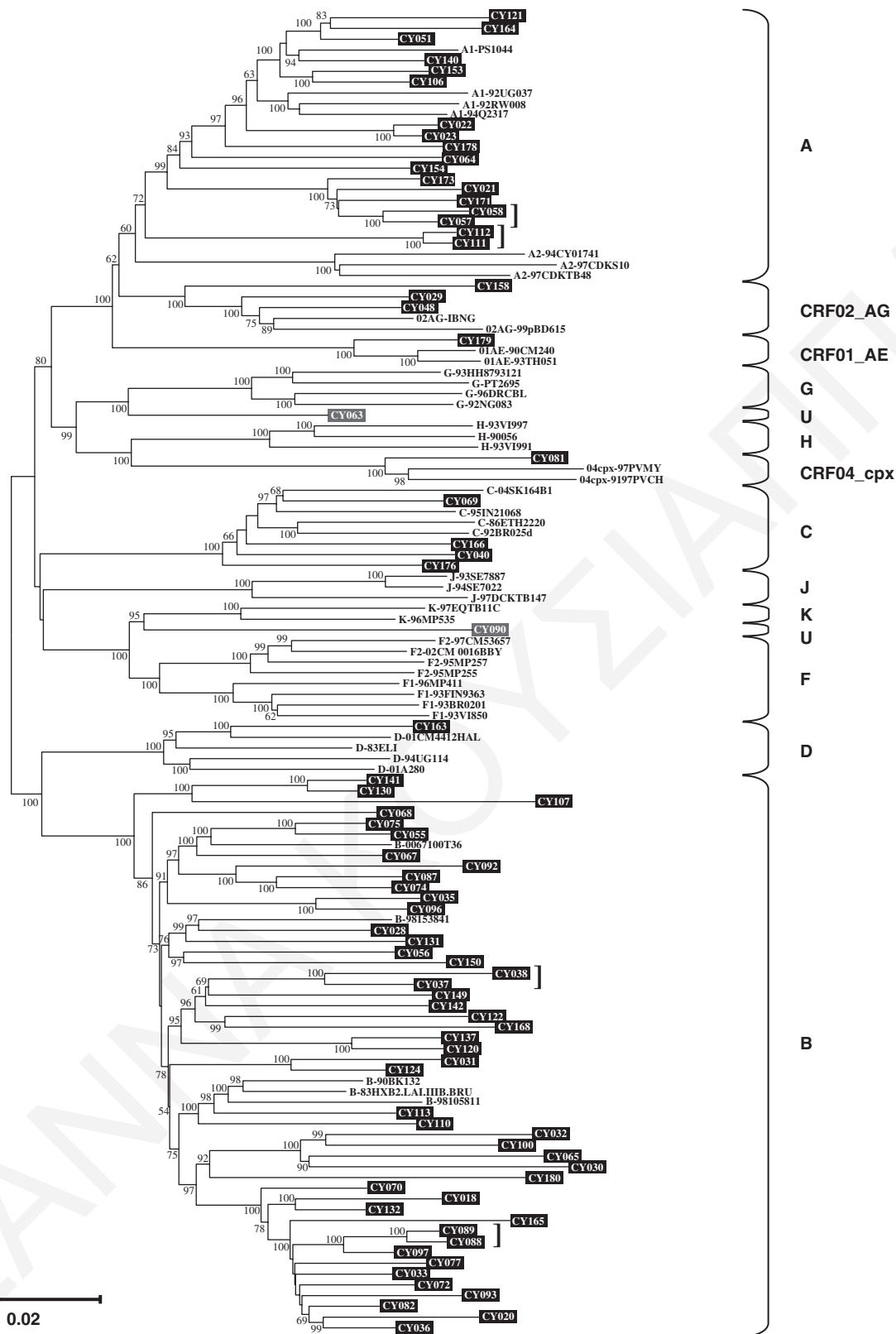
<sup>e</sup>MSM, men who have sex with men; HSX, heterosexual contact; OHPC, origin from a high prevalence country; IVDU, intravenous drug user.

<sup>f</sup>Information provided by the study subjects. N/A, Not available; CMV, Cytomegavirus; HBV, Hepatitis B virus; HCV, Hepatitis C virus.

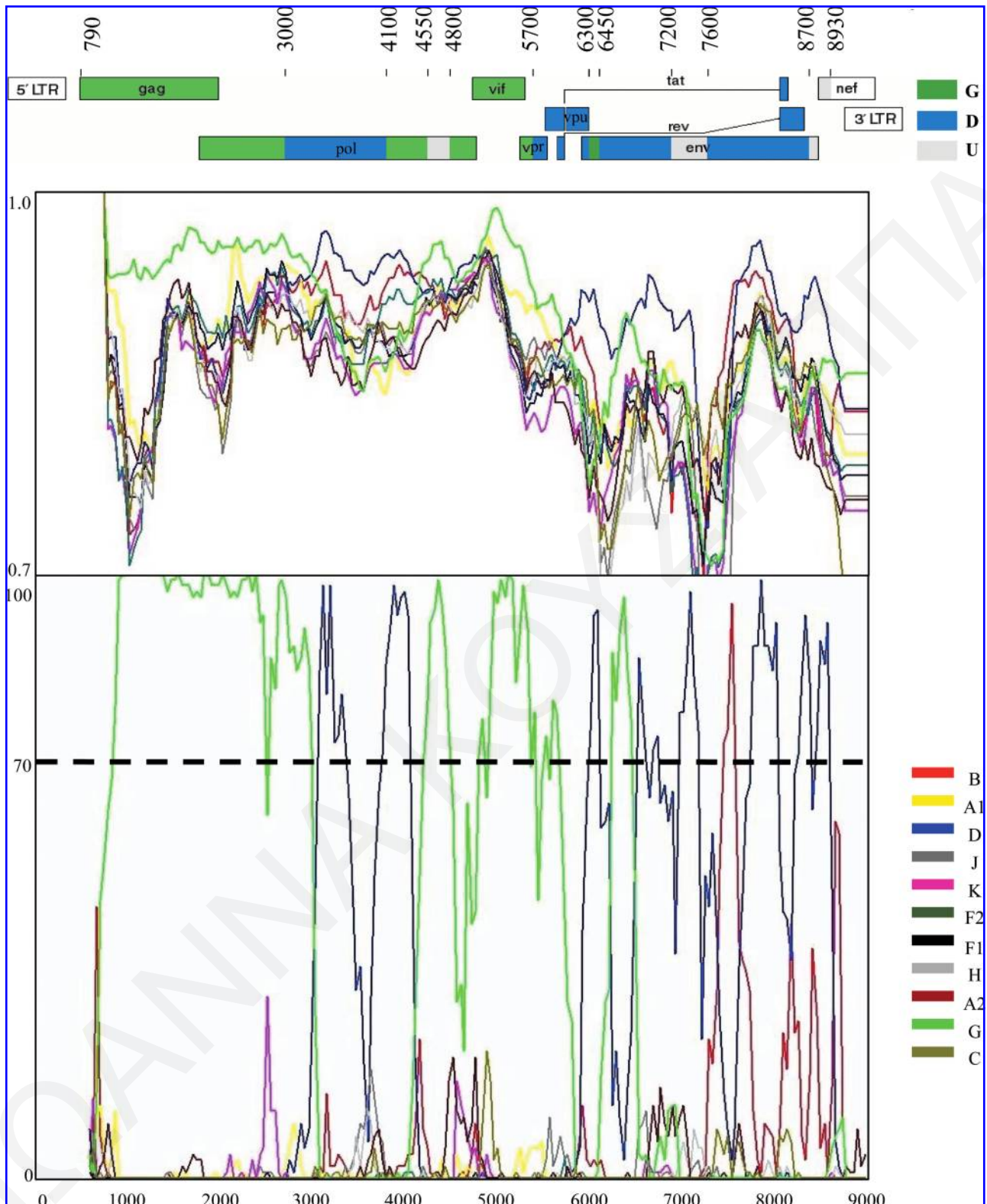
classification as a recombinant strain. Subtype assignments for each segment derived from the bootscan analyses were confirmed with NJ trees, in each case with a bootstrap value of  $\geq 70\%$  supporting the relation with subtype references (Fig. 4). The CY063 sequence contained 10 breakpoints (Fig. 3). The beginning of the genome, nucleotide (nt) 790–3000 (HXB2 numbering), was subtype G with a bootstrap value of 100%, shifting to subtype D with a low bootstrap value of 60% in the 3'-end of RT and 5'-end of RNase H of pol (3000–4100 nt). The third subregion in the 3'-end of RNase H and 5'-end of IN of pol (4100–4550 nt) clustered with subtype G with an 89% bootstrap value, followed by a small fragment in IN (250 nt) that was an area of poor resolution between subtypes D and G (Fig. 3). This area clustered with reference sequences of subtype D at a low bootstrap value of 11% in the NJ and was considered as unclassified. From the 3'-end of IN to the 3'-end of vpr (4800–5700 nt) the genome was of subtype G with the bootstrap value of 97%. The genome was shifted back to

subtype D (5700–6300 nt) with an 81% bootstrap value and had the next breakpoint at the beginning of env (gp120). A following small fragment of 150 nt clustered with reference sequences of subtype G with a bootstrap value 86%. The eighth fragment (6450–7200 nt) clustered in the NJ tree with subtype D and a 93% bootstrap value, while the next subregion (7200–7600 nt) of env (gp120) was determined as unclassified as it was poorly resolved between D and B references, and it was clustered in the NJ tree with subtype B with a 65% bootstrap value. The tenth fragment (7600–8700 nt) coding part of exon 2 of rev and tat through env (gp41) belonged to subtype D with a bootstrap value of 95%. The last region (8700–8930 nt) was unclassified due to a poor signal and clustering (not shown in Fig. 4). CY063 had nearly equal proportions of G and D subtypes. It is significant that the crossover sites of the CY063 isolate recombinant form corresponds to the genomic regions (the 5'-end of RT, 3'-end of RNase and IN of pol, vpr, 5'-end of gp120, 3'-end of gp120, and 3'-end of

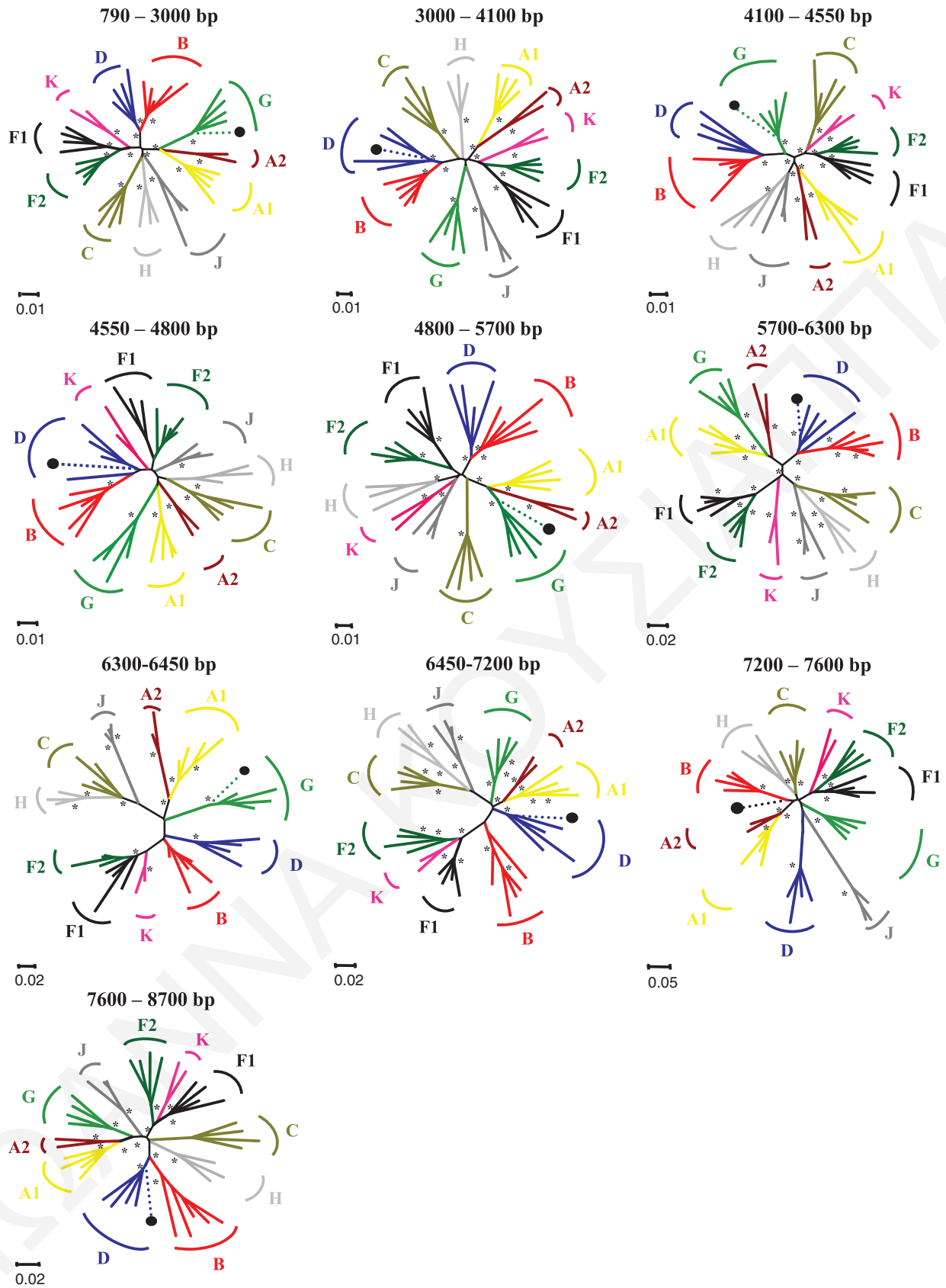




**FIG. 2.** NJ phylogenetic tree for the nucleotide sequence of the near full-length genome of HIV-1 strains obtained from 77 HIV-1-seropositive patients in Cyprus, based on the Kimura two-parameter distance estimation method. The tree includes representative reference sequences of HIV-1 subtypes (A–K) and CRF01\_AE, CRF02\_AG, and CRF04\_cpx (shown in bold). The numbers indicated at several nodes are consensus bootstrap values out of 1000 replications (only bootstrap values greater than 50% are denoted). The sequences determined in the study are shown in black boxes with a prefix CY for Cyprus and the numbers following denoting the laboratory code. The unclassified sequences are shown in boxes. Epidemiologically linked patients are indicated by brackets. The divergence between any two sequences is obtained by summing the horizontal branch length, using the scale at the lower left, which represents 2% genetic distance (0.02 substitutions per site). The brackets on the right side of the tree indicate the determined subtypes as described in Results; U, for unclassified.



**FIG. 3.** Recombinant analysis of the near full-length genome of the CY63 isolate in comparison to reference strains of all HIV-1 pure subtypes of the M group. The upper diagram indicates the gene regions and the recombination breakpoints of the CY63 isolate as determined by informative analysis. The illustration was created according to HXB2 numbering using the Recombinant Drawing tool available on the Los Alamos HIV sequence Database website.<sup>28</sup> The middle panel presents the similarity plot diagram and the bottom panel shows the bootscan analysis performed as described in Materials and Methods. The *y*-axis in the similarity plot indicates the percent identity of the query sequence to a set of reference sequences; in the bootscan diagram, the bootstrap value. The *x*-axis shows the nucleotide position of the HXB2 genome. The dotted line indicates 70% (significant) bootstrap value.



**FIG. 4.** Phylogenetic analysis of the interbreakpoint segments comprises the CY063 strain as defined by the similarity plot and the bootscan analysis. Analysis was performed using the NJ method with the Kimura's two-parameter parameter distance estimation method and bootstrap analysis (1000 replicates). All reference HIV-1 pure (sub)subtypes of the M group were used to construct the trees and are denoted with different colors. \*, Bootstrap value  $\geq 70\%$ ; •, query sequence of CY063. Loci of genome segments are based on the HXB2 numbering. The divergence between any two sequences is obtained by summing the horizontal branch length, using the scale at the lower left.

*gp41* of *env*) of HIV-1, which have been characterized as recombination hot spots.<sup>29–31</sup> A BLAST search was performed to carry out comparative phylogenetic analysis with HIV-1 sequences from the Los Alamos HIV Sequence Database. No similar recombinant patterns were found in samples from the database, supporting the belief that this recombinant sequence is a unique recombinant form. A previous study referred to the existence of a D/G/D recombinant sequence of the *protease* and *RT* region (2042–4261 nt) of *pol* from a Cameroonian isolate,<sup>32</sup> but did not have the same recombinant pattern as the one found in this study, since CY063 has a G/D/G pattern for the same region. Additionally, one Portuguese strain was found to have a *envG-nefD/G* proviral genomic structure,<sup>33</sup> but did not match with the recombinant CY063, since it has the *envD/U-nefD/U* pattern, where U represents unclassified.

As illustrated in the similarity plot (Fig. 5), along the CY090 sequence there are multiple regions with similarity to subsubtypes F2 or F1, but in general the similarity with these subsubtypes is not significantly higher than the similarity with the other subtypes. Further analysis of the CY090 sequence by the bootscan approach demonstrated that clustering close to subtype K existed in a few short genetic regions with bootstrap values above 70%, but in the rest of the sequence the bootstrap values with this clade were <70% (Fig. 5). A detailed similarity analysis and bootscan analysis were performed with the inclusion of near full-length sequences of all the pure subtypes and CRFs, but no difference was seen (data not shown). The limited size of the few regions that cluster with subtype K in bootscan analysis and the mixed similarity plot suggest that the new sequence does not cluster with any known subtype or CRF. An ML tree was constructed from the near full-length sequence of CY090 and all pure HIV-1 reference sequences to determine if a clustering occurs (Fig. 5). The ML tree confirms the previous analysis: it is close to subtype K, but does not totally cluster. An HIV-1 variant that belongs to the M group, with limited similarity of short genetic regions to subtype K and the remainder of the genome unrelated to any established HIV-1 subtype, was found in an HIV-1-infected male patient living in the Netherlands who most likely encountered the virus in Africa before 1989 via heterosexual contact.<sup>34</sup> However, phylogenetic analyses using near full-length sequences from the two unknown “K-like” strains, CY090 from Cyprus and H10986 from the Netherlands, revealed that they are unrelated HIV-1 variants (data not shown).

## Discussion

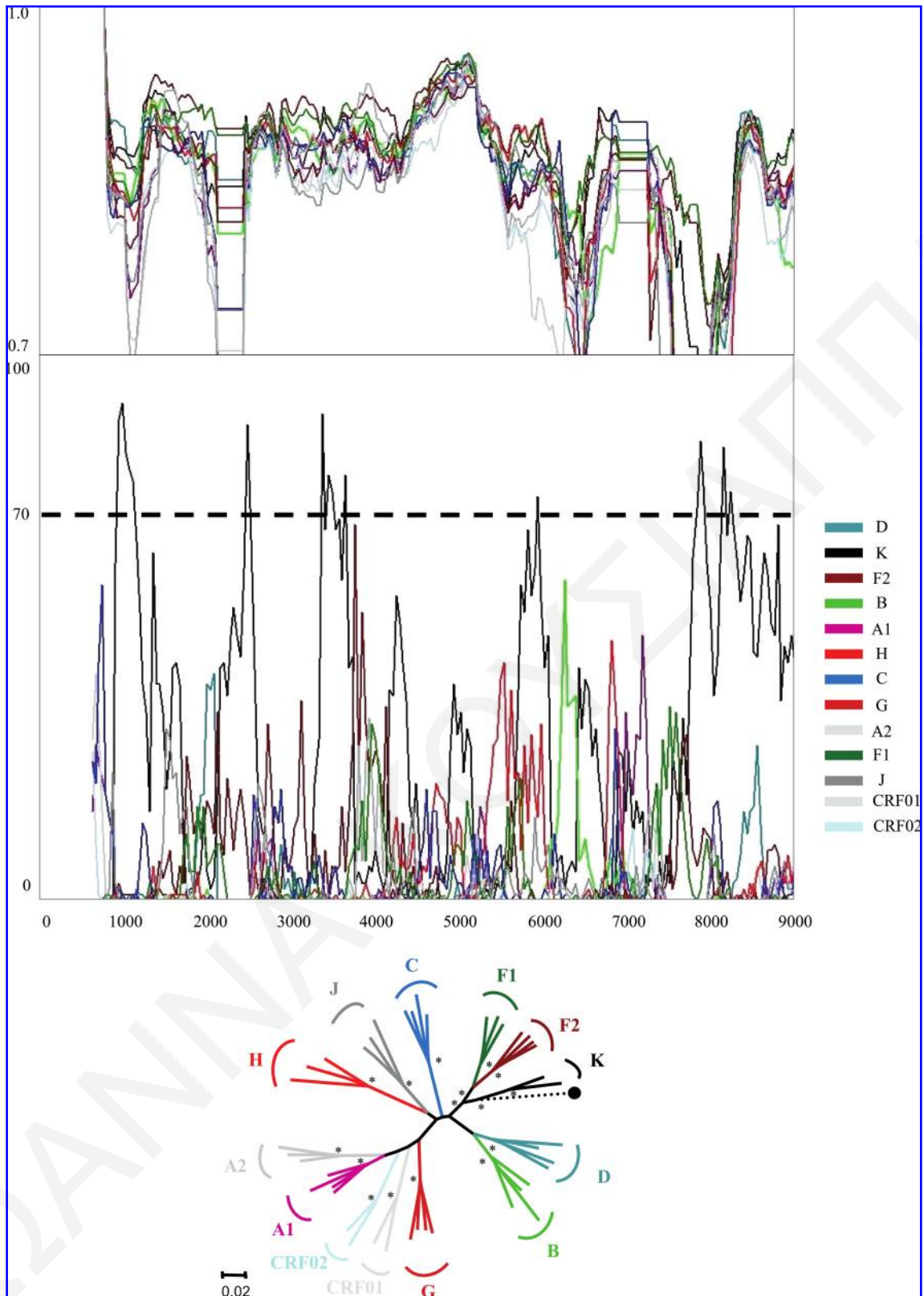
In the period 1986 to 2006, 287 persons were reported infected with HIV-1 in Cyprus. In this study, a genetic characterization and a phylogenetic analysis were performed in the near full-length genome sequences of 77 HIV-1 seropositives, depicting 38% of the known infected population of HIV-1 seropositives, to determine the genetic profile of HIV-1 strains circulating in Cyprus in the past two decades. Compared with the data already published by Kostrikis *et al.*,<sup>19</sup> and Koussiappa *et al.*,<sup>21</sup> the present study offers more detailed information on the molecular epidemiology of HIV-1 infection in Cyprus.

The phylogenetic analysis of the near full-length genome of the analyzed HIV-1 samples indicated clearly that subtype B

is the dominant subtype, followed by subtypes A, C, and CRF02\_AG, strains that dominate the global epidemic.<sup>35</sup> Representative strains of other subtypes have also been observed, as of subtype D, CRF01\_AE, and CRF04\_cpx. Two unclassified isolates derived from different HIV-1-seropositive individuals; CY063 and CY090 were further characterized phylogenetically. The CY063 isolate had a unique mosaic pattern, comprising segments of subtypes D and G and unclassified short regions. The newly found URF is probably generated from a recombination event between two parental viruses: one belonging to the subtype G lineage and the other to subtype D, in DRC where the infection was contracted. The profile of HIV-1 in DRC is characterized by high HIV-1 genetic diversity with a large number of cocirculating HIV-1 subtypes, recombinant viruses, and unclassified strains.<sup>36,37</sup> Subtypes D and G are present in DRC, with a regional range of 5.1–17.4% in 2002 and 6.7–13.1% in 1997 for subtype D and 2.3–21.7% in 2002 and 3.3–9.7% in 1997 for subtype G.<sup>37</sup> This new and unique recombinant form of HIV-1 displays a recombinant structure distinct from any other CRFs or URFs reported so far. The detailed phylogenetic analysis of the near full-length sequence of the CY090 isolate revealed that it is close to subtype K, but does not totally cluster within. Similarity plot and bootscan analyses revealed that most of the genome sequence of the CY090 isolate is not closely related to subtype K sequences or any other known HIV sequence (Fig. 5). In a previous study of Kostrikis *et al.*,<sup>19</sup> an isolate of patient CY090 (H044) was collected, amplified in the *env* (C2–V3) region, and analyzed by heteroduplex mobility assay (HMA), but could not be classified into any HIV-1 subtype (A to F) known at that time. A phylogenetic analysis with HIV-1 pure reference subtypes denoted a relation to subtype F reference sequences, the ancestor lineage of subtype K,<sup>38</sup> but formed a distinct divergent cluster; because it was not clear whether that sequence belonged to a new subtype or was recombinant, it was referred to as FcY. Nevertheless, although the near full-length sequence of this strain has been analyzed, no clarification about its phylogeny could be made. The CY090 strain may represent a novel subtype or a subsubtype of subtype K. At least two epidemiologically unrelated patients with an HIV-1 variant that is similar to the CY090 isolate are required to formally designate this variant as a new HIV-1 subtype or subsubtype.

The presence of a new URF and an HIV-1 diverse unclassified strain increases the genetic complexity of the HIV-1 epidemic in Cyprus. This is not consistent with the country's small area, population size, and transmission type, but it can be explained by the population flow in Cyprus of many foreign tourists, workers, political refugees, as well as repatriating Cypriots. The majority of non-B subtypes entering Cyprus in the past two decades is due to a large number of immigrants from Africa and eastern European countries, where non-B strain are predominant.<sup>35</sup> It is well known that Africa has the greatest genetic diversity of HIV-1,<sup>39,40</sup> and in this study 12.9% of the HIV-1 infections are linked to Africa, including the strains CY063 and CY090. This phenomenon has also been observed in other European countries,<sup>41–47</sup> in countries of the Mediterranean region,<sup>48,49</sup> and in the United States.<sup>50</sup>

Current subtype screening assays may not be sufficiently effective to capture the increasing complexity of recombinant genomes or new variants. In our method we employed near



**FIG. 5.** Recombinant analysis of the near full-length genome of the CY090 isolate in comparison to reference strains of all HIV-1 pure subtypes of the M group. The upper diagram indicates the similarity plot of the CY090 isolate; in the middle is the bootscan analysis. Similarity and bootscan plots were performed as described in Materials and Methods. The *y*-axis in the similarity plot indicates the percent identity of the query sequence to a set of reference sequences; in the bootscan diagram, the bootstrap value. The *x*-axis shows the nucleotide position of the HXB2 genome. The dotted line indicates 70% (significant) bootstrap value. At the bottom of the scheme an ML tree of the near full-length sequence of CY090 and all pure HIV-1 reference sequences and two CRFs is presented with bootstrap analysis (1000 replicates). All reference HIV-1 pure (sub)subtypes of the M group were used to construct the trees and are denoted by different colors. \*, Bootstrap value  $\geq 70\%$ ; •, query sequence of CY090.



full-length characterization, a highly accurate assay that enables us to determine subtype distribution. Nevertheless, the assay must be continually evaluated and optimized in relation to newly identified recombinant forms as new and strange variants are circulating in Cyprus.<sup>51</sup>

In conclusion, this is the largest study of phylogenetic analysis of near full-length coding sequences of Cypriot HIV-1 strains confirming the high genetic diversity of HIV-1 in Cyprus, which derives from the introduction of multiple non-B genetic forms from other countries. Furthermore, a novel URF and an unclassified variant, both originating from the DRC in Africa, were identified as part of this study. Ongoing surveillance of HIV-1 subtypes and recombinant forms in Cyprus may have important implications for HIV-1 vaccine development and new drug design and can provide insights into the evolutionary history of HIV-1.

### Sequence Data

GenBank accession numbers for the near full-length sequences obtained in this study are as follows: FJ388890–FJ388965 and FJ403482.

### Acknowledgments

We thank all participating subjects from the Larnaca General Hospital AIDS Clinic, I. Demetriades, E. Lazarou, C. Kasapis, I. Christodoulou, M. Christophina, the Cyprus Ministry of Health, and the Cyprus National Bioethics Committee for valuable assistance, as well as S. Gilliland and E. Yiacomou for data preparation. This work was supported by grants from the European Commission (FP6-014822, QLK2-CT-2001-01344, and LSHP-CT-2006-518211), the Cyprus Research Promotion Foundation (Health/0104/22), the University of Cyprus (8037-3/312-25004 and 837-25011), and the Birch Biomedical Research LLC (3416-25017) awarded to L.G. Kostrikis.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, and Negroni M: Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res* 2008;134:64–73.
- Robertson DL, Hahn BH, and Sharp PM: Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol* 1995;40:249–259.
- Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, and Hahn BH: Recombination in HIV-1. *Nature* 1995;374:124–126.
- Roberts JD, Bebenek K, and Kunkel TA: The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988;242:1171–1173.
- Leitner T, Korber B, Daniels M, Calef C, and Foley B: *HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2005.
- Los-Alamos-HIV-sequence-database: *HIV-1 Subtype Reference Alignments*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2005.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, *et al.*: HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288:55–56.
- Thomson MM and Najera R: Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: An update. *AIDS Rev* 2005;7:210–224.
- Parekh B, Phillips S, Granade TC, Baggs J, Hu DJ, and Respass R: Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:133–142.
- Gottesman BS, Grossman Z, Lorber M, Levi I, Shitrit P, Katzir M, *et al.*: Comparative performance of the Amplicor HIV-1 Monitor Assay versus NucliSens EasyQ in HIV subtype C-infected patients. *J Med Virol* 2006;78:883–887.
- Gobbers E, Franssen K, Oosterlaken T, Janssens W, Heyndrickx L, Ivens T, *et al.*: Reactivity and amplification efficiency of the NASBA HIV-1 RNA amplification system with regard to different HIV-1 subtypes. *J Virol Methods* 1997;66:293–301.
- Chew CB, Herring BL, Zheng F, Browne C, Saksena NK, Cunningham AL, *et al.*: Comparison of three commercial assays for the quantification of HIV-1 RNA in plasma from individuals infected with different HIV-1 subtypes. *J Clin Virol* 1999;14:87–94.
- Emery S, Bodrug S, Richardson BA, Giachetti C, Bott MA, Panteleeff D, *et al.*: Evaluation of performance of the Gen-Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C, and D isolates from Kenya. *J Clin Microbiol* 2000;38:2688–2695.
- Jenny-Avital ER and Beatrice ST: Erroneously low or undetectable plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ribonucleic acid load, determined by polymerase chain reaction, in West African and American patients with non-B subtype HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2001;32:1227–1230.
- Fischer W, Liao HX, Haynes BF, Letvin NL, and Korber B: Coping with viral diversity in HIV vaccine design: A response to Nickle *et al.* *PLoS Comput Biol* 2008;4:e15; author reply e25.
- Nickle DC, Rolland M, Jensen MA, Pond SL, Deng W, Seligman M, *et al.*: Coping with viral diversity in HIV vaccine design. *PLoS Comput Biol* 2007;3:e75.
- Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, Funkhouser R, *et al.*: Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med* 2007;13:100–106.
- Rolland M, Nickle DC, and Mullins JI: HIV-1 group M conserved elements vaccine. *PLoS Pathog* 2007;3:e157.
- Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, and Ho DD: Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: Identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 1995;69:6122–6130.
- Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Li YY, Bailes E, Kostrikis LG, *et al.*: An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* 1998;72:10234–10241.
- Kousiappa I, Van de Vijver DAMC, Demetriades I, and LG: K: Genetic analysis of HIV type 1 strains from newly infected untreated patients in Cyprus: High genetic diversity and low prevalence of drug resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:23–35.
- Loizidou EZ, Kousiappa I, Zeinalipour-Yazdi CD, Van de Vijver DA, and Kostrikis LG: Implications of HIV-1 M group polymorphisms on integrase inhibitor efficacy and resistance: Genetic and structural *in-silico* analyses. *Biochemistry* 2009;48(1):4–6.

23. Available at [www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm](http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm); 2008 applied Maths NV.
24. Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596–1599.
25. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, *et al.*: An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005;21:3797–3800.
26. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, *et al.*: Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999;73:152–160.
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–410.
28. Available at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/HIVTools.html>.
29. Magiorkinis G, Paraskevis D, Vandamme AM, Magiorkinis E, Sypsa V, and Hatzakis A: In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: Determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol* 2003;84:2715–2722.
30. Fan J, Negroni M, and Robertson DL: The distribution of HIV-1 recombination breakpoints. *Infect Genet Evol* 2007;7:717–723.
31. Magiorkinis G, Paraskevis D, and Hatzakis A: Comments on “The distribution of HIV-1 recombination breakpoints” by Jun Fan, Matteo Negroni, David L. Robertson. *Infect Genet Evol* 2008;8:527–528.
32. Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Bourgeois A, Liegeois F, Toure-Kane C, *et al.*: Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: Evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:3919–3925.
33. Parreira R, Padua E, Piedade J, Venenno T, Paixao MT, and Esteves A: Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef in Portugal: Subtyping, identification of mosaic genes, and amino acid sequence variability. *J Med Virol* 2005;77:8–16.
34. van der Hoek L, Pollakis G, Lukashov VV, Jebbink MF, Jeeninga RE, Bakker M, *et al.*: Characterization of an HIV-1 group M variant that is distinct from the known subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:466–470.
35. McCutchan FE: Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* 2006;78:S7–S12.
36. Kita K, Ndambi N, Ekwilanga M, Ido E, Kazadi R, Bikandou B, *et al.*: Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:1352–1357.
37. Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Mwamba JK, Tshimpaka JW, Kashi M, *et al.*: Distribution of HIV-1 variants in the Democratic Republic of Congo suggests increase of subtype C in Kinshasa between 1997 and 2002. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:456–462.
38. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, *et al.*: Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:139–151.
39. Janssens W, Buve A, and Nkengasong JN: The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *AIDS* 1997;11:705–712.
40. Papathanasopoulos MA, Hunt GM, and Tiemessen CT: Evolution and diversity of HIV-1 in Africa—a review. *Virus Genes* 2003;26:151–163.
41. Palma AC, Araujo F, Duque V, Borges F, Paixao MT and Camacho R: Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect Genet Evol* 2007;7:391–398.
42. Alaeus A, Leitner T, Lidman K, and Albert J: Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS* 1997;11:199–202.
43. Chaix ML, Descamps D, Harzic M, Schneider V, Deveau C, Tamalet C, *et al.*: Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS* 2003;17:2635–2643.
44. Maljkovic I, Wilbe K, Solver E, Alaeus A, and Leitner T: Limited transmission of drug-resistant HIV type 1 in 100 Swedish newly detected and drug-naive patients infected with subtypes A, B, C, D, G, U, and CRF01\_AE. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:989–997.
45. Deroo S, Robert I, Fontaine E, Lambert C, Plessier JM, Arendt V, *et al.*: HIV-1 subtypes in Luxembourg, 1983–2000. *AIDS* 2002;16:2461–2467.
46. Esteves A, Parreira R, Venenno T, Franco M, Piedade J, De Sousa JG, *et al.*: Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: High prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:313–325.
47. Snoeck J, Van Laethem K, Hermans P, Van Wijngaerden E, Derdelinckx I, Schrooten Y, *et al.*: Rising prevalence of HIV-1 non-B subtypes in Belgium: 1983–2001. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:279–285.
48. Grossman Z, Lorber M, Maayan S, Bar-Yacov N, Levy I, Averbuch D, *et al.*: Drug-resistant HIV infection among drug-naive patients in Israel. *Clin Infect Dis* 2005;40:294–302.
49. Bouzeghoub S, Jauvin V, Recordon-Pinson P, Garrigue I, Amrane A, Belabbes EH, *et al.*: High diversity of HIV type 1 in Algeria. *AIDS Res Human Retroviruses* 2006;22:367–372.
50. Bennett D: HIV-1 genetic diversity surveillance in the United States. *J Infect Dis* 2005;192:4–9.
51. Salminen MO, Carr JK, Robertson DL, Hegerich P, Gotte D, Koch C, *et al.*: Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* 1997;71:2647–2655.

Address correspondence to:

Leondios G. Kostrikis  
 Department of Biological Sciences  
 University of Cyprus  
 75 Kallipoleos Avenue, P.O. Box 20537  
 1678 Nicosia, Cyprus  
 E-mail: lkostrik@ucy.ac.cy

# Genetic Analysis of HIV Type 1 Strains from Newly Infected Untreated Patients in Cyprus: High Genetic Diversity and Low Prevalence of Drug Resistance

Ioanna Kousiappa,<sup>1</sup> David A.M.C. van de Vijver,<sup>2</sup> Ioannis Demetriades,<sup>3</sup> and Leondios G. Kostrikis<sup>1</sup>

## Abstract

The molecular epidemiology of HIV-1 infection was first studied in Cyprus in the mid-1990s, but the extent of HIV-1 diversity and the prevalence of drug resistance have remained elusive. In an effort to address this issue, the present study examined HIV-1 strains isolated from 37 newly diagnosed untreated HIV-1 patients, representing 72% of the total number of newly diagnosed and drug-naive patients in the period 2003 to 2006. DNA sequences encoding the *gag* (p17, p24, p2, p7, p1, and p6), *pol* (protease and reverse transcriptase), and *env* (gp160) regions were amplified by RT-PCR from plasma HIV-1 RNA from all patients and sequenced using a newly designed methodology. All amplified products were studied according to established genetic methodologies to determine the genetic subtype and the prevalence of drug-resistance-associated mutations to currently available antiretroviral drugs. Analyses of the obtained viral sequences indicated that subtype A was the most common subtype present and accounted for 38% of the infections followed by subtype B (35%), subtype C (13%), CRF02\_AG (8%), and subtypes D and CRF01\_AE (3% each). One patient (2.7%) had an M41L/M and another patient (2.7%) an M184V amino acid substitution in the reverse transcriptase (RT) associated with high-level resistance to RT inhibitors. There were no patients with resistant mutations to protease inhibitors (PI). Additionally, one patient (2.7%) had an L44M amino acid substitution within the HR1 region of gp41 conferring resistance to the enfuvirtide (T20) fusion inhibitor. Similar to results of the 1994 molecular epidemiological study, these data demonstrate the extensive heterogeneity of HIV-1 infection in Cyprus and the low prevalence of transmitted resistance to current HIV-1 antiretroviral drugs. Taken together, these findings demonstrate that HIV-1 infection in Cyprus is being replenished by a continuous influx of new strains from many countries, establishing an ever-evolving and polyphyletic infection in the island.

## Introduction

**H**UMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1) is able to develop extensive genetic diversity, and by this means acquires mutations to resist inhibitory pressures by antiretroviral drugs. The global genetic diversity of HIV-1 and the spread of variants with resistance to current antiretroviral drugs are being studied through the collective efforts of multinational consortia and many other groups worldwide. Genetic analysis of HIV-1 strains isolated from many countries thus far has revealed nine distinct phylogenetic subtypes (A–D, F–H, J, and K) and at least 21 intersubtype circulating

recombinants forms (CRFs) among the isolates within the major group, M.<sup>1–6</sup> The constant tracking of the genetic diversity of HIV-1 infection has important implications for monitoring the global evolution of HIV-1 and ensuring the efficacy of viral RNA quantitation methods<sup>7–12</sup> and future vaccine development.<sup>13–16</sup> The reported prevalence of HIV-1 infection in Cyprus is lower (about 0.05%) than other European countries and is comparable to that of neighboring countries in the eastern Mediterranean region.<sup>17–21</sup> The first AIDS patient in Cyprus was reported in 1987 and the first molecular epidemiological study of HIV-1 infection in Cyprus was conducted in 1994.<sup>22</sup> Based on phylogenetic analyses of

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, University of Cyprus, 1678 Nicosia, Cyprus.

<sup>2</sup>Department of Virology, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands.

<sup>3</sup>AIDS Clinic, Larnaca General Hospital, 6043 Larnaca, Cyprus.



obtained viral sequences encoding the C2 to V3 *env* gp120 from 24 patients infected from 1987 to 1994, subtype B was identified as the most prevalent subtype accounting for 63% of the infections, followed by subtype A (21%), subtype F (8%), and subtypes C and I (4% each).<sup>22</sup> Subtype I was later determined to be a complex mosaic comprising subtypes A, G, and I and has been named CRF04\_cpx.<sup>23</sup>

Combination antiretroviral therapy (cART) with recently approved highly active antiretroviral drugs has significantly improved the quality of life for HIV-infected patients.<sup>3</sup> However, infection with drug-resistant HIV-1 variants with reduced susceptibility to drugs can impair the response to cART and may have important implications for the clinical management of HIV-1-infected patients. Based on reported worldwide studies, the prevalence of transmitted drug-resistant HIV-1 variants ranges from 1.4% to 28.9%.<sup>3,24–30</sup> The prevalence of HIV-1 variants with drug-resistant mutations in newly diagnosed individuals from western Europe and Israel is approximately 9%.<sup>31</sup> cART using protease and reverse transcriptase inhibitors was first introduced in the late 1990s, and until now there have been no studies investigating the extent and impact of transmission of drug-resistant HIV-1 variants in Cyprus. As part of a continuing effort to monitor the genetic diversity of HIV in Cyprus, in this study we determined the genetic diversity and the prevalence of antiretroviral drug resistance mutations among HIV-1 strains isolated from 37 newly diagnosed untreated HIV-1 patients, representing 72% of the total number of newly diagnosed patients in the period 2003 to 2006.

## Materials and Methods

### Study subjects

Between 2003 and 2006 blood samples were obtained from 37 HIV-1 newly diagnosed patients at the Cyprus Reference AIDS Clinic, Larnaca National Hospital, with the informed consent of all participants and the approval of the Cyprus National Bioethics Committee. All patients were living permanently in Cyprus at the time of sampling. The majority of study subjects were Greek-Cypriots, although a number reported traveling or living abroad in the past. The HIV-1 serostatus of each subject was previously established by commercial enzyme-linked immunoassay and confirmed by Western blotting. Blood was drawn within 3 months of HIV-1 diagnosis. A description of the clinical profile of each patient is presented in Table 1. All blood samples were processed at the Laboratory of Biotechnology and Molecular Virology of the University of Cyprus on the same day of sampling.

### HIV-1 plasma RNA and cell-associated DNA isolation

Patients' blood (16 ml) was collected in CPT tubes (Becton Dickinson, Annapolis, MD) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma were isolated using the CPT vacutainer procedure. HIV-1 RNA was extracted from 200  $\mu$ l plasma and genomic DNA from about 10<sup>7</sup> uncultured PBMCs using QIAamp silica-gel-membrane technology with the QIAamp UltraSens Virus Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit, respectively (Qiagen, Valencia, CA). Genomic DNA was quantified by ultraviolet (UV) absorbance spectrophotometry using the Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE).

### PCR and sequencing

HIV-1 sequences encoding approximately 1722 bp of the *gag* region, 1461 bp of the *pol* (*protease and RT*) region, and 2927 bp of the *env* (*gp160*) region were amplified from each sample by nested polymerase chain reaction (PCR) using PBMC-associated HIV-1 DNA. For any samples where the PCR product of genomic DNA was problematic, reverse transcription nested PCR (RT-PCR) using plasma HIV-1 RNA was performed instead. Primers used in the first round of PCR were 623 and 2501 for *gag*,<sup>32</sup> 1832 and 3583 for *pol* (*protease and RT*), and 5955 and 9181 for *env* (*gp160*). Inner primers were 684 and 2406 for *gag*, 2078–3539 for *pol* (*protease and RT*), and 6111 and JL88 for *env* (*gp160*). The primer positions corresponding to the HXB2 strain (accession number K03455) are described in Table 2. In the first round of PCR, approximately 60–100 ng of patient PBMC DNA was used, as were 20 pmol of each primer and 1.1X Platinum PCR SuperMix (Invitrogen Corp., San Diego, CA) in a 50- $\mu$ l volume. DNA amplifications were carried out in an Eppendorf Master Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). For *gag* amplification, the thermocycling conditions were one cycle at 94°C for 2 min, 40 cycles at 94°C for 20 s, 53°C for 30 s, 72°C for 2 min, and one cycle at 72°C for 7 min. For *pol* (*protease and RT*) and *env* (*gp160*), the thermocycling conditions were the same except the hybridization temperatures were 52 and 54°C, respectively. In the second round of PCR, 3  $\mu$ l samples of primary reaction products were used, along with 20 pmol of each primer and 1.1X Platinum PCR SuperMix (Invitrogen Corp., San Diego, CA) in a 50- $\mu$ l volume. The amplification conditions were identical to those described for the first round of PCR, except the hybridization temperatures were 56°C for *gag* and 52°C for *pol* (*protease and RT*) and *env* (*gp160*) and the polymerization times were 2.20 min for *gag*, 2 min for *pol* (*protease and RT*), and 3.20 min for *env* (*gp160*). The detailed experimental method for the amplification of the *pol* (*protease and RT*) region by RT-PCR using plasma HIV-1 RNA is described below in this section. For *gag* and *env* RT-PCR amplification, the experimental conditions were the same as those described in the nested PCR methods with the following modifications: the Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity was used instead of the 1.1X Platinum PCR SuperMix according to the manufacturer's specifications (Invitrogen Corp., San Diego, CA); in the first round *env* RT-PCR amplification there was an additional reverse transcription cycle at 54°C for 1 h; for *gag* RT-PCR amplification, the reverse transcription cycle was at 52°C for 1 h; in both RT-PCR amplifications, the polymerization temperature was 68°C instead of 72°C.

Amplified products from the second-round PCR were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA), their lengths were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis, and the concentrations were quantified by UV absorbance spectrophotometry using the Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). In each sample, the DNA sequences encoding the *gag*, *pol* (*protease and RT*), and *env* (*gp160*) regions were determined by directly sequencing both complementary strands in separate reactions, using the second-round-amplified PCR product as the template and sequencing primers as follows (Table 2): primers 684, 1173, 1985, 2406 for *gag*; 2136, 3462 for *pol* (*protease and RT*); and 6111, 6438, 6858,

TABLE 1. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL INFORMATION FOR STUDY PATIENTS

Patient <sup>a</sup>	Sex <sup>b</sup>	Age (years)	Weeks since diagnosis <sup>c</sup>	Country of origin <sup>d</sup>	Transmission risk group <sup>e</sup>	CD4 (cells/mm <sup>3</sup> )	Plasma HIV-1 RNA (copies × 10 <sup>4</sup> /ml)	Epidemiological information <sup>f</sup>
CY004	M	47	1	Cyprus	MSM	363	1.3	N/A
CY005	M	32	1	Cyprus	MSM	357	2.0	N/A
CY006	M	33	1	Cyprus	MSM	593	2.9	N/A
CY007	M	36	1	Cameroon	MSM	842	1.2	Political refugee from Cameroon
CY008	F	36	1	Cyprus	HSX	556	0.2	N/A
CY009	M	24	1	Cyprus	MSM	290	2.7	HBV positive
CY010	M	45	1	Cyprus	MSM	442	12.0	N/A
CY012	M	30	8	Cyprus	MSM	461	30.0	N/A
CY013	M	54	1	Cyprus	MSM	79	100.3	N/A
CY014	M	N/A	1	Cyprus	MSM	671	1.7	N/A
CY015	F	19	4	Georgia	HSX	369	7.7	Possibly infected by heterosexual partner CY009
CY016	M	59	3	Cyprus	HSX	202	17.0	N/A
CY035	M	27	2	Cyprus	MSM	191	55.0	Diagnosed with <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia
CY048	M	30	1	Burkina-Faso	MSM	181	27.0	Political refugee from Burkina-Faso
CY057	F	28	1	Georgia	HSX	N/A	2.8	Heterosexual partner of CY058; HCV positive
CY058	M	34	1	Georgia	HSX	N/A	3.2	Heterosexual partner of CY057; HCV positive
CY066	M	28	1	Cyprus	MSM	N/A	0.6	N/A
CY073	M	26	1	Pakistan	Unknown	425	6.4	Diagnosed with tuberculosis lymphadenopathy
CY089	F	20	1	Cyprus	HSX	262	5.6	Possibly infected by heterosexual partner CY008
CY109	M	36	12	Cyprus	MSM	339	2.3	Possible infected by homosexual contact in Germany
CY111	F	37	1	Sweden	HSX	32	200.0	Heterosexual partner of CY112
CY112	M	N/A	1	U.K.	HSX	292	6.0	Heterosexual partner of CY111; HCV positive
CY142	M	53	1	Cyprus	MSM	32	31.0	Diagnosed with pneumonia recurrent
CY153	M	20	2	Cyprus	MSM	223	5.9	Diagnosed with pneumonia recurrent
CY158	M	37	1	Burkina-Faso	OHPC	78	6.5	Political refugee from Burkina-Faso
CY159	M	34	4	Cyprus	MSM	1390	0.2	N/A
CY166	M	57	4	Cyprus	HSX	134	100.0	Diagnosed with non-Hodgkin's lymphoma
CY169	F	33	1	Georgia	HSX	72	12.0	Heterosexual partner of CY171; currently on treatment for lymphoma
CY170	M	36	2	Cyprus	HSX	473	13.0	Diagnosed with infectious mononucleosis and herpes genital
CY171	M	47	2	Cyprus	HSX	447	11.0	Heterosexual partner of CY169, diagnosed with gonorrhoea
CY172	M	24	12	Cameroon	HSX	363	8.8	Political refugee from Cameroon
CY173	F	27	4	Ukraine	HSX	598	1.8	Infected by heterosexual partner CY170 six months before
CY175	M	30	8	Cyprus	HSX	320	1.2	Heterosexual partner of CY176
CY176	F	24	4	Ethiopia	HSX	595	2.1	Heterosexual partner of CY175
CY177	M	47	8	Cyprus	MSM	641	4.7	HBV positive
CY178	M	42	1	Cyprus	MSM	785	0.1	N/A
CY179	M	36	2	Cyprus	HSX	498	3.3	N/A

<sup>a</sup>Indicates the laboratory code for each study subject.

<sup>b</sup>F, female; M, male.

<sup>c</sup>Indicates the duration from the first known positive HIV antibody test.

<sup>d</sup>Country of birth of the study subjects.

<sup>e</sup>MSM, men who have sex with men; HSX, heterosexual contact; OHPC, origin from a high prevalence country.

<sup>f</sup>Information provided by the study subjects. N/A, not available; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus.

TABLE 2. PCR AND SEQUENCING PRIMERS

Designation <sup>a</sup>	Target gene	Sequence <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>	Amplicon length (nts)	Reference <sup>d</sup>
<b>PCR primers</b>					
623 (F)	<i>gag</i>	AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCCGAA	623–646	1878	32
2501 (R)	<i>gag</i>	GTTGACAGGTGTAGGTCCCTAC	2481–2501		32
684 (F) <sup>e</sup>	<i>gag</i>	TCTCGACGCAGGACTCGGCTTG	684–705	1722	This study
2406 (R) <sup>e</sup>	<i>gag</i>	CTCCAATCCYCCTATCATTITTTGGTTTCC	2377–2406		This study
1832 (F)	<i>pol</i>	CAGCATGYCAGGGAGTRGGRGGACC	1832–1856	1751	This study
3583 (R)	<i>pol</i>	GGYTCTGRTAAATTTGATATGTCCATTG	3555–3583		This study
2078 (F)	<i>pol</i>	AGGCTAATTTTTAGGGAARATYTGCCCTCC	2078–2109	1461	This study
3539 (R)	<i>pol</i>	CTGTATTTCTGCTAYTAAGTCTTTTGATGG	3510–3539		This study
5955 (F)	<i>env</i>	GCTTAGGCATCTCCTATGGCA	5955–5975	3226	This study
9181 (R)	<i>env</i>	GTGTGTAGTTYTGCCAATCAGG	9160–9181		This study
6111 (F) <sup>e</sup>	<i>env</i>	TMATAGCAATAGTTGTGTGGACYATAG	6111–6137	2927	This study
JL88 (R) <sup>e</sup>	<i>env</i>	TAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG	9013–9038		32
<b>Sequencing primers</b>					
1173 (F)	<i>gag</i>	CAGYCAAATAYCCTATAGTGCA	1173–1196		This study
1985 (R)	<i>gag</i>	CCTTCYTTGCCACARTTGAAACAY	1962–1985		This study
2136 (F)	<i>pol</i>	YCAGARCAGACCAGAGCCAACAGCCCC	2136–2162		This study
2216 (F)	<i>pol</i>	AGGAGCMGAWAGACARG	2216–2232		This study
2454 (F)	<i>pol</i>	GGAMAWAARGCTATAGGTACAG	2454–2475		This study
2610 (R)	<i>pol</i>	CYTTGGGCCATCCATTCC	2593–2610		This study
2650 (R)	<i>pol</i>	AATGCTTTTATITTYTCTTCTGTCAATGGC	2621–2650		This study
2734 (R)	<i>pol</i>	GCAAATAYTGAGTATTRTATGGATTTTCAGG	2703–2734		This study
3003 (F)	<i>pol</i>	GGATGGAAAGGATCACC	3003–3019		This study
3019 (R)	<i>pol</i>	GGTGATCCTTTCCATCC	3003–3019		This study
3462 (R)	<i>pol</i>	CTGCCARTTCTARYTCTGCTTC	3441–3462		This study
6438 (F)	<i>env</i>	CATGCCRTGTACCCACAGA	6438–6457		This study
6858 (F)	<i>env</i>	CCAATCCYATACATTATTGTGCYC	6858–6882		This study
8039 (R)	<i>env</i>	GGTGCARATGWGTTTTCCAGAGC	8017–8039		This study
8530 (R)	<i>env</i>	TGGTAGCTGAAGAGGCACAG	8511–8530		This study

<sup>a</sup>Reverse transcriptase, primary and secondary PCR primers, and sequencing primers name as appears in the text; orientation of the PCR primer is indicated in parentheses: F, forward; R, reverse.

<sup>b</sup>Y, indicates equal molar mixture of C and T; R, A, and G; M, A, and C; W, A, and T.

<sup>c</sup>Primer positions correspond to subtype B HIV-1 HXB2 strain (GenBank accession number K03455).

<sup>d</sup>Salminen *et al.*<sup>32</sup>

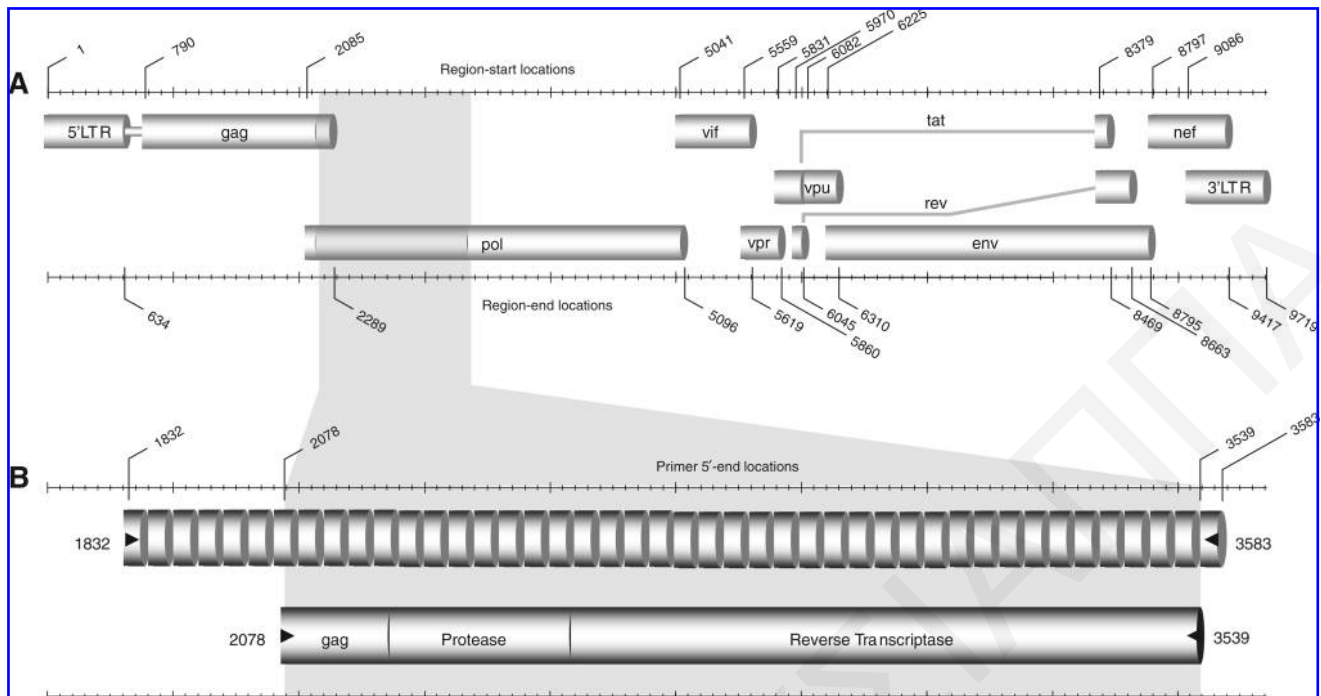
<sup>e</sup>Used also as sequencing primers as described in the text.

8039, 8530, JL88 for *env* (*gp160*). DNA sequence reactions were performed by the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's recommendations. Samples were sequenced with the ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Samples exhibiting partial or extensive viral diversity by direct sequencing were subsequently cloned, using the TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen Corp., San Diego, CA) and sequenced as described above.

#### Determination of drug-resistance-associated mutations in protease, reverse transcriptase, *gag*, and *gp41*

Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs to protease and reverse transcriptase were determined using a genotyping in-house assay that analyzes *protease* and *RT* genes within M-group strains (Fig. 1). HIV-1 DNA sequences encoding 1461 bp of the *pol* (*protease and RT*) region were amplified from each sample by nested RT-PCR using extracted viral RNA (Fig. 1). Primers 1832 and 3583 were used in the first round of RT-PCR; the inner primers were 2078–3539 (Table 2). In the first round of RT-PCR, approximately 15  $\mu$ l of patient plasma RNA was used, as were 20 pmol of each

primer and Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen Corp., San Diego, CA) in a 50- $\mu$ l volume. Amplification was carried out in an Eppendorf Master Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The thermocycling conditions were one cycle at 52°C for 1 h, one cycle at 94°C for 2 min, 40 cycles at 94°C for 15 s, 52°C for 30 s, 68°C for 2 min, and one cycle at 68°C for 5 min. In the second round of PCR, 3- $\mu$ l samples of primary reaction products were used, along with 20 pmol of each primer and 1.1X Platinum PCR SuperMix (Invitrogen Corp., San Diego, CA) in a 50- $\mu$ l volume. The amplification conditions were identical to those described for the second round of PCR in the nested PCR of *pol* (*protease and RT*). The DNA sequences of amplified products were determined by direct sequencing using the following sequencing primers: 2136, 2216, 2454, 2610, 2650, 2734, 3003, 3019, 3462, and 3539 (see Table 2 and Fig. 2). Genotypic resistance was defined as the presence of at least one resistance-related amino acid substitution as specified by the International AIDS Society (IAS)-USA<sup>33</sup> and the Stanford HIV Drug Resistance Database.<sup>34</sup> Assessment of the possible impact of transmitted drug resistance on the therapeutic response was performed using the Stanford drug-resistant algorithm.<sup>35</sup> *Gag* cleavage site-associated mutations (NC/p1/p6, corresponding to amino acids



**FIG. 1.** Schematic representation summarizes the amplification of the 5'-end-half *pol* region within HIV-1 M Group subtypes used in a novel genotypic drug-resistant assay of *protease* and *reverse transcriptase* described in this study. (A) The upper diagram summarizes the overall HIV-1 genetic organization exemplified by the HXB2 genome (GenBank accession number K03455). The beginning and end of each major genetic region are indicated by a corresponding number above and below the diagram, respectively, using the HXB2 numbering. The shaded area in the HIV-1 gene map indicates the *gag* (*p6*) and *pol* (*prot* and *p51 RT*) region amplified in the genotypic drug-resistant assay. (B) The lower scheme summarizes the nested RT-PCR designed for the amplification of *protease* and *RT* genes. Black arrows indicate the orientations and 5'-end-primer-binding positions of the primary (1832 and 3583) and secondary (2078 and 3539) PCR primers with respect to the HXB2 genome. The intermittent and solid cylinders indicate the product of the primary RT-PCR and secondary PCR, respectively.

428–454 of the HXB2 *gag* precursor protein) were analyzed from the Cypriot *gag* sequences as specified by Maguire *et al.*<sup>36</sup> and Nijhuis *et al.*<sup>37</sup> Fusion-inhibitor-associated mutations of gp41 (heptad repeat 1, corresponding to amino acids 30–51 of the HXB2 gp41) were analyzed from Cypriot gp41 sequences as specified by the IAS-USA<sup>33</sup> and Van Laethem *et al.*<sup>38</sup>

#### Phylogenetic tree analysis

We used DNA alignment, distance calculation, and phylogenetic tree construction programs from the Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA) software.<sup>39</sup> Patients' DNA sequences encoding the *pol*, *gag*, and *env* viral regions were aligned against corresponding sequences of genetically characterized HIV-1 strains obtained from the Los Alamos database<sup>1</sup> using the alignment method described in the MEGA program run with default conditions. Pairwise distance matrices were calculated using the Kimura two-parameter distance estimation approach with a transition/transversion ratio of 2.0 and phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method. The consistency of the phylogenetic clustering was tested using bootstrap analysis with 100 replicates. Bootstrap values above 70 were considered adequate for subtype assignment. The subtype assignment was confirmed using the REGA algorithm.<sup>40</sup> GenBank accession numbers for control reference sequences in phylogenetic analyses are as follows: A1-94SE7253, AF069670; A1-9292UG037.1, U51190; A1-94Q23, AF004885; A1-98UG57136, AF484509; A2-

97CDKTB48, AF286238; A2-94CY017, AF286237; B-83HXB2, K03455; B-981058, AY331295; B-90BK132, AY173951; B-00671, AY423387; C-9292BR025.8, U52953; C-86ETH2220, U46016; C-04SK164B1, AY772699; C-95IN21068, AF067155; D-01A280, AY253311; D-9494UG114.1, U88824; D-83ELI, K03454; D-014412HAL, AY371157; F1-93VI850, AF077336; F1-93FIN9363, AF075703; F1-9393BR020-1, AF005494; F1-96MP411, AJ249238; F2-95MP255, AJ249236; F2-95MP257, AJ249237; F2-020016BBY, AY371158; F2-97CM53657, AF377956; G-93HH8793.1.1, AF061640; G-96DRCBL, AF084936; G-92NG083, U88826; G-93SE6165, AF061642; H-93VI997, AF190128; H-90056.1, AF005496; H-94VI991, AF190127; J-94SE9280.9, AF082394; J-93SE9173.3, AF082395; K-97EQTBI1C, AJ249235; K-96MP535, AJ249239; 01AE-90CM240, U54771; and 02AG-IBNG, L39106.

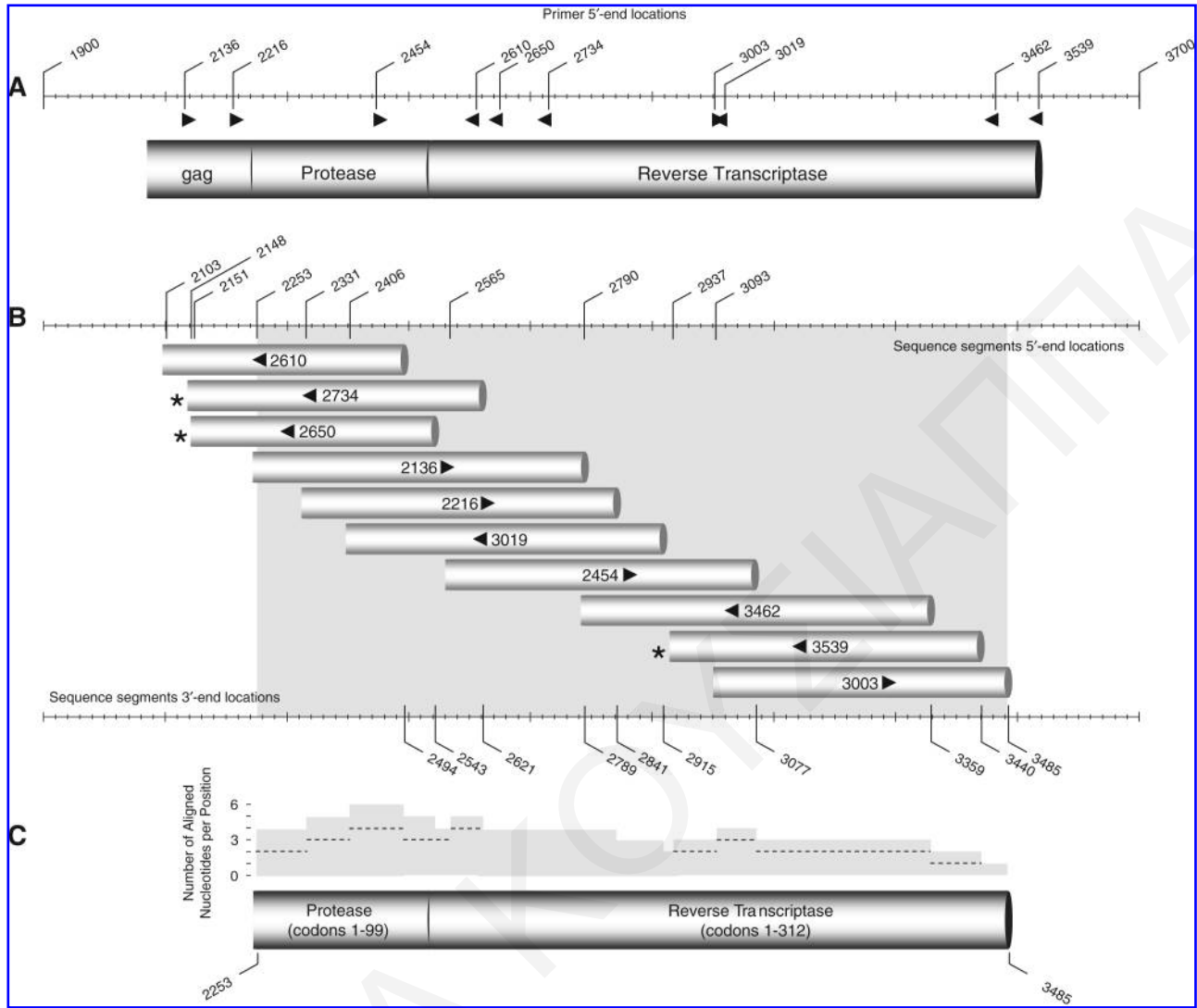
#### Coreceptor usage

The coreceptor usage of HIV-1 was predicted from DNA sequences encoding the *env* (V3 loop) region using the Geno2pheno<sup>41</sup> and PSSM<sup>42</sup> coreceptor prediction algorithms running with default conditions.

## Results

#### Clinical and epidemiological features of the study patients

The study group consisted of 37 HIV-1-seropositive patients from the Cyprus Reference AIDS Clinic of Larnaca



**FIG. 2.** Schematic diagram summarizes the sequencing procedure of the *protease-RT pol* region. (A) A solid cylinder represents the final amplicon containing *gag* (*p6*) and *pol* (*prot* and *p51 RT*) regions derived from the RT-PCR procedure (Fig. 1). Black arrows indicate the orientations and 5'-end binding positions of the sequencing primers. (B) Gray cylinders indicate the sequence segments obtained from each sequencing primer. The beginning and end of each segment are indicated by a corresponding number above and below the diagram, respectively. DNA segments marked by asterisks are alternates: 2734 and 2650 can be used instead of 2610 and 3539 instead of 3462. (C) A solid cylinder represents the final aligned DNA sequence derived from all partial segments (corresponding to nucleotides 2253 to 3485 on the HXB2 genome) containing the full *protease* (codons 1 to 99) and partial *RT* (codons 1 to 312) genes. At the bottom, the diagram indicates the number of aligned nucleotides per nucleotide position from information derived from all partial sequence segments; dashed lines indicate the limit of aligned nucleotides per aligned nucleotide position used in the genotypic analysis.

National Hospital. Each patient is identified by a laboratory registration number ascending in chronological order of blood drawn. The study subjects represent 72% of the total number of newly HIV-1-diagnosed patients monitored at the clinic from 2003 until 2006 in Cyprus. The general demographic, epidemiological, and clinical features of all study subjects are summarized in Table 3. Among the 37 patients, 29 were male and 8 were female. Their median age was 34 years. Twenty-eight patients have asymptomatic infection, whereas nine have symptomatic infections. Two patients were coinfecting with hepatitis B virus (HBV) and three with hepatitis C virus (HCV). The median CD4<sup>+</sup> lymphocyte count was 363 cells/mm<sup>3</sup> and the median plasma HIV-load was 4.75 log HIV-1 RNA copies/ml. Twenty-four patients are Cypriots,

five are from sub-Saharan Africa, five from Eastern Europe, two from western Europe, and one from Asia. Of the patients, 18 were infected by homosexual/bisexual contact, 17 were infected by heterosexual contact, one was infected in an HIV-1 high prevalence country (Burkina-Faso), and for one the route of infection is unknown.

Epidemiological features varied among the 37 patients. Sixteen subjects were infected in Cyprus: eight men by homosexual contact and three men and five women by heterosexual contact. Four subjects were presumably infected in Greece by homosexual contact. One man was infected in Germany, one in the United Kingdom, and one in the United States by homosexual contact. Two men were infected in Cameroon, one heterosexually and one homosexually. One

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF THE STUDY SUBJECTS

Characteristics <sup>a</sup>	Patients (N = 37)
Gender (%)	
Male	29 (78)
Female	8 (22)
Age (years) <sup>b</sup>	
Median (IQR)	34 (27–42)
Region of origin (%)	
Cyprus	24 (65)
Western Europe	2 (5)
Eastern Europe	5 (14)
Sub-Saharan Africa	5 (14)
Asia	1 (3)
Route of transmission (%)	
MSM	18 (49)
HSX	17 (46)
OHPC	1 (3)
N/A	1 (3)
CDC stage number (%)	
A	28 (76)
B	3 (8)
C	6 (16)
Plasma HIV-RNA (log copies/ml)	
Median (IQR)	4.75 (4.3–5.1)
CD4 count (cells/ml) <sup>c</sup>	
Median (IQR)	363 (199–565)
Subtype (%)	
A	14 (38)
B	13 (35)
C	5 (13)
D	1 (3)
CRF01_AE	1 (3)
CRF02_AG	3 (8)
Coinfection (%)	
HBV	2 (5.4)
HCV	3 (8.1)

<sup>a</sup>IQR, interquartile range.

<sup>b</sup>Information available for 35 patients.

<sup>c</sup>Information available for 34 patients.

man was infected in South Africa by homosexual contact. Two men were infected in Burkina-Faso, one by homosexual contact and the other by an unknown route of infection. One man was infected in Thailand by heterosexual contact. One heterosexual couple was infected in Georgia. One heterosexual couple was infected in Ethiopia. One heterosexual couple (the man is from the United Kingdom and the woman from Sweden) living in Cyprus reported that the place of infection is unknown. One patient was infected by homosexual contact whose place of infection is unknown and for one patient the route and place of infection are unknown.

#### PCR and DNA sequencing

Uncultured PBMCs and plasma from all subjects were HIV-1 positive by nested PCR in the *gag*, *pol* (*protease and RT*), and *env* (*gp160*) regions. The positive PCR combined with the extensive genetic diversity of the HIV-1 strains, as described in the phylogenetic analysis (Fig. 3), demonstrates that the newly designed PCR primers are suitable for diverse M-group strains. All HIV-1 PCR products were further analyzed by nucleotide sequencing analysis. The complete DNA sequences from *gag* and *pol* were derived by direct (population)

sequencing using PCR-amplified products from PBMC-extracted genomic DNA. The *env* regions in 10 patients were derived by direct sequencing, in 15 patients from *env* inserts of cloned PCR fragments, in five patients by RT-PCR from plasma-extracted HIV-1 RNA, and in seven patients no *env* sequences were obtained because of primer failure to bind to the DNA template.

#### Phylogenetic analysis

The molecular epidemiological relationship between DNA sequences encoding the *gag*, *pol*, and *env* regions was analyzed by nucleotide phylogenetic analysis. Three phylogenetic trees, one corresponding to each viral region, were constructed for the 37 study subjects on the basis of 37 derived *gag* and *pol* and 30 *env* DNA sequences (see Fig. 3A, B, and C, respectively). In addition to the sequences from Cyprus, 37 previously sequenced HIV-1 isolates from diverse global locations, encompassing all nine known subtypes (A through K) and two circulating recombinant forms (CRF), CRF01\_AE and CRF02\_AG, were also included in the analysis.

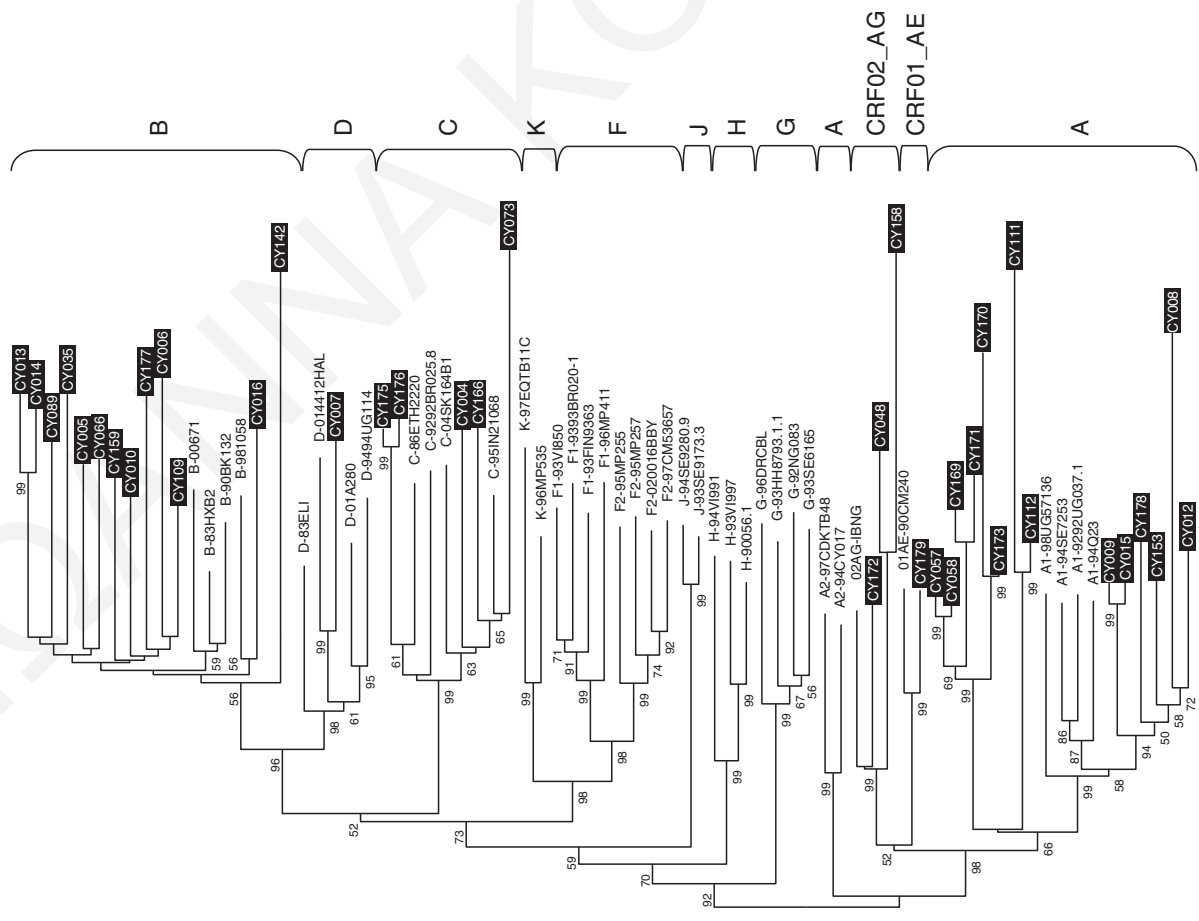
According to the constructed phylogenetic trees shown in Fig. 3, four distinct subtypes (A, B, C, and D) and two CRFs (CRF01\_AE and CRF02\_AG) were identified for the Cypriot sequences within the M group: subtype A, 14 sequences; subtype B, 13 sequences; subtype C, five sequences; subtype D, one sequence; CRF01\_AE, one sequence; and CRF02\_AG, three sequences. In the phylogenetic tree constructed based on *env* sequences (Fig. 3C), seven sequences classified previously as *gag* and *pol* are missing: subtype A, one sequence; subtype B, five sequences; and CRF02\_AG, one sequence. It is important to note that the Cypriot sequences in subtypes A (38% of patients), B (35%), C (13%), and CRF02\_AG (8%) have a relatively high average intrasubtype genetic diversity. The average (range) intrasubtype nucleotide divergence among the Cypriot *gag* sequences with subtype A is 11.0% (0.6 to 27.9%); within subtype B, 10.0% (3.2 to 16.2%); within subtype C, 10.3% (1.0 to 14.0%); and within CRF02\_AG, 12.6% (8.1 to 14.9%). This finding suggests that subtypes A, B, C, and CRF02\_AG were transmitted to Cyprus during the study period (2003 to 2006) by multiple sources, which is consistent with the epidemiological data of the study subjects presented in Table 1.

#### Genotypic drug resistance

There was no protease inhibitor (PI)-associated mutation observed in the untreated study population, but a number of minor PI-associated mutations (L10I, K20M/R, M36I, L63P/F/S/A/V, A71V/T, and V77I) were observed in 36 patients (97%). The amino acid substitution M36I was found in all non-B samples, while the amino acid substitutions K20R and L10I were observed in 14% and 9% of subtype A sequences, respectively. Furthermore, amino acid substitutions L63P and A71V were seen in 17 sequences (46%) of subtype B sequences and V77I was seen in 12 sequences (31%). Nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI)-associated mutations were seen in one subtype B sequence (M41L/M mutation in CY010 patient) and in one subtype A sequence (M184V mutation in patient CY169). The M41L mutation is associated with potentially low resistance (PLR) to didanosine, abacavir, and tenofovir and low resistance (LR) to zidovudine and stavudine, whereas the M184V mutation is

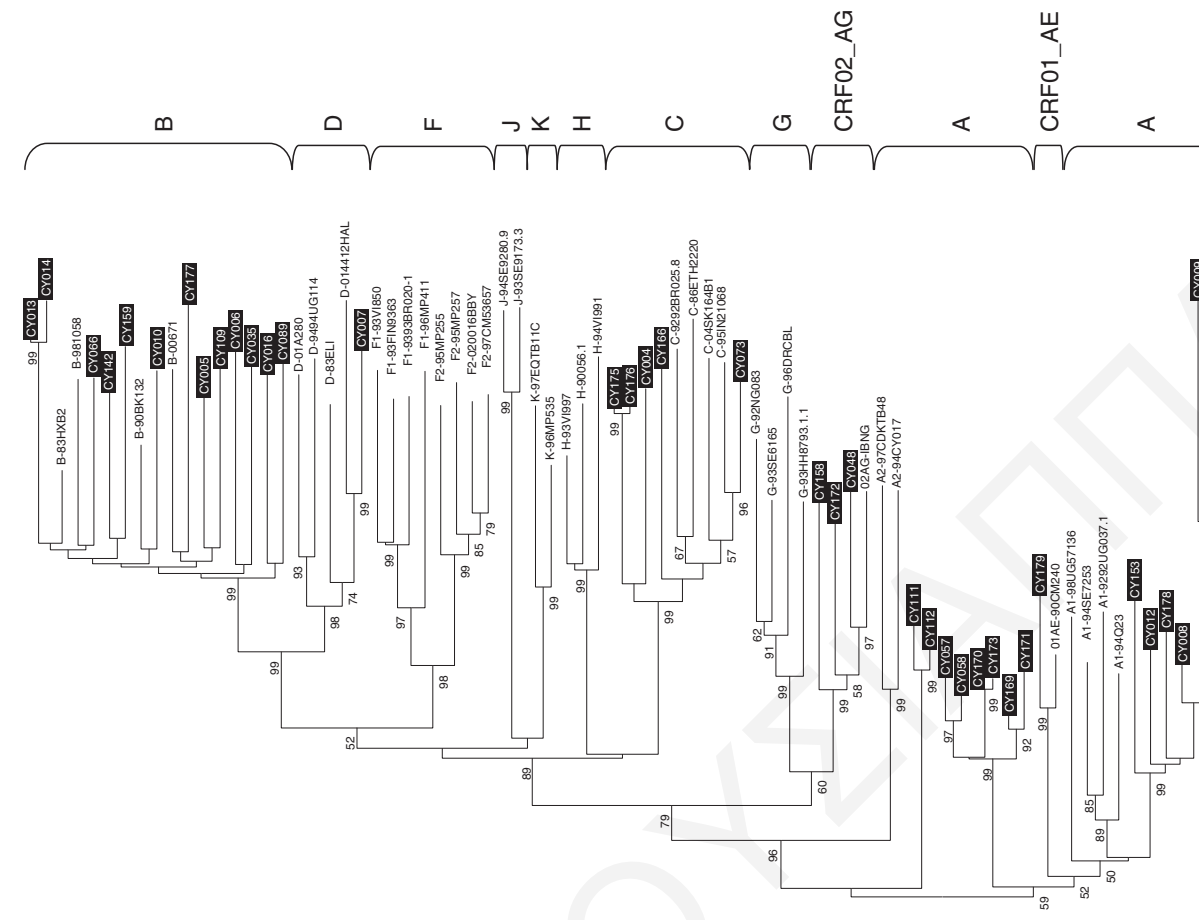
(A)

gag

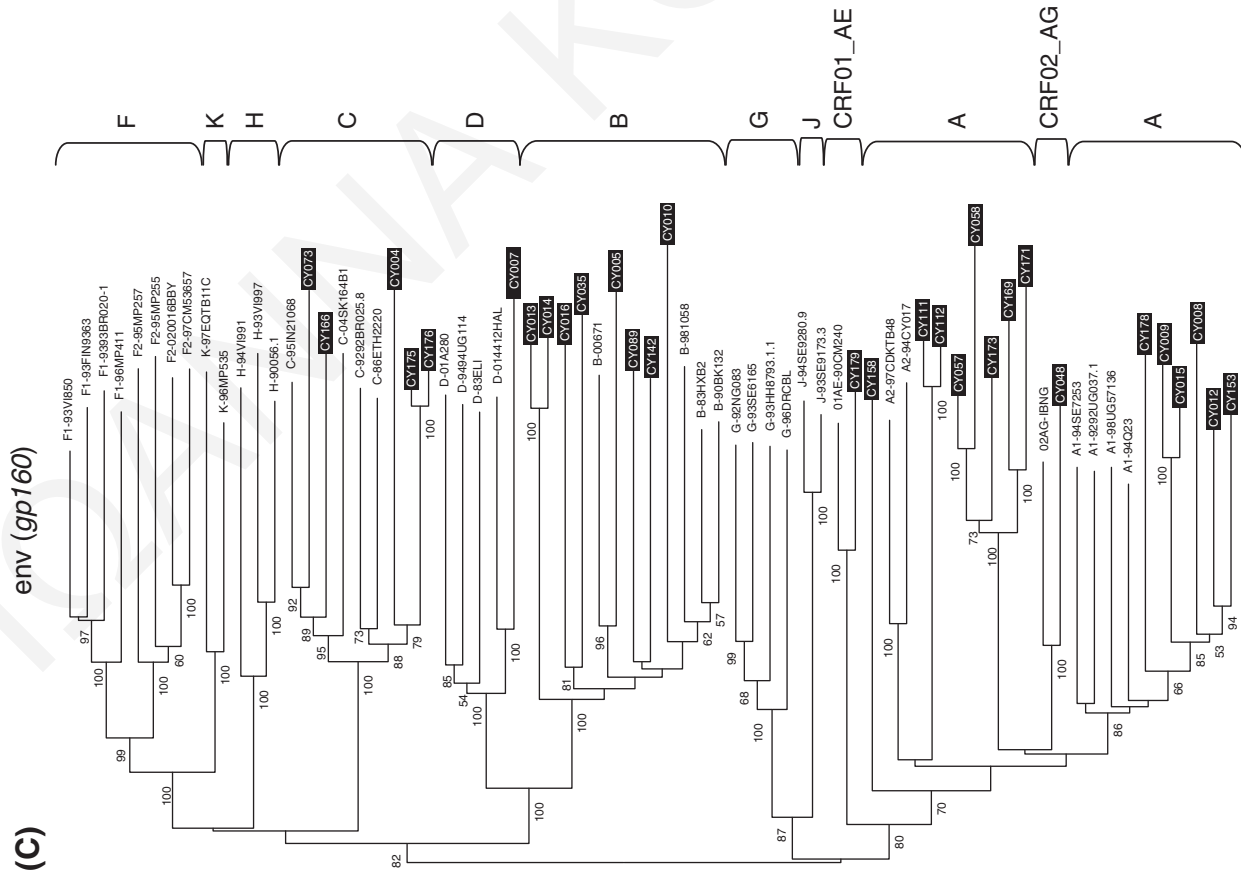


(B)

pol (protease and RT)







**FIG. 3.** Neighbor-joining phylogenetic trees for the nucleotide sequence of the *gag* region (A), the *pol* region (*prot* and *p51 RT*) (B), and the *env* region (*gp160*) (C) of HIV-1 strains obtained from newly diagnosed drug-naive patients in Cyprus, based on the Kimura two-parameter distance estimation method. In all trees representative reference sequences of HIV-1 subtypes (A–K) and CRF01\_AE, CRF02\_AG (shown in boldface) are included. The numbers indicated at several nodes are consensus bootstrap values out of 100 replications (only bootstrap values greater than 50% are denoted). The sequences determined in the study are shown in white on black boxes with a prefix CY for Cyprus and the number following denoting the laboratory code. The divergence between any two sequences is obtained by summing the horizontal branch length, using the scale at the lower left. The brackets on the right side of the trees indicate the determined subtypes as described in Results.



associated with high resistance (HR) to lamivudine and emtricitabine and PLR for abacavir. Furthermore, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-associated mutations were observed in one subtype C sequence (V179D mutation in CY004). The V179D mutation is associated with low-level (about 2-fold) resistance to nevirapine, delavirdine, and efavirenz and it has an impact on the sensitivity to etravirine when it coexists with other mutations.<sup>33,43</sup>

*Gag* cleavage site-associated mutations were analyzed from the 37 Cypriot *gag* sequences as previously established.<sup>36,37</sup> Genetic analysis of the *gag* sequences revealed that two subtype B sequences (CY013 and CY014) and one subtype A sequence (CY178) had the P453L (p1/p6 cleavage site) amino acid substitution previously shown to be linked with PI-associated drug resistance in combination with the presence of the protease 150V amino acid substitution.<sup>36,37</sup> Fusion inhibitor-associated mutations were analyzed from 33 Cypriot *env* sequences as previously established.<sup>33,38</sup> The *env* sequences from four patients (CY006, CY066, CY109, and CY177) were excluded due to incomplete sequencing as previously explained. Genetic analysis of the gp41 heptad repeat 1 (HR1) revealed that one subtype B sequence (CY005) had the L44M amino acid substitution, which is associated with resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide (T20).<sup>33,38</sup>

#### Sequence analysis of *env* (V3 loop) region

Alignment of the predicted protein sequences of the V3 loop of *env* gp120 sequences from 36 Cypriot sequences was performed. For comparison, the consensus sequence from each subtype was also deduced (data not shown). The positions of the two cysteine residues in this region (corresponding to amino acid positions 296 and 331 of the HXB2 gp41) were conserved, suggesting a similar folding of this region of the protein. Thirty-one sequences have 35 amino acid residues, while five sequences (CY111, CY112, CY016, CY089, and CY166) have 34 amino acid residues, missing glycine (G) at position 24. All 36 sequences had a putative N-linked glycosylation site at the N-terminus of the V3 loop. Nine of 13 subtype B sequences had the GPGR tetrapeptide motif at the crest of the V3 loop, which is the most common motif found throughout subtype B sequences. However, in two subtype B sequences (CY005 and CY089), the first G in the GPGR motif was replaced by alanine (A), another nonpolar amino acid leading to the motif APGR. In other three B sequences (CY010, CY016, and CY035) the arginine (R) in the GPGR motif was replaced by serine (S), a polar amino acid, alanine (A), a nonpolar amino acid, and lysine (K), a basic amino acid, respectively. Additionally, the subtype B sequence CY159 had the motif RPRK. The tetrapeptide motifs at the tip of the loops of the 14 subtype A sequences were highly variable, containing 10 GPGQ, one RPGQ, and two GPRK. The five subtype C sequences had the GPGQ motif, as did the subtype D sequence and the CRF01\_AE and CRF02\_AG sequences.

The PSSM algorithm detected all the viruses as R5 (using CCR5 coreceptor). The Geno2pheno algorithm predicted 34 viruses as R5, and two (CY035 and CY111) as dual-tropic/mixed-tropics or X4 (using CXCR4 coreceptor). The two algorithms were in accordance in their capacity to detect, or not detect, R5 viruses in 34 of 36 cases (94.5%). The two samples detected as carrying dual-tropic/mixed-tropic or X4

viruses had a low CD4 cell count and high viral load, respectively (Table 1). It is important, however, to note that both interpretation coreceptor algorithms may not be fully compatible to non-B strains.

#### Discussion

In the period between January 2003 and December 2006, 52 persons were reported to be infected with HIV-1 in Cyprus, of which 65% were Cypriots and the rest were foreigners. Compared with the data already published by Kostrikis *et al.*, where the samples were studied with a heteroduplex mobility assay of the *env* (C2–V3) region,<sup>22</sup> the present study yields more detailed information about the epidemiological status of HIV infection in Cyprus among 72% of the newly diagnosed patients in the time period 2003–2006. Clearly, subtypes A and B are dominant, followed by subtypes C, CRF02\_AG, D, and CRF01\_AE, strains that dominate the global epidemic. The frequency of non-B subtypes entering Cyprus (65%) is higher than that reported a decade ago (40%).<sup>22</sup> This finding reinforces the observed trend of the increasing prevalence of HIV-1 non-B subtypes among newly diagnosed patients in Europe.<sup>24</sup> This phenomenon is most likely due to a large number of immigrants from African and eastern European countries, where non-B subtypes are predominant; this has also been observed in other European countries,<sup>18,27,44–51</sup> countries of the Mediterranean region,<sup>17,52</sup> and in the United States.<sup>4,53</sup> The present study represents a significant contribution to the molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe and the Mediterranean countries and to the evaluation of the movement of various strains across geographic regions.

The phylogenetic trees show that there are three distinct and divergent clusters within the A subtype, one in subtype B, one in subtype C, and one in CRF02\_AG. The average intrasubtype diversity (range) among six Cypriot *gag* sequences within subtype A (CY057, CY058, CY169, CY171, CY170, and CY173) is 5.1% (0.6–11.9%). The relatively low genetic diversity (5.1%) among these sequences in comparison with the overall intrasubtype diversity (11.0%) suggests that the isolates were derived from epidemiologically linked individuals. This finding is further reconfirmed by the branch topologies in the phylogenetic trees from the *gag*, *pol*, and *env* sequences (Fig. 3A, B, and C), the bootstrap values associated with the cluster (99 out of 100 replicates), and the epidemiological information provided by the study subjects. Indeed, this cluster of patients consists of three heterosexual couples: a couple from Georgia (CY057 and CY058) who reported being infected in Georgia, a man from Cyprus (CY171) and a woman from Georgia (CY169) who were infected in Cyprus, and a man from Cyprus (CY170) and a woman (CY173) from Ukraine who were infected in Cyprus.

This is the first time the prevalence and patterns of anti-retroviral drug resistance-associated mutations were estimated for a population in Cyprus in 2003–2006. A novel method for dealing with B- and non-B subtypes has been successfully established and used to determine transmitted drug resistance. Cyprus has one of the lowest levels of transmitted drug resistance (5.4%) worldwide,<sup>30</sup> similar to Brazil, Chile, Japan, Denmark, Slovenia, and Georgia,<sup>28,46,54–57</sup> and in contrast to Greece, The Netherlands, and Portugal.<sup>3,18,27</sup> No primary mutations conferring resistance to PIs or NNRTIs were observed in

the Cyprus isolates, but a high rate of minor mutations was seen. Two patients (5.4%) had RT mutations associated with reduced susceptibility to the NRTIs. The results of this study support the need for routine resistance testing before the initiation of antiretroviral therapy for HIV patients in Cyprus following the European and IAS-USA guidelines, which recommend resistance testing in chronically infected drug-naive patients when the regional prevalence of resistance is  $\geq 10\%$  and  $\geq 5\%$ , respectively.<sup>58,59</sup> This is also supported by the increase in newly diagnosed HIV-1-infected patients in 2007 in relation to the total number of newly diagnosed HIV-1-infected patients in 2006. Therefore, there should be more active surveillance of resistance-associated mutations in untreated individuals in order to recognize, as soon as possible, any significant change that may affect their future clinical management, as well as to plan and optimize the first line regimen and estimate of prevalence of resistance over time.

The gp41 HR1 domain is well conserved in all study subjects. However, one newly diagnosed patient out of 33 (3%) had one of the currently known mutations in the HR1 region associated with resistance to T20. The incidence of genotypic changes at amino acids 36–45 among T20-naive populations is low, demonstrating a natural conservation of the motif.<sup>60,61</sup> Our results reinforce the suggestion of testing the HR1 region with population sequencing before commencing therapy with T20.

Tropism predictions of the newly diagnosed patients were in accordance with the literature data, where it is well known that R5 variants are generally responsible for the establishment of primary infection.<sup>62</sup> To effectively monitor patient response to the new coreceptor inhibitors, such as maraviroc, a sequence-based method for predicting *coreceptor* usage should be performed prior to and after administration of the inhibitors in correlation with the CD4 cell count and viral load.<sup>62,63</sup>

In conclusion, the results presented in this report provide important information about HIV-1 genetic variation in Cyprus. A high genetic diversity of subtypes and CRFs in *gag*, *pol* (*protease and RT*), and *env* (*gp160*) sequences indicates multiple introductions of distinct viral variants. New data are provided for HIV-1 variation associated with resistance to protease, RT, and entry inhibitors: 5.4% had resistant mutations associated with NRTIs and 3% presented a T20-resistant mutation. Cyprus has a low prevalence of transmitted resistance compared with most other European countries in the *pol* (*protease and RT p51*) region, but the presence of resistant mutations in the genetic area of gp41 reveals that the newly diagnosed patients have a very heterogeneous genetic profile. Furthermore, these results provide important baselines prior to the introduction of combined antiretroviral therapy to newly diagnosed individuals in Cyprus.

### Sequence Data

GenBank accession numbers for the sequences obtained in this study are as follows: *gag* sequences, EU673411–EU673447; *pol*, EU673374–EU673410 and *env*, EU668962–EU668991.

### Acknowledgments

We thank all participating subjects from the Larnaca General Hospital AIDS Clinic, E. Lazarou, C. Kasapis, I. Christodoulou, M. Christophina, the Cyprus Ministry of Health, and the Cyprus National Bioethics Committee for valuable assis-

tance; S. Gilliland and E. Yiakoumi for data preparation; and E. Loizidou for helpful discussions. This work was supported by grants from the European Commission (FP6-014822, QLK2-CT-2001-01344, and LSHP-CT-2006-518211), the Cyprus Research Promotion Foundation (Health/0104/22), the University of Cyprus (8037-3/312-25004 and 837-25011), and the Birch Biomedical Research LLC (3416-25017) awarded to L.G. Kostrikis.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Leitner T, Korber B, Daniels M, Calef C, and Foley B: HIV-1 subtype and circulating recombinant form (CRF) reference sequences, 2005. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2005.
- Peeters M, Toure-Kane C, and Nkengasong JN: Genetic diversity of HIV in Africa: Impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003;17:2547–2560.
- Wensing AM and Boucher CA: Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* 2003;5:140–155.
- Bennett D: HIV-1 genetic diversity surveillance in the United States. *J Infect Dis* 2005;192:4–9.
- Anastassopoulou CG and Kostrikis LG: Global genetic variation of HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 2006;4:365–373.
- McCutchan FE: Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* 2006;78:S7–S12.
- Gobbers E, Franssen K, Oosterlaken T, Janssens W, Heyndrickx L, Ivens T, *et al.*: Reactivity and amplification efficiency of the NASBA HIV-1 RNA amplification system with regard to different HIV-1 subtypes. *J Virol Methods* 1997;66:293–301.
- Chew CB, Herring BL, Zheng F, Browne C, Saksena NK, Cunningham AL, *et al.*: Comparison of three commercial assays for the quantification of HIV-1 RNA in plasma from individuals infected with different HIV-1 subtypes. *J Clin Virol* 1999;14:87–94.
- Parekh B, Phillips S, Granade TC, Baggs J, Hu DJ, and Renshaw R: Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:133–142.
- Emery S, Bodrug S, Richardson BA, Giachetti C, Bott MA, Panteleeff D, *et al.*: Evaluation of performance of the Gen-Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C, and D isolates from Kenya. *J Clin Microbiol* 2000;38:2688–2695.
- Jenny-Avital ER and Beatrice ST: Erroneously low or undetectable plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ribonucleic acid load, determined by polymerase chain reaction, in West African and American patients with non-B subtype HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2001;32:1227–1230.
- Gottesman BS, Grossman Z, Lorber M, Levi I, Shitrit P, Katzir M, *et al.*: Comparative performance of the Amplicor HIV-1 Monitor Assay versus NucliSens EasyQ in HIV subtype C-infected patients. *J Med Virol* 2006;78:883–887.
- Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, Funkhouser R, *et al.*: Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med* 2007;13:100–106.
- Nickle DC, Rolland M, Jensen MA, Pond SL, Deng W, Seligman M, *et al.*: Coping with viral diversity in HIV vaccine design. *PLoS Comput Biol* 2007;3:e75.

15. Rolland M, Nickle DC, and Mullins JI: HIV-1 group M conserved elements vaccine. *PLoS Pathog* 2007;3:e157.
16. Fischer W, Liao HX, Haynes BF, Letvin NL, and Korber B: Coping with viral diversity in HIV vaccine design: A response to Nickle et al. *PLoS Comput Biol* 2008;4:e15; author reply e25.
17. Grossman Z, Lorber M, Maayan S, Bar-Yacov N, Levy I, Averbuch D, et al.: Drug-resistant HIV infection among drug-naïve patients in Israel. *Clin Infect Dis* 2005;40:294–302.
18. Paraskevis D, Magiorkinis E, Katsoulidou A, Hatzitheodorou E, Antoniadou A, Papadopoulos A, et al.: Prevalence of resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Greece. *Virus Res* 2005;112:115–122.
19. Traboulsi R, Kanafani ZA, Nakib M, and Kanj SS: Epidemiology of HIV infection in Lebanon. Data from 1985–2005. *J Med Liban* 2006;54:61–64.
20. Yilmaz G, Midilli K, Turkoglu S, Bayraktaroglu Z, Kuskucu AM, Ozkan E, et al.: Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. *Int J Infect Dis* 2006;10:286–290.
21. Chemtob D and Grossman Z: Epidemiology of adult and adolescent HIV infection in Israel: A country of immigration. *Int J STD AIDS* 2004;15:691–696.
22. Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, and Ho DD: Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: Identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 1995;69:6122–6130.
23. Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Li YY, Bailes E, Kostrikis LG, et al.: An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* 1998;72:10234–10241.
24. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Ballotta C, Boeri E, et al.: Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005;192:958–966.
25. Babic DZ, Zelnikar M, Seme K, Vandamme AM, Snoeck J, Tomazic J, et al.: Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations and HIV-1 non-B subtypes in newly diagnosed drug-naïve patients in Slovenia, 2000–2004. *Virus Res* 2006;118:156–163.
26. Geretti AM: Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naïve persons. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:22–32.
27. Palma AC, Araujo F, Duque V, Borges F, Paixao MT, and Camacho R: Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect Genet Evol* 2007;7:391–398.
28. Rios M, Delgado E, Perez-Alvarez L, Fernandez J, Galvez P, de Parga EV, et al.: Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol* 2007;79:647–656.
29. Sagir A, Oette M, Kaiser R, Daumer M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, et al.: Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:843–848.
30. Booth CL and Geretti AM: Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1047–1056.
31. The SPREAD programme: Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS* 2008;22:625–635.
32. Salminen MO, Carr JK, Robertson DL, Hegerich P, Gotte D, Koch C, et al.: Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* 1997;71:2647–2655.
33. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al.: Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. *Top HIV Med* 2007;15:119–125.
34. Shafer RW: Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database. *J Infect Dis* 2006;194(Suppl. 1):S51–58.
35. Stanford HIV Resistance Database: Genotypic resistance interpretation algorithm (HIVdb program: Sequence analysis). <http://hivdb.stanford.edu>.
36. Maguire MF, Guinea R, Griffin P, Macmanus S, Elston RC, Wolfram J, et al.: Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants *in vivo* and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness *in vitro*. *J Virol* 2002;76:7398–7406.
37. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B, et al.: A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med* 2007;4:e36.
38. Van Laethem K, Schrooten Y, Lemey P, Van Wijngaerden E, De Wit S, Van Ranst M, et al.: A genotypic resistance assay for the detection of drug resistance in the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene. *J Virol Methods* 2005;123:25–34.
39. Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S: MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596–1599.
40. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, et al.: An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005;21:3797–3800.
41. Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, et al.: Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antiviral Ther* 2007;12:1097–1106.
42. Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, et al.: Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 *env* V3 loop sequences. *J Virol* 2003;77:13376–13388.
43. Parkin NT, Gupta S, Chappey C, and Petropoulos CJ: The K101P and K103R/V179D mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:351–354.
44. Alaeus A, Leitner T, Lidman K, and Albert J: Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS* 1997;11:199–202.
45. Chaix ML, Descamps D, Harzic M, Schneider V, Deveau C, Tamalet C, et al.: Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS* 2003;17:2635–2643.
46. Jorgensen LB, Christensen MB, Gerstoft J, Mathiesen LR, Obel N, Pedersen C, et al.: Prevalence of drug resistance mutations and non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 patients in Denmark. *Scand J Infect Dis* 2003;35:800–807.
47. Maljkovic I, Wilbe K, Solver E, Alaeus A, and Leitner T: Limited transmission of drug-resistant HIV type 1 in 100 Swedish newly detected and drug-naïve patients infected with subtypes A, B, C, D, G, U, and CRF01\_AE. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:989–997.

48. Deroo S, Robert I, Fontaine E, Lambert C, Plessier JM, Arendt V, *et al.*: HIV-1 subtypes in Luxembourg, 1983–2000. *AIDS* 2002;16:2461–2467.
49. Esteves A, Parreira R, Venenno T, Franco M, Piedade J, De Sousa JG, *et al.*: Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: High prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:313–325.
50. Fleury H, Recordon-Pinson P, Caumont A, Faure M, Roques P, Plantier JC, *et al.*: HIV type 1 diversity in France, 1999–2001: Molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:41–47.
51. Snoeck J, Van Laethem K, Hermans P, Van Wijngaerden E, Derdelinckx I, Schrooten Y, *et al.*: Rising prevalence of HIV-1 non-B subtypes in Belgium: 1983–2001. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:279–285.
52. Bouzghoub S, Jauvin V, Recordon-Pinson P, Garrigue I, Amrane A, Belabbes EH, *et al.*: High diversity of HIV type 1 in Algeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:367–372.
53. Brodine SK, Shaffer RA, Starkey MJ, Tasker SA, Gilcrest JL, Louder MK, *et al.*: Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion. *Ann Intern Med* 1999;131:502–506.
54. Babic DZ, Poljak M, Seme K, Tomazic J, and Vidmar L: Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes based on analysis of pol sequences in Slovenia, 1996–2005. *J Med Virol* 2006;78:997–1002.
55. Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, *et al.*: Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 2007;75:75–82.
56. Zarandia M, Tsertsvadze T, Carr JK, Nadai Y, Sanchez JL, and Nelson AK: HIV-1 genetic diversity and genotypic drug susceptibility in the Republic of Georgia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:470–476.
57. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhacker RD, Ferreira JL, *et al.*: Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006;116:201–207.
58. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, *et al.*: Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003;37:113–128.
59. Vandamme AM, Sonnerborg A, Ait-Khaled M, Albert J, Asjo B, Bachelier L, *et al.*: Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antiviral Ther* 2004;9:829–848.
60. Greenberg ML and Cammack N: Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:333–340.
61. Roman F, Gonzalez D, Lambert C, Deroo S, Fischer A, Baurith T, *et al.*: Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naïve patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:134–139.
62. Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, and Stuyver LJ: HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods* 2007;146:61–73.
63. Soulie C, Derache A, Aime C, Marcelin AG, Carcelain G, Simon A, *et al.*: Comparison of two genotypic algorithms to determine HIV-1 tropism. *HIV Med* 2008;9:1–5.

Address reprint requests to:

Leonidios G. Kostrikis

Department of Biological Sciences

University of Cyprus

75 Kallipoleos Avenue, P.O. Box 20537

1678 Nicosia, Cyprus

E-mail: lkostrik@ucy.ac.cy

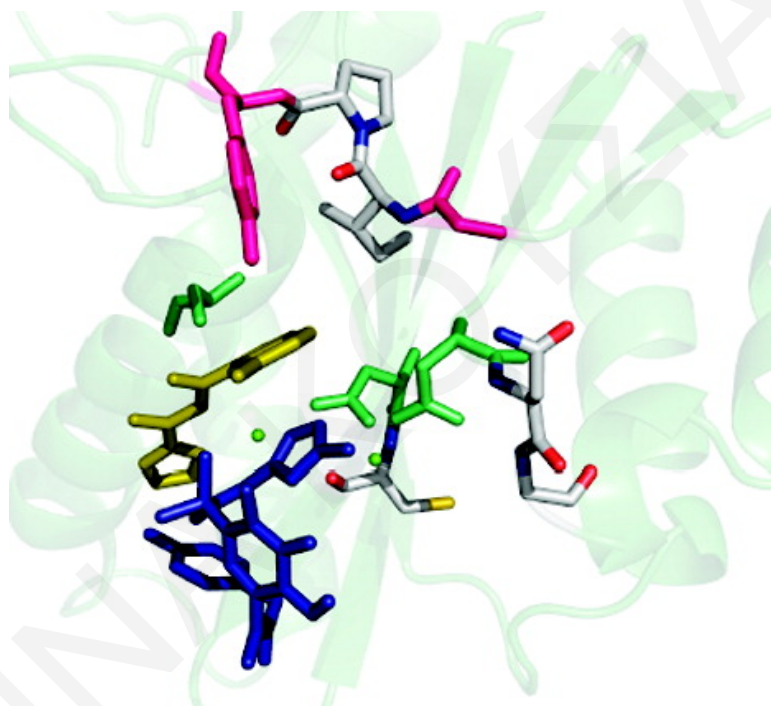
## Rapid Report

### Implications of HIV-1 M Group Polymorphisms on Integrase Inhibitor Efficacy and Resistance: Genetic and Structural *in Silico* Analyses

Eriketi Z. Loizidou, Ioanna Kousiappa, Constantinos D. Zeinalipour-Yazdi,  
David A. M. C. Van de Vijver, and Leondios G. Kostrikis

*Biochemistry*, 2009, 48 (1), 4-6 • DOI: 10.1021/bi8019349 • Publication Date (Web): 17 December 2008

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on January 12, 2009



#### More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article



ACS Publications  
High quality. High impact.

Biochemistry is published by the American Chemical Society, 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

# BIOCHEMISTRY

including biophysical chemistry & molecular biology

Subscriber access provided by UNIV OF CYPRUS

[View the Full Text HTML](#)

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΥΣΙΑΠΠΑ



**ACS Publications**  
High quality. High impact.

Biochemistry is published by the American Chemical Society, 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

# Implications of HIV-1 M Group Polymorphisms on Integrase Inhibitor Efficacy and Resistance: Genetic and Structural *in Silico* Analyses<sup>†</sup>

Eriketi Z. Loizidou,<sup>‡</sup> Ioanna Kousiappa,<sup>‡</sup> Constantinos D. Zeinalipour-Yazdi,<sup>§</sup> David A. M. C. Van de Vijver,<sup>||</sup> and Leondios G. Kostrikis<sup>\*‡</sup>

Department of Biology, University of Cyprus, 75 Kallipoleos Avenue, P.O. Box 20537, 1678 Nicosia, Cyprus, Department of Chemistry, University of Cyprus, 75 Kallipoleos Avenue, P.O. Box 20537, 1678 Nicosia, Cyprus, and Department of Virology, Erasmus MC, University Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands

Received October 16, 2008; Revised Manuscript Received November 24, 2008

**ABSTRACT:** The extensive polymorphisms among HIV-1 subtypes have been implicated in drug resistance development. Integrase inhibitors represent the latest addition to the treatment of HIV-1, and their efficacy and resistance patterns among M group strains are currently under investigation. This study analyzed the intersubtype variation within 108 integrase sequences from seven subtypes. The residues associated with catalytic activity and primary resistance to raltegravir were highly conserved among all strains. Variations were observed in residues associated with secondary resistance. Molecular modeling studies indicated a two-way binding mode of raltegravir that explains the resistance pathways and the implication of nonconservative mutations in integrase–raltegravir interactions.

The genetic variability of HIV-1 constitutes the most striking challenge in treating HIV infection. The highly active antiretroviral therapy (HAART) includes inhibitors that target viral entry, and the viral enzymes reverse transcriptase (RT) and protease (PR). The integration of viral DNA in the human chromosome, catalyzed by integrase (IN), is an essential step for the survival of HIV and a viable target for antiviral agents (1).

IN is a single polypeptidic chain that consists of three structurally distinct domains, the N-terminal domain (NTD), the catalytic core domain (CCD), and the C-terminal domain (CTD). The function of IN has been linked to key motifs, primarily the DDE triad in the catalytic core domain (CCD), and to secondary motifs such as the zinc in the NTD. Point mutations in any of these residues lead to loss of activity. The DDE triad catalyzes the 3'-processing and strand transfer steps mediated by the formation of a chelating complex with Mg<sup>2+</sup> (1, 2). The zinc motif, comprised of residues H12, H16, C40, and C43, is not directly related to the catalytic processes but has an indirect role through the multimerization of IN (3, 4). Host factors have been implicated in the integration process in the context of the preintegration complex (PIC). LEDGF/p75 is the most recently identified cellular partner of HIV-1 IN, for which structural information exists within the same context as IN (5).

To date, the only classes of validated IN inhibitors (INI) are the diketo acids (DKAs) and the pyrroloquinoline and naphthyridine carboxamide derivatives. These inhibitors bind at the interface of the viral DNA–IN and metal complex, preventing the strand transfer reaction (6). Recently, raltegravir, a DKA analogue developed by Merck, has been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as a combination therapy for patients with multidrug resistance to HIV-1 (7). Elvitegravir, a second INI, is currently in phase III clinical trials (8). Current antiretrovirals are primarily designed to target HIV-1 subtype B strains, and little is known about the efficacy and drug resistance of these regimens among HIV-1 intersubtypes. Naturally existing polymorphisms when present with primary resistance mutations may affect the resistance pathway and trigger early resistance development. This effect was demonstrated with HIV-1 subtype C and AE PR (9, 10). Myers et al. (11) have recently characterized the natural polymorphisms of HIV-1 IN. Variation was greatest at the CCD around the active site. Phenotypic testing showed a minimal contribution of baseline intersubtype polymorphisms on INI efficacy (12); however, these polymorphisms in combination with primary resistant mutations could potentially affect INI efficacy and resistance.

This study explored the effect of the polymorphisms present within the IN gene from M group strains on IN activity and INI binding by combining genetic and computational structural analyses. The identified polymorphisms were compared to the residues associated with catalytic activity, the DDE triad (2, 13), the zinc motif (3, 4), LEDGF/p75 binding (5), and raltegravir (14–16) and INI (6, 17, 18) resistance. Computational docking (19, 20) of raltegravir was performed at the active site of a three-dimensional two-metal IN–DNA model that was designed to mimic the strand transfer step by including two Mg<sup>2+</sup> ions at the active site and 5CITEP to mark the position of the viral DNA end and by interacting with the DNA residues Q148, Y143, and K159 (21). The two-metal mechanism of action is believed to be true for IN, even though only one Mg<sup>2+</sup> ion per CCD is observed in the crystal structures (22). The study group included 108 INI-naïve Cypriot patients infected with HIV-1. The patient sequences fell into seven subtypes: subtype A, 19 sequences; subtype B, 72 sequences; subtype C, 11 sequences; subtype F1, one sequence; subtype G, three sequences; CRF02\_AG, one sequence; and CRF04\_cpx, one sequence (Figure S1 of the Supporting Information). The sequences of the IN gene from subtypes A and C were

<sup>†</sup> Funded by Marie Curie Grant FP7-PEOPLE-2007-4-3-IRG-204263, the Patti Birch 1991 Trust, and the University of Cyprus.

\* To whom correspondence should be addressed. Phone: +357-22892885. Fax: +35722892893. E-mail: lkostrik@ucy.ac.cy.

<sup>‡</sup> Department of Biology, University of Cyprus.

<sup>§</sup> Department of Chemistry, University of Cyprus.

<sup>||</sup> University Medical Centre.



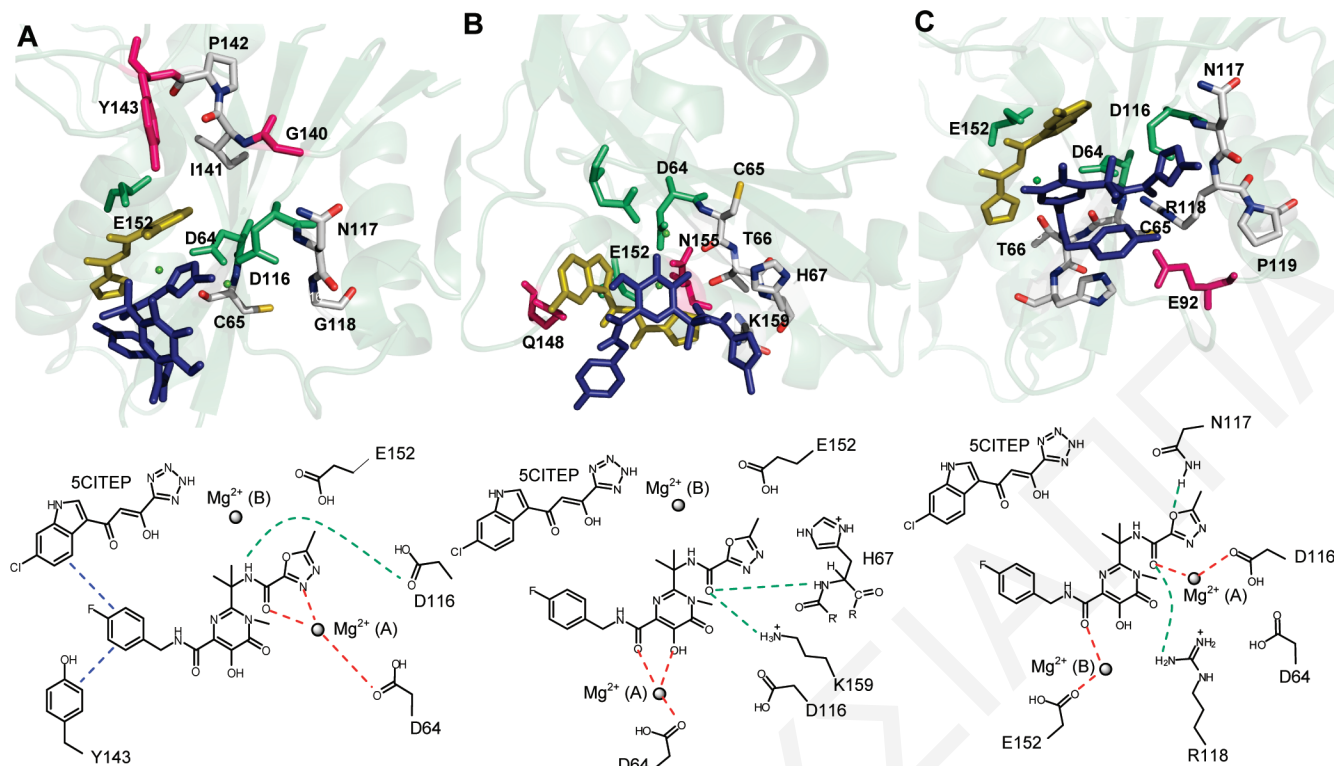


FIGURE 1: Docked conformations of raltegravir in the active site of IN. DDE triad (green stick representation), amino acids associated with raltegravir resistance (magenta), the remaining amino acids within 15 Å of the root of raltegravir (gray), 5CITEP (orange), and raltegravir (blue stick representation).  $Mg^{2+}$  ions are presented as green spheres. Red lines represent dipole–metal interaction, green lines hydrogen bonding, and blue lines  $\pi$ -stacking. Cutoff values for metal coordination set to 2 Å, those for hydrogen bonding to 3 Å, and those for  $\pi$ -stacking to 4 Å. (A) For subtype B IN,  $\Delta G_{\text{bind}} = -6.07$  kcal/mol. (B) For subtype B IN,  $\Delta G_{\text{bind}} = -5.36$  kcal/mol. (C) For subtype C IN,  $\Delta G_{\text{bind}} = -6.13$  kcal/mol. The IN–raltegravir models were optimized using the energy minimization module of the SPDBV (Supporting Information).

compared to the sequence of consensus B. In subtype A, 47 mutations were identified in 42 positions, and in subtype C, 32 mutations were identified in 29 positions.

Variants occurring at a frequency of more than 10% can be found in Table S1 of the Supporting Information. Both the DDE and zinc motif are phylogenetically conserved, in agreement with other studies (11) and as expected from the fact that these residues are conserved in all retroviral INs. In terms of host factor interactions, the IN residues that interact with LEDGF/p75 have been mapped to  $\alpha$ 4/5 connector residues R166, D167, Q168, A169, E170, and H171. Of these, the H171Y substitution was identified as a natural polymorphism of subtype A IN. This substitution represents a nonconservative change from a basic to a polar amino acid, the effect of which should be determined experimentally on isolates of subtype A IN.

Resistance to raltegravir is obtained through three distinct pathways, Q148H/K/R, N155H (15), and less frequently Y143H (14). Secondary mutations associated with the resistance pathways are L74M, E138A, E138K, G140S, E92Q, T97A, G163K/R, V151I, D232N, and E157Q (16). Resistance mutations identified for other INI in clinical and preclinical development, including elvitegravir, are T66I/A/K, V72I, F121Y, T125K, G140C, S147G, Q148H, V151I, S153Y, M154I, and S230R (6, 17, 18). None of the mutations associated with primary resistance (N155H, Q148H/K/R, Y143, T66, and E92) were observed. Variation was greater at residues involved in secondary resistance. Substitutions V72I, L74I, T125A, and M154I were identified as natural polymorphisms of subtype A [16% (V72I), 45% (L74I), 100% (T125A), and 0.5% (M154I)] and subtype C [64%

(V72I) and 91% (T125A)]. Substitutions V72I and T125A were also present in subtypes F1, G, CRF02, and the additional CRF04 for T125A. Variation was also present at G140 in one subtype C and E157 in two subtype B subjects.

In addition to the drug resistant residues, the computational docking analysis of this study identified residues around the active site of IN that may be involved in important interactions with raltegravir. Considering their location proximal to the active site, and their possible involvement in interactions with raltegravir, these residues could be potentially involved in drug resistance. Two distinct conformations of raltegravir were identified at the active site of IN that differ in the nature of these interacting residues. The affinity of raltegravir for the active site residues is described by the estimated free energy of binding ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ). In the first conformation ( $\Delta G_{\text{bind}} = -6.07$  kcal/mol), raltegravir is positioned in the proximity of the DDE triad, Y143 associated with primary and secondary drug resistance, G140 associated with secondary drug resistance, and additional residues P142, I141, G118, N117, and C65 (Figure 1A). In the second conformation ( $\Delta G_{\text{bind}} = -5.36$  kcal/mol), raltegravir is placed in the interacting proximity of the DDE triad, N155, Q148 associated with primary drug resistance, and additional residues K159, H67, T66, and C65 (Figure 1A).

The fact that two different groups of interacting residues are identified from the docking experiments implies a differential binding mode of raltegravir, one leading to the Y143 and another to the N155 and Q148 resistance pathway. This hypothesis is further justified by the experimental drug resistance data (14). In vivo, the primary resistance mutation Y143H is not observed as often as the Q148H/K/R and N155H mutations.



This trend was also observed in the docking experiments. In 75% of the docked poses, raltegravir interacts with Q148 and N155 (Figure 1B), while in 25% of the docked poses, raltegravir interacts with Y143 (Figure 1A). Closer examination of the interactions between raltegravir and the active site residues further supports the differential binding mode hypothesis. Figure 1 displays the detailed interactions of the two conformations. In both conformations, certain functionalities of raltegravir are at an ideal distance for formation of dipole–charge complexes with  $Mg^{2+}$ (A) but not with  $Mg^{2+}$  (B). However, in each conformation, it is a different functionality of raltegravir that interacts with the metal cation, colored red in Figure 1. In addition, in the first conformation, the benzene ring of raltegravir is located in an ideal position for  $\pi$ -stacking interactions with the indole ring of 5CITEP, suggesting an *in vivo* interaction of raltegravir and the terminal portion of the 3'-processed viral DNA. These observations are in agreement with the suggested mechanism of inhibition of the DKA inhibitors that act on the interface between the IN–DNA and  $Mg^{2+}$  complex (23). This  $\pi$ -stacking interaction is not observed in the second conformation. Residue Y143, implicated in raltegravir resistance, is in an ideal location for  $\pi$ -stacking interactions with the benzene ring of raltegravir (24). In the second conformation, H67 and K159 are involved in direct hydrogen bonding with raltegravir while Q148 and N155, which coincide with raltegravir resistance, are probably involved in dipole–dipole interactions with either the inhibitor or DNA.

Considering their potential involvement in the interactions with raltegravir, the interacting residues were examined against the 108 IN sequences to determine their variability. Among these residues, the G118R and G140R substitutions were identified in a single subtype C strain. The possible effect of these substitutions on the binding of raltegravir was examined by generating *in silico* a mutated two-metal IN–DNA model that includes polymorphic residues I60V, F100Y, L101I, T112V, G118R, S119P, K136Q, G140R, E198D, and V201I of the particular subtype C strain and repeat docking of raltegravir. In this case, the docked conformations displayed similar interacting residues, with the most prevalent being N155, P119, R118, N117, E92, H67, T66, and C65. The DDE triad was present in all conformations. In the lowest-energy docked conformation ( $\Delta G_{\text{bind}} = -6.13$  kcal/mol), raltegravir is placed in the interacting proximity of the DDE triad, E92 associated with secondary drug resistance, and additional residues P119, R118, N117, H67, T66, and C65 (Figure 1C). The energetics of binding were not affected by these point mutations; in contrast, a single trend is observed in all docked poses. Raltegravir is placed at an ideal distance to interact with both  $Mg^{2+}$  cations, hydrogen bonding with the side chain of N117 and R118, and dipole–dipole interactions with T66 and E92. Both  $Mg^{2+}$  ions are involved in interactions with raltegravir in contrast to what is observed at the active site of the “wild-type” two-metal IN–DNA model (Figure 1A,B). These observations imply that strains with particularities in key amino acids may have an effect on the binding mechanism of raltegravir. More experiments, including functional assays, with intersubtype HIV-1 patients are currently under way to further elucidate the intersubtype efficacy of raltegravir.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Methods, Table S1, and Figure S1. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

- Loizidou, E. Z., Nicolaou, C., Nicolaidis, A., and Kostrikis, L. G. (2007) *Curr. HIV Res.* 5, 365–388.
- Engelman, A., and Craigie, R. (1992) *J. Virol.* 66, 6361–6369.
- Lee, S. P., Xiao, J., Knutson, J. R., Lewis, M. S., and Han, M. K. (1997) *Biochemistry* 36, 173–180.
- Zheng, R., Jenkins, T. M., and Craigie, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13659–13664.
- Cherepanov, P., Ambrosio, A. L. B., Rahman, S., Ellenberger, T., and Engelman, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17308–17313.
- Hazuda, D. J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J. A., Espeseth, A., Gabrylski, L., Schleif, W., Blau, C., and Miller, M. D. (2000) *Science* 287, 646–650.
- Evering, T. H., and Markowitz, M. (2008) *Expert Opin. Invest. Drugs* 17, 413–422.
- Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., Watanabe, Y., Ohata, Y., Doi, S., Sato, M., Kano, M., Ikeda, S., and Matsuoka, M. (2008) *J. Virol.* 82, 764–774.
- Clemente, J. C., Coman, R. M., Thiaville, M. M., Janka, L. K., Jeung, J. A., Nukoolkarn, S., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R., Leelamanit, W., Goodnow, M. M., and Dunn, B. M. (2006) *Biochemistry* 45, 5468–5477.
- Coman, R. M., Robbins, A. H., Fernandez, M. A., Gilliland, C. T., Sochet, A. A., Goodenow, M. M., McKenna, R., and Dunn, B. M. (2008) *Biochemistry* 47, 731–743.
- Richard, E., and Myers, D. P. (2008) *J. Virol.* 82, 9228–9235.
- Van Baelen, K., Van Eygen, V., Rondelez, E., and Stuyver, L. J. (2008) *AIDS* 22, 1877–1879.
- Kulkosky, J., Katz, R. S., Mack, J. P., and Skalka, A. M. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 2331–2338.
- Hazuda, D. J., Miller, M. D., Nguyen, B. Y., and Zhao, J. (2007) *Antiviral Ther.* 12, S10.
- Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Gunthard, H. F., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J. M., and Richman, D. D. (2007) *Top. HIV Med.* 15, 119–125.
- Malet, I., Delelis, O., Valantin, M. A., Montes, B., Soulie, C., Wiriden, M., Tchertanova, L., Peytavin, G., Reynes, J., Mouscadet, J. F., Katlama, C., Calvez, V., and Marcelin, A. G. (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2069–2078.
- Hazuda, D. J., Anthony, N. J., Gomez, R. P., Jolly, S. M., Wai, J. S., Zhuang, L., Fisher, T. E., Embrey, M., Guare, J. J. P., Egbertson, M. S., Vacca, J. P., Huff, J. R., Felock, P. J., Witmer, M. V., Stillmock, K. A., Danovich, R., Grobler, J., Miller, M. D., Espeseth, A. S., Jin, L., Chen, I.-W., Lin, J. H., Kassahun, K., Ellis, J. D., Wong, B. K., Xu, W., Pearson, P. G., Schleif, W. A., Cortese, R., Ermini, E., Summa, V., Holloway, M. K., and Young, S. D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11233–11238.
- Fikkert, V., Van Maele, B., Vercaemen, J., Hantson, A., Van Remoortel, B., Michiels, M., Gurnari, C., Pannecouque, C., De Maeyer, M., Engelborghs, Y., De Clercq, E., Debyser, Z., and Witvrouw, M. (2003) *J. Virol.* 77, 11459–11470.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998) *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., and Goodsell, D. S. (2007) *J. Comput. Chem.* 28, 1145–1152.
- Savarino, A. (2007) *Retrovirology* 4, 21–35.
- Goldgur, Y., Craigie, R., Cohen, G. H., Fujiwara, T., Yoshinaga, T., Fujishita, T., Sugimoto, H., Endo, T., Murai, H., and Davies, D. R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13040–13043.
- Deng, J., Kelley, J. A., Barchi, J. J., Sanchez, T., Dayam, R., Pommier, Y., and Neamati, N. (2006) *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3785–3792.
- Zeinalipour-Yazdi, C. D., and Pullman, D. P. (2006) *J. Phys. Chem. B* 110, 24260–24265.

BI8019349