



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

Τμήμα Βιολογίας & Ιατρική Σχολή

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
«Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική»

Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΤΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΗΙΝ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Νικόλαος Ψαρράς (Α.Μ. 41702)
Βιολόγος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Καθ. Ουρανία Τσιτσιλώνη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Καθ. Ουρανία Τσιτσιλώνη (Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.)
Επικ. Καθ. Μαρία Καντζανού (Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α.)
Διευθ. Ερευνών Διονύσιος Σγούρας (Ε.Ι.Παστέρ)

ΑΘΗΝΑ 2019

I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πρώτον, θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας μου, Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να επισκεφτώ ένα εργαστήριο μιας χώρας του εξωτερικού και να αποκτήσω περισσότερη εμπειρία εργαζόμενος σε ένα τελείως νέο περιβάλλον με νέους ανθρώπους. Η επιθυμία μου όμως αυτή δε θα πραγματοποιούνταν αν δεν υπήρχε ο apl. Prof. Dr. Carsten Scheller που με καλωσόρισε στο εργαστήριο του στο Institut für Virologie und Immunbiologie του Julius-Maximilians-Universität Würzburg στη Γερμανία και του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για αυτό αλλά και για τις συμβουλές και γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε. Θέλω να ευχαριστήσω και τους φοιτητές του εργαστηρίου, και ιδιαίτερα τον φίλο και προπτυχιακό φοιτητή Βιοχημείας Leon Albert, που έκαναν την καθημερινότητά μου στο εργαστήριο ακόμα και στις δύσκολες περιστάσεις ευχάριστη. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στην διπλωματική εργασία μου και για τις επισημάνσεις τους σχετικά με το κείμενο της εργασίας. Αυτή η μεταπτυχιακή εργασία όμως, όπως και κάθε βήμα των σπουδών μου, δε θα ήταν εφικτή αν δεν είχα τη στήριξη των γονιών μου.

II. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
II. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
III. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας – AIDS	13
1.1.1 Αιτιολογικός παράγοντας, στάδια, κλινικά χαρακτηριστικά	13
1.1.2 Ανακάλυψη του HIV.....	15
1.1.3 Επιδημιολογία.....	16
1.1.4 Μετάδοση	16
1.1.5 Διάγνωση της μόλυνσης από τον HIV	17
1.1.6 Θεραπευτική αγωγή	18
1.2 Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας – HIV.....	20
1.2.1 Ταξινόμηση του ιού και υπότυποι.....	20
1.2.2 Η προέλευση του HIV.....	20
1.2.3 Το στέλεχος αναφοράς Hxb2.....	24
1.2.4 Το γενετικό υλικό του HIV	25
1.2.5 Οι πρωτεΐνες του HIV.....	26
1.2.6 Η δομή του HIV	27
1.2.7 Η ικανότητα μεταλλαγής και η εξελικτική προσαρμοστικότητα του HIV	28
1.2.8 Είσοδος του HIV στα ανθρώπινα κύτταρα	29
1.2.9 Ενσωμάτωση του ιικού cDNA στο γονιδίωμα του ανθρώπινου κυττάρου.....	32
1.2.10 Έξοδος του ιού από τα κύτταρα.....	33
1.2.11 Ρεζερβουάρ (reservoirs) του HIV	33
1.3 Ανοσοποιητικό σύστημα και HIV	34
1.3.1 Αλληλεπίδραση ανοσοποιητικού συστήματος και HIV	34
1.3.2 Υποδοχείς κυττάρων και στόχοι του HIV.....	36
1.3.3 Συνέπειες της μόλυνσης από τον HIV στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος	37
1.3.4 Αμυντικοί μηχανισμοί των ανθρώπινων κυττάρων έναντι του HIV.....	38
1.3.5 Τα αντισώματα έναντι του HIV	38
1.3.6 Η ωρίμανση συγγένειας ως τρόπος δημιουργίας των bNAbs.....	41
1.4 Το γονίδιο <i>Env</i> και τα πεπτίδια gp120 και gp41.....	42
1.4.1 Η δομή του γονιδίου <i>Env</i> και η πρωτοταγής δομή των gp120 και gp41 του HIV.....	42

1.4.2 Η τρισδιάστατη δομή των τμημάτων gp120 και gp41	44
1.4.3 Οι περιοχές V1 και V2 της gp120.....	46
1.5 Γλυκοζυλίωση.....	48
1.5.1 Η γλυκοζυλίωση της gp120	48
1.5.2 Η γλυκοζυλίωση των περιοχών V1 και V2 της gp120	49
1.6 Σκοπός της εργασίας.....	50
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	52
2.1 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου ρετροϊών με χρήση του γονιδίου <i>Env</i>	52
2.2 Σύγκριση της πρωτεΐνης του γονιδίου <i>Env</i> διάφορων ρετροϊών με βάση το επίπεδο της N-συνδεόμενης γλυκοζυλίωσης.....	53
2.3 Κλινική Δοκιμή.....	53
2.4 Υπολογισμός ιικού φορτίου	54
2.5 Παρασκευή θρεπτικού υλικού κυττάρων.....	54
2.6 Παρασκευή αντισώματος anti-p24 έναντι του HIV	54
2.7 Καλλιέργεια HIV στην κυτταρική σειρά H9	55
2.8 Δοκιμασία Εξουδετέρωσης του HIV από αντισώματα ασθενών.....	56
2.9 Υπολογισμός EC ₅₀ από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εξουδετέρωσης.....	58
2.10 Απομόνωση PBMC από πλήρες αίμα δοτών	60
2.11 Ψύξη κυττάρων.....	62
2.12 Απόψυξη κυττάρων.....	62
2.13 Απομόνωση DNA από PBMC	63
2.14 Απομόνωση RNA από πλάσμα αίματος	64
2.15 Κατασκευή πρωτοκόλλου PCR για την απομόνωση του γονιδίου <i>Env</i> ή τμήματός του από δείγματα ασθενών	66
2.16 Κατασκευή πρωτοκόλλου RT-PCR για την απομόνωση του γονιδίου <i>Env</i> ή τμήματός του από δείγματα ασθενών	69
2.17 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αгарόζης.....	71
2.18 Καθαρισμός των προϊόντων PCR ή RT-PCR.....	72
2.19 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα (gel) ηλεκτροφόρησης.....	73
2.20 Προετοιμασία μιγμάτων για αλληλούχιση από την Microsynth-SeqLab και στοίχιση των αλληλουχιών.	74
2.21 Μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε αμινοξικές αλληλουχίες και εντοπισμός της περιοχής V1V2.....	77
2.22 Σύγκριση της περιοχής V1V2 της πρωτεΐνης του γονιδίου <i>Env</i> διάφορων ιών από ασθενείς με βάση το επίπεδο της N-συνδεόμενης γλυκοζυλίωσης	77

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	78
3.1 Φυλογενετικά δέντρα ρετροϊών	78
3.2 Σύγκριση των ρετροϊών με βάση το επίπεδο γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης Env	84
3.3 Αποτελέσματα δοκιμασιών εξουδετέρωσης HIV-1 (Hxb2) με αντισώματα ασθενών	86
3.4 Κατασκευή πρωτοκόλλου PCR	88
3.4.1 Αντιδράσεις PCR με την πολυμεράση Taq.....	88
3.4.2 Αντιδράσεις σύγκρισης των πολυμερασών Taq και Phusion®	89
3.4.3 Αντιδράσεις PCR με την πολυμεράση Phusion®	90
3.4.3.1 Αρχικές αντιδράσεις PCR.....	90
3.4.3.2 Επιλογή Βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού 1ου γύρου	93
3.4.3.3 Επιλογή Βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού 2ου γύρου	96
3.4.3.4 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεων αντιδρώντων 1ου γύρου	99
3.4.3.5 Αλλαγή του πρωτοκόλλου της nested PCR	106
3.4.3.6 Αλλαγή τμήματος προς πολλαπλασιασμό	110
3.4.3.7 Touchdown PCR.....	111
3.4.3.8 Απόπειρες για έλεγχο της επαναληψιμότητας και των διακυμάνσεων της PCR	114
3.5 Κατασκευή πρωτοκόλλου RT-PCR.....	116
3.6 Αλληλουχίες από PCR και RT-PCR.....	122
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	124
IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130
V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	144
VI. ABSTRACT.....	145
VII. ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ.....	146

III. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ελληνικές Συντμήσεις	Πλήρες όνομα στα Ελληνικά
ΕΔ	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
ΣΜΝ	Σεξουαλικά Μεταδιδόμενο(-α) Νόσημα(τα)

Αγγλικές Συντμήσεις	Πλήρες όνομα στα Αγγλικά
ADCC	Antigen Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
AP2	Adaptor Protein 2
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G
ART	Antiretroviral Therapy
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
BFV	Bovine Foamy Virus
BLV	Bovine Leukemia Virus
bNab	broadly Neutralizing Antibody
CCR5	C-C chemokine Receptor type 5
CD#	Cluster of Differentiation #
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CDR	Complementarity Determining Region
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
CpG	sites of CG sequences
CXCL12	C-X-C motif chemokine Ligand 12
CXCR4	C-X-C chemokine Receptor type 4
DSB	Double Strand Break
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
EBL	Enzootic Bovine Leukosis

EBV	Epstein–Barr Virus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>Env</i>	γονίδιο που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη Env
Fc	Fragment crystallizable region
Fab	Fragment antigen-binding
FasL	Fas cell surface death Ligand
<i>Gag</i>	γονίδιο που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη Gag
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
HAART	Higly Active ART
HERV-K	Human Endogenous Retrovirus - K
HIV	Human Immunodeficiency Virus(es)
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus type 2
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus(es)
HTLV-I	Human T-Lymphotropic Virus type I
HTLV-II	Human T-Lymphotropic Virus type II
IL-2	Interleukin-2
IL-2R	Interleukin-2 Receptor
JTT	Jones-Taylor-Thornton
KSHV	Kaposi Sarcoma Herpes Virus
Ku80	X-ray repair cross complementing 5
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LTNP	Long Term Non-Progressors
LTR	Long Terminal Repeat
MBL	Mannose-Binding Lectin
MHC-I	Major Histocompatibility Complex I
ML	Maximum-Likelihood
MLV	Murine Leukemia Virus
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
NAb	Neutralizing Antibody
Nef	Negative regulatory Factor

NES	Nuclear Exit Signal
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor κ B
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NJ	Neighbor-Joining
ORF	Open Reading Frame
NK	Natural Killer
p6	Budding protein
p7	Nucleocapsid protein
p17	Matrix protein
p24	Capsid protein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Death protein 1
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PNGS	Potential (Putative) N-linked Glycosylation Site(s)
<i>Pol</i>	γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Pol
P-TEFb	Positive-Transcription Elongation Factor b
Rev	Regulator of expression of virion protein
RNA	Ribonucleic Acid
RNP	Ribonucleoprotein
RRE	Rev Response Element
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SFVcpz	Simian Foamy Virus chimpanzee
SHIV	Simian-Human Immunodeficiency Virus(es)
SIV	Simian Immunodeficiency Virus(es)
SIVcpz	Simian Immunodeficiency Virus chimpanzee
SIVgor	Simian Immunodeficiency Virus gorilla
SIVsmm	Simian Immunodeficiency Virus sooty mangabey monkey

STD (or STI)	Sexually Transmitted Disease (or Infection)
Tat	Trans-activator of transcription
<i>Tat</i>	γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Tat
TD-PCR	Touchdown - PCR
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing Ligand
TRIM5 α	Tripartite motif-containing protein 5 – isoform α
Vif	Virus Infectivity Factor
Vpu	Viral protein unique
<i>Vpu</i>	γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Vpu

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας – AIDS

1.1.1 Αιτιολογικός παράγοντας, στάδια, κλινικά χαρακτηριστικά

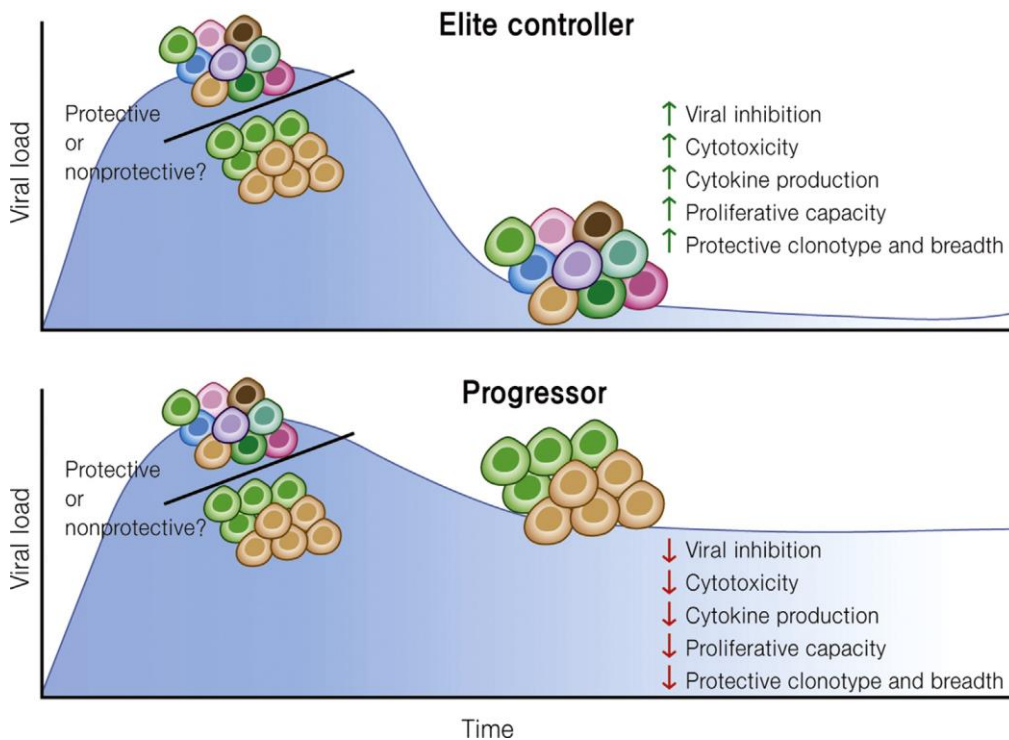
Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS) ονομάζεται το τελικό στάδιο της ασθένειας που προκαλείται από λοίμωξη από τον ιό HIV (Human Immunodeficiency Virus) και χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα CD4+ T λεμφοκυττάρων. Αυτό καθιστά τους ασθενείς ευάλωτους σε ευκαιριακές λοιμώξεις, όπως η πνευμονία. Ο HIV θεωρείται ένα από τα πιο θανατηφόρα παθογόνα. Ο κύριος στόχος του HIV είναι τα CD4+ (βοηθητικά) T λεμφοκύτταρα. Ο υποδοχέας CD4 και οι συνυποδοχείς χημειοκινών που απαιτούνται για την είσοδο του ιού στο κύτταρο βρίσκονται στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων. Άτομα με μεταλλάξεις στα γονίδια αυτών των συνυποδοχέων είναι ανθεκτικοί στη λοίμωξη από HIV [1].

Η πορεία της λοίμωξης χωρίζεται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η οξεία λοίμωξη. Σε αυτό το στάδιο, ο ιός εισβάλλει στο εσωτερικό του σώματος και πολλαπλασιάζεται ταχύτατα με αποτέλεσμα ο ιός να εντοπίζεται σε αφθονία στο περιφερικό αίμα. Σε αυτό το στάδιο, το ιικό φορτίο φτάνει σε επίπεδα αρκετών εκατομμυρίων ανά χιλιοστό λίτρου αίματος. Ακολουθεί μείωση των κυκλοφορούντων CD4+ T λεμφοκυττάρων. Η οξεία φάση συσχετίζεται με την ενεργοποίηση CD8+ T λεμφοκυττάρων που θανατώνουν μολυσμένα από τον HIV κύτταρα και με την παραγωγή αντισωμάτων ή ορομετατροπή (seroconversion) [2].

Πολλοί ασθενείς (40-60%) αναπτύσσουν συμπτώματα σαν αυτά της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης (influenza virus) 2-4 εβδομάδες μετά την μόλυνση από τον HIV, ενώ άλλοι δεν εμφανίζουν κάποια σημαντικά συμπτώματα. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, διογκωμένους και ευαίσθητους λεμφαδένες, φλεγμονή στο φάρυγγα, εξανθήματα, πονοκέφαλο ή εξελκώσεις στο στόμα και στα γεννητικά όργανα. Η διάρκειά τους ποικίλλει, αλλά συνήθως είναι 1-2 εβδομάδες. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των μολυσμένων με HIV ατόμων είναι η λεμφοπενία [2].

Το δεύτερο στάδιο ονομάζεται ασυμπτωματική ή χρόνια φάση ή κλινικά λανθάνουσα περίοδος. Ονομάζεται έτσι επειδή υποχωρούν τα παραπάνω συμπτώματα. Όμως ο ιός συνεχίζει και πολλαπλασιάζεται. Χωρίς θεραπευτική αγωγή, αυτό το στάδιο διαρκεί 3-20 χρόνια με μέσο όρο τα 8 χρόνια. Ένα μικρό ποσοστό (0,3%) διατηρεί υψηλούς αριθμούς CD4+ T λεμφοκυττάρων χωρίς αντιρετροϊκή αγωγή (ART). Οι άνθρωποι που ελέγχουν την αντιγραφή του ιού χωρίς φάρμακα και επιτυγχάνουν ασυμπτωματική λοίμωξη αποκαλούνται

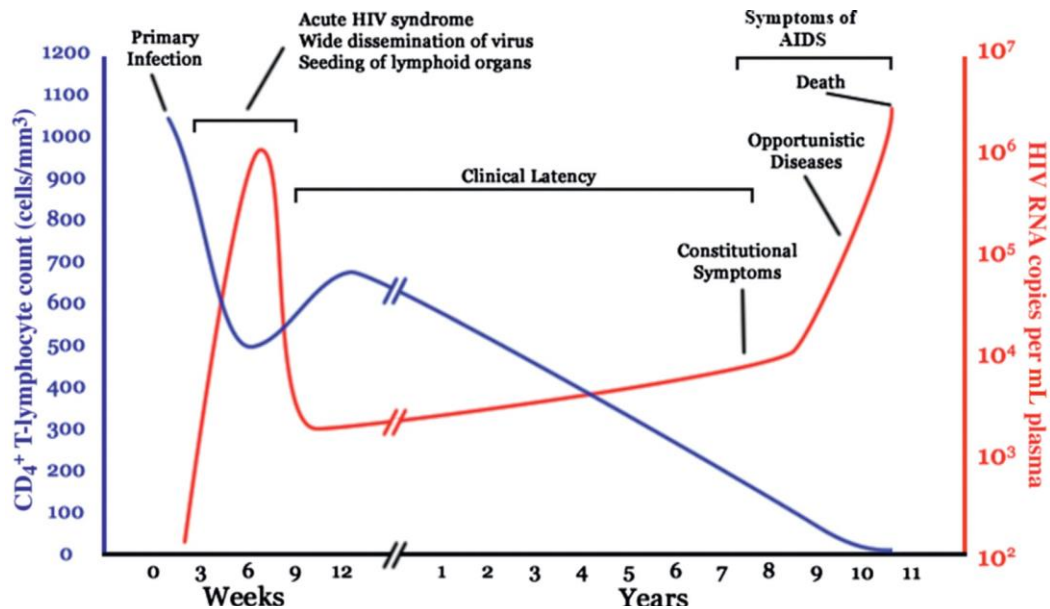
μακροχρόνια μη εξελισσόμενοι (Long Term Non Progressors - LTNP) [2]. Υπάρχει και μια επιπλέον ομάδα ανθρώπων που ονομάζονται εκλεκτοί ελεγκτές (elite controllers) που δεν ακολουθούν αγωγή και έχουν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο στην πλειονότητα των εξετάσεών τους [3]. Δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός ελέγχου αυτών των ασθενών, αλλά θεωρείται ότι βασίζεται στον αντι-ιικό ανοσολογικό έλεγχο (Εικόνα 1.1.1.1). Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν ανιχνεύσιμο φορτίο HIV και χωρίς θεραπεία κάποια στιγμή θα περάσουν στο επόμενο και τελικό στάδιο, το στάδιο του AIDS [2]. Οι διαφορές στα ιικά χαρακτηριστικά, στις αποκρίσεις του ξενιστή και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες συνεισφέρουν στην φυσική πρόοδο της ασθένειας. Είναι αναμενόμενο πως σε όλους τους οροθετικούς αν δεν ακολουθήσουν θεραπευτική αγωγή, τελικά η κατάστασή τους θα επιδεινωθεί [3].



Εικόνα 1.1.1.1: Σύγκριση ιικού φορτίου και απόκρισης μεταξύ εξελισσόμενων ασθενών και εκλεκτών ελεγκτών [2].

Το τελικό στάδιο του AIDS προσδιορίζεται από αριθμό CD4+ κυττάρων χαμηλότερο του 200 κύτταρα ανά χιλιοστό του λίτρου (<200 κυτ./mL), όπως φαίνεται στο γράφημα της Εικόνας 1.1.1.2, ή από την εμφάνιση κάποιας ασθένειας που σχετίζεται με τη λοίμωξη από HIV, όπως η πνευμονία (40%), το Σύνδρομο Απίσχνανσης Σχετιζόμενο με HIV (καχεξία σχετιζόμενη με HIV), οισοφαγική καντιντίαση και επανερχόμενες λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού. Οι ασθενείς με AIDS έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ιικά

επαγόμενων καρκίνων, όπως το σάρκωμα Kaposi που σχετίζεται με τον KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) και το λέμφωμα Burkitt που σχετίζεται με τον EBV (Epstein Barr virus) [2].



Εικόνα 1.1.1.2: Το πλήθος CD4+ T κυττάρων και το ιικό φορτίο κατά τη διάρκεια των τριών σταδίων της λοίμωξης από HIV [2].

1.1.2 Ανακάλυψη του HIV

Το 1981, υπήρξε αναφορά στην Καλιφόρνια για ασθενείς που έπασχαν από ένα σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας, χωρίς καμία γνωστή αιτία νόσου και που σχετιζόταν με άρρενες ομοφυλόφιλους. Οι ασθενείς έπασχαν από ευκαιριακές λοιμώξεις. Επίσης, χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, αιμορροφιλικοί και άλλα άτομα που είχαν δεχτεί μετάγγιση αίματος αναγνωρίστηκαν ως ομάδες υψηλού κινδύνου. Εξαιτίας της ασυνήθιστης επιδημιολογίας και της θνησιμότητας της ασθένειας, μόνο δύο χρόνια αργότερα οι ιολόγοι Luc Montagnier και Françoise Barre-Sinoussi εντόπισαν δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) σε καλλιεργημένα CD4+ T λεμφοκύτταρα, απομονωμένα από ασθενή με λεμφαδενοπάθεια. Η ύπαρξη της RT ήταν ισχυρό στοιχείο για τη μόλυνση από ρετροϊό (retrovirus) [2].

1.1.3 Επιδημιολογία

Η πανδημία του AIDS συνεχίζει να μας ανησυχεί εδώ και πολλά χρόνια από τις πρώτες αναφορές στην αρχή της δεκαετίας του 1980. Η επιδημιολογία του AIDS είχε συσχετισθεί με συγκεκριμένες ομάδες ανθρώπων, χαρακτηριζόμενες ως ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως οι άρρενες ομοφυλόφιλοι και οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Τώρα πια αυτή η κατηγοριοποίηση δεν είναι ικανοποιητική, επειδή ο ιός μεταδίδεται συχνά και μέσω ετεροφυλόφιλων [2].

Μία αναφορά το 2018 από τον UNAIDS εκτιμούσε πως 74,9 εκατομμύρια έχουν μολυνθεί από τον ιό από την αρχή της επιδημίας και το 62% των 37,9 εκατομμυρίων φορέων που ζουν ακόμα έχουν πρόσβαση σε θεραπευτική αγωγή. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν αισιόδοξη πρόοδο έως το 2020 προς τον στόχο του 90-90-90 (το 90% των μολυσμένων να είναι διαγνωσμένοι, το 90% αυτών να λαμβάνουν θεραπευτική αγωγή και το 90% αυτών να επιτύχουν ιική καταστολή), αφού το 2010 οι μισοί από αυτούς είχαν πρόσβαση σε θεραπευτική αγωγή [4].

Υπολογίζεται ότι οι θάνατοι σχετιζόμενοι με το AIDS πλησιάζουν τα 25 εκατομμύρια. Οι λοιμώξεις από τον HIV είναι πιο συχνές στην υποσαχάρια Αφρική με πάνω από το 10% του πληθυσμού να είναι μολυσμένο. Αντίστοιχα και η πλειονότητα των νέων περιστατικών βρίσκεται στην υποσαχάρια Αφρική. Το μειωμένο προσδόκιμο ζωής σε αυτή τη μεγάλη περιοχή είναι απόδειξη του κοινωνικού αντίκτυπου της επιδημίας AIDS. Η επιδημία AIDS στην υποσαχάρια Αφρική αποτελεί μείζονα ανησυχία της παγκόσμιας κοινότητας, όπως του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (ΟΗΕ) [2].

1.1.4 Μετάδοση

Ο HIV μεταδίδεται μέσω του αίματος, της σεξουαλικής επαφής και από τη μητέρα στο παιδί. Μη επαρκείς ιατρικές πρακτικές όπως η επαναχρησιμοποίηση συρίγγων έχουν βοηθήσει στη μετάδοση σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές. Πρέπει όλοι οι δότες αίματος να εξετάζονται. Η συχνότητα μετάδοσης μέσω αρρένων ομοφυλόφιλων είναι υψηλότερη από των ετεροφυλόφιλων [2].

Η αποτελεσματικότητα της μετάδοσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιικών σωματιδίων στα σωματικά υγρά στα οποία ένας άνθρωπος εκτίθεται. Τα περισσότερα μολυσμένα κύτταρα είναι τα περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα (PBMC) και το ιικό φορτίο

είναι υψηλότερο στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Το σπέρμα και οι γεννητικές εκκρίσεις αποτελούν σημαντικές πηγές του ιού. Ο ιός εξουδετερώνεται μέσα σε ένα 24ωρο όταν εκτεθεί σε ξηρό αέρα, με θέρμανση στους 56-60°C για 30 λεπτά, ή με έκθεση σε pH<6 ή pH>10 για 10 λεπτά [1].

Εκτός από τις περιπτώσεις τρυπήματος με σύριγγα και μετάγγισης αίματος, ο HIV εισέρχεται στο σώμα και μέσω των βλεννογόνων. Έρευνες έχουν δείξει ότι η μόλυνση μπορεί να γίνει στο κολπικό και τραχηλικό επιθήλιο μέσω αλληλεπίδρασης αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που έχουν εγκολπώσει ιικά σωματίδια (αλλά δεν έχουν καταφέρει να τα εξουδετερώσουν) με CD4+ T λεμφοκύτταρα [1].

Ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα από μολύνσεις σε γεννητικά έλκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές του ιού. Αν και ο ενεργητικός σύντροφος διατρέχει χαμηλό κίνδυνο, μετάδοση μπορεί να συμβεί μέσω κυττάρων της ουρήθρας μετά από αλληλεπίδραση με μολυσμένα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας ή του εντερικού επιθηλίου. Οι αρσενικές και οι θηλυκές ορμόνες φαίνεται πως βοηθούν τη μετάδοση προκαλώντας διακυτταρικές επαφές [1].

Η αρχική και τοπική μόλυνση ακολουθείται μέσα σε λίγες μέρες από τη μετανάστευση του ιού από τους λεμφαδένες στον σχετιζόμενο με το έντερο λεμφικό ιστό (GALT) που περιέχει το ~40% των λεμφοκυττάρων του σώματος και όπου τα ευάλωτα CCR5 CD4+ T λεμφοκύτταρα βρίθουν. Εκεί ο ιός πολλαπλασιάζεται ταχύτατα και σε 10-20 ημέρες εξαπλώνεται στα υπόλοιπα λεμφικά όργανα και έτσι ξεκινά το πρώτο στάδιο της λοίμωξης από τον HIV [1].

1.1.5 Διάγνωση της μόλυνσης από τον HIV

Η διάγνωση γίνεται μέσω εργαστηριακών εξετάσεων και αξιολόγησης ορισμένων συμπτωμάτων. Ο έλεγχος για μόλυνση από τον HIV συνιστάται σε όλους με ηλικία 15-65 έτη και σε όλες τις εγκύους και ακόμα περισσότερο σε άτομα υψηλού κινδύνου και άτομα που έχουν διαγνωσθεί με άλλο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα (ΣΜΝ). Οι περισσότεροι μολυνθέντες αναπτύσσουν ειδικά αντισώματα (ορομετατροπή) μέσα σε 3-12 εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Η τεχνική ELISA είναι μία συνηθισμένη μέθοδος για τον εντοπισμό των αντισωμάτων ενάντια του HIV. Σε θετικό αποτέλεσμα από ELISA, χρησιμοποιείται ανοσοστύπωμα Western για τον εντοπισμό αντιγόνων του ιού στο αίμα. Πρωταρχικές μολύνσεις από HIV ανιχνεύονται μετρώντας το HIV-RNA ή το αντιγόνο p24 στο αίμα. Τα

θετικά αποτελέσματα από ανοσοστύπωμα Western ή PCR επαληθεύονται με διαφορετικό αντίσωμα ή με ενίσχυση διαφορετικού γενετικού τύπου με PCR [2].

1.1.6 Θεραπευτική αγωγή

Περισσότερα από 25 φάρμακα ενάντια του HIV έχουν αναπτυχθεί μέσα στις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Τα φάρμακα χωρίζονται σε 5 κατηγορίες. Νουκλεοσιδικά φάρμακα που στοχεύουν την RT, μη νουκλεοσιδικά φάρμακα που στοχεύουν την RT, αναστολείς πρωτεάσης, αναστολείς ιντεγκράσης και φάρμακα που δρουν στον ιικό φάκελο. Παραδείγματα αυτών αναφέρονται στον Πίνακα 1.1.6.1. Το πρώτο φάρμακο που κυκλοφόρησε ήταν το zidovudine (AZT), ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο που δρα ως αναστολέας της RT του ιού. Όλα τα φάρμακα μεμονωμένα δεν είναι ικανά να σταματήσουν τον ιό και γι' αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί [2].

Η σημερινές θεραπευτικές αγωγές αποτελούνται από τουλάχιστον τρία φάρμακα από τουλάχιστον δύο κατηγορίες. Αυτή η προσέγγιση ονομάζεται HAART (highly active anti-retroviral therapy). Η θεραπεία για να είναι αποτελεσματική χρειάζεται να συνεχίζεται επ' αόριστον χωρίς διακοπές. Σκοπός είναι ο αριθμός HIV-RNA να είναι μικρότερος από 50 ανά χιλιοστόλιτρο αίματος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτός ο στόχος οδηγεί σε μειωμένο κίνδυνο για πρόοδο της ασθένειας, μειωμένη πιθανότητα μετάδοσης μέσω της σεξουαλικής επαφής και από τη μητέρα στο βρέφος [2]. Το 2018 έγινε αποδεκτό από τον UNAIDS ότι μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο (<200 αντίγραφα/mL) σε ασθενείς σημαίνει αδυναμία μετάδοσης του ιού. Αυτή η απόφαση λήφθηκε μετά από στατιστικά δεδομένα ζευγαριών όπου ο ένας σύντροφος ήταν οροθετικός χωρίς ανιχνεύσιμο φορτίο και ο άλλος υγιής και είχαν σεξουαλικές επαφές χωρίς προφυλακτικό για αρκετά χρόνια. Μετά από συνολικά 58.000 σεξουαλικές επαφές, δεν υπήρξε ούτε μία μετάδοση του ιού. Αν όμως η αγωγή διακοπεί, τότε το ιικό φορτίο αυξάνεται μέσα σε 2-3 εβδομάδες [5], [6].

Πίνακας 1.1.6.1: Κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων και παραδείγματα. [2]

Μηχανισμός	Όνομα φαρμάκου
Αναστολέας RT (νουκλεοσίδιο)	Abacavir (ABC), Didanosine (ddl)
	Emtricitabine (FTC), Lamivudine (3TC)
	Stavudine (d4T), Zalcitabine (ddC)
	Zidovudine (ZDV)
Αναστολέας RT (νουκλεοτίδιο)	Tenofovir (TDF)
Αναστολέας RT (μη νουκλεοσίδιο)	Delavirdine (DLV), Etravirine (EFV)
	Nevirapine (NVP)
Αναστολέας Πρωτεάσης	Amprenavir (APV), fos-Amprenavir (fAPV)
	Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV)
	Indinavir (IDV), Lopinavir (PV)
	Nelfinavir (NFV), Saquinavir (SQV)
	Ritonavir (RTV), Tipranavir (TPV)
Αναστολέας Ιντεγκράσης	Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG), Dolutegravir (DTG)
Αναστολέας Εισόδου	Enfuvirtide (ENF), Maraviroc

Η τεχνική Postexposure Prophylaxis (PEP) που εφαρμόζεται μέσα σε διάστημα λίγων ωρών μετά από πιθανή έκθεση κάποιου ανθρώπου στον ιό μπορεί να μειώσει σημαντικά τις πιθανότητες λοίμωξης. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη λογική πως τα πρώτα μολυσμένα κύτταρα θα θανατωθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα και κατά την οξεία φάση το ιικό φορτίο θα είναι χαμηλό, ώστε τα reservoirs που είναι προϊοί εγκατεστημένοι στο γενετικό υλικό των ανθρώπινων κυττάρων να είναι λίγα [1].

Η τεχνική Preexposure Prophylaxis (PrEP) χρησιμοποιείται από άτομα που έχουν αυξημένες πιθανότητες να μολυνθούν από τον ιό. Τα αντιρετροϊκά φάρμακα που λαμβάνονται καθημερινά (συνήθως tenofovir και emtricitabine) μπορούν να αποτρέψουν την εγκατάσταση του ιού σε ποσοστό 92% με βάση δεδομένα από το Αμερικάνικο CDC [1].

1.2 Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας – HIV

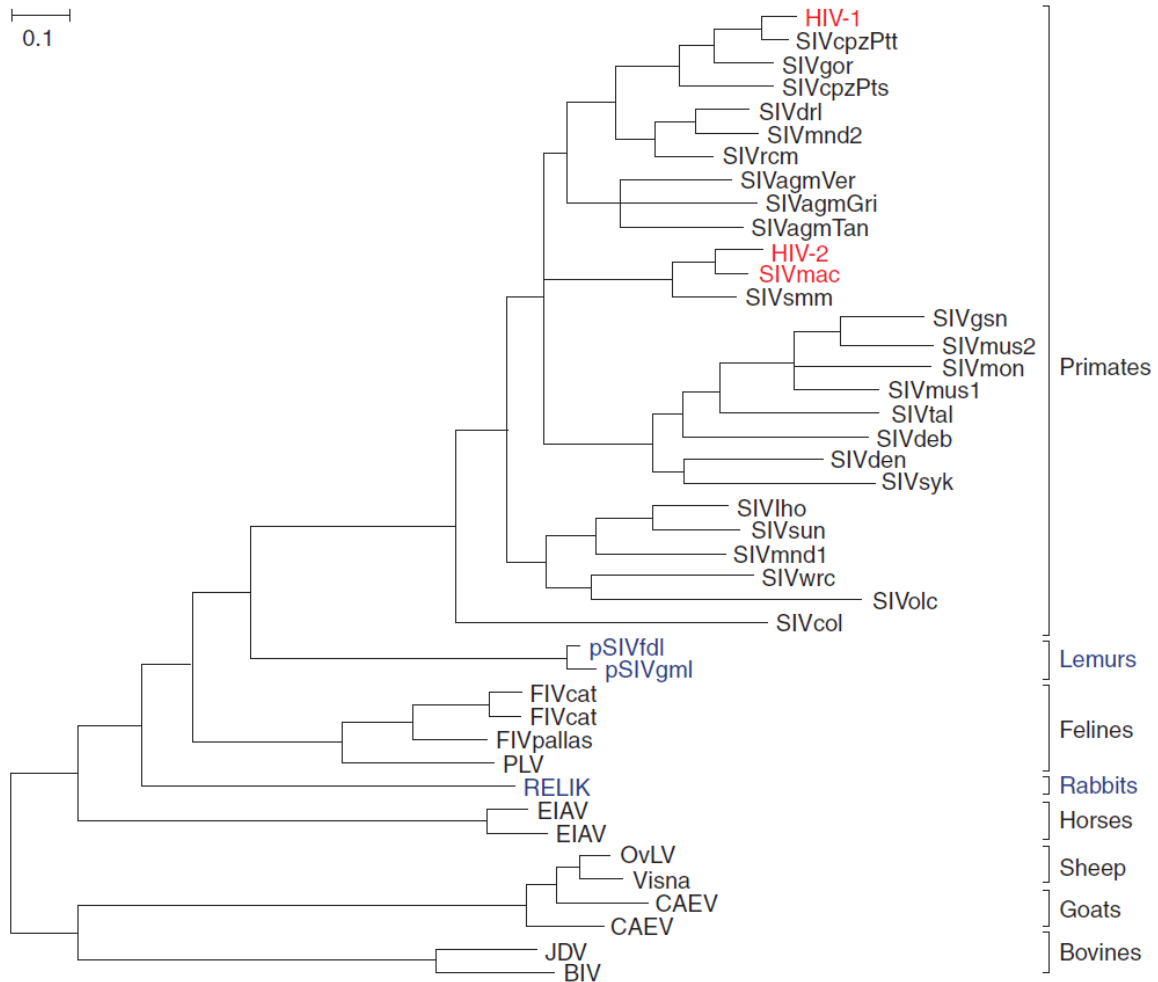
1.2.1 Ταξινόμηση του ιού και υπότυποι.

Ο HIV ανήκει στο γένος *Lentivirus* που ανήκει στην οικογένεια *Retroviridae*. Ο HIV χωρίζεται σε αρκετές ομάδες, εξαιτίας της έντονης μεταλλαξιμότητάς του που οδηγεί σε αρκετές γενετικά διακριτές ομάδες. Η συχνότητα μεταλλαγής στο γενετικό υλικό του HIV είναι $4,1(\pm 1,7) \times 10^{-3}$ ανά βάση ανά κυττάρο, υψηλότερη από κάθε άλλο βιολογικό σύστημα [7]. Υπάρχουν δύο γονότυποι του HIV, ο HIV-1 και ο HIV-2. Ο HIV-2 είναι περιορισμένος στη Δυτική Αφρική και έχει χαμηλότερη μολυσματικότητα από τον HIV-1. Ο HIV-1 χωρίζεται σε 5 ομάδες (groups), οι οποίες στη συνέχεια χωρίζονται σε υποτύπους (clades, sybtypes). Η ομάδες είναι οι M (Major), O (Outlier), N (non-M, non-A) και P (pending the identification of further human cases) [1], [8]. Κυρίαρχη ομάδα είναι η ομάδα M (Major) που είναι η αιτία του 95% των μολύνσεων από HIV. Η ομάδα M χωρίζεται σε 9 υποτύπους που ορίζονται με λατινικά γράμματα (A έως K). Οι υπότυποι A και F χωρίζονται σε υπο-υποτύπους A1, A2 και F1, F2, αντίστοιχα. Ο υπότυπος B είναι ο πιο διαδεδομένος στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Η ομάδα O που ευθύνεται για το 1-5% των λοιμώξεων έχει και αυτή υποτύπους, αλλά είναι σπάνιοι [1], [9]. Ο ιός HIV-1 επίσης, χωρίζεται και σε ομάδες που αποκαλούνται CRFs (Circulating Recombinant Forms). Ένα CRF προκύπτει από τον ανασυνδυασμό δύο υποτύπων που βρίσκονται στον ίδιο ασθενή. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 50 CRFs [9]. Υπάρχουν, επίσης, αρκετοί ιοί που δεν μπορούν να τοποθετηθούν σε καμία από τις υπάρχουσες ομάδες και υποτύπους [9].

1.2.2 Η προέλευση του HIV

Είναι γνωστό ότι πολλαπλές μεταδόσεις του ιού ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (Simian Immunodeficiency Virus - SIV) από μη ανθρώπινα πρωτεύοντα σε ανθρώπους αποτέλεσαν την απαρχή του HIV [10]. Ο HIV-1 είναι συγγενικά πιο κοντά με τα στελέχη SIVcpz και SIVgor, που έχουν απομονωθεί από χιμπατζήδες (*Pan troglodytes troglodytes*) και γορίλλες (*Gorilla gorilla*), αντίστοιχα [11], [12]. Όμως οι πολλές διαφορές στο γονίδιο *Vpu*, ο χαμηλός επιπολασμός του SIVcpz στους χιμπατζήδες και η απουσία των χιμπατζήδων από τις περιοχές όπου θεωρείται ότι ξεκίνησε το AIDS, προκαλούν αμφιβολίες για τον χιμπατζή ως φυσικό ξενιστή και ρεζερβουάρ του HIV-1 και πως κάποιο άλλο άγνωστο πρωτεύον είναι

φυσικός ξενιστής των SIVcpz και HIV-1 [13]–[15]. Ο HIV-2 είναι συγγενικά πιο κοντά στο στέλεχος SIVsmm, που έχει απομονωθεί από ένα είδος κερκοκήβου (*Cercocebus atys*), σε σχέση με τον HIV-1 [16], γεγονός που δηλώνει την ανεξάρτητη εξέλιξή τους. Η φυλογενετική σχέση του HIV και του SIV απεικονίζεται στην Εικόνα 1.2.2.1.

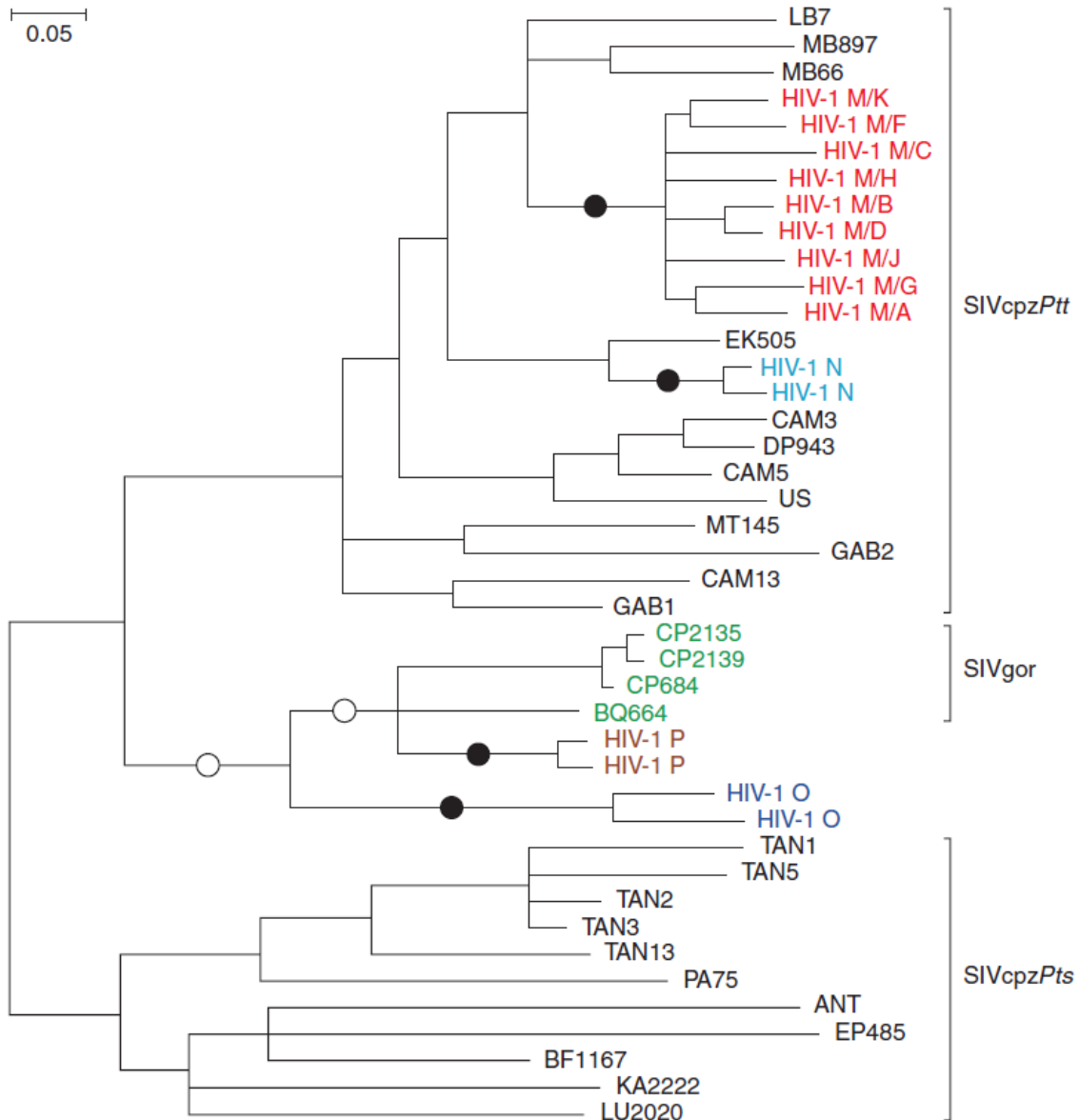


Εικόνα 1.2.2.1: Φυλογενετικό δέντρο από αλληλουχίες πολυμερασών λεντιών (lentiviruses) με τη μέθοδο Maximum Likelihood, στο οποίο φαίνεται η σχέση HIV-1 και HIV-2 με τους κοντινότερους συγγενείς τους. Μπάρα = 0,1 αμινοξικές αντικαταστάσεις ανά θέση [10].

Οι διαφορετικές ομάδες (groups) των ιών HIV-1 (M, O, N, P) και HIV-2 (A-H) οφείλονται σε διαφορετικά περιστατικά μετάδοσης γενετικά διαφορετικών στελεχών SIV [10]. Ο πιο πιθανός τρόπος μετάδοσης είναι η έκθεση σε μολυσμένο αίμα ή ιστούς κατά τη διαδικασία κυνηγιού ή τεμαχισμού κρέατος [17], [18]. Οι Αφρικανικές φυλές περιλαμβάνουν το κρέας των πρωτευόντων στη διατροφή τους.

Οι 4 ομάδες (groups) του HIV-1 προέκυψαν από 4 διαφορετικά συμβάντα στην Κεντροδυτική Αφρική, αλλά μόνο η M έχει εξαπλωθεί σε όλον τον κόσμο. Οι υπόλοιπες ομάδες παραμένουν ενδημικές στις περιοχές όπου έχουν εντοπιστεί τα συγγενικά τους στελέχη

του SIV [19]. Το παλαιότερο ίχνος του AIDS είναι από ένα δείγμα αίματος του 1959 στην Κεντροδυτική Αφρική και είναι παρόμοιο με τους υποτύπους B και D της ομάδας M [20]. Το φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 1.2.2.2 απεικονίζει την εξελικτική πορεία προς τους διαφορετικούς υποτύπους του HIV-1.

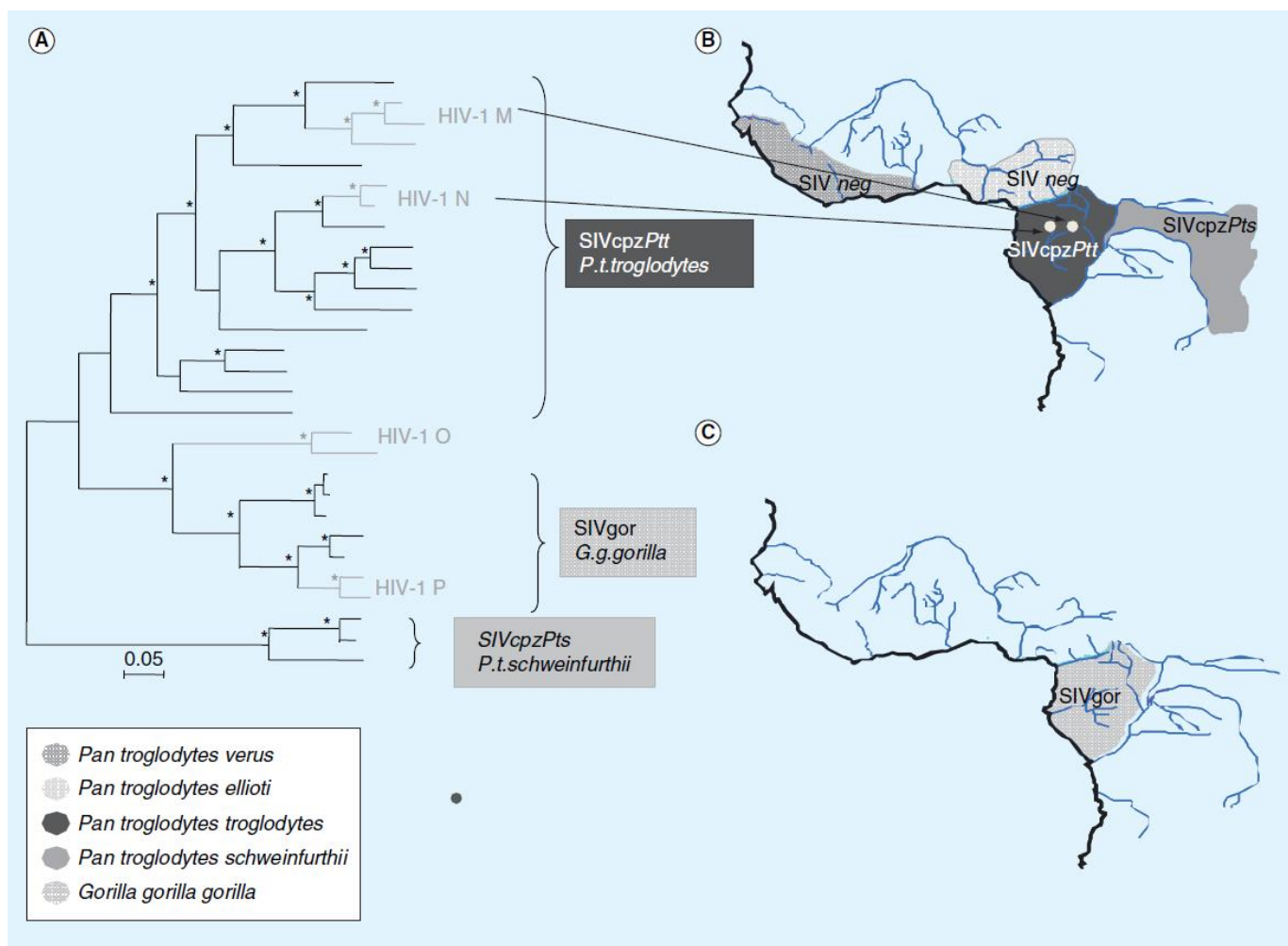


Εικόνα 1.2.2.2: Η προέλευση των 4 ομάδων του HIV-1 μέσα από ένα φυλογενετικό δέντρο Maximum Likelihood από αλληλουχίες του γονιδίου *Pol*. Οι αλληλουχίες των SIVcpz και SIVgor είναι μαύρα και πράσινα χρωματισμένες, αντίστοιχα. Οι μαύροι κύκλοι δηλώνουν διαειδική μετάδοση προς τους ανθρώπους. Οι λευκοί κύκλοι δηλώνουν πιθανούς κλάδους όπου συνέβη μετάδοση από χιμπατζή σε γορίλλα. Μπάρα = 0,05 αντικαταστάσεις ανά θέση [10].

Φυλογενετικές και στατιστικές αναλύσεις χρονολογούν τον τελευταίο κοινό πρόγονο της ομάδας M του HIV-1 μεταξύ 1910-1930 [21], [22]. Αυτό σημαίνει πως για 50-70 χρόνια πριν την έναρξη της πανδημίας του HIV-1 στην Κεντροδυτική Αφρική, η ασθένεια δεν είχε ακόμα ανακαλυφθεί [10]. Μοριακές και επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν πως η ομάδα M προέκυψε στην περιοχή Kinshasa του Κονγκό [23] και υπήρχαν αρχικές διαφοροποιήσεις σε υποτύπους πριν από το 1960 [22]. Η εξάπλωση της ομάδας M συνέβη μέσα από περιστατικά στενωπού που οδήγησαν στην επικράτηση κάποιων υποτύπων σε συγκεκριμένες περιοχές. Οι σημερινοί υπότυποι A και D προέρχονται από την Κεντρική Αφρική, αλλά δημιούργησαν επιδημίες στην Ανατολική Αφρική. Ο υπότυπος C εμφανίστηκε στο νότιο μέρος της Αφρικής και εξαπλώθηκε εκεί καθώς και στην Ινδία και την Ασία. Ο υπότυπος B εξαπλώθηκε αρχικά στην Αϊτή τη δεκαετία του 1960 και μεταφέρθηκε στις ΗΠΑ και από εκεί στην Ευρώπη [24].

Ο HIV-2 είναι περιορισμένος στη Δυτική Αφρική και τα περιστατικά του μειώνονται, εξαιτίας της εξάπλωσης του HIV-1 [25]. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη χαμηλότερη παθογένεια και μετάδοση του ιού και στα χαμηλά ιικά φορτία στα υγρά του σώματος [26], [27]. Οι περισσότεροι ασθενείς με HIV-2 δεν εμφανίζουν συμπτώματα AIDS, αλλά αυτοί που εμφανίζουν δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν από τους ασθενείς που μολύνθηκαν από τον HIV-1 [28].

Οι περιοχές και οι φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών SIV και HIV απεικονίζονται στην Εικόνα 1.2.2.3.



Εικόνα 1.2.2.3: (A) Εξελικτικές σχέσεις μεταξύ SIVs και των ομάδων του HIV-1 με βάση την αλληλουχία gp41 με τη μέθοδο Maximum Likelihood. Μπάρα = 0,05 μεταλλαγές ανά θέση. (B) Γεωγραφική εξάπλωση των *Pan troglodytes* spp. (C) Γεωγραφική εξάπλωση του *Gorilla gorilla gorilla* [19].

1.2.3 Το στέλεχος αναφοράς Hxb2

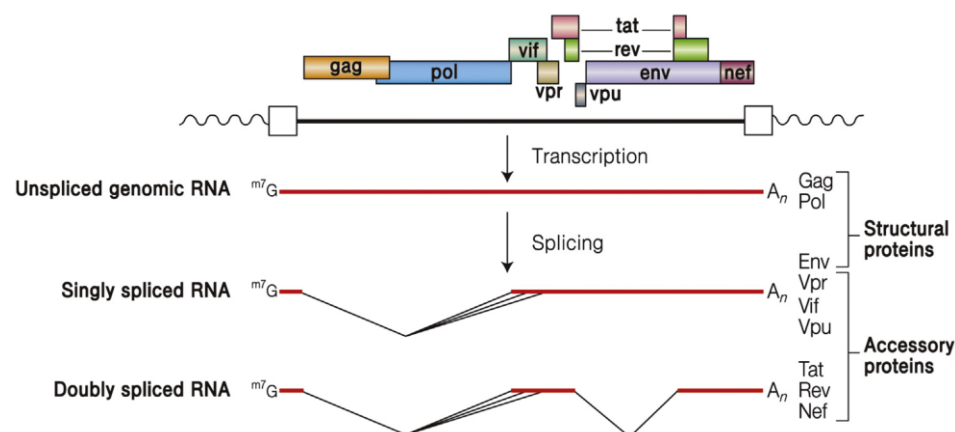
Το στέλεχος Hxb2 του HIV χρησιμοποιείται ως στέλεχος αναφοράς στις βάσεις δεδομένων Los Alamos HIV Databases. Ήταν ένα από τα πρώτα στελέχη που αλληλουχήθηκαν πλήρως. Το απομόνωσε ο Montagnier από έναν Γάλλο ασθενή με προχωρημένο σάρκωμα Kaposi [29]. Αυτό το στέλεχος χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο και υπάρχει σε πολλές επιστημονικές δημοσιεύσεις. Η αλληλουχία του διαφέρει από το πρώτο στέλεχος που απομονώθηκε επειδή περιέχει μία μεταλλαγή στο αρχικό κωδικόνιο του Vpu (6062-6064, ATG→ACG) και μία αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης στη θέση 5772 που προκαλεί πρόωρη λήξη του Vpr [30]. Είναι ένας ιός υποτύπου B. Είναι ένα στέλεχος κατηγορίας tier-1A. Αυτό σημαίνει πως είναι ένας ιός ευαίσθητος στην

εξουδετέρωση από αντισώματα, επειδή έχει ανοιχτή διαμόρφωση του τριμερούς της gp120 [31]. Η πλήρης νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του Hxb2 βρίσκεται στη GenBank με κωδικό K03455. Σε αυτή την εργασία, η αρίθμηση του γονιδιώματος και των πρωτεϊνών θα γίνεται με βάση αυτό το στέλεχος, εκτός εάν προσδιορίζεται διαφορετικά.

1.2.4 Το γενετικό υλικό του HIV

Ο HIV είναι ιός τάξης VI. Αυτό σημαίνει πως έχει ως γενετικό υλικό μονόκλωνο (+) RNA, με cDNA σε κάποιο στάδιο του κύκλου του συντιθέμενο από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT). Ανήκει στην οικογένεια Retroviridae και ειδικότερα στο γένος *Lentivirus*. [32]. Το γένος *Lentivirus* περιέχει τους πολύπλοκους (complex) ρετροϊούς. Αυτοί έχουν εκτός από τις πρωτεΐνες Gag, Pol και Env και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της διάδοσης και της παθογένειας του ιού [2]. Η ιδιαιτερότητα των ρετροϊών είναι πως το RNA τους δε λειτουργεί ως mRNA, αλλά ως εκμαγείο για τη σύνθεση δίκλωνου DNA από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT) [32].

Το μονόκλωνο RNA του HIV έχει μέγεθος 9719 βάσεις, με βάση το στέλεχος αναφοράς Hxb2 (GenBank: K03455). Το γενετικό υλικό βρίσκεται σε δύο αντίγραφα. Τα μόρια RNA συρράπτονται με δύο εναλλακτικούς τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση προκύπτει 1 μόριο μεγέθους 4 kb και στη δεύτερη 2 μόρια μεγέθους 2 kb. Το μόριο των 4 kb κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Env, Vpr, Vif και Vpu και τα δύο μόρια των 2 kb κωδικοποιούν τις Tat, Rev και Nef. Υπάρχουν εναλλακτικά σημεία συρραφής και στις δύο περιπτώσεις που καθορίζουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), ώστε να μεταφράζεται η σωστή πρωτεΐνη κάθε φορά. Στην Εικόνα 1.2.3.1 φαίνονται τα σημεία συρραφής και τα πλαίσια ανάγνωσης [2].



Εικόνα 1.2.3.1: Ολόκληρο και εναλλακτικά συραμμένα RNA του HIV με εμφανείς τις θέσεις των γονιδίων. Οι τρεις γραμμές σε κάθε συραμμένο RNA δηλώνουν διαφορετικά ORF [2].

1.2.5 Οι πρωτεΐνες του HIV

Το γονίδιο *Gag-Pol* κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη από την οποία μετά από καταλυτικό κόψιμο από την πρωτεάση του ιού (PR), προκύπτουν αρκετά πεπτίδια. Το ένα είναι ένα ένζυμο με δύο δραστηριότητες, αντίστροφης μεταγραφάσης και ριβονουκλεάσης H. Αυτό το πολύπλοκο ένζυμο συμβάλει στη δημιουργία δίκλωνου DNA από το RNA του ιού. Ένα άλλο πεπτίδιο που προκύπτει είναι η ιντεγκράση και είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση του δίκλωνου DNA από το προηγούμενο ένζυμο στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Το ενσωματωμένο δίκλωνο cDNA ονομάζεται προϊός (provirus) [32].

Η πρωτεΐνη p17 οδηγεί μέρος της πολυπρωτεΐνης πριν αποκοπεί πλήρως στην πλασματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη p24 είναι η πρωτεΐνη που συγκροτεί το καψίδιο του ιού σχηματίζοντας πολλά εξαμερή και σε μερικές περιπτώσεις πενταμερή. Η πρωτεΐνη p7 εγκλωβίζει το διπλοειδές γενετικό υλικό του ιού και συμβάλει στον ανασυνδυασμό του. Η πρωτεΐνη p6 βοηθά στην ελευθέρωση του ιού από την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή [33]–[35].

Το γονίδιο *Env* κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ιού που αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς των ανθρώπινων κυττάρων. Από το γονίδιο προκύπτουν το εξωκυττάριο πεπτίδιο gp120 και το διαμεμβρανικό gp41 που συμπλοκοποιούνται [1].

Η πρωτεΐνη Tat (Trans-activator of transcription) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που προσδένει RNA και αναγνωρίζει την περιοχή TAR (Tat-responsive element) στο RNA του HIV. Με την απουσία της Tat, η RNA πολυμεράση II αποχωρίζεται από το εκμαγείο και η μεταγραφή διακόπτεται. Η Tat προσελκύει το σύμπλοκο P-TEFb που δρα ως θετικός παράγοντας επιμήκυνσης [2].

Η πρωτεΐνη Rev (Regulator of expression of virion protein) είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του γονιδιακού RNA από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Η Rev προσδένεται σε ένα στοιχείο του RNA που ονομάζεται RRE (Rev response element) και μεταφέρει το RNA του ιού μέσω του πυρηνικού πόρου. Η πρωτεΐνη Rev περιέχει το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο του πυρηνικού σήματος εξόδου (NES) [2].

Η πρωτεΐνη Vif (Virus infectivity factor) είναι απαραίτητη για τη μόλυνση των T λεμφοκυττάρων. Το ένζυμο APOBEC3G τροποποιεί το RNA μέσω απαμίνωσης και η Vif σηματοδοτεί αυτό το ένζυμο για αποικοδόμηση από μία E3 λιγάση ουβικουιτίνης. Έτσι το APOBEC3G δεν πακετάρεται μέσα στο ιικό σωματίδιο και το ένζυμο δεν απαμινώνει την C σε U που οδηγεί σε υπερμετάλλαξη ή αποικοδόμηση του RNA [2].

Η πρωτεΐνη Nef (Negative factor) έχει μέγεθος περίπου 27 kDa και είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση υψηλού ιικού φορτίου και για τη πρόοδο της ασθένειας. Οι δράσεις της οδηγούν σε διαφυγή του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα και στην εξάπλωση του ιού. Η Nef ρυθμίζει αρνητικά πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή. Παραδείγματα είναι τα μόρια CD4, MHC-I και CCR4. Δρα μεταφέροντας αυτά τα μόρια μέσω της AP2 (adaptor protein 2) στο εσωτερικό του κυττάρου ή προς αποικοδόμηση στα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα την αδυναμία του κυττάρου να επικοινωνήσει με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [2].

Η πρωτεΐνη Vpu (Viral protein unique) που έχει μέγεθος 16 kDa, αλληλεπιδρά με δύο παράγοντες του ξενιστή και διευκολύνει τη συγκρότηση του ιού και την απελευθέρωσή του. Πρωταρχικά, αλληλεπιδρά με νεοσυντιθέμενα μόρια CD4 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και επιστραπεύει το σύμπλοκο λιγάνης ουβικουιτίνης SCF, να πολυουβικουιτινιλιώσει το CD4 για να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα. Αυτό μπορεί, επίσης, να προκαλέσει απουσία του CD4 στο ΕΔ, ώστε να αποφευχθεί η συμπλοκοποίησή του με τα τριμερή Επν του HIV και να μπορέσει ο ιός να εξωτερικευθεί. Η Vpu βοηθά στην απελευθέρωση του ιού και μέσω αναστολής της αντι-ιικής πρωτεΐνης tetherin. Η tetherin σχηματίζει συνδέσεις μεταξύ πλασματικής μεμβράνης και του φακέλου του ιού [2].

Η πρωτεΐνη Vpr (Virion protein R) έχει μέγεθος 14 kDa και εδρεύει στο εσωτερικό του καψιδίου σε 100-700 μόρια. Αυτή η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την εξάπλωση του ιού σε μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα. Οι δράσεις της περιλαμβάνουν διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M, μέσω αποικοδόμησης DNA-επιδιορθωτικών ενζύμων και ενεργοποίησης της ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), και πρόκληση απόπτωσης [2].

1.2.6 Η δομή του HIV

Ο HIV έχει 2 αντίγραφα μονόκλωνου (+) RNA που βρίσκονται σε επαφή με το νουκλεοκαψίδιο που συγκροτείται από πρωτεΐνες p7. Το κωνικό καψίδιο εγκλωβίζει το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο στο εσωτερικό του μαζί με τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και ιντεγκράση (integrase) και την πρωτεΐνη Tat. Το καψίδιο καλύπτεται από πολλά αντίγραφα της πρωτεΐνης p17 και αυτά από τη σφαιρική λιπιδική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή που απέκτησε ο ιός κατά την έξοδό του από το κύτταρο-ξενιστή. Αυτός ο σχηματισμός ονομάζεται ιικός φάκελος. Η λιπιδική μεμβράνη έχει στην επιφάνειά της τα

σύμπλοκα gp120/gp41 του ιού. Στο ενδιάμεσο του φακέλου και του καψιδίου βρίσκονται τα μόρια της πρωτεΐνης του ιού [36].

Το καψίδιο του HIV έχει κωνικό σχήμα και συγκροτείται από 1000-1500 μόρια της πρωτεΐνης p24. Η πρωτεΐνη του καψιδίου αποτελείται από 231 αμινοξέα με δύο επικράτειες (domains) που αναδιπλώνονται ανεξάρτητα. Η σταθερότητα και η ακεραιότητα του καψιδίου είναι σημαντική για τον κύκλο ζωής και τη μολυσματικότητα του ιού. Τα πρόδρομα πεπτίδια που παράγονται από την έκφραση του γονιδίου *Gag* σχηματίζουν ένα ανώριμο σφαιρικό καψίδιο με πολλές οπές. Κατά την ωρίμανση του ιού, η πρωτεάση τέμνει τα ανώριμα πεπτίδια και μόνο το ~30% αυτών συγκεντρώνεται γύρω από το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP complex) προς σχηματισμό του κωνικού καψιδίου. Τα μονομερή p24 σχηματίζουν κυρίως εξαμερή αλλά και πενταμερή και στη συνέχεια συγκροτούν το καψίδιο [35].

Ο ιικός φάκελος, με διάμετρο ~120 nm [37], έχει στην επιφάνεια του τα εξαμερή gp120/gp41. Το εξαμερές αποτελείται από ένα τριμερές gp120 και ένα τριμερές gp41. Ο HIV έχει πολύ λίγα μόρια αυτού του εξαμερούς στην επιφάνεια του, περίπου 14 ανά ιικό σωματίδιο, ενώ ένας μεταλλαγμένος SIV έχει περίπου 73 [38] και ο ιός της γρίπης (Influenza) τύπου A έχει περίπου 450 [39].

1.2.7 Η ικανότητα μεταλλαγής και η εξελικτική προσαρμοστικότητα του HIV

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο ιός έχει την υψηλότερη συχνότητα μεταλλαγής ($4,1 \pm 1,7 \times 10^{-3}$ ανά βάση ανά κύτταρο) [7] και εκτός αυτού, ο ιός μπορεί να ανασυνδυάζει το γενετικό υλικό του (2-20 γεγονότα ανά γονιδίωμα ανά κύκλο) με αποτέλεσμα την αύξηση της γενετικής ποικιλομορφίας σε έναν ασθενή [40].

Η υψηλή μεταλλαξιμότητα οφείλεται σε κάποιο βαθμό στη φύση του γενετικού υλικού. Οι RNA ιοί είναι πιο επιρρεπείς σε μεταλλάξεις, αφού οι RNA πολυμεράσες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα λάθους από τις DNA πολυμεράσες. Στην περίπτωση του ιού HIV που έχει γενετικό υλικό μήκους ~9,7 kb, η συχνότητα μεταλλαγής είναι 0,9-9,7 μεταλλαγές ανά αντίγραφο. Γι' αυτό το λόγο σε έναν ασθενή συνυπάρχουν διαφορετικές παραλλαγές του ίδιου ιού σε ισορροπία με τη μία παραλλαγή να κυριαρχεί σε συχνότητα. Αυτές χαρακτηρίζονται *quasispecies* και συναντώνται και σε άλλους RNA ιούς. Οι συχνές μεταλλαγές προσφέρουν στον ιό την πιθανότητα να δημιουργήσει νέα ανθεκτικά στελέχη που διαφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αλλά προκαλεί και την παραγωγή πολλών ελαττωματικών ιών, αφού προκύπτουν και καταστροφικές μεταλλαγές [32].

Οι γενετικοί ανασυνδυασμοί στον HIV εντοπίζονται κυρίως σε συγκεκριμένα τμήματα του γενετικού υλικού και του προσδίδουν ανθεκτικότητα σε φάρμακα ή έναντι των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέτοιες περιοχές είναι τα γονίδια *Env* και *Pol*. Ανάμιξη των ανθεκτικών μεταλλαγών στα γονίδια της αντίστροφης μεταγραφάσης και της πρωτεάσης αυξάνουν την ποικιλομορφία των ανθεκτικών σε φάρμακα γονοτύπων. Στην περίπτωση μιας εξελικτικής στενωπού που οφείλεται σε πίεση από αντιρετροϊκά φάρμακα ή από ειδικά ανοσοκύτταρα, θα επικρατήσει πληθυσμοί ανθεκτικών ιών που θα κινδυνεύσουν σε μία επόμενη και διαφορετική πίεση ενάντια στους κοινούς αντιγονικούς καθοριστές. Αν όμως αυτά τα ιικά σωματίδια ανασυνδυάσουν διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματός τους, θα διατηρηθεί η ποικιλομορφία εκτός της περιοχής που επιλέγεται από τη στενωπό και θα επικρατήσουν νέοι ανθεκτικοί και στις δύο πιέσεις πληθυσμοί. Ανασυνδυασμοί μεταξύ διαφορετικών γονιδιακών τμημάτων, προκαλούν και αλλαγές στο γονίδιο *Env*, επειδή τα ORFs τους αλληλοεπικαλύπτονται, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2.3.1. Επίσης, συμβαίνουν ανασυνδυασμοί μεταξύ ιών με διαφορετικό τροπισμό [40]. Έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις όπου ιοί έχουν επανακτήσει χαμένα τμήματα του *Env* γονιδίου, πιθανώς από ιούς που αντιγράφονται σε προστατευμένες περιοχές μέσα στον οργανισμό [40], [41].

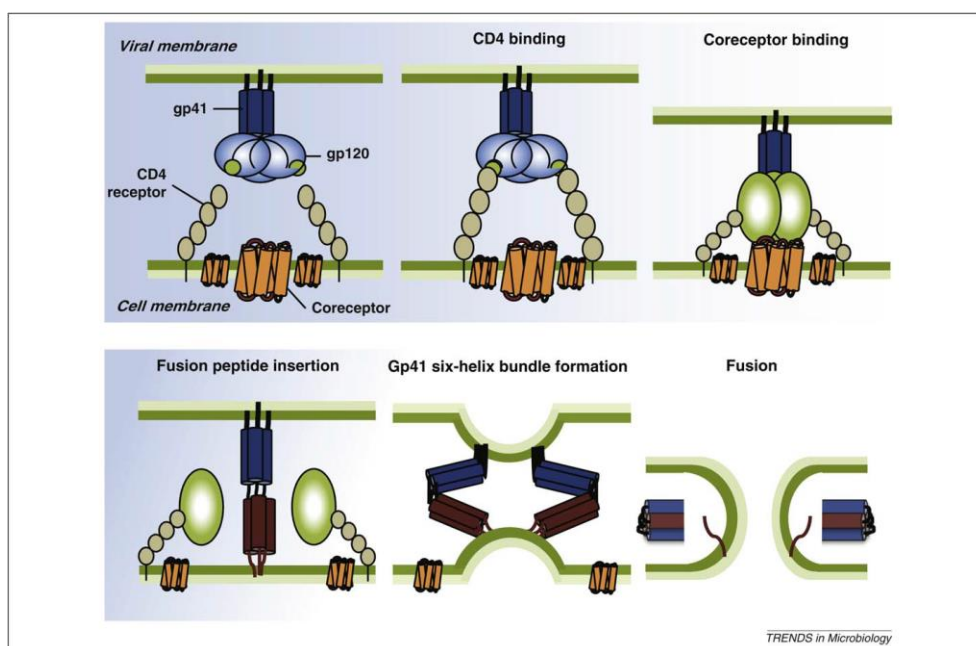
Η ερευνητική ομάδα των Bunnik, Euler και συνεργατών τους [42], [43] έδειξε πως απομονωμένα στελέχη του υποτύπου B του HIV-1 από ασθενείς την περίοδο 2003-2006 ήταν πιο ανθεκτικά στην εξουδετέρωση από διάφορα bNAbs σε σχέση με στελέχη του υποτύπου B απομονωμένα την περίοδο 1985-1989.

1.2.8 Είσοδος του HIV στα ανθρώπινα κύτταρα

Ο HIV εντοπίζει και αλληλεπιδρά με τα κύτταρα-στόχους του μέσω υποδοχέων. Ο κύριος υποδοχέας είναι ο CD4 των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Εκτός από τον κύριο υποδοχέα, ο HIV χρησιμοποιεί και δευτερεύοντες υποδοχείς (ή συνυποδοχείς), όπως οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4. Κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, η ενεργοποίηση των κυτταρικών υποδοχέων προκαλεί αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού που επιτρέπει την ενδοκυττάρωση του ιού. Μετά την είσοδο, ο ιός χάνει τον φάκελό του και αρχίζει να αντιγράφεται [44].

Γενικά, ο HIV εισέρχεται μέσα στο κύτταρο μέσω μιας διαδικασίας τριών βημάτων. Αρχικά, η γλυκοπρωτεΐνη gp120 προσδένεται στο CD4 των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Κατόπιν, ο HIV αλληλεπιδρά με επιπλέον δευτερεύοντες υποδοχείς, όπως οι CCR5 και

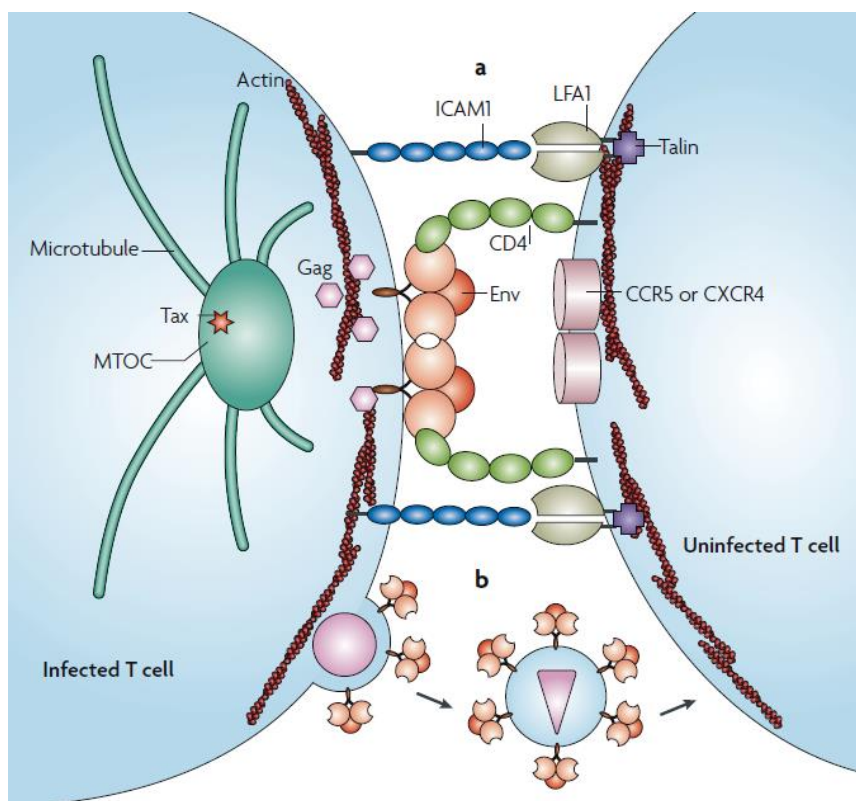
CXCR4. Κατά την αλληλεπίδραση των υποδοχέων, οι γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41 αλλάζουν διαμόρφωση και προκαλούν τη σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου. Αποκτούν μία διαμόρφωση παράλληλη προς τις μεμβράνες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2.8.1. Αυτή η σύντηξη μπορεί να προηγηθεί της ενδοκυττάρωσης, όπως έχουν δείξει πολλές έρευνες [45].



Εικόνα 1.2.8.1: Στάδια αλλαγής διαμόρφωσης του τριμερούς gp120/gp41 του HIV κατά την αλληλεπίδραση με τον CD4 και τον συνυποδοχέα του ανθρώπινου κυττάρου [45].

Αυτή η υπόθεση έχει αποδειχθεί από πολλές έρευνες. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, έχουν παρατηρηθεί ενδοσώματα και μικροπινοσώματα με ιικά σωματίδια στο εσωτερικό τους [46]. Αναστολή της διαδικασίας μείωσης του pH στα ενδοσώματα αυξάνει τη μόλυνση από τον HIV-1, πιθανόν προστατεύοντας τον ιό από την αποικοδόμηση στα λυσοσώματα [47]. Επιπλέον, η αναστολή της διαμεσολαβούμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης μειώνει τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa [48]. Τέλος, πειράματα από τον Miyauchi και τους συνεργάτες του [49] δείχνουν πως ο ιός δε μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο από την επιφάνεια του κυττάρου και απαιτείται η ενδοκυττάρωσή του, γεγονός που ανατρέπει την ευρεία ιδέα της σύντηξης των δύο μεμβρανών στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Οι ίδιοι έδειξαν πως η είσοδος του ιού εξαρτάται από την πρωτεΐνη Δυναμίνη (Dynamin) του κυττάρου, ίσως επειδή η διατήρηση ενός πόρου σύντηξης είναι πολύ ενεργειακά «σπάταλη» διαδικασία και ο ιός δεν έχει αρκετά μόρια gp120 για να τον διατηρήσει [49].

Στην περίπτωση του HIV έχει παρατηρηθεί και μετάδοση του ιού μέσω κυττάρων χωρίς την απελευθέρωση του ιού στον εξωκυττάριο χώρο. Τέτοιου τύπου μετάδοση έχει πολλά πλεονεκτήματα. Υπάρχουν ενδείξεις πως το μόριο προσκόλλησης LFA-1 συμβάλλει στην προσέλκυση υγιών κυττάρων. Αν μόρια του ιού εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη του μολυσμένου κυττάρου, τότε το κύτταρο μπορεί να προσελκύσει ένα υγιές κύτταρο και ο ιός να μεταφερθεί στο υγιές κύτταρο μέσω ελευθέρωσής του στο σημείο της σύναψης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2.8.2. Με αυτό τον τρόπο ο ιός αποφεύγει το ανοσοποιητικό σύστημα και τα αντιρετροϊκά φάρμακα και οι ξενιστές του μπορούν να τον μεταφέρουν σε μέρη του σώματος που εναλλακτικά δε θα μπορούσε να βρεθεί [44]. Ο ιός μπορεί επίσης με την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση με διάφορα κύτταρα να προκαλέσει τη συγχώνευση αυτών των κυττάρων προς δημιουργία ενός συγκυτίου. Αυτό πραγματοποιείται με την πρωτεΐνη gp41 [32]. Ένας νέος μηχανισμός μετάδοσης που έχει παρατηρηθεί είναι η μεταφορά μέσω σωλήνων. Μπορούν αν σχηματιστούν νανοσωλήνες από ακτίνη με μήκος έως 300 μm μεταξύ ανοσοκυττάρων που αποτελούν μια γέφυρα των πλασματικών μεμβρανών. Εκτός από μεταφορά πρωτεϊνών και οργανιδίων, πραγματοποιείται και μεταφορά ικών σωματιδίων [44].

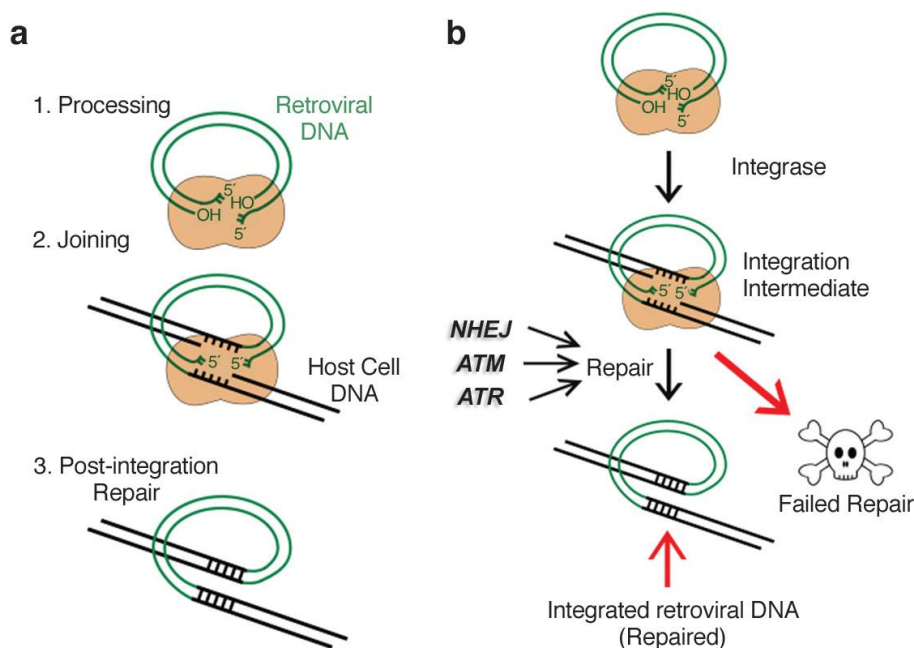


Εικόνα 1.2.8.2:

Αλληλεπίδραση ανθρώπινου μολυσμένου κυττάρου με υγιές και μεταφορά του ιού HIV στο υγιές κύτταρο [44].

1.2.9 Ενσωμάτωση του ιικού cDNA στο γονιδίωμα του ανθρώπινου κυττάρου

Το ικό καψίδιο αφού έχει ελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα μπορεί τώρα να εισέλθει στον πυρήνα. Το καψίδιο εισέρχεται στον πυρήνα μέσω του πυρηνικού πόρου [2]. Μετά την είσοδο του καψιδίου του HIV στον πυρήνα του κυττάρου, ακολουθεί η δημιουργία του cDNA από την ιική αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί ένα μονόκλωνο αρχικά μόριο DNA με μήτρα τα δύο μόρια RNA του ιού. Μεταφέρεται από το ένα μόριο RNA, στο άλλο ώστε να προκύψει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA [50]. Στη συνέχεια το μονόκλωνο μόριο DNA γίνεται δίκλωνο και είναι έτοιμο να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου για τη δημιουργία του προϊόν. Το κύριο ένζυμο για αυτή τη διαδικασία είναι η ιική ιντεγκράση, αλλά συμβάλλουν και άλλα ανθρώπινα ένζυμα. Η ιντεγκράση αποκόπτει ένα δινουκλεοτίδιο από τα δύο 3' άκρα του ιικού cDNA. Κατόπιν, το ίδιο ένζυμο ενώνει τα 3' άκρα του ιικού cDNA με το γονιδιακό DNA με μία αντίδραση κοπής και ένωσης. Στη συνέχεια, ένζυμα επιδιόρθωσης του κυττάρου ενώνουν τα υπόλοιπα άκρα και επιδιορθώνουν ατέλειες που έχουν προκύψει και δημιουργούν τον πλήρη ενσωματωμένο προϊόν. Τα ανθρώπινα ένζυμα που φαίνεται να συμβάλλουν στην ενσωμάτωση του προϊόν είναι η DNA-PK, η ATM και η ATR. Αυτά τα ένζυμα ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις διπλής κοπής του DNA (DSB) και πραγματοποιούν μη ομόλογη ένωση των άκρων τους (Non-Homologous End Joining - NHEJ) [51]. Έχειδειχθεί ότι και η μείωση της Ku80 οδηγεί σε μείωση της μόλυνσης [52]. Η Εικόνα 1.2.9.1 δείχνει μία συνοπτική απεικόνιση των βημάτων.



Εικόνα 1.2.9.1: Συνοπτική απεικόνιση των βημάτων εισαγωγής του cDNA του HIV στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή [51].

1.2.10 Έξοδος του ιού από τα κύτταρα

Τα πλήρη ιικά μόρια RNA που προέρχονται από μεταγραφή διμερίζονται και πακετάρονται σε σύμπλοκα Gag. Τα σύμπλοκα Gag σχηματίζονται πάντα με μόρια RNA στο εσωτερικό τους. Αν δεν υπάρχει ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα, εγκολπώνουν ανθρώπινο mRNA που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα από το κύτταρο-ξενιστή [53]. Τα ιικά μόρια RNA έχουν το στοιχείο ψ (psi) που η αλληλεπίδρασή του με τα μόρια Gag οδηγεί σε γρηγορότερο σχηματισμό των αρχικών εξαμερών Gag [50].

Η πρωτεΐνη μήτρας p17 οδηγεί μέρος της πολυπρωτεΐνης Gag πριν αποκοπεί πλήρως στην πλασματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη p24 είναι η πρωτεΐνη που συγκροτεί το καψίδιο του ιού σχηματίζοντας πολλά εξαμερή και σε μερικές περιπτώσεις πενταμερή. Η πρωτεΐνη p7 εγκλωβίζει το διπλοειδές γενετικό υλικό του ιού και συμβάλλει στον ανασυνδυασμό του. Η πρωτεΐνη p6 βοηθά στην απελευθέρωση του ιού από την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή [33]–[35].

1.2.11 Ρεζερβουάρ (reservoirs) του HIV

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι επιστήμονες στην αναζήτηση μίας αποτελεσματικής θεραπείας για το AIDS είναι οι δεξαμενές, τα ρεζερβουάρ, του ιού που βρίσκονται στον ασθενή με τη μορφή προϊόν, δηλαδή τμήματα DNA που βρίσκονται στο γονιδίωμα ανθρώπινων κυττάρων και διαφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα και την HAART, και εκφράζονται με μικρή συχνότητα. Τα ρεζερβουάρ προκύπτουν όταν μολυσμένα και ενεργά CD4⁺ κύτταρα μετατρέπονται σε κύτταρα μνήμης που επιβιώνουν για χρόνια, γεγονός που επιτρέπει την μακροχρόνια επιβίωση και των προϊόν. Δεν είναι μόνο τα CD4⁺ κύτταρα που αποτελούν ρεζερβουάρ. Τα μολυσμένα μακροφάγα επιβιώνουν και μολύνουν συνεχώς νέα CD4⁺ T κύτταρα και τα δένδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους ιικά σωματίδια που μπορούν για μήνες να μολύνουν νέα CD4⁺ T κύτταρα. Έχει παρατηρηθεί ότι ο HIV-1 προτιμά τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν έντονα τον ανασταλτικό υποδοχέα PD-1, και ο PD-1 είναι αυξημένος σε T κύτταρα ειδικά για τον HIV-1 [54]. Τρεις δημοσιευμένες έρευνες έδειξαν πως αν ανασταλλεί η αλληλεπίδραση PD-1 με PD-L1 αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός των ειδικών για τον HIV CTLs [55]–[57].

Στη μολυσμένη με HIV-1 κυτταρική σειρά J-Lat (μολυσμένα κύτταρα Jurkat) [58], οι προΐοί βρίσκονται σε περιοχές ετεροχρωματίνης, συμπεριλαμβανομένων και

κεντρομεριδιακών περιοχών [59]. Αυτοί οι προΐοι μπορούν να ενεργοποιηθούν, όταν τα κύτταρα εκτεθούν στον TNF α [60]. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής του HIV-1 στα κύτταρα J-Lat βρίσκεται μεταξύ δύο νησίδων CpG που είναι μεθυλιωμένες [61]. Όμως αυτός δεν είναι ένας γενικός κανόνας. Σε μελέτες *in vivo*, οι προΐοι ενσωματώθηκαν σε μεταγραφικά ενεργά σημεία μη ενεργών CD4 $^{+}$ T κυττάρων [62]. Η μεταγραφή των προΐων που βρίσκονται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές εκτελείται μόνο με τους μεταγραφικούς παράγοντες του κυττάρου που αναγνωρίζουν την περιοχή 5' LTR (Long Terminal Repeat) του HIV-1. Για παράδειγμα, σε μη ενεργά κύτταρα, οι παράγοντες NF- κ B και NFAT βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και δεν μπορούν να προκαλέσουν τη μεταγραφή των προΐων HIV-1 [63].

Στην περίπτωση χορήγησης HAART, παρατηρείται μία γρήγορη μείωση του ιικού φορτίου που ακολουθείται από μία πιο αργή μείωση μέχρι το ικό φορτίο του αίματος να πέσει κάτω από τα 50 αντίγραφα/mL και μερικές φορές να φτάσει το 1 αντίγραφο/mL και να παραμένει στη συγκέντρωση αυτή επ' αόριστον. Αυτό σημαίνει πως δεν προκύπτουν ανθεκτικοί στα φάρμακα ιοί, διότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί και καταστρέφει αυτόν τον μικρό αριθμό, αλλά κάθε μέρα ένας μικρός αριθμός μολυσμένων CD4 $^{+}$ T κυττάρων ενεργοποιείται, λόγω επαφής τους με διάφορα αντιγόνα ή κυτταροκίνες, μεταγράφεται ο προΐός τους και έτσι παράγονται νέοι ιοί [64].

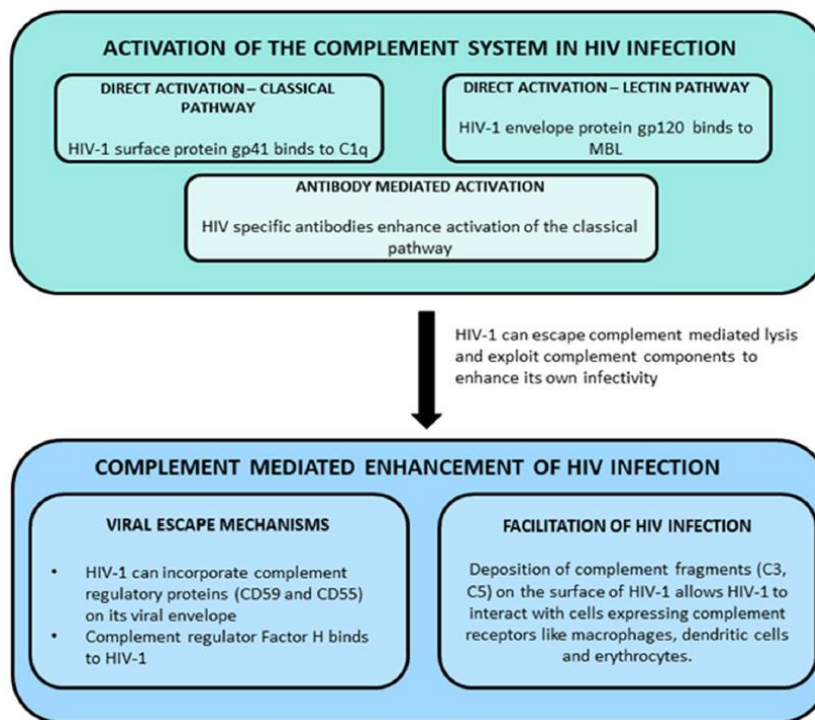
1.3 Ανοσοποιητικό σύστημα και HIV

1.3.1 Αλληλεπίδραση ανοσοποιητικού συστήματος και HIV

Η μη ειδική ανοσία του ανθρώπινου οργανισμού ενεργοποιείται νωρίς κατά την οξεία φάση της λοίμωξης από τον HIV. Η αναγνώριση ιικών συστατικών από τα δενδριτικά κύτταρα προκαλεί την έκκριση ιντερφερονών τύπου I, TNF- α και άλλων κυτταροκινών από αυτά και τα μολυσμένα κύτταρα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού τους αναγνωρίζοντας αυτές τις κυτταροκίνες. Άλλα κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα κυτταρολυτικά NK κύτταρα αντιδρούν σε αυτό τον καταρράκτη κυτταροκινών και συμβάλλουν στην καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων και την πρόσληψη ιικών αντιγόνων για την παρουσίασή τους στον κλάδο της ειδικής ανοσίας [1].

Το συμπλήρωμα ενεργοποιείται μέσω του κλασικού μονοπατιού από την πρόσδεση της gp41 του HIV στο C1q και μέσω του μονοπατιού λεκτίνης από την πρόσδεση της gp120 του HIV στην MBL (Mannose-binding Lectin). Ο ιός μπορεί να αποφύγει το συμπλήρωμα μέσω

των ρυθμιστικών πρωτεϊνών CD59 και CD55 που απέκτησε στον φάκελό του κατά την ελευθέρωσή του από το κύτταρο-ξενιστή στο οποίο παρήχθη [65]. Επίσης, η εναπόθεση των θραυσμάτων C3 και C5a στην επιφάνεια του ιού οδηγεί σε πρόσδεση του ιού σε κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς του συμπληρώματος, γεγονός που βοηθά στη μόλυνση αυτών των κυττάρων από τον ιό [66]. Ο οψωνισμός ικών σωματιδίων από το συμπλήρωμα προωθεί την αντιγονοπαρουσίαση μέσω MHC-I των δενδριτικών κυττάρων [67], αλλά και τη μόλυνση των δενδριτικών κυττάρων μέσω του υποδοχέα CR3 [68]. Μία σύνοψη των παραπάνω αλληλεπιδράσεων του συμπληρώματος με τον HIV παρατίθεται στην Εικόνα 1.3.1.1.



Εικόνα 1.3.1.1: Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης του συμπληρώματος στη μόλυνση από HIV και η εκμετάλλευση του συμπληρώματος από τον HIV [69].

Η ειδική κυτταρομεσολαβητική ανοσία περιλαμβάνει τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTL) και τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Τα CTLs εκτός από τη βασική κυτταροτοξική τους λειτουργία παράγουν και αντιϊκές κυτταροκίνες και μικρά πεπτίδια, τις αμυντίνες (defensins), που αναστέλλουν τη μεταγραφή των ιικών γονιδίων. CTLs που αναγνωρίζουν πρακτικά όλα τα πεπτίδια του HIV-1 έχουν εντοπιστεί σε μεμονωμένους ασθενείς. Υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ καλής απάντησης των CTLs, του χαμηλού ιικού φορτίου και της αργής προόδου της νόσου. Το στάδιο του AIDS χαρακτηρίζεται από γρήγορη μείωση των αντι-HIV-1 CTLs [1].

Η χυμική ανοσία είναι ένας ισχυρός σύμμαχος στη μάχη κατά του HIV. Αντισώματα κατά του HIV-1 ανιχνεύονται μέσα σε 1-3 μήνες μετά τη μόλυνση. Αυτά τα αντισώματα

εκκρίνονται στα σωματικά υγρά. Τα αντισώματα IgG1 κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε όλα τα στάδια της λοίμωξης ενεργοποιώντας την εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρική κυτταροτοξικότητα (ADCC), και την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (CDC) [1].

Η χυμική ανοσία κάποιες φορές μπορεί να λειτουργήσει αρνητικά. Κάποια αντισώματα (interfering antibodies) προσδένονται σε ιικά σωματίδια ή μολυσμένα κύτταρα και εμποδίζουν την αλληλεπίδρασή τους με τα εξουδετερωτικά αντισώματα. Άλλα αντισώματα βοηθούν ιικά σωματίδια με τα οποία έχουν προσδεθεί να εισέλθουν σε κύτταρα. Στη εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα, οι υποδοχείς του συμπληρώματος Cr1, Cr2 και Cr3 στα ευαίσθητα στη μόλυνση κύτταρα βοηθούν στην πρόσδεση συμπλόκων αντισωμάτων με ιικά σωματίδια. Τα ίδια σύμπλοκα μπορούν να εισέλθουν σε κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα NK μέσω του υποδοχέα Fc [1].

1.3.2 Υποδοχείς κυττάρων και στόχοι του HIV

Ο κύριος υποδοχέας που αναγνωρίζει ο HIV είναι ο CD4 των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Επιμόλυνση (transfection) ανθρώπινων κυττάρων που κανονικά δεν εκφράζουν CD4 με ανασυνδυασμένα νουκλεϊκά συστήματα που εκφράζουν CD4, οδηγεί αυτά τα κύτταρα σε μόλυνση από τον HIV. Επιμόλυνση κυττάρων τρωκτικών με αυτά τα συστήματα, δεν έχει αντίστοιχο αποτέλεσμα. Όμως αν ο προϊός ενσωματωθεί στο DNA των κυττάρων τρωκτικού, τότε ο ιός πολλαπλασιάζεται και παράγει άλλους ιούς. Αυτά τα πειράματα υποδεικνύουν πως υπάρχει φραγμός στην είσοδο του ιού μέσα στο κύτταρο του τρωκτικού, αλλά δεν υπάρχει αντίστοιχος φραγμός κατά τον πολλαπλασιασμό του. Υπάρχουν πολλοί βοηθητικοί παράγοντες που απαιτούνται για το σχηματισμό ενός αποτελεσματικού υποδοχέα για τον HIV. Οι οικογένειες υποδοχέων χημειοκινών έχει δείχθει πως παίζουν ρόλο στην είσοδο του ιού στα κύτταρα και η κατανομή των υποδοχέων κατέχει πρωταρχικό ρόλο στον τροπισμό του ιού [32]. Δύο πρωταγωνιστικοί βοηθητικοί υποδοχείς είναι ο υποδοχέας των α -χημειοκινών CXCR4, και ο υποδοχέας των β -χημειοκινών CCR5. Τα στελέχη του HIV που προσδένονται σε CXCR4 ή CCR5 αναφέρονται ως στελέχη X4 ή R5, αντίστοιχα. Η σημαντικότητα των δύο αυτών υποδοχέων υποδηλώνεται από το γεγονός ότι άνθρωποι με μεταλλαγμένο CCR5 και άνθρωποι με μεταλλαγή που αυξάνει την παραγωγή του προσδέτη του CXCR4, του CXCL12, είναι ανθεκτικά στη μόλυνση από τον HIV [1]. Παρ' όλ' αυτά, υπάρχουν ενδείξεις πως ο ιός έχει

και ένα δεύτερο μονοπάτι εισόδου ανεξάρτητο του CD4, το οποίο είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικό από το κύριο [32].

Σε μερικές περιπτώσεις, ο ιός μπορεί να εγκλωβιστεί από κύτταρα τα οποία δεν έχουν τους κατάλληλους υποδοχείς, μέσω πινοκυττάρωσης και φαγοκυττάρωσης. Αν όμως δεν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση που κρατά το κύτταρο σε στενή επαφή με τον ιό, αυτό το φαινόμενο είναι πολύ σπάνιο. Έχει προταθεί πως ιικά σωματίδια καλυμμένα από αντισώματα, τα οποία προσδένονται στον υποδοχέα Fc είναι δυνατόν να προκαλέσουν είσοδο του ιού στο εσωτερικό ενός κυττάρου που κανονικά δε μολύνεται (π.χ. μονοκύτταρα και μακροφάγα) [32].

1.3.3 Συνέπειες της μόλυνσης από τον HIV στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Ο HIV αναπαράγεται πιο αποτελεσματικά σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και είναι γνωστό πως η συγκέντρωση του ιού στα σωματικά υγρά αυξάνεται με την εκδήλωση ευκαιριακών λοιμώξεων στον ασθενή. Αυτά τα κύτταρα, πριν μειωθούν σε αριθμό που είναι το τελικό στάδιο της λοίμωξης, το AIDS, έχουν μειωμένη έκφραση της IL-2 και του υποδοχέα IL-2R, του υποδοχέα CD4 και μειωμένη απάντηση σε διάφορα αντιγόνα [1]. Τα μολυσμένα και ενεργοποιημένα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα παράγουν περισσότερους ιούς που μολύνουν άλλα ενεργοποιημένα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος ενεργοποίησης, μόλυνσης, πολλαπλασιασμού του ιού και καταστροφής των κυττάρων [32].

Στην αρχή της λοίμωξης, τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αυξάνονται, λογικά ως αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος προς ισοστάθμιση της μείωσης των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Αργότερα, η μείωσή τους εξηγείται με τη μόλυνση των διπλά θετικών (CD4+CD8+) T κυττάρων που θα ωριμάζαν σε CTLs, αλλά κυρίως από την ανάγκη των CD8+ κυττάρων για διέγερση από τα CD4+ κύτταρα που έχουν μειωθεί [1].

Η δυσλειτουργία των μονοκυττάρων και των μακροφάγων οφείλεται σε έμμεσους λόγους, αφού ο ιός δε μολύνει αυτά τα κύτταρα, και ίσως σε μόλυνση από εναλλακτικά μονοπάτια που δεν αξιοποιούν τον CD4. Τα NK κύτταρα εξαρτώνται από την IL-2 των CD4+ T κυττάρων, γι' αυτό η μείωση της παραγωγής IL-2, μειώνει την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων [1].

Τα B λεμφοκύτταρα παράγουν παράλογα μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων IgG, IgA και IgD, λόγω αυξημένου πολλαπλασιασμού των κυττάρων στους λεμφαδένες. Η πρόσδεση ιικών πρωτεϊνών προκαλεί πολυκλωνικό πολλαπλασιασμό και αυτά τα κύτταρα δεν έχουν σωστή απόκριση σε διάφορα αντιγόνα *in vitro* [1].

Ο ιός δημιουργεί πολλά προβλήματα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και είναι λοιπόν αναμενόμενο το ανοσοποιητικό σύστημα να δυσλειτουργεί. Ανάμεσα στις πολλές δυσλειτουργίες που μπορεί να έχει είναι και η ανικανότητά του να ξεχωρίσει το εαυτό αντιγόνο από το μη εαυτό. Παλαιότερες έρευνες έχουν ανακαλύψει αντισώματα έναντι των αιμοπεταλίων, Τ λεμφοκυττάρων, περιφερικών νευρώνων και πολλών ανθρώπινων κυτταρικών πρωτεϊνών. Αυτή η παραγωγή αυτοαντισωμάτων ίσως οφείλεται στην ύπαρξη ιικών πρωτεϊνών που ομοιάζουν με ανθρώπινες ή στην ύπαρξη ανθρώπινων πρωτεϊνών στην επιφάνεια των ιικών σωματιδίων που απέκτησε ο ιός κατά την απελευθέρωσή του από το κύτταρο-ξενιστή [1].

1.3.4 Αμυντικοί μηχανισμοί των ανθρώπινων κυττάρων έναντι του HIV

Τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν πρωτεΐνες που τα βοηθούν στην άμυνα έναντι της μόλυνσής τους από ιούς, συμπεριλαμβανομένου και του HIV. Αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι η «εσωτερική ανοσία» με πρωτεΐνες που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την ελευθέρωση του ιού, όπως οι APOBEC3, tetherin και SAMHD1. Το ένζυμο APOBEC3G τροποποιεί το RNA μέσω απαμίνωσης της κυτιδίνης σε ουριδίνη. Η tetherin σχηματίζει συνδέσεις μεταξύ πλασματικής μεμβράνης και φακέλου του ιού και εμποδίζει την ελευθέρωσή του. Η SAMHD1 (SAM domain-and HD domain-containing protein 1) μειώνει τη διαθεσιμότητα των NTPs που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη από την RT για τη σύνθεση του cDNA του ιού και παρουσιάζει δραστηριότητα νουκλεάσης. Η άλλη κατηγορία είναι οι πρωτεΐνες που καθορίζουν το εύρος μόλυνσης των ιών. Η πρωτεΐνη TRIM5α (Tripartite motif-containing protein 5 – isoform alpha) εμποδίζει τη μόλυνση ανθρώπινων κυττάρων από τον SIV (Simian immunodeficiency virus) και προκαλεί αποσυναρμολόγηση του καψιδίου [2].

1.3.5 Τα αντισώματα έναντι του HIV

Τα αντισώματα χωρίζονται σε μη-εξουδετερωτικά και εξουδετερωτικά. Τα μη-εξουδετερωτικά αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν μη-λειτουργικά τμήματα του ιού που προβάλλουν στην επιφάνεια τους μολυσμένα κύτταρα και μέσω της ADCC τα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να θανατωθούν μαζί με τον προϊό [70], [71].

Τα εξουδετερωτικά αντισώματα (NAbs) έναντι των ιών είναι αντισώματα με την ικανότητα να προσδένονται στα μολυσματικά ιικά σωματίδια και να εμποδίζουν τη μόλυνση κυττάρων του οργανισμού [72], μέσω της παρεμπόδισης εισόδου του ιού στα κύτταρα ή ενεργοποίησης της ADCC [73]. Για την εξουδετέρωση των ιών απαιτείται τα αντισώματα να προσδένονται σε λειτουργικά μόρια Επν στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου [74]. Όμως η ποσότητα των NAbs είναι μικρή και έτσι ευνοείται η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού. Κατά αυτόν τον τρόπο, NAbs που απομονώνονται από ασθενείς δεν είναι αποτελεσματικά ενάντια στο στέλεχος που κυριαρχεί την περίοδο της δειγματοληψίας.

Τα NAbs συνήθως προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις της γλυκοπρωτεΐνης του ιικού φακέλου. Τα αντισώματα συνήθως προσδένονται στις μεταβλητές περιοχές αυτής της γλυκοπρωτεΐνης και γι' αυτό είναι ειδικά για κάθε στέλεχος του ιού [1]. Στον οργανισμό παράγονται αντισώματα που αναγνωρίζουν την περιοχή πρόσδεσης του ιού με το CD4, τα σάκχαρα που βρίσκονται στην πρωτεΐνη gp120, τις περιοχές V1, V2 και V3, τεταρτοταγείς δομές του τριμερούς Επν, το σημείο πρόσδεσης με κάποιον συνυποδοχέα και τμήματα της gp41 [70]. Τα NAbs μπορούν, επίσης, να προσδένονται σε ιικά αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων και με τη βοήθεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, αυτά τα μολυσμένα κύτταρα καταστρέφονται [75].

Κάποια Nabs έχουν ευρεία ικανότητα εξουδετέρωσης και ετερόλογων στελεχών του ιού. Αυτά ονομάζονται ευρέως εξουδετερωτικά αντισώματα (broadly Neutralizing Antibodies - bNAbs). Τα bNAbs είναι αντισώματα που αναγνωρίζουν πολλά διαφορετικά στελέχη του HIV-1. Εμφανίζονται αρκετά χρόνια μετά από τη μόλυνση και μετά από μία μεγάλη περίοδο αντιγονοπαρουσίας. Επιπροσθέτως, απαιτούνται εκτεταμένες σωματικές μεταλλαγές για να αποκτήσουν την αποτελεσματικότητά τους. [1], [76]. Μία έρευνα σε LTNP που λαμβάνουν θεραπεία έδειξε πως το 1,7 % αυτών είχαν αναπτύξει bNAbs [77], αν και συνήθως οι ασθενείς που έχουν υψηλό ιικό φορτίο αναπτύσσουν bNAbs [78]. Αυτά τα αντισώματα αναγνωρίζουν συνήθως τους πολυσακχαρίτες στις περιοχές V1, V2 και V3 της gp120, την περιοχή πρόσδεσης με το CD4 και την επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ gp120 και gp41 [79].

Έχει παρατηρηθεί πως τα πρώτα αντισώματα που παράγονται κατά την οξεία φάση της λοίμωξης από HIV έχουν μικρή ικανότητα εξουδετέρωσης [80], [81] και τα αντισώματα που παράγονται κατά την χρόνια φάση έχουν πιο ευρεία ικανότητα εξουδετέρωσης [82]. Όμως, ο ιός έχει την ικανότητα να μην επιτρέπει την αναγνώριση των συντηρημένων περιοχών του από τα αντισώματα όπως αναφέρουν οι Klein και Bjorkman [38] και όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 1.5 σε αυτήν την εργασία.

Το πρώτο σημείο πρόσδεσης των αντισωμάτων που αναφέρθηκε παραπάνω, το σημείο πρόσδεσης με το CD4, βρίσκεται στην gp120 και προστατεύεται στερεοχημικά από τα τμήματα V1, V2 και από τις γλυκάνες τους [83]. Ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει αυτήν την περιοχή είναι το b12. Το b12 μπορεί και προσδένεται χωρίς να προκαλέσει σημαντικές δομικές αλλαγές στην gp120. Η ευρεία αποτελεσματικότητα του αντισώματος φαίνεται να οφείλεται σε αυτόν τον λόγο [84]. Άλλα αντισώματα που προσδένονται στην περιοχή πρόσδεσης με το CD4, όπως τα HJ16, VRC01, VRC02 και VRC03, αναγνωρίζουν διαφορετικά αμινοξέα και άρα διαφορετικά στελέχη του HIV και έχουν διαφορετικό εύρος εξουδετέρωσης [70].

Τα αντισώματα που αναγνωρίζουν πρότυπα γλυκοζυλίωσης, όπως το 2G12, έχουν ασυνήθιστες δομές και μάλλον αυτή η ιδιαιτερότητα εξηγεί το ασυνήθιστα μεγάλο εύρος εξουδετέρωσής τους [70]. Το 2G12 έχει διπλό Fab [85]. Μία έρευνα έδειξε πως αντισώματα με παρόμοια λειτουργία με του 2G12 παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες σε κάποιους LTNP [86].

Τα αντισώματα που αναγνωρίζουν την περιοχή V3, η οποία βρίσκεται καλά προστατευμένη δεν έχουν μεγάλη ικανότητα εξουδετέρωσης. Τέτοιο αντίσωμα είναι το 447-52D που αναγνωρίζει μία συντηρημένη περιοχή στη μέση της V3. Η αιτία παραγωγής αυτών των αντισωμάτων ίσως είναι η εντόπιση ελεύθερων τμημάτων του ιού που προκύπτουν από τη λύση των ιών από το ανοσοποιητικό σύστημα [87].

Δεδομένης της μεγάλης ποικιλομορφίας των περιοχών V1 και V2, θα αναμέναμε τα αντισώματα έναντι αυτών των περιοχών να είναι ειδικά μόνο για ιούς του ίδιου ασθενούς. Έχουν όμως απομονωθεί αντισώματα, όπως τα PG9 και PG16, που είναι αποτελεσματικά για τρισδιάστατες δομές που συγκροτούνται από τις V1, V2 και V3 περιοχές. Τα δύο αυτά αντισώματα εξουδετερώνουν το ~80% των γνωστών στελεχών που υπάρχουν [88]. Και σε αυτά τα πολύ αποτελεσματικά αντισώματα παρατηρούνται ασυνήθιστες δομές. Τα δύο αυτά αντισώματα έχουν μεγάλη σε μήκος CDR H3 [89].

Τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τη θέση πρόσδεσης με τον συνυποδοχέα δεν έχουν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης, αφού η θέση αυτή δεν προβάλλεται στο εξωτερικό τμήμα του μορίου, παρά μόνο μετά την πρόσδεση του ιού με το CD4 [90].

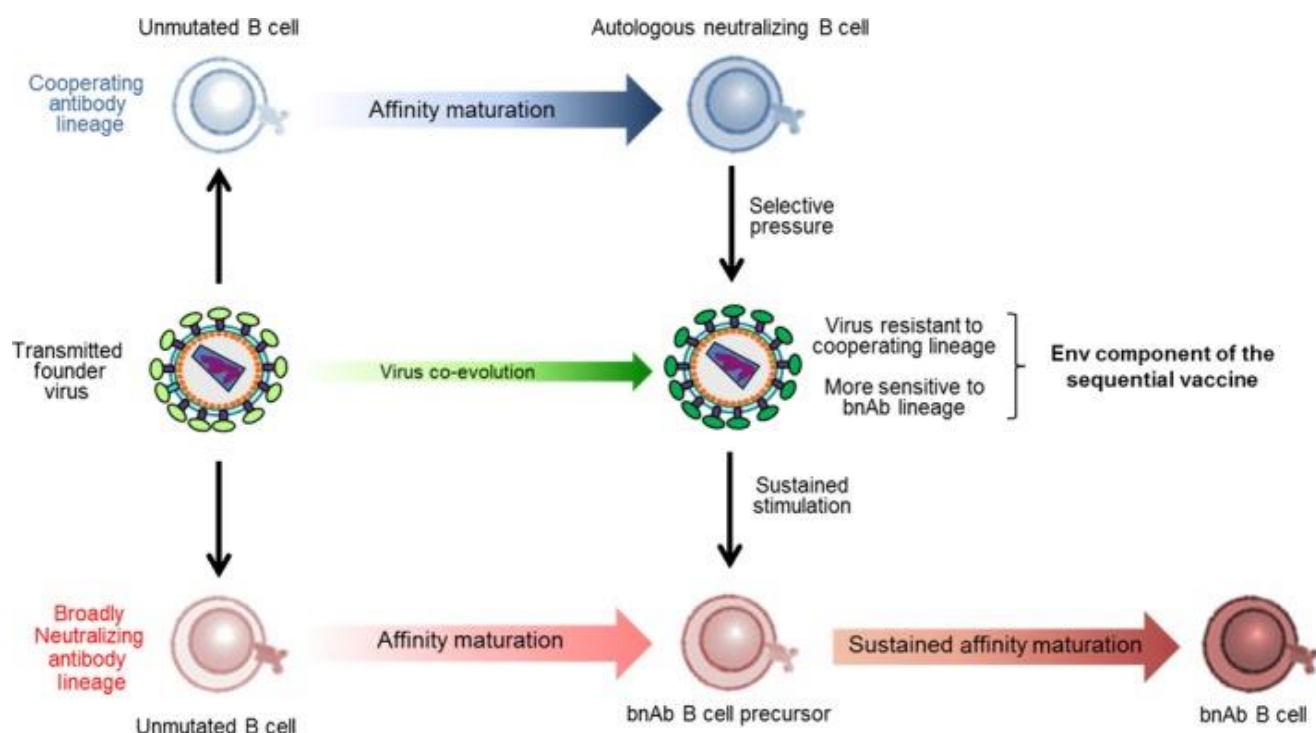
Κάποια bNAbs, όπως το PGT121, εκτός από την εξουδετέρωση ελεύθερων ιικών σωματιδίων, μπορούν να συνεισφέρουν στη θανάτωση μολυσμένων κυττάρων και κατ' επέκταση στη μείωση των ρεζερβουάρ [91].

1.3.6 Η ωρίμανση συγγένειας ως τρόπος δημιουργίας των bNAbs

Τα bNAbs έχουν συσσωρευμένες πολλές σωματικές υπερμεταλλάξεις που δηλώνουν συνεξέλιξη αυτών με τους ιούς. Δύο έρευνες έδειξαν πως τα αντισώματα εξελίσσονται τόσο γρήγορα όσο και ο ιός [92], [93]. Σε μία έρευνα για το αντίσωμα CAP256-VRC26, κάποια μέλη ενός κλώνου B κυττάρων στα αρχικά στάδια αναγνώριζαν τον επίτοπο του ιού ακόμα και με διαφορές σε σημαντικά σημεία του. Αντιθέτως, B κύτταρα που δεν είχαν αυτή την ικανότητα δεν επιβίωσαν. Οι ικές μεταλλαγές προέκυψαν εξαιτίας της πίεσης από τα πρώτα διαφοροποιημένα B κύτταρα [94], αλλά αυτή δεν είναι η μόνη εξήγηση.

Τα πολλά διαφορετικά στελέχη του ιού στον ίδιο ασθενή προκύπτουν και από συνεχόμενη πίεση από δύο ή περισσότερα αντισώματα που συνεξελίσσονται με ερεθίσματα από τους νέους ιούς. Αυτό έγινε πρώτη φορά γνωστό το 2014. Από έναν ασθενή απομονώθηκαν 2 bNAbs, τα CH103 και CH235, που αρχικά δεν είχαν ευρεία ικανότητα εξουδετέρωσης. Οι B κλώνοι και των δύο αντισωμάτων ενεργοποιήθηκαν από τον ιό που μόλυνε τον ασθενή. Το αντίσωμα CH235 προσδενόταν πιο ισχυρά στον ιό. Το αντίσωμα CH235 προκάλεσε την δημιουργία νέων ανθεκτικών σε αυτό στελεχών του ιού. Ο κλώνος CH103 με την αρχικά μικρή ικανότητα πρόσδεσης συγκέντρωσε μεταλλάξεις που τελικά επέτρεψαν στο αντίσωμα να προσδέσει ισχυρά τα νέα στελέχη του ιού (ωρίμανση συγγένειας). Αυτές οι μεταλλάξεις προσέφεραν την ικανότητα πρόσδεσης μιας ποικιλίας στελεχών του ιού και έτσι το αντίσωμα CH103 απέκτησε ευρεία ικανότητα εξουδετέρωσης και ετερόλογων ιών [95]. Στη συνέχεια, το αντίσωμα CH235 με την ωρίμανση συγγένειας απέκτησε μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης ετερόλογων ιών και από το αντίσωμα CH103 [96].

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν πως συνεργαζόμενα αντισώματα οδηγούν τις μεταλλαγές του ιού προς ένα εύρος στελεχών ευαίσθητων στα bNAbs [95]. Αυτή η συνεχόμενη μεταλλαξιγένεση ιού και αντισωμάτων, οδηγεί τα αντισώματα στην αναγνώριση πολλών στελεχών του ιού που τυχαίνει να συμπίπτουν και με άλλων ασθενών. Με άλλα λόγια τα αντισώματα καθοδηγούν τον ιό και ο ιός τα αντισώματα. Η Εικόνα 1.3.6.1 δείχνει διαγραμματικά τη δημιουργία των bNAbs.



Εικόνα 1.3.6.1: Διαγραμματική απεικόνιση της ωρίμανσης συγγένειας του bNAb μέσα από αλληλεπιδράσεις του ιού και δύο NAb [97].

1.4 Το γονίδιο *Env* και τα πεπτίδια gp120 και gp41

1.4.1 Η δομή του γονιδίου *Env* και η πρωτοταγής δομή των gp120 και gp41 του HIV

Το γονίδιο *Env* έχει μήκος 2571 βάσεις και βρίσκεται στη θέση 6225-8795. Κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στον ιικό φάκελο. Αρχικά παράγεται ένα πρόδρομο μόριο που λέγεται gp160 και αποτελείται από 856 αμινοξέα. Το τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί το πολυπεπτίδιο gp120 βρίσκεται στη θέση 6225-7757 και έχει μήκος 1533 βάσεις, ενώ το τμήμα που κωδικοποιεί το πολυπεπτίδιο gp41 ακολουθεί ακριβώς καταρροϊκά της gp120, στη θέση 7758-8795 και έχει μήκος 1038 βάσεις. Κατ' επέκταση, τα πεπτίδια έχουν μήκος 511 και 345 αμινοξικά κατάλοιπα, αντίστοιχα. Στην αρχή της gp120 βρίσκεται και το πεπτιδικό σινιάλο (signal peptide) μήκους 33 αμινοξέων [98].

Ο HIV, όπως και πολλοί άλλοι ιοί, έχει ένα πολυμερές πρωτεΐνης που προεξέχει από τον ιικό φάκελο, γι' αυτό και συχνά αποκαλείται ακίδα (spike). Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη που έχει ένα διαμεμβρανικό τμήμα με το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης να βρίσκεται εξωτερικά του φακέλου. Τέτοιες πρωτεΐνες συνήθως τροποποιούνται μέσω N- ή O-συνδεόμενης γλυκοζυλίωσης. Σε πολλές γλυκοπρωτεΐνες τα σάκχαρα που προστίθεται μετα-

μεταφραστικά αποτελούν το 70% της μάζας τους. Οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες συνήθως είναι ανοσογονικές, αλλά κατέχουν και σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία με το περιβάλλον. Στην περίπτωση του HIV αυτή η γλυκοπρωτεΐνη είναι η πρωτεΐνη gp160 που κωδικοποιείται από το ιικό γονίδιο *Env* [32].

Η πρωτεΐνη gp160 πήρε το όνομά της από το μοριακό της βάρος. Αποτελείται από 845-870 αμινοξικά κατάλοιπα. Στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή τα πολυπεπτίδια gp120 τριμερίζονται μετά τη σύνθεσή τους στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και γλυκοζυλιώνονται σε κατάλοιπα ασπαραγίνης. Κατόπιν, τέμνονται από τις πρωτεάσες furin στο trans Golgi και προκύπτουν οι gp120 και gp41 που παραμένουν συνδεδεμένες μη-ομοιοπολικά. Το εξαμερές μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και μαζί με τις πρωτεΐνες Gag συγκροτούν τα μολυσματικά ιικά σωματίδια. [99]–[101]. Σε αντίθεση με πολλούς ιούς, ο HIV έχει πολύ λίγα πολυμερή gp120/gp41 στον φάκελό του, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων έναντι του πολυμερούς [38]. Το τμήμα gp41 είναι διαμεμβρανικό και η gp120 βρίσκεται εκτός του ιού και είναι μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την gp41 [102].

Το τμήμα gp120 έχει συντηρημένες (conserved) και μεταβλητές (variable) περιοχές. Αυτές ονομάζονται C1 έως C5 και V1 έως V5, αντίστοιχα. Οι μεταβλητές περιοχές αποκαλούνται και variable loops (μεταβλητές θηλίες). Το τμήμα gp120 έχει επίσης και μία υποπεριοχή στην C3 που ονομάζεται CD4-binding loop (θηλιά πρόσδεσης του CD4) που εκεί συνδέεται ο υποδοχέας CD4 των T λεμφοκυττάρων. Οι περιοχές V1, V2, V4, V5 έχουν υποπεριοχές που ονομάζονται υπερμεταβλητές (hypervariable), επειδή σε αυτές παρατηρούνται ακόμα πιο συχνά μεταλλάξεις. Η περιοχή V1 βρίσκεται στα νουκλεοτίδια 391 - 468 του γονιδίου *Env* (ή 6615 - 6692 του ολικού γονιδιώματος του Hxb2) και έχει μήκος 78 βάσεων. Η περιοχή V2 βρίσκεται αμέσως καταρροϊκά της V1 στα νουκλεοτίδια 469 - 588 του γονιδίου *Env* και έχει μήκος 120 βάσεων. Η περιοχή V3 βρίσκεται στα νουκλεοτίδια 886 - 990 του γονιδίου *Env* και έχει μήκος 105 βάσεων. Η περιοχή V4 βρίσκεται στα νουκλεοτίδια 1153 - 1254 του γονιδίου *Env* και έχει μήκος 102 βάσεων. Η περιοχή V5 βρίσκεται στα νουκλεοτίδια 1381 - 1413 του γονιδίου *Env* και έχει μήκος 33 βάσεων. Η περιοχή *CD4-binding loop* αποτελεί μέρος της C3 περιοχής και βρίσκεται στα νουκλεοτίδια 1090 - 1122 του γονιδίου *Env* και έχει μήκος 33 βάσεων. Οι θέσεις των περιοχών φαίνονται στην Εικόνα 1.4.1.1 [103].

Οι μεταβλητές περιοχές (variable regions) της πολυπεπτιδικής αλυσίδας gp120 βρίσκονται στις παρακάτω θέσεις. Η περιοχή V1 βρίσκεται στις θέσεις αμινοξέων 131 - 156 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της gp120 και έχει μήκος 26 αμινοξικών καταλοίπων. Η περιοχή V2 βρίσκεται ακριβώς μετά την V1 στις θέσεις αμινοξέων 157 - 196 της πολυπεπτιδικής

αλυσίδας της gr120 και έχει μήκος 40 αμινοξικών καταλοίπων. Η περιοχή V3 βρίσκεται στις θέσεις αμινοξέων 296 - 330 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της gr120 και έχει μήκος 35 αμινοξικών καταλοίπων. Η περιοχή V4 βρίσκεται στις θέσεις αμινοξέων 385 - 418 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της gr120 και έχει μήκος 34 αμινοξικών καταλοίπων. Η περιοχή V5 βρίσκεται στις θέσεις αμινοξέων 461 - 471 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της gr120 και έχει μήκος 11 αμινοξικών καταλοίπων. Η περιοχή CD4-binding loop βρίσκεται στις θέσεις αμινοξέων 364 - 374 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της gr120 και έχει μήκος 11 αμινοξικών καταλοίπων [102].

		*	10	*	20	*	30	*	40	*	50	*	60	*	70	*	80	*	90	*	100
1	atgagagtggaaggagaaatatcagcacttgttgagatgggggtggagatggggcaccatgctccttgggatgttgatgatctgtagtgctacagaaaaat																				
101	tgtgggtcacagtgctattatgggtacctgtgtggaagggaagcaaccaccactctattttgtgcacagatgctaaagcatatgatacagaggtacataa																				
201	tgtttgggcccacacatgcctgtgtaccacagaccccacccacacaagaagtagtattggtaaatgtgacagaaaaattttaacatgtggaaaaatgacatg																				
301	gtagaacagatgcatgaggtatataatcagtttatgggatcaagcctaaagccatgtgtaaaaattaaacccactctgtgttagtttaagtgcactgatt																				V1
401	tgaagaatgatactaataccaatagtagtagcgggagaatgataatggagaaaggagagataaaaaactgctctttcaatatcagcacaaagcataaagg																				V2
501	taagggtgcagaaagaatagcattttttataaacttgatataataccaatagataatgatactaccagctataaagttgacaagttgttaacacctcagtc																				
601	attacacagggcctgtccaaagggtatcctttgagccaattcccatataattttgtgcccggctgggttttgcgattctaaaaatgtaataaagacgttca																				
701	atggaacaggaccatgtacaaatgtcagcacagtagacaatgtacacatggaattaggccagtagtatcaactcaactgctgttaaatggcagctctagcaga																				
801	agaagaggtagtaattagatctgtcaatttcacggacaatgtctaaaccataatagtacagctgaacacatctgtagaatttaattgtacaagacccaac																				V3
901	aaacaatacaagaaaaagaatccgtatccagagaggaccaggagagcattttgttacaataggaaaaataggaaatatgagacaagcacattgttaacatta																				
1001	gtagagcaaaatggaataaacacttttaaacagatagctagcaaatgaagagaacaatttggaataataaaaacaataatctttaagcaa																				
1101	ggaccacagaaattgttaacgcacagtttttaattgtggagggaattttttctactgttaattcaacacaaactgtttaatagtagtacttgggttaatagtagtctgg																				V4
1201	agtactgaaggggtcaaataaacactgaaggaagtgcacacaatcacccctcccatgcagaataaaaacaaattataaacatgtggcagaaaagtaggaaaagcaa																				
1301	tgtatgcccctcccatcagtggaacaaattagatgttcatcaaatattacagggctgctattacaagagatgggtgtaattagcaacaatgagtcggagat																				V5
1401	cttcagacctggaggagagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattagggagtagcaccaccacaag																				
1501	gcaaagagaagagtggtgcaagagaaaaaagagcagtggggaatagggagctttgttcccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcct																				
1601	caatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgagcagcagacaacatttgctgagggctattgagggcgaacagcatctgttgca																				
1701	actcacagctctggggcatcaagcagctccagggaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgtctctgga																				
1801	aaactcatttgcaccactgctgtgcttgggaatgctagtgtggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgaggacagag																				
1901	aaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggc																				
2001	aagtttgtggaatttggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtagggaggtctggtaggtttaaagaatagtttttgc																				
2101	gtactttctatagtgaatagattagggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacccctcccaaccccgaggggagccgacagcccgaggaatag																				
2201	aagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgatttagtgaacggatccttggcacttatctgggacgactctgocggagcctgtgocctctcag																				
2301	ctaccaccgcttgagagacttactcttgattgttaacgaggattgttggaacttctgggacgcaggggggtgggaagccctcaaatattgggtggaatctccta																				
2401	cagtattggagtcaggaaactaaagaatagtgctgttagcttctgctcaatgccacagccatagcagtagctgaggggacagatagggttatagaagtagtac																				
2501	aaggagctctgtagagctattcgccacatacctagaagaataagacaggggcttggaaaggattttgctataa																				

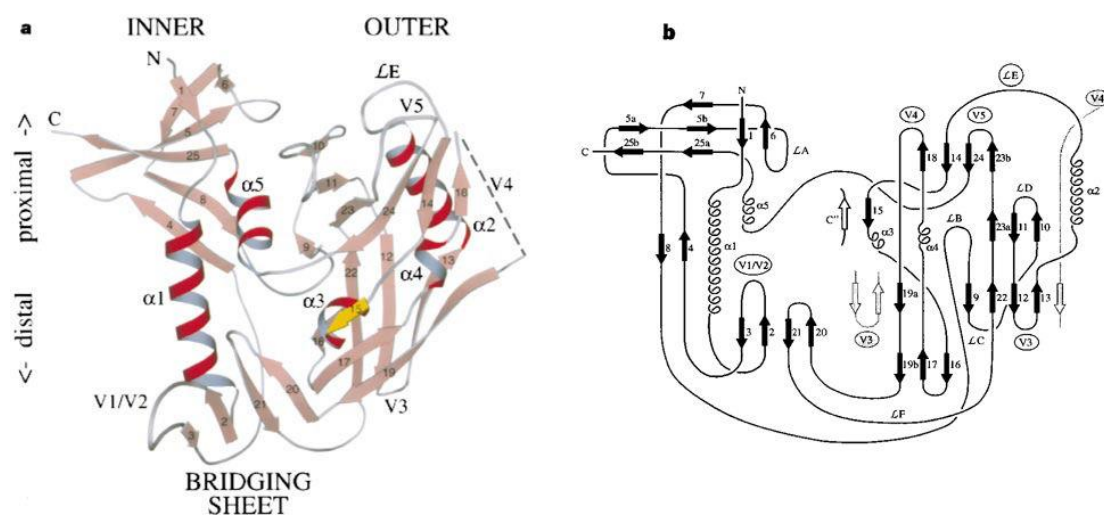
Εικόνα 1.4.1.1: Το γονίδιο *Env* του στελέχους Hxb2 και οι μεταβλητές του περιοχές. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται η CD4-binding loop.

1.4.2 Η τριςδιάστατη δομή των τμημάτων gr120 και gr41

Το πρόδρομο πολυπεπτίδιο gr160 τριμερίζεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή και κατόπιν αποκόπτεται από πρωτεάσες της οικογένειας furin προς σχηματισμό των gr120 και gr41, τα οποία συνδέονται μη-ομοιοπολικά πριν το σύμπλοκο φτάσει στην πλασματική μεμβράνη. Το τριμερές σύμπλοκο gr120/gr41 πραγματοποιεί στερεοδιαταξικές αλλαγές κατά τη σύνδεση με τον υποδοχέα του, γεγονός που δυσχεραίνει την ανακάλυψη της δομής του [100]. Η αλληλεπίδραση με τον CD4 οδηγεί σε αλλαγές που δημιουργούν ή/και αποκαλύπτουν το σημείο πρόσδεσης με τους συνυποδοχείς [104]. Σε αυτό συμβάλλει και η

υψηλή γλυκοζυλίωσή του με μέσο όρο 81 θέσεις γλυκοζυλίωσης ανά τριμερές. Μία ιδέα για την σταθεροποίηση του συμπλόκου είναι η δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού που αποκαλείται SOS και ενώνει τα πεπτίδια gr120 και gr41. Ο δεσμός SOS σχηματίζεται μεταξύ του καταλοίπου 501 της gr120 και 605 της gr41, με βάση την αριθμηση Hxb2 [100]. Ο καθορισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου δεν είναι εύκολη υπόθεση. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αποπειραθεί να την εξακριβώσουν χωρίς όμως να συμφωνούν τα αποτελέσματά τους. Μία συνηθισμένη πρακτική είναι η κρυσταλλοποίηση του συμπλόκου ενώ είναι δεσμευμένο σε κάποιο NAb.

Με βάση τα αποτελέσματα του Kwong και των συνεργατών του [104], το πεπτίδιο gr120 έχει έναν πυρήνα ελλειψοειδούς σχήματος με διαστάσεις 50 x 50 x 25 Å που αποτελείται από 25 β-αλυσίδες, 5 α-έλικες και 10 βρόγχους. Το πεπτίδιο gr120 χωρίζεται σε δύο επικράτειες (domains) και κάποια τμήματα που εξέχουν από το κύριο σχήμα. Η εσωτερική επικράτεια έχει ένα πακέτο 2 α-ελίκων με 2 β-αλυσίδες που στην άκρη του έχει ένα β-σάντουιτς 5 β-αλυσίδων και στο άλλο άκρο προεξέχουν οι περιοχές V1 και V2. Η εξωτερική επικράτεια αποτελείται από ένα διπλό βαρέλι σε τέτοια διαμόρφωση ώστε να είναι παράλληλο με τους άξονες της εσωτερικής επικράτειας. Το ένα αποτελείται από 6 β-αλυσίδες και των δύο κατευθύνσεων και το άλλο από 7 αντιπαράλληλες β-αλυσίδες. Μία γραφική απεικόνιση φαίνεται στην Εικόνα 1.4.2.1.



Εικόνα 1.4.2.1: Απεικόνιση των δύο επικρατειών της υπομονάδας gr120. (A) Τρισδιάστατη απεικόνιση. (B) Διαγραμματική απεικόνιση. [104]

Με βάση τα αποτελέσματα του Julien και των συνεργατών του [100], το πεπτίδιο gr41 έχει 3 α-έλικες με μήκος ~30 Å παράλληλες στον άξονα του τριμερούς και κάθετες στην ιική μεμβράνη. Μία ακόμα κοντή α-έλικα εξέχει από το κύριο σώμα.

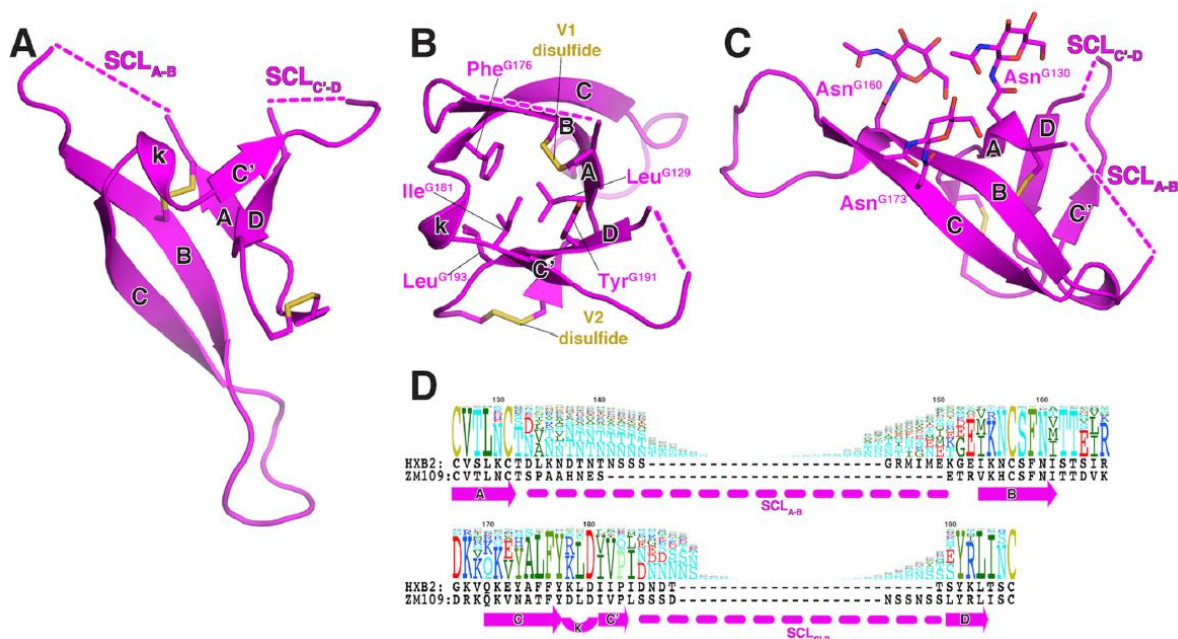
Το τριμερές gp120/gp41 είναι στενά πακεταρισμένο, ειδικά η gp41, αλλά με μικρά ανοίγματα στην κορυφή του και στην κορυφή των κεντρικών α-ελίκων της gp41. Οι υπομονάδες gp120 παραμένουν κοντά από αλληλεπιδράσεις των V1, V2 και V3 περιοχών. Οι κεντρικές α-έλικες της gp41 σταθεροποιούν την επαφή μεταξύ gp120 και gp41 [100].

1.4.3 Οι περιοχές V1 και V2 της gp120

Η δομή, η τοποθεσία και η αμινοξική αλληλουχία των V1 και V2 παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο του ιού (αν και δεν είναι σημαντικές για τη μολυσματικότητα του ιού), την ανθεκτικότητα στην εξουδετέρωση και στην αλληλεπίδραση με ιντεγκρίνες [105].

Οι περιοχές V1 και V2, αν και μεταβλητές, έχουν ορισμένες διατηρημένες περιοχές [105]. Οι περιοχές V1 και V2 του τμήματος gp120 βρίσκονται στην κορυφή του τριμερούς και συμβάλλουν στη σταθεροποίηση [100]. Η περιοχή των δύο διαδοχικών περιοχών V1 και V2 έχει συνήθως δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο δεσμός της V1 περιοχής σχηματίζεται μεταξύ Cys131 και Cys157. Ο δεσμός της V2 περιοχής σχηματίζεται μεταξύ Cys126 και Cys196 και περικλείει τον V1 δεσμό. [106].

Ο Pan και οι συνεργάτες του [83] ανακάλυψαν τη δομή της V1V2 περιοχής του στελέχους ZM109 του HIV-1 προσδεμένη με ένα αντίσωμα. Η περιοχή V1V2 σχηματίζει μία δομή κυλινδρικού β-βαρελίου με 5 β-αλυσίδες, δομή που είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τις λειτουργίες της περιοχής. Οι αλυσίδες ονομάστηκαν A, B, C, C', D. Μεταξύ των αλυσίδων A και B βρίσκεται η υπερμεταβλητή περιοχή της V1 και μεταξύ των αλυσίδων C' και D η υπερμεταβλητή περιοχή της V2. Μεταξύ των αλυσίδων C και C' βρίσκεται ένας αρμός (kink) που ομοιάζει με α-έλικα. Το βαρέλι έχει έναν υδρόφοβο πυρήνα στον οποίο βρίσκονται τα υδρόφοβα αμινοξέα. Σε αυτόν τον πυρήνα βρίσκεται και η Ile181 (με βάση την αρίθμηση του στελέχους ZM109) που έχει συσχετισθεί με αυξημένη αποτελεσματικότητα του εμβολίου κατά την κλινική δοκιμή RV144 [107]. Στο εξωτερικό του προβάλλουν τα σάκχαρα που είναι συνδεδεμένα πάνω στα αμινοξέα. Επίσης, έχει μία θέση πρόσδεσης με ιντεγκρίνη. Η θέση πρόσδεσης με ιντεγκρίνη σχηματίζεται από αμινοξέα της περιοχής της κάμψης και της αλυσίδας C'. Η Εικόνα 1.4.3.1 απεικονίζει τη δομή της V1V2 περιοχής που ανακάλυψε αυτή η ερευνητική ομάδα [83].



Εικόνα 1.4.3.1: (A) Εμπρόσθια απεικόνιση της V1V2 περιοχής. (B) Κορυφαία απεικόνιση της V1V2 περιοχής. (C) Πλάγια απεικόνιση της V1V2 περιοχής. (D) Αμινοξικές αλληλουχίες δύο πρότυπων ιών HIV-1 και η συχνότητα των αμινοξέων σε κάθε θέση [83].

Ο Yuan και οι συνεργάτες του απέδειξαν πως αφαιρώντας τις περιοχές V1 και V2, ο ιός χάνει την ικανότητα μόλυνσής του και αν αφαιρεθεί μόνο η V2, τότε χάνεται το 69% της μολυσματικότητάς του [108]. Η περιοχή V1V2 κρύβει μερικώς δομικά την περιοχή πρόσδεσης με τον CD4 και την περιοχή V3 [83]. Μετά την πρόσδεση με τον CD4, μία αλλαγή στη δομή εκτοπίζει τις περιοχές V2 και V3 και ο CCR5 του κυττάρου μπορεί να προσδέσει την περιοχή V1V2 [104]. Συνήθως η έλλειψη της περιοχής V2 αυξάνει την ευαισθησία του ιού σε αντισώματα που αναγνωρίζουν την περιοχή πρόσδεσης με το CD4, ενώ έλλειψη της V1 τη μειώνει [109]. Σε πειράματα του Haaland και των συνεργατών του φάνηκε πως αλλαγές στην αλληλουχία της V2 που ευνοούν την ανοσοδιαφυγή, εμποδίζουν την μετάδοση [110]. Ο γενικός κανόνας δείχνει πως μικρότερες σε μήκος αλληλουχίες των V1 και V2 οδηγούν σε μεγαλύτερη ευαισθησία σε εξουδετερωτικά αντισώματα [111]–[113]. Αλλαγές στην περιοχή V1V2 έχουν επίσης επιπτώσεις στο βαθμό αποτελεσματικότητας των NAb που αναγνωρίζουν επιτόπους εκτός αυτής της περιοχής, γεγονός που δηλώνει πως αυτή η περιοχή είναι γενικός ρυθμιστής της ευαισθησίας στα NAb, πιθανώς λόγω αποκάλυψης επιτόπων που εναλλακτικά καλύπτονται στερεοχημικά από την περιοχή V1V2 [109], [114].

1.5 Γλυκοζυλίωση

1.5.1 Η γλυκοζυλίωση της gp120

Στην N-συνδεόμενη γλυκοζυλίωση, ο πολυσακχαρίτης συνδέεται σε ένα άτομο αζώτου μιας Asn που αποτελεί μέρος ενός μοτίβου Asn-X-Ser/Thr (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός της Pro). Το 70% των περιπτώσεων N-γλυκοζυλίωσης συμβαίνει σε β-στροφές [115], ενώ το 10% και το 20% σε α-έλικες και β-φύλλα, αντίστοιχα [116]. Τα σάκχαρα αποτελούν τη μισή μάζα των gp120 πρωτεϊνών και καλύπτουν μεγάλο μέρος της επιφάνειάς τους [99].

Κάποιες PNGS (Potential N-Glycosylation Sites) είναι διατηρημένες σε όλες τις ομάδες του HIV-1. Εντούτοις, υπάρχει σημαντική ποικιλομορφία στην αλληλουχία και τη γλυκοζυλίωση της gp120 ακόμα και στον ίδιο ασθενή με την πάροδο του χρόνου [117]. Αυτή η ποικιλομορφία μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοδιαφυγή, αφού οι εκάστοτε πολυσακχαρίτες μπορεί να αποτελούν μέρος επιτόπου κάποιου αντισώματος [118]. Ο αριθμός των PNGS εξαρτάται από αντικαταστάσεις, προσθήκες, ελλείψεις που συμβαίνουν στις μεταβλητές περιοχές [119].

Το ετεροδιμερές gp120/gp41 έχει 18-33 και κατά μέσο όρο 25 θέσεις γλυκοζυλίωσης (Potential N-Glycosylation Sites, PNGS) [120]. Ο μηχανισμός γλυκοζυλίωσης είναι ο ίδιος σε κάθε τύπο ανθρώπινου κυττάρου [121].

Οι N-συνδεόμενοι πολυσακχαρίτες είναι απαραίτητοι για τη σωστή αναδίπλωση της gp120 και των δομικών επαναδιευθετήσεων της που προκύπτουν κατά την πρόσδεση με τον υποδοχέα CD4 και τον συνυποδοχέα που προκαλούν την ένωση των δύο μεμβρανών και την είσοδο του HIV στο κύτταρο [122].

Η πυκνή διάταξη των πολυσακχαριτών στην gp120 προστατεύει τον ιό από τα NAbs [123]. Έρευνες έχουν δείξει ότι η απογλυκοζυλίωση προκαλεί αύξηση της ευαισθησίας στα αντισώματα [124]. Εντούτοις, πολλά bNAbs εξαρτώνται από τους πολυσακχαρίτες για την αποτελεσματικότητά τους [125], [126]. Μάλιστα κάποια αναγνωρίζουν αυτούς του πολυσακχαρίτες [126]. Ο ιός χρησιμοποιεί πολυσακχαρίτες του ξενιστή με χαμηλή ανοσογονικότητα. Σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον ιό για αρκετά χρόνια παράγονται bNAbs που μπορούν να ξεπεράσουν αυτή την ασπίδα έχοντας ασυνήθιστη αρχιτεκτονική, όπως το αντίσωμα PGT128 με μεγάλες αλυσίδες HCDR3 που διαπερνούν την «ασπίδα» των σακχάρων και δημιουργούν επαφές πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [127] και το αντίσωμα 2G12 που αποτελείται από σύμπλοκο με δύο Fab [85].

Οι πολυσακχαρίτες της gp120 αλληλεπιδρούν με μεγάλο εύρος λεκτινών κατά τη μόλυνση, προωθώντας την εξάπλωση του ιού ή την ανοσολογική απόκριση. Για παράδειγμα, το μόριο προσκόλλησης DC-SIGN των δενδριτικών κυττάρων συνδέεται με πολυσακχαρίτες του HIV και ο ιός προσκολλάται στα δενδριτικά κύτταρα και μετά μέσω επικοινωνίας αυτών με τα CD4+ T κύτταρα, ο ιός μολύνει τα τελευταία [128]. Ένα αντίθετο παράδειγμα είναι η Langerin που εκφράζεται από τα κύτταρα Langerhans. Όταν ο ιός προσκολλάται στα κύτταρα Langerhans, τα κύτταρα τον ενδοκυτταρώνουν και τον καταστρέφουν [129].

Σε περιπτώσεις που δε συμβαίνει γλυκοζυλίωση ή χάνονται αργότερα οι πολυσακχαρίτες, το ανοσοποιητικό αναγνωρίζει ισχυρά ανοσογονικούς επιτόπους και παράγει αντισώματα για επιτόπους που σε λειτουργικούς ιούς δεν υπάρχουν, γεγονός που οδηγεί σε αντισώματα με μικρή έως καθόλου ικανότητα αναγνώρισης του λειτουργικού Επν [87], [130].

1.5.2 Η γλυκοζυλίωση των περιοχών V1 και V2 της gp120

Ο Tian και οι συνεργάτες [131] του παρατήρησαν πως οι Cys που σχηματίζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς βρίσκονται σχεδόν πάντα κοντά σε θέσεις γλυκοζυλίωσης των μεταβλητών περιοχών. Επίσης, παρατήρησαν πως οι απογλυκοζυλιωμένες περιοχές V1 και V2, έχουν την τάση να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές, γεγονός που δηλώνει ότι η γλυκοζυλίωση αυξάνει την ανοργάνωτη διαμόρφωση των περιοχών αυτών. Παρ' όλ' αυτά, διατηρεί τους ήδη υπάρχοντες δευτεροταγείς σχηματισμούς και μειώνει την ευκαμψία.

Σε πειράματα του Wang και των συνεργατών του [132]δείχθηκε πως η μετάλλαξη μόνο μιας θέσης γλυκοζυλίωσης έχει επιπτώσεις στη μολυσματικότητα του ιού. Δοκίμασαν 3 στελέχη του HIV-1 (FE, YU-2, Sc19-15) και είδαν ότι η αλλαγή της Asn που γλυκοζυλιώνεται, στις αμινοξικές θέσεις 133, 142, 156, 160 και 181 (η αρίθμηση γίνεται με βάση το στέλεχος FE) που ανήκουν στην περιοχή V1V2, προκαλεί μείωση της μολυσματικότητας ή μηδενισμό της. Επίσης, τα αντισώματα PG9 και PG16 που αναγνωρίζουν επιτόπους στην V1V2 είχαν μικρότερη αποτελεσματικότητα έναντι των μεταλλαγμένων ιών. Στοχευμένες μεταλλαγές στις PNGS της περιοχής V1V2 τροποποιούν το βαθμό πρόσδεσης αντισωμάτων στην πρωτεΐνη Επν [133].

Σε μία έρευνα 9 ασθενών που σύγκρινε τη γλυκοζυλίωση των ιών κατά την οξεία φάση και τη χρόνια φάση, προέκυψε αύξηση των PNGS στην V1V2 κατά τουλάχιστον 1 θέση σε 4 ασθενείς, σε άλλους 4 ασθενείς δεν υπήρχε αύξηση και σε έναν ασθενή υπήρξε απώλεια 1 PNGS [134].

Συγκριτική μελέτη μεταξύ tier 2 και tier 3 ιών, έδειξε πως οι τελευταίοι έχουν κατά μέσο όρο 4 αμινοξέα περισσότερα και 1 περισσότερη PNGS στην περιοχή V1V2 [135]. Στην ίδια μελέτη πειράματα έδειξαν πως μεγαλύτερες σε μήκος περιοχές V1 και V2 με περισσότερες PNGS μειώνουν την ευαισθησία του ιού σε αντισώματα που αναγνωρίζουν την CD4-συνδεόμενη περιοχή. Αυτό υποδηλώνει ότι μεγαλύτερες και πιο έντονα γλυκοζυλιωμένες V1 και V2 περιοχές αποκρύπτουν την CD4-συνδεόμενη περιοχή [135]. Πολλοί ασθενείς παράγουν τέτοια αντισώματα [136] και φαίνεται λογικό να συμβαίνει μία φυσική επιλογή ιών που να ευνοεί τους ιούς με μεγάλες μεταβλητές περιοχές V1 και V2. Επίσης, μπορεί να γίνεται και επιλογή ισχυρά συνδεόμενων στον CD4 ιών, λόγω αυξημένης μολυσματικότητας, και ως εξισορρόπηση να γίνεται δεύτερη επιλογή για ιούς που αποκρύπτουν τη νέα και ισχυρότερα συνδεόμενη στον CD4 περιοχή. Αυτό γεννά το ερώτημα, αν δημιουργηθεί ένα εμβόλιο με κάποιους επιλεγμένους επιτόπους, λόγω των συνεχόμενων πιέσεων που θα δημιουργούν νέα πρότυπα, θα υπάρχουν ακόμα αυτοί οι επίτοποι όταν θα κυκλοφορήσει το εμβόλιο [135];

Η γλυκοζυλίωση των περιοχών V1 και V2 επηρεάζει και τον τροπισμό του ιού HIV-1. Μεταλλαγές κοντά στις δύο αυτές μεταβλητές περιοχές μεταβάλλουν την ικανότητα του ιού να προσδένεται στον συνυποδοχέα CCR5 ή στον CXCR4 [137].

1.6 Σκοπός της εργασίας

Το ανοσοποιητικό σύστημα παράγει συνεχώς νέα αντισώματα για διαφορετικούς επιτόπους του ιού, αφού ο ιός μεταλλάσσεται αδιάκοπα. Η μεγαλύτερη σε μήκος περιοχή V1V2 με περισσότερες PNGS αποτελεί εμπόδιο για τα περισσότερα εξουδετερωτικά αντισώματα. Οι σκοποί της εργασίας είναι:

- να αξιολογηθεί η επίδραση της γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης *Env* στην παθογένεια του HIV σε σχέση με άλλους ρετροϊούς,
- ο συσχετισμός της αποτελεσματικότητας των αντισωμάτων των ασθενών με το ποσοστό γλυκοζυλίωσης της περιοχής V1V2 των ιών τους μέσω δοκιμασιών εξουδετέρωσης του Hxb2 και αλληλούχισης του γονιδίου *Env* κάθε ιού και
- η εξέταση της υπόθεσης πως ιοί ασθενών με υψηλά ποσοστά γλυκοζυλίωσης της V1V2 παράγουν αποτελεσματικότερα αντισώματα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου ρετροϊών με χρήση του γονιδίου *Env*

Η άντληση των αλληλουχιών του γονιδίου *Env* έγινε από τη βάση δεδομένων Nucleotide του NIH των ΗΠΑ. Χρησιμοποιήθηκαν έως 10 εκπροσωπευτικές αλληλουχίες από 11 διαφορετικούς ρετροϊούς και 2 στελέχη του SIV από τα οποία πιστεύεται ότι προέκυψαν οι HIV. Η λίστα των ρετροϊών παρατίθεται στον Πίνακα 2.1.1.

Πίνακας 2.1.1: Λίστα των ρετροϊών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων μαζί με τον αριθμό των αντιπροσωπευτικών αλληλουχιών τους.

Ρετροϊοί	Αριθμός αλληλουχιών
Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)	10
Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2)	10
Human T-Lymphotropic Virus type I (HTLV-I)	10
Human T-Lymphotropic Virus type II (HTLV-II)	10
Human Endogenous Retrovirus K (HERV-K)	4
Bovine Leukemia Virus (BLV)	10
Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)	10
Bovine Foamy Virus (BFV)	9
Simian Foamy Virus chimpanzee (SFVcpz)	5
Murine Leukemia Virus (MLV)	8
Rous Sarcoma Virus (RSV)	5
Simian Immunodeficiency Virus chimpanzee (SIVcpz)	10
Simian Immunodeficiency Virus sooty mangabey monkey (SIVsmm)	8
Συνολικά	109

Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης του γονιδίου *Env* χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των δέντρων με τους εκπροσώπους των ιικών ειδών. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα MUSCLE που εμπεριέχεται στο πακέτο MEGA-X 10.0.5. Η δημιουργία των δέντρων έγινε με το πακέτο MEGA-X 10.0.5 χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Neighbor-Joining (NJ) και Maximum-Likelihood (ML).

Το δέντρο που επιλέχθηκε μέσω της NJ μεθόδου είναι αυτό με το υψηλότερο άθροισμα μήκους των κλάδων [138]. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις για ομοιότητες μεταξύ όλων των πιθανών δέντρων (2000 bootstraps) [139]. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με το μοντέλο Poisson [140]. Τα αμινοξέα αμφιβόλου ποιότητας αφαιρέθηκαν με τη μέθοδο pairwise deletion. Συνολικά αξιοποιήθηκαν 1228 αμινοξέα από 109 αλληλουχίες [141].

Το δέντρο ML κατασκευάστηκε με τη μέθοδο ML και το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton [142]. Τα αρχικό δέντρο αποκτήθηκε εφαρμόζοντας αλγορίθμους NJ και BioNJ σε ένα σύνολο αποστάσεων ζευγών υπολογισμένο με το μοντέλο JTT και μετά επιλέχθηκε το δέντρο με την υψηλότερη πιθανότητα. Τα αμινοξέα αμφιβόλου ποιότητας αφαιρέθηκαν με τη μέθοδο pairwise deletion. Συνολικά αξιοποιήθηκαν 1228 αμινοξέα από 109 αλληλουχίες [141].

2.2 Σύγκριση της πρωτεΐνης του γονιδίου *Env* διάφορων ρετροϊών με βάση το επίπεδο της N-συνδεόμενης γλυκοζυλίωσης

Αξιοποιήθηκαν οι ίδιες αλληλουχίες με τα φυλογενετικά δέντρα και με τη χρήση του διαδικτυακού προγράμματος N-GlycoSite (Τελευταία τροποποίηση: 13.09.2018) [117], εντοπίστηκαν οι πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης (PNGS). Η γλυκοζυλίωση συμβαίνει στην ακολουθία αμινοξέων Asn-X(εκτός Pro)-Ser/Thr. Έστερα, υπολογίστηκε το ποσοστό των PNGS της κάθε αλληλουχίας με βάση τον μαθηματικό τύπο:

$$PNGS (\%) = 100 * \frac{\text{πλήθος PNGS}}{\text{πλήθος αμινοξέων}}$$

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την κατασκευή του γραφήματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.01. Έγινε μη παραμετρικό Kruskal-Wallis τεστ με Dunn's post-hoc τεστ, αφού τα ποσοστά των αλληλουχιών των HTLV-II, SFVcpz, MLV, MMTV δεν είχαν κανονική κατανομή.

2.3 Κλινική Δοκιμή

Τα δείγματα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την κλινική δοκιμή «Πρόοδος της HIV λοίμωξης με χορήγηση χαμηλής δόσης κορτικοστεροειδών (ProCort1)» με κωδικό NCT01299948 στην ιστοσελίδα www.clinicaltrials.gov και πραγματοποιήθηκε στη Μουάνζα της Τανζανίας. Στην κλινική δοκιμή πήραν μέρος άντρες και γυναίκες που δεν είχαν δεχτεί αντιρετροϊκή θεραπεία. Σε κάποια άτομα χορηγούνταν 5 g Prednisolone ημερήσια και τα υπόλοιπα δεχόντουσαν ένα όμοιο placebo χάπι. Η πρεδνιζολόνη (prednisolone) είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και συγκεκριμένα είναι ένα συνθετικό παράγωγο της κορτιζόλης. Η πρεδνιζολόνη έχει κυρίως αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες.

2.4 Υπολογισμός ιικού φορτίου

Ο υπολογισμός του ιικού φορτίου των ασθενών έγινε από το διαγνωστικό τμήμα του Institut für Virologie und Immunbiologie του Julius-Maximilians-Universität Würzburg από δείγματα που λήφθηκαν 1 χρόνο μετά την έναρξη της κλινικής δοκιμής.

2.5 Παρασκευή θρεπτικού υλικού κυττάρων

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

RPMI-1640 (Gibco)

Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco)

Penicillin/Streptomycin (10^4 U/mL πενικιλίνης, 10^4 µg/mL στρεπτομυκίνης) (Gibco)

Γυάλινες πιπέτες των 10 mL (BRAND)

Μικροπιπέτα 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη μικροπιπέτας 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

Παρασκευή διαλύματος 90% RPMI-1640, 10% FCS και 0,1% μίγμα αντιβιοτικών Penicillin & Streptomycin. Για παράδειγμα, 500 mL RPMI-1640, 55,5 mL FCS και 0,5 mL Pen/Strep.

2.6 Παρασκευή αντισώματος anti-p24 έναντι του HIV

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Κυτταρική σειρά ποντικού Anti-HIV-1 p24 Hybridoma 183-H12-5C ($4,7 \times 10^6$ κυτ/μL) (NIH AIDS Reagent Program)

RPMI-1640 (Gibco)

FCS (Gibco)

Penicillin/Streptomycin (10^4 U/mL πενικιλίνης, 10^4 µg/mL στρεπτομυκίνης) (Gibco)

Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας T75 (Greiner-Bio One)

Σωλήνες Falcon 15mL (Greiner-Bio One)

Γυάλινες πιπέτες των 10 mL (BRAND)

Μικροπιπέτα 200-1000 μ L (Gilson Pipetman)

Ρύγχη μικροπιπέτας 1000 μ L (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

1. Καλλιέργεια 1 mL των κυττάρων σε μία φιάσκα T75 με 10 mL θρεπτικού υλικού RPMI-1640 με 15% FCS και 0,1% Pen/Strep. ($\sim 0,5 \times 10^6$ κυτ/mL)
2. Επώαση 2 ημερών στους 37°C μέχρι η συγκέντρωση των κυττάρων να γίνει 2×10^6 κυτ/mL
3. Τα αιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα falcon των 15 mL και φυγοκεντρείται στις 1500 rpm για 5 λεπτά.
4. Το εναιώρημα συλλέγεται και είναι έτοιμο για χρήση σε πρωτόκολλο χρώσης κυττάρων για κυτταρομετρία ροής.

2.7 Καλλιέργεια HIV στην κυτταρική σειρά H9

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Φυγόκεντρος (Hettich Rotanta 460R)

Επωαστήρας κυττάρων (Thermo Fischer Scientific Heracell 240i)

Σωλήνες Falcon 50mL (Greiner-Bio One)

Πλαστικές Πιπέτες 5, 10 και 25 mL (Greiner-Bio One)

Μικροπιπέτα 20-200 μ L (Gilson Pipetman)

Ρύγχη μικροπιπέτας 200 μ L (Sorenson Bioscience)

Φιάσκες κυτταροκαλλιέργειας T-75 και T-175 (Greiner-Bio One)

CryoVials 2mL (Thermo Fischer Scientific)

Κυτταρική σειρά H9 (NIH AIDS Reagent Program)

Διάλυμα HIV-1 (NIH AIDS Reagent Program)

FBS (Gibco)

Penicillin/Streptomycin (10^4 U/mL πενικιλίνης, 10^4 μ g/mL στρεπτομυκίνης) (Gibco)

RPMI-1640 (Gibco)

Μικροπιπέτα 200-1000 μ L (Gilson Pipetman)

Ρύγχη μικροπιπέτας 1000 μ L (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

1. Αραίωση 2×10^6 κυττάρων H9 σε 2 mL πλήρους θρεπτικού υλικού (10^6 κύτ./mL) σε σωλήνα falcon των 50 mL.
2. Προσθήκη 1 mL διαλύματος HIV-1 στο falcon.
4. Επώαση του διαλύματος στο falcon στους 37°C για 1 ώρα και ήπια ανάδευση ανά 15 λεπτά.
5. Μεταφορά του διαλύματος σε φλάσκα T-75 με 10 mL πλήρες θρεπτικό υλικό.
6. Επώαση της φλάσκας σε όρθια θέση στους 37°C για 4 ημέρες.
8. Προσθήκη 90 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και χωρισμός του διαλύματος σε δύο φλάσκες T-175 με 50 mL η κάθε μία.
9. Επώαση σε οριζόντια θέση στους 37°C για 3 ημέρες.
10. Ένωση των διαλυμάτων σε μία φλάσκα.
14. Μεταφορά του διαλύματος της φλάσκας σε δύο falcon των 50 mL, 50 mL στο κάθε ένα.
15. Φυγοκέντρωση στις 1200 rpm για 5 λεπτά.
16. Προσεκτική απομάκρυνση του αιωρήματος και διαίρεσή του σε CryoVials ανά 1,5 mL.
17. Διατήρηση των ιών στους -80°C .

2.8 Δοκιμασία Εξουδετέρωσης του HIV από αντισώματα ασθενών

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Θερμαινόμενο μπλοκ (BioSan TDB-120)

Μικροφυγόκεντρος (Hettich MIKRO 200R)

Φυγόκεντρος (Hettich Rotanta 460R)

Επωαστήρας κυττάρων (Thermo Fischer Scientific Heracell 240i)

Αναδευτήρας Vortex (GLW L46)

Κυτταρόμετρο ροής (BD FACSCalibur)

Καλλιεργητικές μικροπλάκες 96 φρεατίων F-bottom (Greiner-Bio One)

Σωλήνες FACS (Falcon)

Πλήρες θρεπτικό υλικό (In-house)

Κυτταρική σειρά A3.01 (NIH AIDS Reagent Program)

83 δείγματα πλάσματος ασθενών (Μουάνζα, Τανζανία)

Διάλυμα HIV-1 (Hxb2) (In-house)

Διάλυμα αντισώματος ποντικού anti-p24 (In-house)

Αντίσωμα abcam goat anti-mouse IgG H&L FITC (#ab6785)

Διάλυμα 37% Φορμαλδεΰδης (AppliChem)

Ξηρή σαπονίνη (saponin) (ROTH)

BSA (Sigma-Aldrich)

Διάλυμα 500 mL PBS με 4% Φορμαλδεΰδη (In-house)

Διάλυμα 1 L PBS με 0,1% BSA και 0,5 % Saponin (In-house)

Πλαστικές πιπέτες των 5 mL (Greiner-Bio One)

Γυάλινες πιπέτες των 10 mL (BRAND)

Μικροπιπέτα 20-200 μ L (Gilson Pipetman)

Ρύγχη μικροπιπέτας 200 μ L (Sorenson Bioscience)

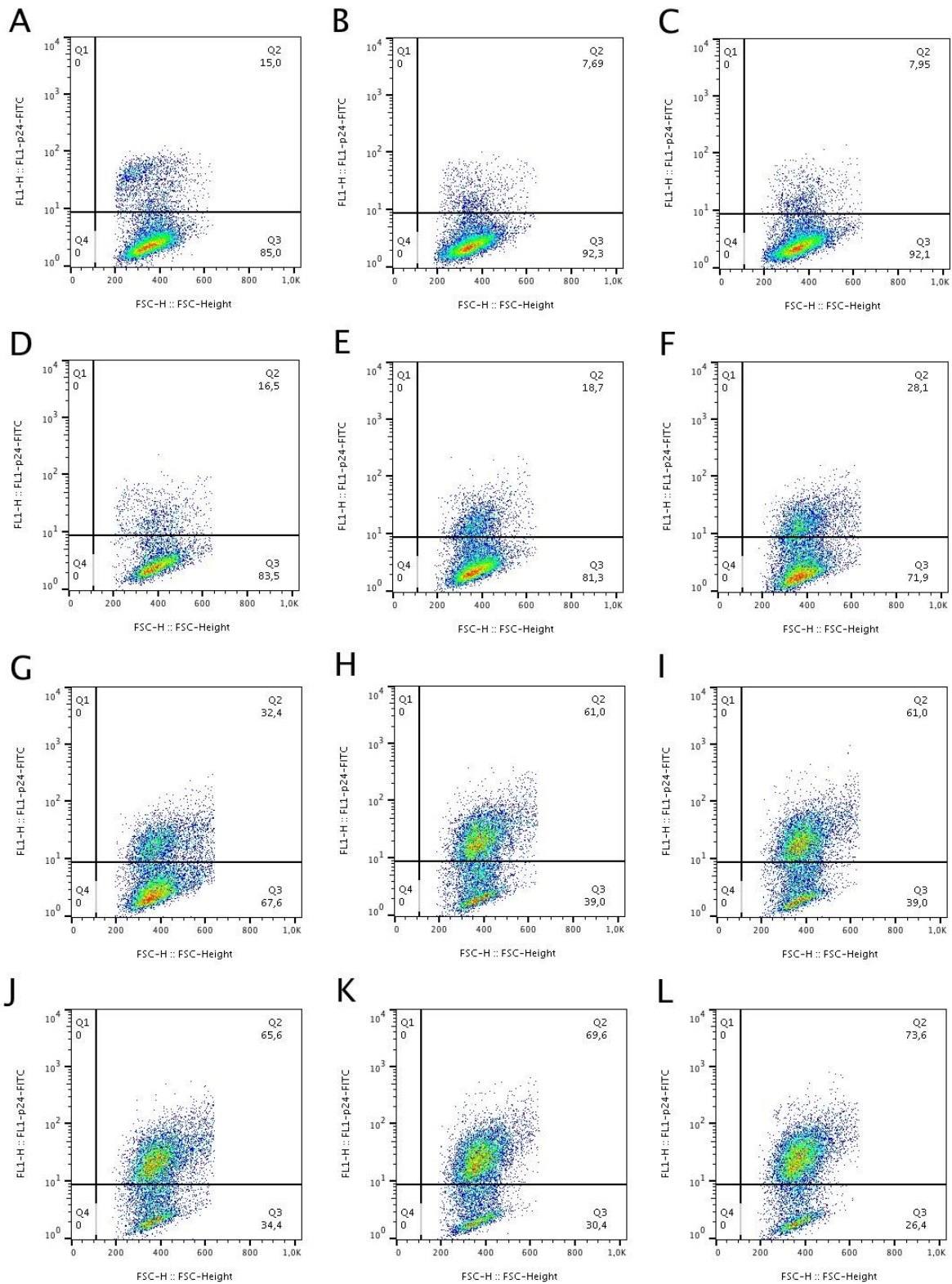
Μέθοδος:

1. Απενεργοποίηση του ορού στους 56°C για 30 λεπτά.
2. Προσθήκη 100 μ L ορού ασθενούς στο πρώτο φρεάτιο μιας σειράς μιας πλάκας 96 φρεατίων F-bottom. Προσθήκη 50 μ L πλήρους θρεπτικού υλικού στα υπόλοιπα φρεάτια της σειράς. Πραγματοποίηση διαδοχικών υποδιπλάσιων αραιώσεων του ορού, μεταφέροντας 50 μ L από το κάθε φρεάτιο στο δεξιό του, αναδεύοντας με την μικροπιπέτα.
3. Προσθήκη 50 μ L διαλύματος HIV-1 (Hxb2) σε όλα τα φρεάτια της σειράς.
4. Επώαση της πλάκας στους 37°C για 1 ώρα, ώστε τα αντισώματα να προσδεθούν στους ιούς.
6. Παρασκευή εναιωρήματος κυττάρων A3.01 συγκέντρωσης 2×10^6 κυτ./mL με όγκο 1,5 mL σε falcon των 15 mL.
5. Προσθήκη στα φρεάτια 100 μ L (2×10^5 κυττάρων) από το εναιώρημα κυττάρων A3.01.
6. Επώαση της πλάκας στους 37°C για 3 ημέρες.
7. Μεταφορά όλων των διαλυμάτων σε σωλήνες FACS που περιέχουν ήδη 1 mL διαλύματος PBS με 4% Φορμαλδεΰδη, ώστε να χάσουν τη μολυσματικότητά τους οι ιοί και να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα.
8. Κλείσιμο των σωλήνων FACS με καπάκι, ανάδευση σε vortex και αναστροφή κατά 180 μοίρες 2 φορές των σωλήνων για να έρθει όλη η εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα σε επαφή με τη φορμαλδεΰδη.
9. Αναμονή 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
10. Φυγοκέντρηση των σωλήνων στις 1800 rpm για 2 λεπτά. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 2 mL διαλύματος PBS με 0,1% BSA και 0,5 % Saponin. Η Saponin δημιουργεί οπές στην πλασματική μεμβράνη αφαιρώντας τις χοληστερόλες.
11. Επανάληψη του βήματος 10.

12. Επανάληψη ξανά του βήματος 10.
13. Προσθήκη 50 μL διαλύματος αντισώματος anti-p24 από ποντικό σε κάθε σωλήνα FACS και ανάδευση σε vortex.
14. Επώαση στους 4°C για 30 λεπτά.
15. Έκπλυση με 2 mL PBS με 0,1% BSA και 0,5 % Saponin και φυγοκέντρωση στις 1200 rpm για 3 λεπτά. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
16. Επανάληψη του βήματος 15.
17. Προσθήκη σε κάθε σωλήνα FACS 1 μL αντισώματος goat anti-mouse FITC αραιωμένου σε 50 μL διαλύματος PBS με 0,1% BSA και 0,5 % Saponin.
18. Επώαση των σωλήνων FACS στους 4°C για 30 λεπτά.
19. Έκπλυση με 2 mL PBS με 0,1% BSA και 0,5 % Saponin και φυγοκέντρωση στις 1200 rpm για 3 λεπτά. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
20. Προσθήκη στους σωλήνες 100 μL από το διάλυμα PBS με 4% Φορμαλδεύδη.
21. Μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής των p24⁺ T λεμφοκυττάρων, μέσω διάκρισής τους από τα υπόλοιπα μη μολυσμένα T λεμφοκύτταρα.

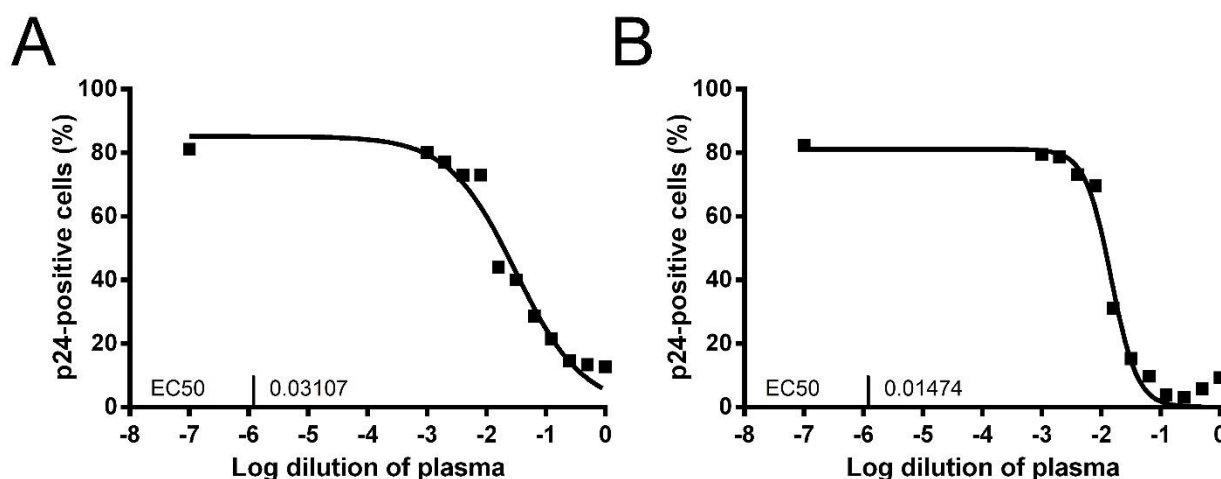
2.9 Υπολογισμός EC₅₀ από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εξουδετέρωσης

Από τα διαγράμματα για κάθε αραιώση που αποκτήθηκαν από το κυτταρόμετρο ροής, γίνεται υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από τον HIV-1 (Εικόνα 2.9.1).



Εικόνα 2.9.1: Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής ενός αντιπροσωπευτικού ασθενούς. A: αραιώση πλάσματος 1:1, B: αραιώση πλάσματος 1:2, C: αραιώση πλάσματος 1:4, D: αραιώση πλάσματος 1:8, E: αραιώση πλάσματος 1:16, F: αραιώση πλάσματος 1:32, G: αραιώση πλάσματος 1:64, H: αραιώση πλάσματος 1:128, I: αραιώση πλάσματος 1:256, J: αραιώση πλάσματος 1:512, K: αραιώση πλάσματος 1:1024, L: απουσία πλάσματος. Q2: το κλάσμα των μολυσμένων (p24+) κυττάρων, Q3: το κλάσμα των υγιών (p24-) κυττάρων

Με το σύνολο των ποσοστών για κάθε αραιώση κατασκευάζεται ένα γράφημα για τον υπολογισμό της EC_{50} με το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.01. Στην Εικόνα 2.9.2 απεικονίζονται τα γραφήματα με την αυτομάτως υπολογισμένη EC_{50} δύο ασθενών.



Εικόνα 2.9.2: Γραφήματα ποσοστών Hxb2+ κυττάρων μετά από επώαση με εξουδετερωμένους από ανθρώπινα αντισώματα ιούς συναρτήσεως διαφόρων αραιώσεων του πλάσματος του ασθενούς που περιείχε αντισώματα. Α: Ασθενής με αντισώματα με χαμηλή εξουδετερωτική δράση. Β: Ασθενής με αντισώματα με ισχυρή εξουδετερωτική δράση.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όλων των ασθενών και η συσχέτισή τους με το φύλο, τη θεραπεία και το ιικό φορτίο πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.01.

2.10 Απομόνωση PBMC από πλήρες αίμα δοτών

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Κώνοι με αίμα

Ψαλίδι

Φυγόκεντρος (Hettich Rotanta 460R)

Μικροσκόπιο (Nikon Eclipse T100)

Αιμοκυτταρόμετρο (Marienfeld superior Neubauer improved)

Διάλυμα αιθανόλης 70% (In-house)

Διάλυμα EDTA (Gibco Versene Solution)

Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)

RPMI-1640 (gibco)

FCS (gibco)

Penicillin/Streptomycin (10^4 U/mL πενικιλίνης, 10^4 μ g/mL στρεπτομυκίνης) (gibco)

Σωλήνες Falcon 50 mL (Greiner-Bio One)

Πλαστικές πιπέτες των 10 mL (Greiner-Bio One)

Γυάλινες πιπέτες των 10 mL (BRAND)

Μικροπιπέτες 20-200 μ L, 200-1000 μ L (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 200 μ L, 1000 μ L (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος

1. Απολύμανση ενός ψαλιδιού με διάλυμα αιθανόλης.
2. Τοποθέτηση του κώνου στην κορυφή ενός falcon των 50mL, αφού πρώτα έχει κοπεί το κάτω σωληνάριο του κώνου.
3. Κόψιμο του επάνω σωληναρίου και αναμονή μέχρι όλο το αίμα να μεταφερθεί στο falcon.
4. Προσθήκη 30 mL Versene Solution στο falcon με πλαστική πιπέτα.
5. Ίσος χωρισμός του μίγματος σε 2 falcon των 50 mL με πλαστική πιπέτα.
6. Αργή και προσεκτική προσθήκη 7 mL Ficoll-Paque PLUS με μία πλαστική πιπέτα των 10 mL στον πυθμένα του falcon, ώστε να προκύψει μία ξεχωριστή φάση.
7. Φυγοκέντρηση των falcon στις 1500 rpm (στροφές/λεπτό) για 30 λεπτά χωρίς φρένο κατά τη λήξη.
8. Αναρρόφηση του buffy coat προσεκτικά, ώστε να μη συλλεχθούν ερυθρά αιμοσφαίρια, με μία πλαστική πιπέτα των 10 mL και μεταφορά του σε ένα νέο falcon των 50 mL.
9. Αραίωση του buffy coat με Versene Solution μέχρι τελικού όγκου 50 mL με πλαστική πιπέτα.
10. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 10 λεπτά.
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Με γυάλινη πιπέτα, επαναιώρηση του ιζήματος σε 10 mL θρεπτικού υλικού RPMI-1640 και φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 3 λεπτά.
12. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 mL θρεπτικού υλικού RPMI-1640 που έχει 10% FCS.
13. Καταμέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο με πλάκα Neubauer.

2.11 Ψύξη κυττάρων

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Φυγόκεντρος Hettich Rotanta 460R

RPMI-1640 (Gibco)

FCS (Gibco)

Penicillin/Streptomycin (10^4 U/mL πενικιλίνης, 10^4 µg/mL στρεπτομυκίνης) (Gibco)

DMSO (AppliChem)

Σωλήνες Falcon 15 mL (Greiner-Bio One)

Μικροπιπέτες 20-200 µL, 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

1. Φυγοκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 1200 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε διάλυμα ψύξης το οποίο περιέχει 50% FCS, 10% DMSO, 40% RPMI+FCS.
3. Μεταφορά κυττάρων σε cryovials και κατάψυξη στους -80°C .

2.12 Απόψυξη κυττάρων

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Υδατόλουτρο (Mettmert WB14)

Φυγόκεντρος Hettich Rotanta 460R

RPMI-1640 (Gibco)

FCS (Gibco)

Penicillin/Streptomycin (10^4 U/mL πενικιλίνης, 10^4 µg/mL στρεπτομυκίνης) (Gibco)

Σωλήνες Falcon 15 mL (Greiner-Bio One)

Μικροπιπέτες 20-200 µL, 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

1. Τα cryovials αποψύχονται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C.
2. Αμέσως μετά την απόψυξη για την αποφυγή παρατεταμένης έκθεσης στο DMSO τα κύτταρα του εναιωρήματος μεταφέρονται σε σωλήνα falcon που περιέχει 10 mL RPMI-1640. Έτσι αποφεύγονται τυχόν κυτταροτοξικά φαινόμενα που προκαλεί το DMSO και διασφαλίζεται η καλή βιωσιμότητα και η λειτουργικότητα των κυττάρων.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1200 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ίζήματος σε 10 mL RPMI-1640 + 10% FCS. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1200 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απομάκρυνση πλήρως του υπερκείμενου και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1 mL RPMI-1640 + 10% FCS.

2.13 Απομόνωση DNA από PBMC

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit (#69504)

- Πρωτεΐνάση K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- DNeasy Mini στήλες
- Σωλήνες συλλογής 2 mL

Θερμαινόμενο μπλοκ (BioSan TDB-120)

Αναδευτήρας Vortex (GLW L46)

Μικροφυγόκεντρος (Hettich MIKRO 200R)

PBMC δοτών ή ασθενών

Διάλυμα PBS (In-house)

100% αιθανόλη (AppliChem)

Μικροπιπέτες 20-200 µL, 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Eppendorf 1,5 mL (Eppendorf)

Μέθοδος:

1. Φυγοκέντρηση έως 5×10^6 κυττάρων στις 1200 rpm για 3 λεπτά και επαναιώρηση του ιζήματος σε 200 μ L PBS. Προσθήκη 20 μ L Proteinase K.
2. Προσθήκη 200 μ L Buffer AL, καλή ανάδευση σε vortex και επώαση στους 56°C για 10 λεπτά.
3. Προσθήκη 200 μ L 96-100% αιθανόλης και καλή ανάδευση σε vortex.
4. Μεταφορά του μίγματος με μικροπιπέτα σε μία στήλη που είναι τοποθετημένη μέσα σε ένα σωλήνα συλλογής των 2 mL. Φυγοκέντρηση της στήλης με τουλάχιστον 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό. Μεταφορά τη στήλης σε έναν νέο σωλήνα συλλογής.
5. Προσθήκη 500 μ L Buffer AW1 στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό. Μεταφορά της στήλης σε έναν νέο σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 500 μ L Buffer AW2 στη στήλη και φυγοκέντρηση στα 20k g (14k rpm) για 3 λεπτά.
7. Μεταφορά της στήλης σε ένα eppendorf 1,5 mL και προσθήκη στη στήλη 100 μ L Buffer AE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
8. Απόρριψη της στήλης και διατήρηση του eppendorf με το έκλουσμα που περιέχει το DNA.

2.14 Απομόνωση RNA από πλάσμα αίματος

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (#52906)

- CarrierRNA
- Buffer AVL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AVE
- QIAamp mini στήλες
- Σωλήνες συλλογής 2 mL

Αναδευτήρας Vortex (GLW L46)

Μικροφυγόκεντρος (Hettich MIKRO 200R)

Πλάσμα ασθενών

100% αιθανόλη (AppliChem)

dH₂O (In-house)

Μικροπιπέτες 20-200 µL, 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Eppendorf 1,5 mL (Eppendorf)

Μέθοδος:

1. Προσθήκη 560 µL του ρυθμιστικού διαλύματος AVL με 5,6 g carrierRNA σε ένα σωλήνα Eppendorf 1,5 mL.
2. Προσθήκη 140 µL πλάσματος στον ίδιο σωλήνα.
3. Ανάδευση με vortex για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) για 10 λεπτά.
4. Βραχύχρονη φυγοκέντρηση για να συγκεντρωθούν τυχόν σταγονίδια στον πυθμένα του σωλήνα.
5. Προσθήκη 560 µL αιθανόλης (96-100%) στον σωλήνα και ανάδευση με vortex για 15 δευτερόλεπτα.
6. Βραχύχρονη φυγοκέντρηση για να συγκεντρωθούν τυχόν σταγονίδια στον πυθμένα του σωλήνα.
7. Προσεκτική μεταφορά 630 µL του διαλύματος από τον σωλήνα eppendorf σε μια στήλη, η οποία βρίσκεται μέσα σε ένα σωλήνα συλλογής όγκου 2 mL.
8. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό και μεταφορά της στήλης σε ένα νέο σωλήνα συλλογής.
9. Επανάληψη των βημάτων 7 και 8 με χρήση της ίδιας στήλης.
10. Προσθήκη 500 µL αραιωμένου με αιθανόλη ρυθμιστικού διαλύματος AW1, φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό και μεταφορά της στήλης σε ένα νέο σωλήνα συλλογής.
11. Προσθήκη 500 µL αραιωμένου με αιθανόλη ρυθμιστικού διαλύματος AW2, φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της στήλης σε έναν νέο σωλήνα Eppendorf 1,5 mL.
12. Προσθήκη 50 µL από 10 φορές αραιωμένου με dH₂O διαλύματος έκλουσης AVE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
13. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη της στήλης. Το διάλυμα με το RNA βρίσκεται στον σωλήνα Eppendorf.

2.15 Κατασκευή πρωτοκόλλου PCR για την απομόνωση του γονιδίου *Enn* ή τμήματός του από δείγματα ασθενών

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

QIAGEN Taq PCR Master Mix Kit (#201445)

- Taq PCR Master Mix (2xBuffer, πολυμεράση 5 U/μL, 3 mM MgCl, 400 μM από το κάθε dNTP)
- Νερό χωρίς RNάση

Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Kit (#F-553L)

- Phusion DNA πολυμεράση, 2 U/μL
- 5xPhusion HF Buffer
- 5xPhusion GC Buffer
- dNTP μίγμα, 10 mM από το κάθε dNTP
- DMSO

Θερμοκυκλωποιητής (BIO-RAD MyCycler with gradient #1709713)

Θερμοκυκλωποιητής (Eppendorf Mastercycler 5333)

Ειδικές θάδες σωλήνων PCR (Hartenstein)

Eppendorf 1,5 mL (Eppendorf)

Μικροπιπέτες 0,5-10 μL, 20-200 μL, 200-1000 μL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 10 μL, 200 μL, 1000 μL (Sorenson Bioscience)

Παγωμένο στατώ για Eppendorf

Παγωμένο στατώ για σωλήνες PCR

Μέθοδος:

Έγιναν προσπάθειες πολλαπλασιασμού ολόκληρου του γονιδίου *Enn* αλλά και τμημάτων του. Στην παρούσα εργασία το πιο ενδιαφέρον τμήμα ήταν αυτό που κωδικοποιεί τις διαδοχικές πρωτεϊνικές περιοχές V1 και V2. Στο γονίδιο *Enn* του ιού HXB2, οι V1 και V2 βρίσκονται στα νουκλεοτίδια 391-468 και 469-588, αντίστοιχα.

Για την απομόνωση του γονιδίου *Enn* (2,4 kbp) χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά kits από δύο διαφορετικές εταιρείες. Το πρώτο περιείχε μία τροποποιημένη Taq πολυμεράση και το δεύτερο μία τροποποιημένη πολυμεράση από το γένος *Pyrococcus* (Phusion).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία αναφέρονται στον Πίνακα 2.15.1 μαζί με τη θερμοκρασία μετάπτωσής τους (T_m). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη βιβλιογραφία και από στοίχιση πολλών γνωστών αλληλουχιών προς εντόπιση διατηρημένων περιοχών.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα εγχειρίδια χρήσης και των δύο kits, κατασκευάστηκαν αρχικά πρωτόκολλα προς βελτίωση. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων κατά τη χρήση του Taq PCR Master Mix kit παρατίθενται στον Πίνακα 2.15.2. Οι διαφοροποιήσεις των ποσοτήτων, όπου υπάρχουν, αναφέρονται στο κείμενο των αποτελεσμάτων για κάθε αντίδραση. Τα στάδια της PCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.15.3. Τυχόν διαφοροποιήσεις αναφέρονται στο κείμενο των αποτελεσμάτων για κάθε αντίδραση. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων κατά τη χρήση του Phusion High-Fidelity PCR Kit παρατίθενται στους Πίνακες 2.15.4 και 2.15.5. Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών κάθε αντίδρασης της Phusion Polymerase γινόταν αυτόματα από την εφαρμογή στην ιστοσελίδα www.thermofisher.com/tmcalculator. Οι διαφοροποιήσεις των ποσοτήτων, όπου υπάρχουν, αναφέρονται στο κείμενο των αποτελεσμάτων για κάθε αντίδραση. Τα στάδια της PCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.15.6. Τυχόν διαφοροποιήσεις αναφέρονται στο κείμενο των αποτελεσμάτων για κάθε αντίδραση.

Πίνακας 2.15.1: Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της εργασίας με τη θερμοκρασία μετάπτωσής τους (T_m). F = πρόσθιος εκκινητής, R = ανάστροφος εκκινητής [143].

Εκκινητές PCR	Αλληλουχία 5'→3'	T_m (°C)
5957hin (F)	TTAGGCATCTCCTATGGCAGG	57
7373R (R)	GAAAAATTCTCCTCYACAATTAA	54
9555R (R)	TGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGA	58
E0 (F)	TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTA	70
E00 (F)	TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA	62
E01 (R)	TCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTAAAAA	59
E03 (R)	TAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG	56
V1V2hinA (F)	TTTAAAYATTTGGAAAAAT	43
V1V2hinB (F)	AAAGCCTAAAGCCATGTGTAA	54
V1V2rucA (R)	TTTGAGCCAATTCCCATACA	53
V1V2rucB (R)	TTCAATGGAACAGGACCATG	54

Πίνακας 2.15.2: Λίστα των αρχικών ποσοτήτων των αντιδραστηρίων για την αντίδραση PCR με το Taq PCR Master Mix kit. *Περιλαμβάνεται στο Buffer

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Buffer	10 μ L
Πολυμεράση Taq*	2,5 U
MgCl ₂ *	1,5 mM
dNTP*	200 μ M
F εκκινητής	0,5 μ M
R εκκινητής	0,5 μ M
DNA εκμαγείο	1 μ L (1-200 ng)
dH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 20 μ L
Τελικός Όγκος	20 μ L

Πίνακας 2.15.3: Τα στάδια των αντιδράσεων PCR με το Taq PCR Master Mix kit.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	35 κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	3 λεπτά	
Αποδιάταξη	94°C	0,5 λεπτά	
Υβριδισμός	Ανάλογα τους εκκινητές	0,5 λεπτά	
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτό / 1kbp	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	

Πίνακας 2.15.4: Λίστα των αρχικών ποσοτήτων των αντιδραστηρίων για την αντίδραση PCR με το Phusion High-Fidelity PCR Kit.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
5x Buffer	4 μ L
dNTP	200 μ M το καθένα
F εκκινητής	0,5 μ M
R εκκινητής	0,5 μ M
Πολυμεράση Phusion	0,4 U
DNA εκμαγείο	1 μ L (20-100 ng)
H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 20 μ L
Τελικός όγκος	20 μ L

Πίνακας 2.15.5: Λίστα των τροποποιημένων ποσοτήτων των αντιδραστηρίων για την αντίδραση PCR με το Phusion High-Fidelity PCR Kit μετά την ανακάλυψη πως η μισή ποσότητα εκκινητών αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
5x Buffer	4 μ L
dNTP	200 μ M το καθένα
F εκκινητής	0,25 μ M
R εκκινητής	0,25 μ M
Πολυμεράση Phusion	0,4 U
DNA εκμαγείο	1 μ L (20-100 ng)
H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 20 μ L
Τελικός όγκος	20 μ L

Πίνακας 2.15.6: Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR με το Phusion High-Fidelity PCR kit.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	35 κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	98°C	1 λεπτό	
Αποδιάταξη	98°C	0,167 λεπτά	
Υβριδισμός	Ανάλογα τους εκκινητές	0,334 λεπτά	
Επιμήκυνση	72°C	0,25 λεπτά / 1 kbp	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	

1. Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων εκτός του εκμαγείου DNA σε κατάλληλες ποσότητες σε ένα ψυχόμενο Eppendorf των 1,5 mL για την παρασκευή του Master Mix με την πολυμεράση να προστίθεται τελευταία.
2. Μεταφορά 19 µL σε κάθε ψυχόμενο ειδικό σωλήνα PCR.
3. Προσθήκη 1 µL δείγματος DNA σε κάθε σωλήνα PCR.

Τα εκμαγεία είναι απομονωμένα DNA από ασθενείς με AIDS. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων υπάρχει πάντα ένας σωλήνας ως αρνητικός μάρτυρας με νερό αντί για δείγμα DNA, ένας σωλήνας ως αρνητικός μάρτυρας διαδικασίας με γενωμικό DNA από υγιή PBMC και ένας σωλήνας ως θετικός μάρτυρας με απομονωμένο DNA από την κυτταρική σειρά ACH-2. Τα κύτταρα ACH-2 είναι κύτταρα A3.01 με ένα αντίγραφο του πρωταρχικά απομονωμένου HIV-1 (LAV) στο πυρηνικό DNA τους [144]. Η κυτταρική σειρά T λεμφοκυττάρων A3.01 προέρχεται από ένα 4-χρονο καυκάσιο κορίτσι με οξεία λεμφογενή λευχαιμία και είναι ευαίσθητη σε μόλυνση από HIV-1 [145].

2.16 Κατασκευή πρωτοκόλλου RT-PCR για την απομόνωση του γονιδίου *Env* ή τμήματός του από δείγματα ασθενών

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaire BSB 4A)

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (#210212)

- 5xBuffer (12,5 mM MgCl₂)
- Enzyme Mix (Omniscript RT, Sensiscript RT, HotStarTaq DNA πολυμεράση)
- dNTP μίγμα (10 mM από το κάθε dNTP)
- 5xQ-Solution[®]
- Νερό χωρίς RNάση

Θερμοκυκλωποιητής (BIO-RAD MyCycler with gradient #1709713)

Θερμοκυκλωποιητής (Eppendorf Mastercycler 5333)

Ειδικές 8άδες σωλήνων PCR (Hartenstein)

Eppendorf 1,5 mL (Eppendorf)

Μικροπιπέτες 0,5-10 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 10 µL, 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Παγωμένο στατώ για Eppendorf

Παγωμένο στατώ για eppendorf, σωλήνες PCR

Μέθοδος:

Για την κατασκευή ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης του γονιδίου *Enn* ή τμημάτων του με τη μέθοδο RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρατίθενται στον Πίνακα 2.16.1 μαζί με τη θερμοκρασία μετάπτωσής τους (T_m). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από στοίχιση πολλών γνωστών αλληλουχιών προς εντόπιση διατηρημένων περιοχών.

Λαμβάνοντας υπόψιν το εγχειρίδιο χρήσης του kit, κατασκευάστηκε ένα αρχικό πρωτόκολλο προς βελτίωση. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων κατά τη χρήση του OneStep RT-PCR Kit παρατίθενται στον Πίνακα 2.16.2. Οι διαφοροποιήσεις των ποσοτήτων, όπου υπάρχουν, αναφέρονται στο κείμενο των αποτελεσμάτων για κάθε αντίδραση. Τα στάδια της PCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.16.3. Τυχόν διαφοροποιήσεις αναφέρονται στο κείμενο των αποτελεσμάτων για κάθε αντίδραση.

Πίνακας 2.16.1: Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR της εργασίας μαζί με τη θερμοκρασία μετάπτωσής τους (T_m). F = πρόσθιος εκκινητής, R = ανάστροφος εκκινητής [143].

Εκκινητές PCR	Αλληλουχία 5'→3'	T_m (°C)
E00 (F)	TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA	62
V1V2hinB (F)	AAAGCCTAAAGCCATGTGTAA	54
V1V2rucA (R)	TTTGAGCCAATTCCCATACA	53

Πίνακας 2.16.2: Λίστα των αντιδρώντων και οι ποσότητές τους στο αρχικό πρωτόκολλο RT-PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
5x Buffer	4 μ L
dNTP	400 μ M από το καθένα
F εκκινητής	0,5 μ M
R εκκινητής	0,5 μ M
Enzyme Mix	0,8 μ L
dH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 20 μ L
RNA εκμαγείο	1 μ L (1 pg – 2 μ g)
Τελικός όγκος	20 μ L

Πίνακας 2.16.3: Οι συνθήκες του αρχικού πρωτοκόλλου RT-PCR.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	35 κύκλοι
Αντίστροφη Μεταγραφή	50°C	30 λεπτά	
Ενεργοποίηση PCR	95°C	15 λεπτά	
Αποδιάταξη	94°C	0,5 λεπτά	
Υβριδισμός	53°C	0,5 λεπτά	
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτά	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	

1. Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων εκτός του δείγματος RNA σε κατάλληλες ποσότητες σε ένα ψυχόμενο Eppendorf των 1,5 mL για την παρασκευή του Master Mix.
2. Μεταφορά 19 µL σε κάθε ειδικό σωλήνα PCR.
3. Προσθήκη 1 µL δείγματος RNA σε κάθε σωλήνα PCR.

Τα εκμαγεία είναι απομονωμένα RNA από ασθενείς με AIDS. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων υπάρχει πάντα ένας σωλήνας ως αρνητικός μάρτυρας με νερό αντί για δείγμα RNA και ένας σωλήνας ως θετικός μάρτυρας με απομονωμένο RNA από τον ιό Hxb2.

2.17 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Υλικά και εξοπλισμός:

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

UV κάμερα

Ζυγαριά ακριβείας

Σπαθίδα

Ποτήρι ζέσεως

Φούρνος μικροκυμάτων

Θερμόμετρο

Κολλητική ταινία

Parafilm (Bemis)

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate + EDTA) (MERCK)

Σκόνη αγαρόζης (Sigma-Aldrich)

SYBR® Safe (Invitrogen)

6xLoading Dye (Thermo Fischer Scientific)

Μάρτυρας GeneRuler (Thermo Fischer Scientific)

Μικροπιπέτες 0,5-10 µL, 20-200 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 10 µL, 200 µL (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

Για πήκτωμα 30 βοθρίων και συγκέντρωσης αγαρόζης 0,8%:

200 mL TAE Buffer (Tris-acetate + EDTA)

1,6 g σκόνη αγαρόζης

20 μ L SYBR® Safe

1. Σε ένα ποτήρι ζέσεως γίνεται θέρμανση του μίγματος TAE Buffer και σκόνης αγαρόζης σε φούρνο μικροκυμάτων για ~3 λεπτά, μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη στο διάλυμα.
2. Κατόπιν, προστίθεται το SYBR® Safe.
3. Μεταφορά του διαλύματος στο κατάλληλο εκμαγείο, που έχει τυλιχτεί με κολλητική ταινία για να κρατηθεί εγκλωβισμένο το υγρό, τοποθέτηση των χτενών για τη δημιουργία των βοθρίων υποδοχής και αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί τελείως.
4. Προσεκτική αφαίρεση των χτενών και της κολλητικής ταινίας, και τοποθέτηση του εκμαγείου μαζί με το στερεό πήκτωμα στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (PD) TAE σε ποσότητα που καλύπτει ολοκληρωτικά το πήκτωμα.
5. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, τοποθετείται ένα κομμάτι Parafilm® στον πάγκο, πάνω στο οποίο γίνεται η ανάμιξη ~1 μ L 6x Loading Dye με 3 μ L προϊόντος PCR πιπετάροντας (1:3).
6. Στο πρώτο βοθρίο τοποθετούνται 3 μ L από ήδη χρωματισμένο μάρτυρα GeneRuler.
7. Προσθήκη 3 μ L των υπόλοιπων δειγμάτων στα βοθρία.
8. Ηλεκτροφόρηση για 40-50 λεπτά σε 110 V διαφορά δυναμικού.
9. Φωτογράφιση του πηκτώματος με UV κάμερα.

2.18 Καθαρισμός των προϊόντων PCR ή RT-PCR

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

SIGMA-ALDRICH GenElute™ PCR Clean-Up Kit (#NA1020)

- Column Preparation Solution
- Binding Solution
- Washing Solution
- Elution Solution
- GenElute plasmid mini στήλες
- Σωλήνες συλλογής 2 mL

Μικροφυγόκεντρος (Hettich MIKRO 200R)

100% αιθανόλη (AppliChem)

dH₂O (In-house)

Μικροπιπέτες 0,5-10 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L (Gilson Pipetman)

Ρύγχι πιπετών 10 µL, 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Μέθοδος:

1. Προσθήκη 500 µL Column Preparation Solution στη στήλη και φυγοκέντρωση στα 12k rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη του εκλούσματος στον πυθμένα του σωλήνα συλλογής.
2. Προσθήκη 5 φορές, σε σχέση με τον όγκο του προϊόντος, PCR Binding Solution στο προϊόν PCR και μεταφορά του μίγματος στη στήλη. Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη του εκλούσματος.
3. Προσθήκη 500 µL αραιωμένου με αιθανόλη Wash Solution στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη του εκλούσματος.
4. Φυγοκέντρωση της στήλης στις 12000 rpm για 2 λεπτά, ώστε να απορριφθεί όλο το εναπομείναν Wash Solution. Μεταφορά της στήλης σε έναν νέο σωλήνα συλλογής.
5. Προσθήκη 30 µL από Elution Solution (ή 30 µL από 10 φορές αραιωμένου με dH₂O Elution Solution) στο κέντρο της στήλης και επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Φυγοκέντρωση της στήλης στις 12000 rpm για 1 λεπτό.
7. Απόρριψη της στήλης και διατήρηση του εκλούσματος με το καθαρισμένο από ένζυμα και εκκινητές προϊόν PCR.

2.19 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα (gel) ηλεκτροφόρησης

Υλικά και εξοπλισμός:

QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (#28704)

- Buffer QG
- Buffer PE
- Buffer EB
- QIAquick στήλες
- Σωλήνες συλλογής 2 mL

Νυστέρι

Ζυγαριά ακριβείας

Θερμαινόμενο μπλοκ (BioSan TDB-120)

Αναδευτήρας Vortex (GLW L46)

Μικροφυγόκεντρος (Hettich MIKRO 200R)

100% αιθανόλη (AppliChem)

100% ισοπροπανόλη (AppliChem)

Μικροπιπέτες 20-200 µL, 200-1000 µL (Gilson Pipetman)

Ρύγχη πιπετών 200 µL, 1000 µL (Sorenson Bioscience)

Eppendorf 1,5 mL (Eppendorf)

Μέθοδος:

1. Προσθήκη, σε ένα Eppendorf των 1,5 mL, 3 όγκων του ρυθμιστικού διαλύματος QG σε 1 όγκο του αποκομμένου τμήματος πηκτώματος με το προϊόν PCR (π.χ. 300 µL QG σε 100 mg πηκτώματος) και ανάδευση σε vortex.
2. Επώαση για 10 λεπτά στους 50°C και ανάδευση σε vortex ανά 2-3 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης.
3. Προσθήκη 1 όγκου ισοπροπανόλης (π.χ. 100 µL ισοπροπανόλης σε 100 mg πηκτώματος) και ανάδευση σε vortex.
4. Προσθήκη μιας στήλης QIAquick σε έναν σωλήνα συλλογής 2 mL.
5. Μεταφορά του μίγματος στη στήλη, φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη του εκλούσματος.
6. Προσθήκη 500 µL ρυθμιστικού διαλύματος QG στην στήλη, φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη του εκλούσματος.
7. Προσθήκη 750 µL του ήδη αραιωμένου με αιθανόλη ρυθμιστικού διαλύματος PE στη στήλη, αναμονή για 2-5 λεπτά, φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και απόρριψη του εκλούσματος.
8. Φυγοκέντρωση ξανά στις 13000 rpm για 1 λεπτό.
9. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα καθαρό σωλήνα Eppendorf 1,5 mL και προσθήκη 30 µL 10 φορές αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος EB, αναμονή για 4 λεπτά και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό.
10. Απόρριψη της στήλης και το απομονωμένο DNA βρίσκεται στον σωλήνα Eppendorf.

2.20 Προετοιμασία μιγμάτων για αλληλούχιση από την Microsynth-SeqLab και στοίχιση των αλληλουχιών.

Υλικά και εξοπλισμός:

Θάλαμος νηματικής ροής (Gelaide BSB 4A)

Εκκινητές (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen)

PCR προϊόν
dH₂O (In-house)
Eppendorf 1,5 mL (Eppendorf)
Μικροπιπέτες 0,5-10 µL, 2-20 µL (Gilson Pipetman)
Ρύγχη πιπετών 10 µL, 200 µL (Sorenson Bioscience)
Πρόγραμμα SeqMan 5.01 (DNASTAR)

Μέθοδος:

Για μίγμα 15 µL με μόρια DNA μήκους ~3 kbp:

12 µL καθαρισμένου προϊόντος PCR συγκέντρωσης 45 ng/µL
3 µL Primer συγκέντρωσης 5 µM

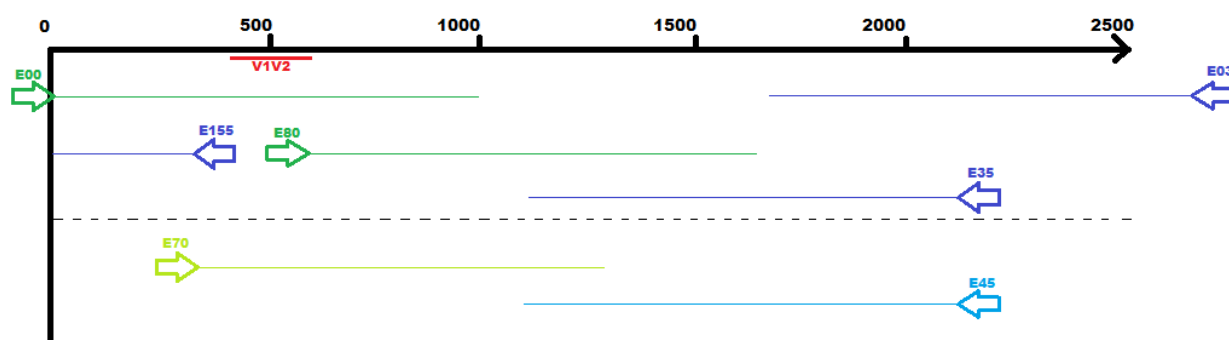
Για μίγμα 15 µL με μόρια DNA μήκους ~300 bp:

12 µL καθαρισμένου προϊόντος PCR συγκέντρωσης 4,5 ng/µL
3 µL Primer συγκέντρωσης 5 µM

Για την αλληλούχιση του γονιδίου *Enn* χρειάστηκαν πάνω από ένας εκκινητές, επειδή η απόδοση του κάθε εκκινητή ήταν ~1 kbp. Οι κύριοι εκκινητές ήταν οι E00 και E80 ως πρόσθιοι και οι E03, E35 και E155 ως ανάστροφοι. Σε περίπτωση που οι εκκινητές E80 και E35 δεν ήταν λειτουργικοί σε κάποιον ασθενή, τότε χρησιμοποιούνταν εναλλακτικά οι E70 και E45, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 2.20.1 παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και η θέση του 3' άκρου τους στο γονίδιο *Enn*. Στην Εικόνα 2.20.1 απεικονίζονται διαγραμματικά οι θέσεις των εκκινητών στο γονίδιο *Enn* καθώς και το μήκος της αλληλουχίας που παράγουν. Ο εκκινητής E155 χρησιμοποιήθηκε, επειδή κατά την αλληλούχιση, το τμήμα ξεκινά ~20 νουκλεοτίδια μετά το 3' άκρο του εκκινητή και κατά τη χρήση του εκκινητή E00 δεν υπήρχαν πληροφορίες για τα πρώτα ~20 νουκλεοτίδια του γονιδίου *Enn*. Μετά την απόκτηση των αλληλουχιών, έγινε στοίχισή τους με το πρόγραμμα SeqMan 5.01 της DNASTAR.

Πίνακας 2.20.1: Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία για την αλληλούχιση των απομονωμένων τμημάτων του *Env*. F = πρόσθιος εκκινητής, R = ανάστροφος εκκινητής. Το σύμβολο + σημαίνει ότι ο εκκινητής βρίσκεται καταρροϊκά του κωδικονίου λήξης του γονιδίου *Env* [143].

Εκκινητές	Αλληλουχία 5'→3'	Θέση 3' του εκκινητή στο <i>Env</i>
E00 (F)	TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA	3
E70 (F)	GGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAA	362
E80 (F)	CCAATTCCCATAACATTATTGTG	656
E03 (R)	TAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG	+244
E35 (R)	GGTGAGTATCCCTGCCTAACTCTATT	2090
E45 (R)	CCTGCCTAACTCTATTTCAC	2094
E155 (R)	CTGTTCTACCATGTTATTTTCCACATGT	252



Εικόνα 2.20.1: Διαγραμματική απεικόνιση των εκκινητών αλληλούχισης επάνω στο μήκος του γονιδίου *Env* (ολικού μήκους 2571 b). Πράσινο = κύριοι πρόσθιοι εκκινητές, Μωβ = κύριοι ανάστροφοι εκκινητές, Ανοιχτό πράσινο = εναλλακτικός πρόσθιος εκκινητής, Γαλάζιο = εναλλακτικός οπίσθιος εκκινητής.

Στην περίπτωση απομόνωσης μόνο της περιοχής V1V2 μέσω PCR, γίνεται αλληλούχιση με τους εκκινητές της PCR, V1V2hinB και V1V2rucA (Πίνακας 2.20.2), ώστε να υπάρχουν δύο αντίγραφα της ίδιας αλληλουχίας για σύγκριση.

Πίνακας 2.20.2: Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία για την αλληλούχιση μόνο της περιοχής V1V2 του *Env*. F = πρόσθιος εκκινητής, R = ανάστροφος εκκινητής. Το σύμβολο + σημαίνει ότι ο εκκινητής βρίσκεται καταρροϊκά του κωδικονίου λήξης του γονιδίου *Env*. Το σύμβολο - σημαίνει ότι ο εκκινητής βρίσκεται αναρροϊκά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *Env*.

Εκκινητές	Αλληλουχία 5'→3'	Θέση 3' του εκκινητή ως προς την V1V2
V1V2hinB (F)	AAAGCCTAAAGCCATGTGTAA	-29
V1V2rucA (R)	TTTGAGCCAATTCCCACATACA	+39

2.21 Μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε αμινοξικές αλληλουχίες και εντοπισμός της περιοχής V1V2

Μετάφραση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα ApE 2.0.60 και με το πρόγραμμα ExPASy Translate Tool [146]. Η στοίχιση με μία γνωστή αλληλουχία για τον εντοπισμό της περιοχής V1V2 του ιού του κάθε ασθενούς έγινε με το διαδικτυακό πρόγραμμα Protein BLAST του NCBI.

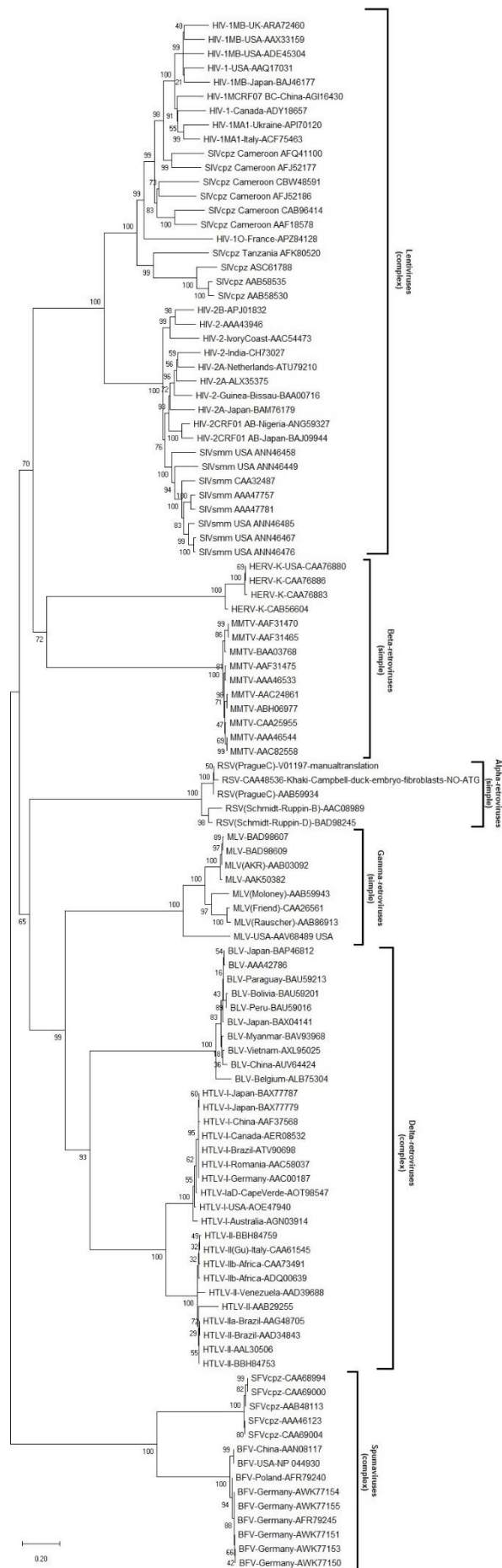
2.22 Σύγκριση της περιοχής V1V2 της πρωτεΐνης του γονιδίου *Enn* διάφορων ιών από ασθενείς με βάση το επίπεδο της N-συνδεόμενης γλυκοζυλίωσης

Με τη χρήση του διαδικτυακού προγράμματος N-GlycoSite (Τελευταία τροποποίηση: 13.09.2018) [117], εντοπίστηκαν οι πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης (PNGS). Η γλυκοζυλίωση συμβαίνει στην ακολουθία αμινοξέων Asn-X(εκτός Pro)-Ser/Thr.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

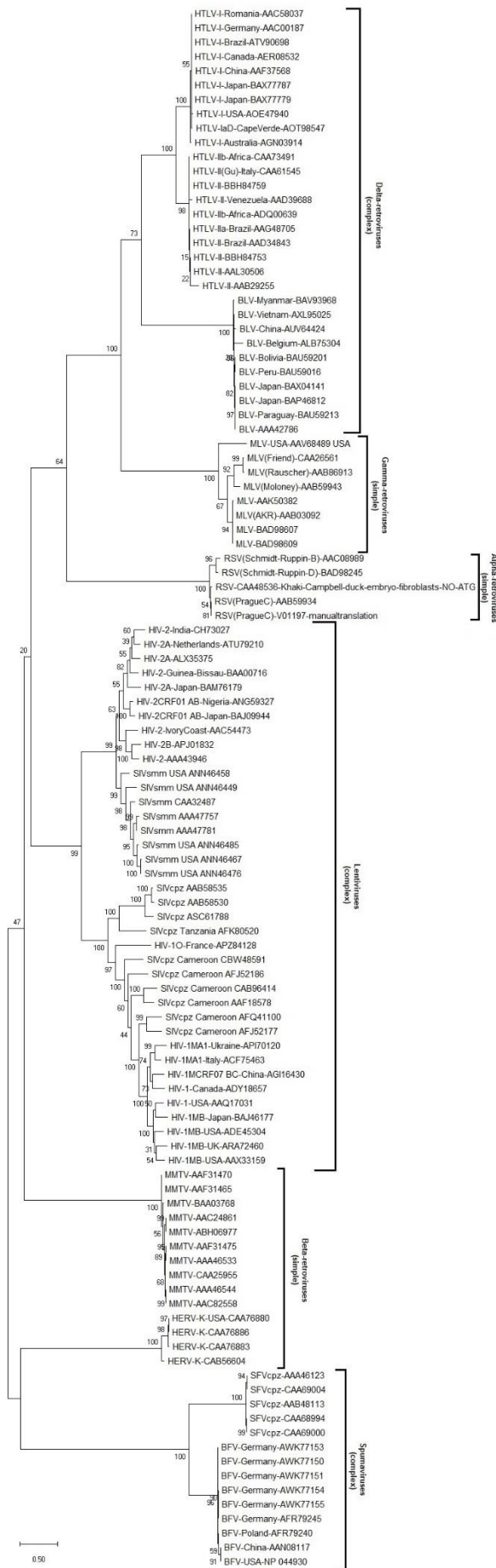
3.1 Φυλογενετικά δέντρα ρετροϊών

Στα φυλογενετικά δέντρα της μεθόδου Neighbor Joining (εικόνες 3.1.1 και 3.1.2) παρατηρούμε την πολύ στενή εξελικτική σχέση του HIV-1 με τον SIVcpz και του HIV-2 με τον SIVsmm, όπως ήταν αναμενόμενο. Οι κόμβοι τους εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό επαναληψιμότητας κατά το bootstrap test γεγονός που δηλώνει την εγκυρότητα της συγκεκριμένης εξελικτικής σχέσης. Οι αλληλουχίες των HIV-1 της ομάδας M είναι εξελικτικά κοντύτερα με ορισμένες αλληλουχίες SIVcpz απ' ό,τι με την αλληλουχία του HIV-1 της ομάδας O. Η διαφορά αυτή στηρίζεται από υψηλά ποσοστά επαναληψιμότητας. Οι ιοί HIV-1 και HIV-2 είναι εξελικτικά πιο διαφορετικοί μεταξύ τους απ' ό,τι ο καθένας ξεχωριστά συγκρινόμενος με τον κατά ευρείας αποδοχής πρόγονό του. Οι ιοί που ανήκουν στα γένη *Lentivirus*, *Deltaretrovirus* και στην οικογένεια *Spumaretrovirinae* είναι οι πολύπλοκοι ρετροϊοί. Στο δέντρο φαίνεται πως οι πολύπλοκοι ιοί, απέχουν εξελικτικά πολύ μεταξύ τους και αποτελούν μία πολυφυλετική ομάδα. Επιλέγοντας τους λιγότερο εξελιγμένους ιούς για να συγκριθούν με τον HIV-1, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι πολύπλοκοι ιοί είναι πιο συγγενικοί με απλούς ιούς παρά μεταξύ τους. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών της ομάδας M του HIV-1 απέχει 1,56 αντικαταστάσεις/θέση από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του HTLV-I. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών του HIV-1 απέχει 1,41 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του HTLV-I. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών της ομάδας M του HIV-1 απέχει 1,66 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του MLV. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών του HIV-1 απέχει 1,51 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του MLV. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών του HTLV-I απέχει 1,36 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του MLV. Αυτοί οι υπολογισμοί από το ορθογώνιο φυλογενετικό δέντρο (εικόνα 3.1.2) υποδηλώνουν πως ο κοινός πρόγονος των HTLV-I αλληλουχιών που είναι ένας πολύπλοκος ρετροϊός έχει λιγότερες αντικαταστάσεις αμινοξέων ανά θέση με τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του απλού MLV (1,36 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος) σε σχέση με τον πολύπλοκο κοινό πρόγονο των HIV-1 αλληλουχιών (1,41 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος). Συναρτήσεϊ του HIV-1 δεν παρατηρείται το ίδιο. Ο κοινός πρόγονος των HIV-1 αλληλουχιών είναι πιο όμοιος με τον κοινό πρόγονο των HTLV-I αλληλουχιών (1,41 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος) σε σχέση με τον κοινό πρόγονο των MLV αλληλουχιών (1,66 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος).



Εικόνα 3.1.2: Ορθογώνια απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου από τη μέθοδο Neighbor Joining με χρήση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης Env. Το βέλτιστο δέντρο που απεικονίζεται έχει άθροισμα μηκών των κλάδων = 15,36644871. Το ποσοστό των πιθανών δέντρων στα οποία τα εκάστοτε ταχα συγκροτήθηκαν μαζί κατά το bootstrap test αναφέρεται δίπλα από τους κόμβους. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με το μοντέλο Poisson. Μπάρα = 0,20 αντικαταστάσεις ανά θέση.

Στα φυλογενετικά δέντρα της μεθόδου Maximum Likelihood (εικόνες 3.1.3 και 3.1.4) παρατηρούμε την πολύ στενή εξελικτική σχέση του HIV-1 με τον SIVcpz και του HIV-2 με τον SIVsmm, όπως ήταν αναμενόμενο. Οι κόμβοι τους εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό επαναληψιμότητας, γεγονός που δηλώνει την εγκυρότητα της συγκεκριμένης εξελικτικής σχέσης. Οι αλληλουχίες των HIV-1 της ομάδας M είναι εξελικτικά κοντύτερα με ορισμένες αλληλουχίες SIVcpz απ' ό,τι με την αλληλουχία του HIV-1 της ομάδας O. Η διαφορά αυτή στηρίζεται από υψηλά ποσοστά επαναληψιμότητας. Οι ιοί HIV-1 και HIV-2 είναι εξελικτικά πιο διαφορετικοί μεταξύ τους απ' ό,τι ο καθένας ξεχωριστά συγκρινόμενος με τον κατά ευρείας αποδοχής πρόγονό του. Οι ιοί που ανήκουν στα γένη *Lentivirus*, *Deltaretrovirus* και στην οικογένεια *Spumaretrovirinae* είναι οι πολύπλοκοι ρετροϊοί. Στο δέντρο φαίνεται πως οι πολύπλοκοι ιοί, απέχουν εξελικτικά πολύ μεταξύ τους και αποτελούν μία πολυφυλετική ομάδα. Επιλέγοντας τους λιγότερο εξελιγμένους ιούς για να συγκριθούν με τον HIV-1, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι πολύπλοκοι ιοί είναι πιο συγγενικοί με απλούς ιούς παρά μεταξύ τους. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών της ομάδας M του HIV-1 απέχει 5,71 αντικαταστάσεις/θέση από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του HTLV-I. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών του HIV-1 απέχει 5,10 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του HTLV-I. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών της ομάδας M του HIV-1 απέχει 5,14 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του MMTV. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών του HIV-1 απέχει 4,52 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του MMTV. Ο κοινός πρόγονος των αλληλουχιών του HTLV-I απέχει 6 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος από τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του MMTV. Αυτοί οι υπολογισμοί από το ορθογώνιο φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.1.4) υποδηλώνουν πως ο κοινός πρόγονος των HIV-1 αλληλουχιών που είναι ένας πολύπλοκος ρετροϊός έχει λιγότερες αντικαταστάσεις αμινοξέων ανά θέση με τον κοινό πρόγονο των αλληλουχιών του απλού MMTV (4,52 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος) σε σχέση με τον πολύπλοκο κοινό πρόγονο των HTLV-I αλληλουχιών (5,10 αντικαταστάσεις/θέση αμινοξέος). Παρατηρείται, επίσης, πως στο 47% των δέντρων ο Beta ρετροϊός HERV-K είναι εξελικτικά κοντύτερα με τους πολύπλοκους Spumaviruses σε σχέση με τον MMTV που ανήκουν στο ίδιο γένος.



Εικόνα 3.1.4: Το ορθογώνιο φυλογενετικό δέντρο προέκυψε από τη μέθοδο Maximum Likelihood με τη χρήση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης Env και το μοντέλο Jones-Taylor-Thornton. Το δέντρο που απεικονίζεται είχε την υψηλότερη λογαριθμική τιμή πιθανότητας = -57623,22. Το ποσοστό των πιθανών δέντρων στα οποία τα εκάστοτε taxa συγκροτήθηκαν μαζί αναφέρεται δίπλα από τα κλαδιά. Τα αρχικά δέντρα αποκτήθηκαν εφαρμόζοντας αλγορίθμους NJ και BioNJ σε ένα σύνολο αποστάσεων ζευγών υπολογισμένο με το μοντέλο JTT και μετά επιλέχθηκε το δέντρο με την υψηλότερη πιθανότητα. Μπάρα = 0,50 αντικαταστάσεις ανά θέση.

3.2 Σύγκριση των ρετροϊών με βάση το επίπεδο γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης Επν

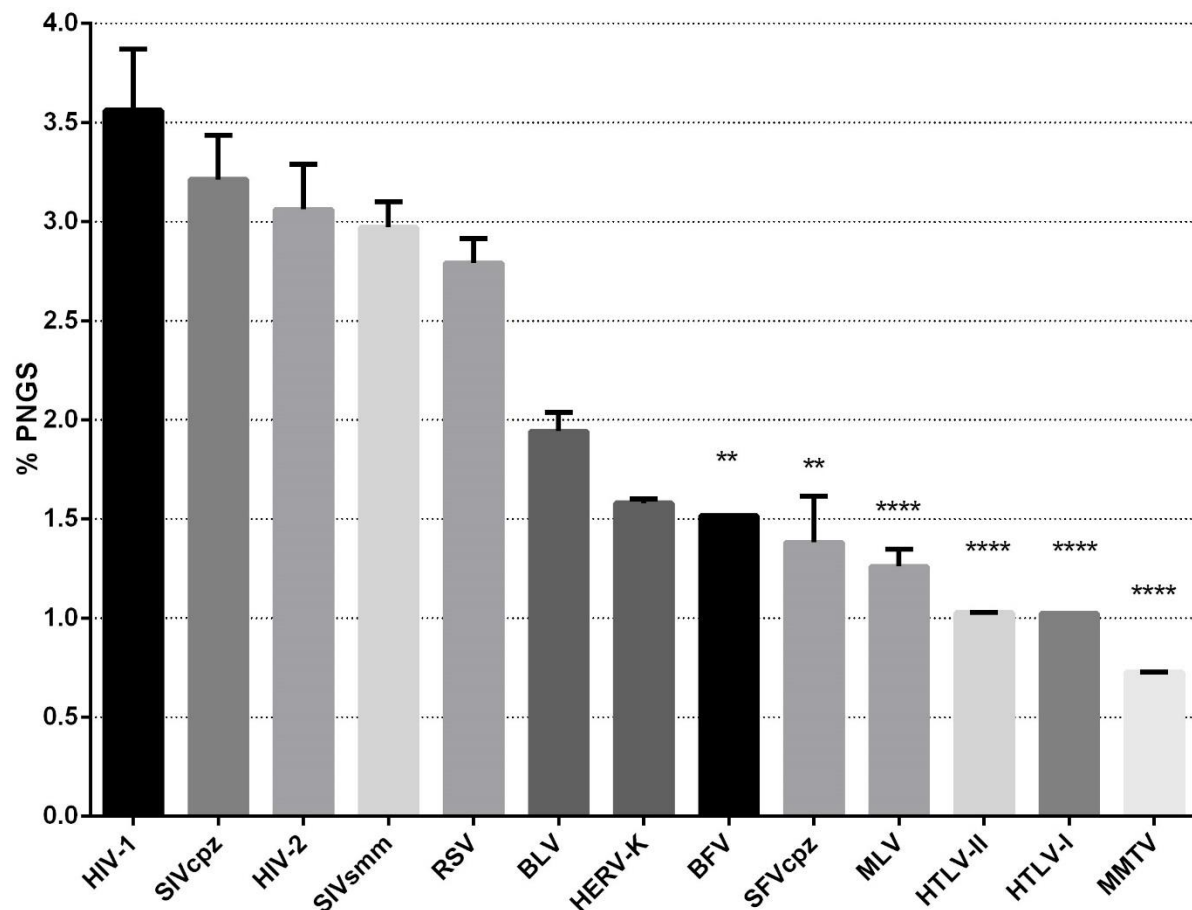
Οι ίδιες αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν και για τη συγκριτική μελέτη με βάση την γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης Επν. Στον Πίνακα 3.2.1 παρατίθεται μία λίστα με τους ιούς και τον συντελεστή μεταβλητότητας (CV) του ποσοστού PNGS για τον κάθε ένα. Ο HIV-1 είναι ο ρετροϊός με τους υψηλότερους CV(PNGS) και CV(%PNGS) σε σχέση με τους υπόλοιπους ιούς της μελέτης με τη δεύτερη θέση να κατέχει ο HIV-2. Αυτοί οι παράμετροι είναι ενδεικτικοί της ποικιλομορφίας του HIV-1 και του HIV-2 όσον αφορά τη γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης Επν.

Πίνακας 3.2.1: Λίστα των ρετροϊών μαζί με τον συντελεστή μεταβλητότητας (CV) του αριθμού αμινοξέων, του αριθμού PNGS και του ποσοστού PNGS. Αναφέρεται επίσης και το πλήθος των αλληλουχιών για κάθε ιό. Η λίστα είναι κατά φθίνοντα CV(%PNGS).

Ιοί	Πλήθος αλληλουχιών	CV πλήθους αμινοξέων (%)	CV πλήθους PNGS (%)	CV %PNGS (%)
HIV-1	10	3,29	11,13	8,23
HIV-2	10	0,78	7,61	7,03
MLV	8	2,68	5,52	6,60
SIVcpz	10	2,03	7,07	6,57
BLV	10	5,70	4,08	4,61
SIVsmm	8	0,41	4,21	4,06
RSV	5	2,19	5,83	3,93
HERV-K	4	7,06	6,53	0,70
MMTV	10	0,30	0	0,30
HTLV-II	10	0,19	0	0,18
SFVcpz	5	0,14	0	0,14
HTLV-I	10	0	0	0
BFV	9	0	0	0

Από το γράφημα των στηλών της Εικόνας 3.2.1 παρατηρούμε ότι από όλους τους ρετροϊούς που εξετάσθηκαν, ο HIV-1 είχε την υψηλότερη μέση τιμή ποσοστού PNGS ανά αμινοξύ στην πρωτεΐνη Επν (3,56 %). Ακολουθεί ο κοντινότερος εξελικτικά ιός με τον HIV-1, ο SIVcpz, και τρίτος είναι ο HIV-2. Από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πρώτων 5 ιών (HIV-1, SIVcpz, HIV-2, SIVsmm, RSV). Παρατηρούμε ότι οι πολύπλοκοι ρετροϊοί βρίσκονται σε όλες τις κλίμακες του γραφήματος με τους HTLV-I και HTLV-II να έχουν χαμηλά ποσοστά PNGS στην πρωτεΐνη Επν, 1,02 % και 1,03 %, αντίστοιχα, τα οποία είναι στατιστικώς πάρα πολύ σημαντικά ($p < 0,0001$) χαμηλότερα από του HIV-1. Το ποσοστό PNGS του πολύπλοκου BLV είναι 1,52

%, το οποίο δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο από του HIV-1. Οι ιοί των χιμπατζήδων SIVcpz και SFVcpz έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,037$) στα ποσοστά PNGS τους με τον SIVcpz να υπερτερεί. Οι HTLV-I και BFV αν και ρετροϊοί έχουν πολύ συντηρημένη πρωτεΐνη Env, αφού όλες οι αλληλουχίες που εξετάστηκαν είχαν ίσο πλήθος αμινοξέων με ελάχιστες αντικαταστάσεις και οι PNGS ήταν στις ίδιες θέσεις.

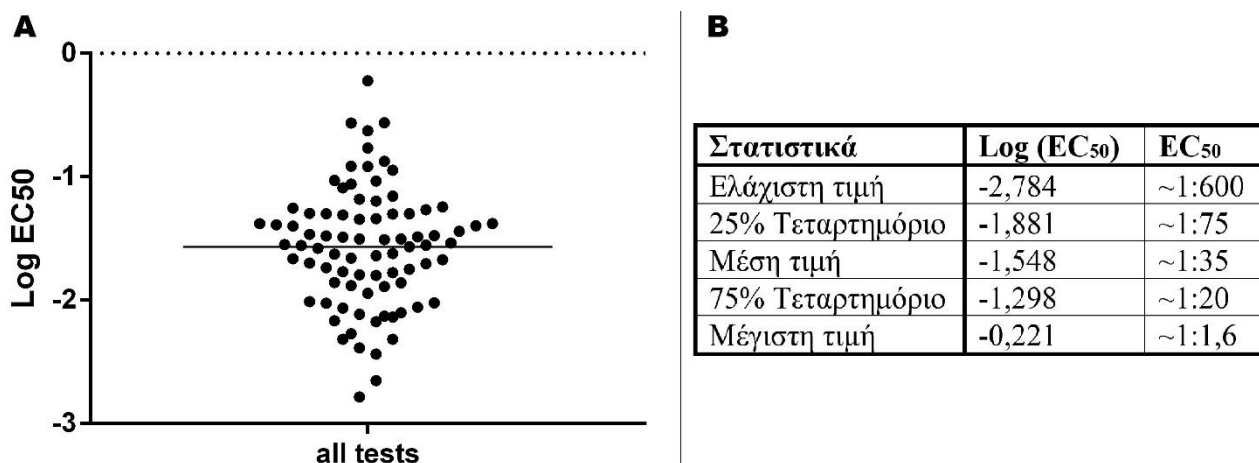


Εικόνα 3.2.1: Γράφημα στηλών που απεικονίζει τα ποσοστά γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης Env διάφορων ρετροϊών. Οι κατακόρυφες γραμμές επιδεικνύουν την τυπική απόκλιση (SD). Στο γράφημα απεικονίζονται οι στατιστικές σημαντικότητες συγκριτικά με τον HIV-1, **: $p \leq 0,01$, ****: $p < 0,0001$. (HIV-2 vs HTLV-I $p < 0,0001$, HIV-2 vs HTLV-I $p = 0,0004$, HIV-2 vs MMTV $p < 0,0001$, HIV-2 vs MLV $p = 0,0101$, HTLV-I vs BLV $p = 0,0277$, HTLV-I vs RSV $p = 0,0450$, HTLV-I vs SIVcpz $p < 0,0001$, HTLV-I vs SIVsmm $p = 0,0006$, HTLV-II vs SIVcpz $p < 0,0001$, HTLV-II vs SIVsmm $p = 0,0050$, BLV vs MMTV $p = 0,0011$, RSV vs MMTV $p = 0,0037$, HERV-K vs MMTV $p = 0,0169$, MMTV vs SIVcpz $p < 0,0001$, MMTV vs SIVsmm $p < 0,0001$, SFVcpz vs SIVcpz $p = 0,0375$, BFV vs SIVcpz $p = 0,0290$, MLV vs SIVcpz $p = 0,0014$)

3.3 Αποτελέσματα δοκιμασιών εξουδετέρωσης HIV-1 (Hxb2) με αντισώματα ασθενών

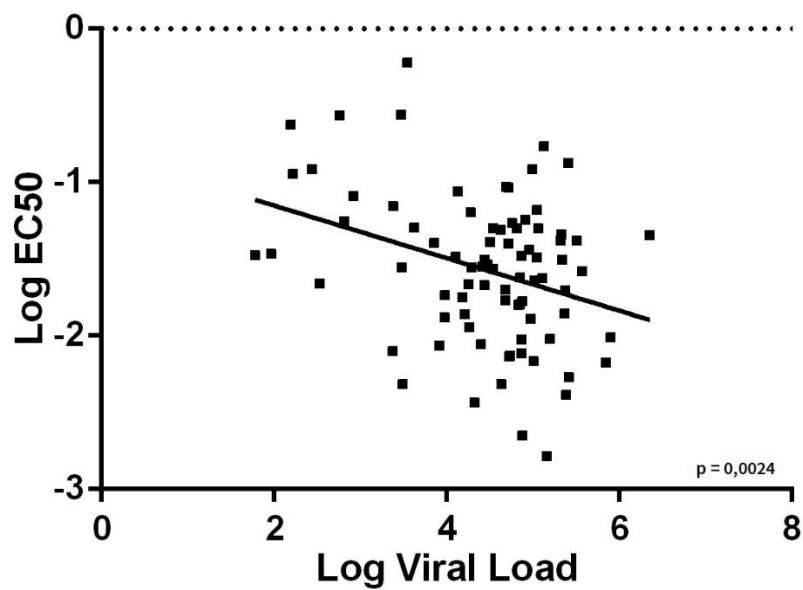
Εξετάσθηκαν δείγματα πλάσματος 83 ασθενών από την Τανζανία ως προς την ικανότητα εξουδετέρωσης ενάντια στον tier-1A Hxb2 και υπολογίστηκε το ιικό φορτίο τους. Το ιικό φορτίο κυμαίνεται από 60 αντίγραφα/mL έως 2.250.000 αντίγραφα/mL. Ο ασθενής με το χαμηλότερο ιικό φορτίο είχε αντισώματα με $EC_{50} = 1:30$ και ο ασθενής με το μεγαλύτερο είχε αντισώματα με $EC_{50} = 1:22$. Και οι δύο ασθενείς αποτελούν ακραίες περιπτώσεις και δεν αντιπροσωπεύουν το σύνολο των μετρήσεων. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά της EC_{50} ή του ιικού φορτίου με βάση το φύλο ή τη θεραπεία των ασθενών. Άρα, η αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων και το ιικό φορτίο είναι ανεξάρτητα του φύλου και της χορήγησης πρεδνισολόνης. Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση υπήρχε μόνο μεταξύ της EC_{50} και του ιικού φορτίου.

Στην Εικόνα 3.3.1 απεικονίζονται διαγραμματικά όλες οι τιμές EC_{50} και στατιστικά στοιχεία για αυτές. Οι τιμές έχουν κανονική κατανομή. Η μέση τιμή των EC_{50} είναι 1:35 με 21 ασθενείς (25%) να έχουν αντισώματα με $EC_{50} \leq 1:75$ και 20 ασθενείς (25%) να έχουν αντισώματα με $EC_{50} \geq 1:20$. Η EC_{50} κυμαίνεται μεταξύ 1:600 και 1:1,6.



Εικόνα 3.3.1: (Α) Διαγραμματική κατανομή όλων των τιμών EC_{50} . (Β) Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία για το σύνολο των EC_{50} .

Η τιμές EC_{50} και οι τιμές ιικού φορτίου έχουν στατιστικώς πολύ σημαντική αρνητική γραμμική συσχέτιση ($p=0,0024$) (Εικόνα 3.3.2). Αυτό σημαίνει πως όσο πιο αποτελεσματικά είναι τα αντισώματα ενός ασθενή, τόσο υψηλότερο είναι το ιικό φορτίο αυτού του ασθενούς.



Εικόνα 3.3.2: Διάγραμμα με τον λογάριθμο του ιικού φορτίου στον οριζόντιο άξονα και τον λογάριθμο της EC_{50} στον κατακόρυφο άξονα που απεικονίζει τη αρνητική γραμμική συσχέτιση των δύο αυτών μεγεθών ($p = 0,0024$).

3.4 Κατασκευή πρωτοκόλλου PCR

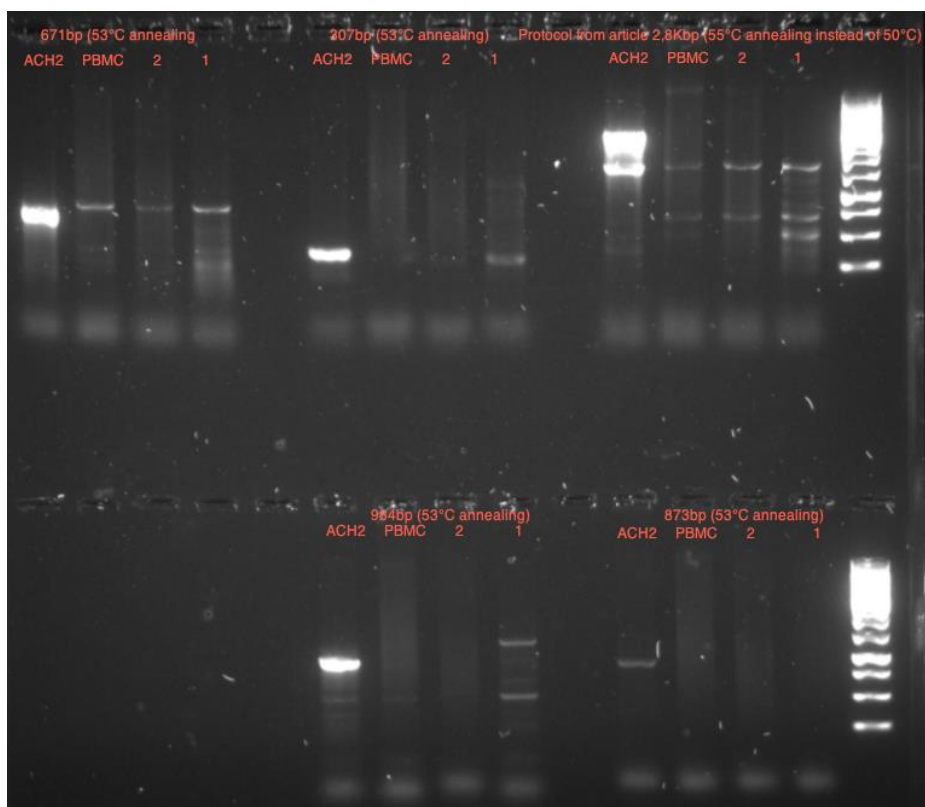
3.4.1 Αντιδράσεις PCR με την πολυμεράση Taq

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές δοκιμές για την απομόνωση διαφορετικών τμημάτων του γονιδίου *Env* υπό συγκεκριμένων συνδυασμών εκκινητών, χρησιμοποιώντας την πολυμεράση Taq. Τα 2 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από το διαγνωστικό τμήμα του Institut für Virologie und Immunbiologie του Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών παρατίθενται στον πίνακα 2.15.2. Τα στάδια των PCR παρατίθενται στον πίνακα 2.15.3. Οι αντιδράσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4.1.1. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην εικόνα 3.4.1.1.

Πίνακας 3.4.1.1: Οι αντιδράσεις PCR με το μήκος του επιθυμητού τμήματος, τους εκκινητές και τη θερμοκρασία υβριδισμού τους με το Taq PCR Master Mix kit.

Αντιδράσεις PCR	Μήκος τμήματος (bp)	Εκκινητές F & R	Θερμοκρασία Υβριδισμού (°C)
1	671	E00 & V1V2rucA	53
2	307	V1V2hinB & V1V2rucA	53
3	2888	E00 & E01	55
4	984	5957hin & V1V2rucB	53
5	873	V1V2hinA & 7373R	53

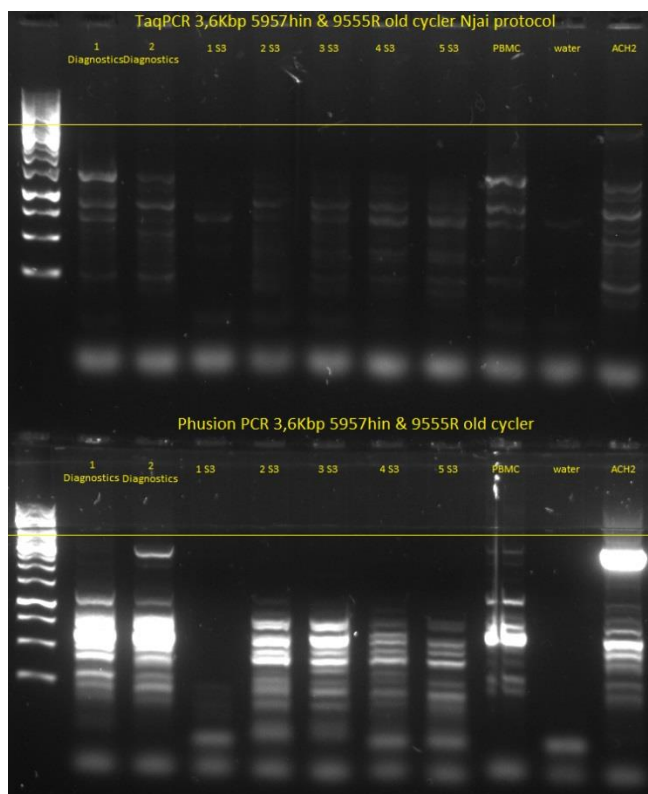
Η ηλεκτροφόρηση της Εικόνας 3.4.1.1 δείχνει ότι σε κάποιες αντιδράσεις υπήρξε ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός τμημάτων του ανθρώπινου DNA, και επομένως, αποκλείστηκαν οι συγκεκριμένοι εκκινητές. Μόνο στην αντίδραση 2 με εκκινητές V1V2hinB και V1V2rucA υπήρξε πολλαπλασιασμός ιικού τμήματος. Το τμήμα αυτό περιέχει την περιοχή V1V2.



Εικόνα 3.4.1.1: Ηλεκτροφορήσεις των αντιδράσεων του Πίνακα 3.4.1.1 με το Taq PCR Master Mix kit.

3.4.2 Αντιδράσεις σύγκρισης των πολυμερασών Taq και Phusion®

Η σύγκριση μεταξύ των δύο kits στην προσπάθεια πολλαπλασιασμού ολόκληρου του γονιδίου με τους εκκινητές 5957hin και 9555R προς παραγωγή τμήματος 3,6 kbp έδειξε μεγάλη διαφορά στην απόδοση των δύο πολυμερασών, αλλά όχι διαφορά στην ειδικότητα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.2.1. Χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα από το διαγνωστικό τμήμα και 5 δείγματα από τους ασθενείς της κλινικής δοκιμής. Η λίστα των αντιδραστηρίων του Phusion kit παρατίθεται στον Πίνακα 2.15.4. Οι συνθήκες της αντίδρασης Taq PCR ήταν: Αρχική αποδιάταξη για 3 λεπτά στους 94°C, 16 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 20 δευτερόλεπτα, υβριδισμό στους 53°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 4 λεπτά που ακολουθήθηκαν από 16 κύκλους με αύξηση 20 δευτερολέπτων του σταδίου επιμήκυνσης ανά κύκλο και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι τροποποιημένες από τις πρωτότυπες των Njai και συνεργατών του [147]. Οι συνθήκες της αντίδρασης Phusion PCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.15.6 και η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 64,4 °C.



Εικόνα 3.4.2.1: Στο πάνω μέρος απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Taq PCR και στο κάτω μέρος της Phusion PCR από τις αντιδράσεις σύγκρισης. Οι οριζόντιες κίτρινες γραμμές τοποθετήθηκαν για ευκολότερη σύγκριση.

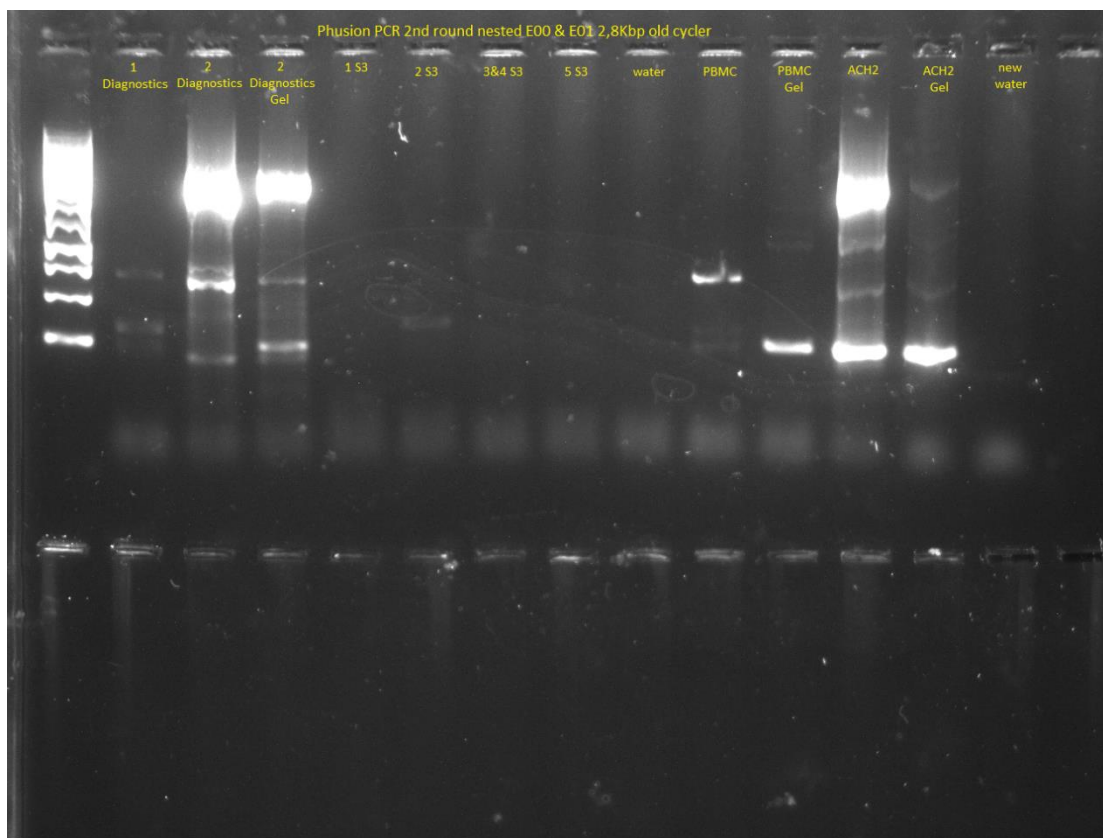
Λόγω της μεγάλης διαφοράς της απόδοσης των δύο πολυμερασών, επιλέχθηκε το Phusion High-Fidelity PCR kit ως ιδανικότερο για τη συνέχιση των πειραμάτων.

3.4.3 Αντιδράσεις PCR με την πολυμεράση Phusion®

3.4.3.1 Αρχικές αντιδράσεις PCR

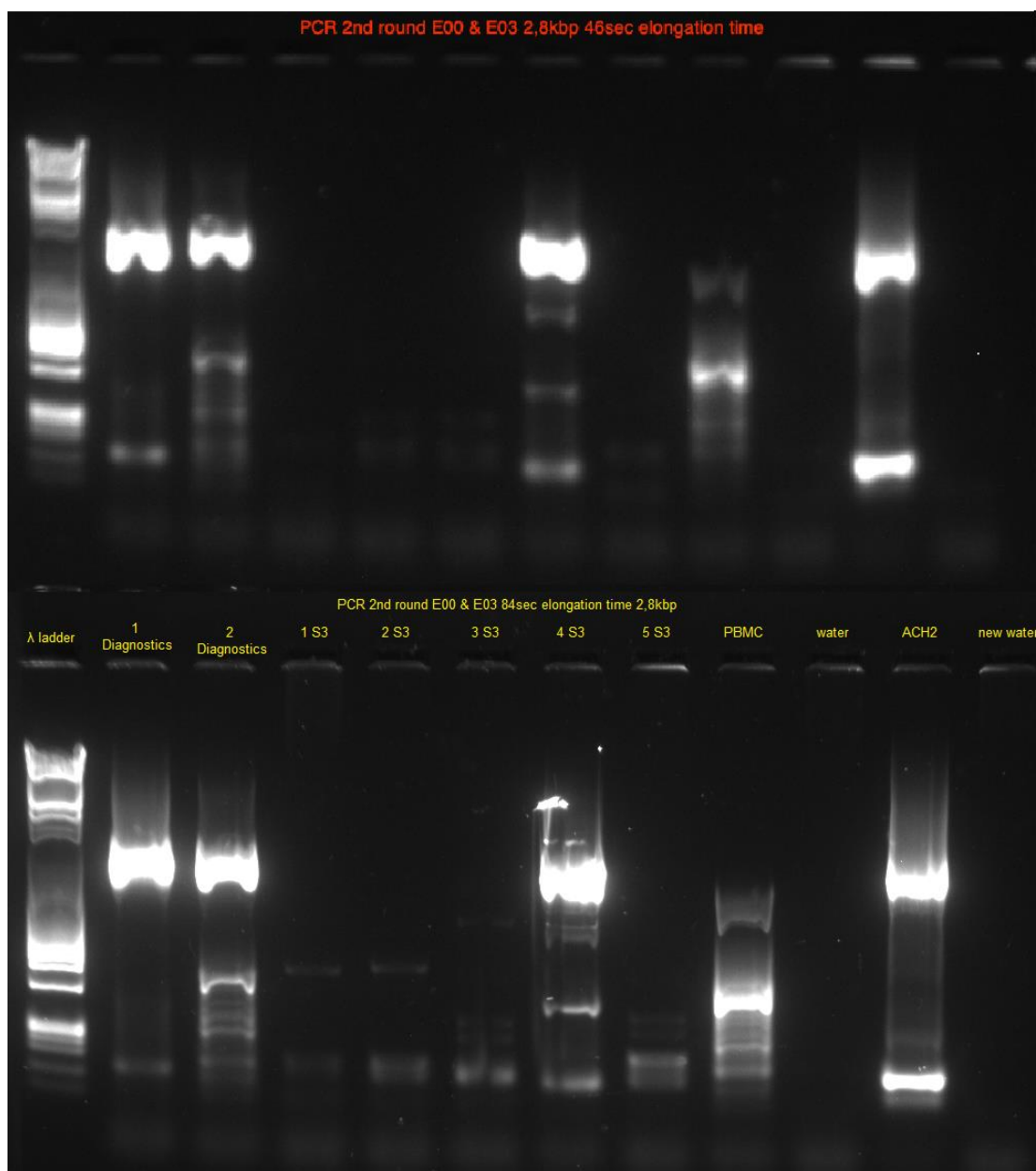
Στην παραπάνω αντίδραση της Phusion κατά τη σύγκριση των δύο πολυμερασών με τους εκκινητές 5957hin και 9555R έγινε καθαρισμός όλων των PCR προϊόντων από εκκινητές, ένζυμα και νουκλεοτίδια και στα 3 δείγματα με το επιθυμητό τμήμα (Diagnostics 2, PBMC, ACH2) έγινε εξαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA κατευθείαν από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, έγινε ένας 2ος γύρος nested PCR με τους εκκινητές E00 και E01 και ως υποστρώματα τα προϊόντα του 1ου γύρου. Ακολουθήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και συνθηκών με τη διαφορά πως η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 66°C και

ο χρόνος επιμήκυνσης ήταν 43 δευτερόλεπτα. Υπό αυτές τις συνθήκες (Εικόνα 3.4.3.1.1) παρατηρήθηκε ότι το δείγμα PBMC του υγιούς δότη δεν περιέχει το επιθυμητό ιικό τμήμα, αλλά υπάρχουν μη επιθυμητά τμήματα που έχουν πολλαπλασιαστεί. Το δείγμα του ασθενούς από το διαγνωστικό τμήμα είναι θετικό ανεξαρτήτως του τρόπου καθαρισμού του προϊόντος του 1ου γύρου της nested PCR. Παρατηρούμε πως το δείγμα ACH2 από την εξαγωγή έδωσε ένα ελάχιστα θετικό αποτέλεσμα. Αυτό ίσως να οφείλεται στο υπερβολικό υπόστρωμα που είχε η αντίδραση PCR, το οποίο λειτούργησε ανασταλτικά. Τα μη επιθυμητά τμήματα στον ασθενή δεν προκάλεσαν πρόβλημα κατά την αλληλούχιση.



Εικόνα 3.4.3.1.1: Ηλεκτροφόρηση από 2ο γύρο PCR με καθαρισμένα δείγματα με kit και με εξαγωγή από gel.

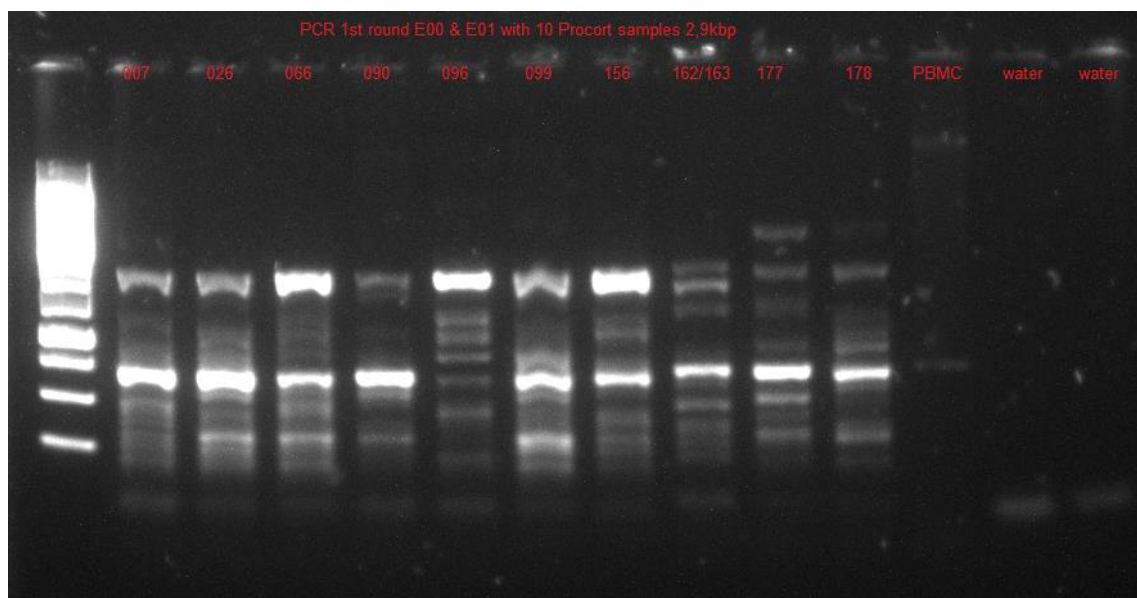
Σε μία άλλη προσπάθεια χρησιμοποιήθηκαν στον 1ο γύρο nested PCR οι εκκινητές 5957hin και E01, με θερμοκρασία υβριδισμού 66°C και χρόνο επιμήκυνσης 47 δευτερόλεπτα και στον 2ο γύρο nested PCR οι E00 και E03 με θερμοκρασία υβριδισμού 63,5°C και χρόνος υβριδισμού 46 δευτερόλεπτα. Έγινε και μία σύγκριση μεταξύ του κανονικού και του διπλάσιου χρόνου επιμήκυνσης, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια διαφορά (Εικόνα 3.4.3.1.2).



Εικόνα 3.4.3.1.2: Σύγκριση δύο ηλεκτροφορήσεων δύο αντιδράσεων PCR με την δεύτερη να έχει διπλάσιο χρόνο επιμήκυνσης.

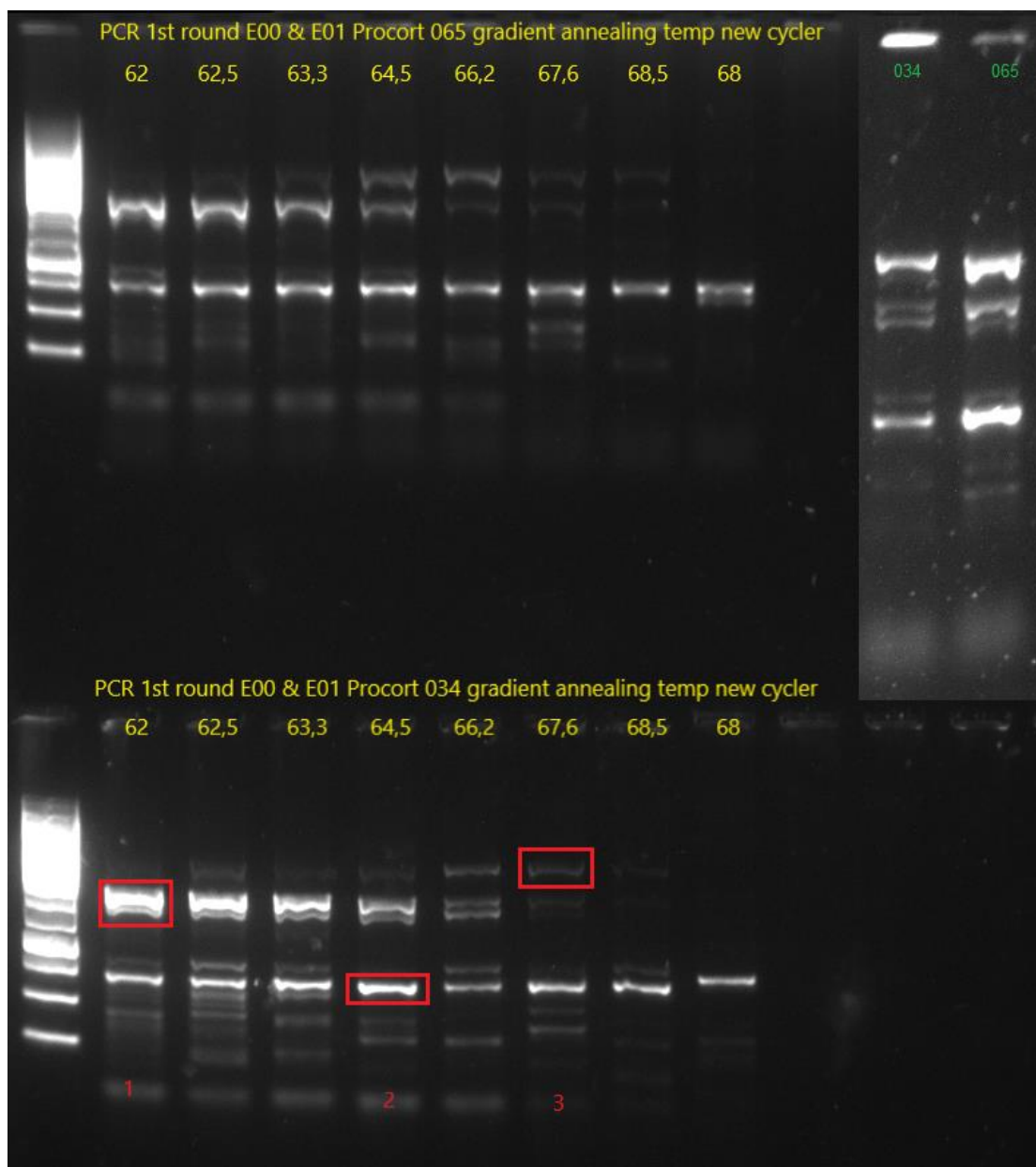
3.4.3.2 Επιλογή Βέλτιστης Θερμοκρασίας υβριδισμού 1ου γύρου

Η αντίδραση PCR με τους εκκινητές E00 και E01 παρήγαγε πολλά μη ειδικά προϊόντα και σε κάποιες περιπτώσεις και τα επιθυμητά μεταξύ των άλλων (Εικόνα 3.4.3.2.1).



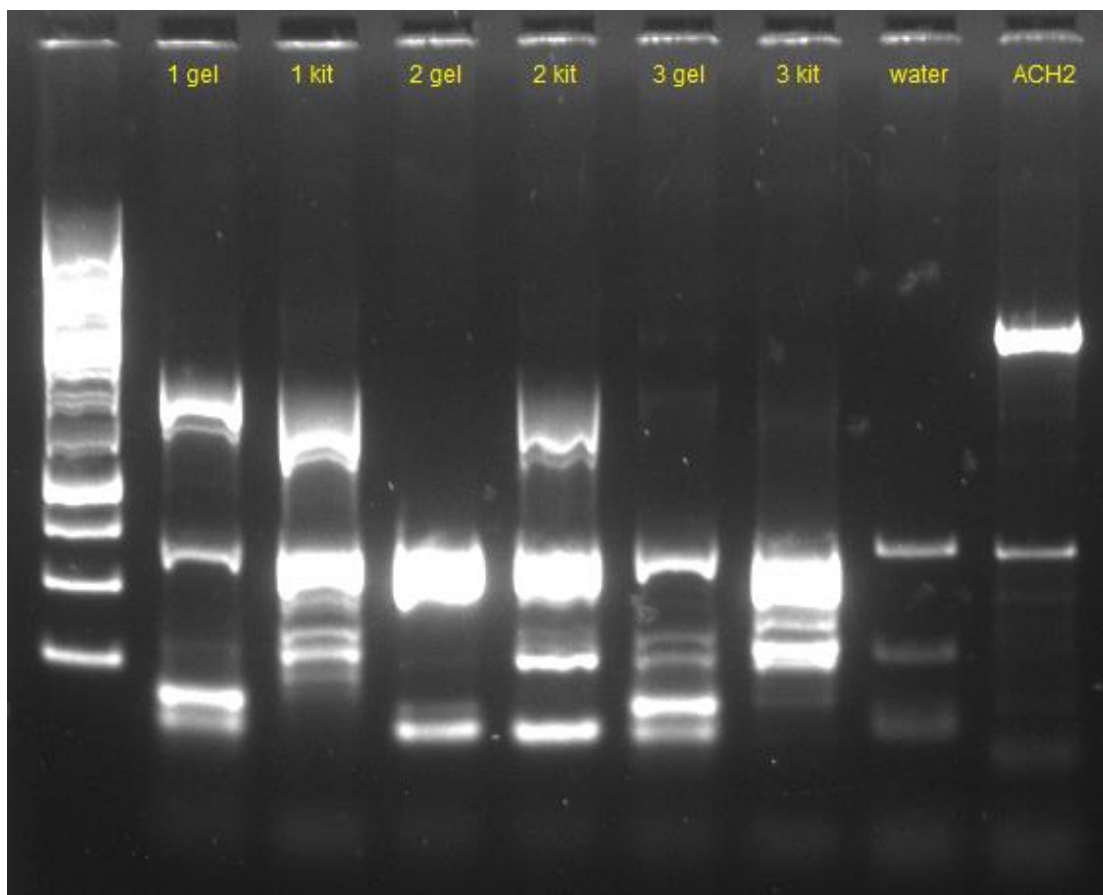
Εικόνα 3.4.3.2.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR 1ου γύρου 10 ασθενών με τους εκκινητές E00 & E01 προς πολλαπλασιασμό ολόκληρου του γονιδίου *Enr*.

Μετά από εξέταση αρκετών δειγμάτων υπό τον συγκεκριμένο συνδυασμό εκκινητών (E00 και E01), επιλέχθηκαν τα δείγματα των ασθενών 034 και 065, καθώς παρήγαγαν τη μεγαλύτερη ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος DNA. Με αυτά τα δύο δείγματα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών για επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.4.3.2.2. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η θερμοκρασία υβριδισμού 66,2°C είναι η βέλτιστη και συμπίπτει με την προτεινόμενη θερμοκρασία από την διαδικτυακή εφαρμογή υπολογισμού θερμοκρασίας της εταιρείας.



Εικόνα 3.4.3.2.2: Ηλεκτροφόρηση 2 αντιδράσεων PCR 2 ασθενών με διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού. Στα κόκκινα πλαίσια βρίσκονται τα τμήματα που αφαιρέθηκαν για την πραγματοποίηση ενός 2ου γύρου nested PCR. Με πράσινα γράμματα είναι τα αποτελέσματα με θερμοκρασία υβριδισμού 66°C για τα οποία έγινε η επιλογή αυτών των 2 ασθενών.

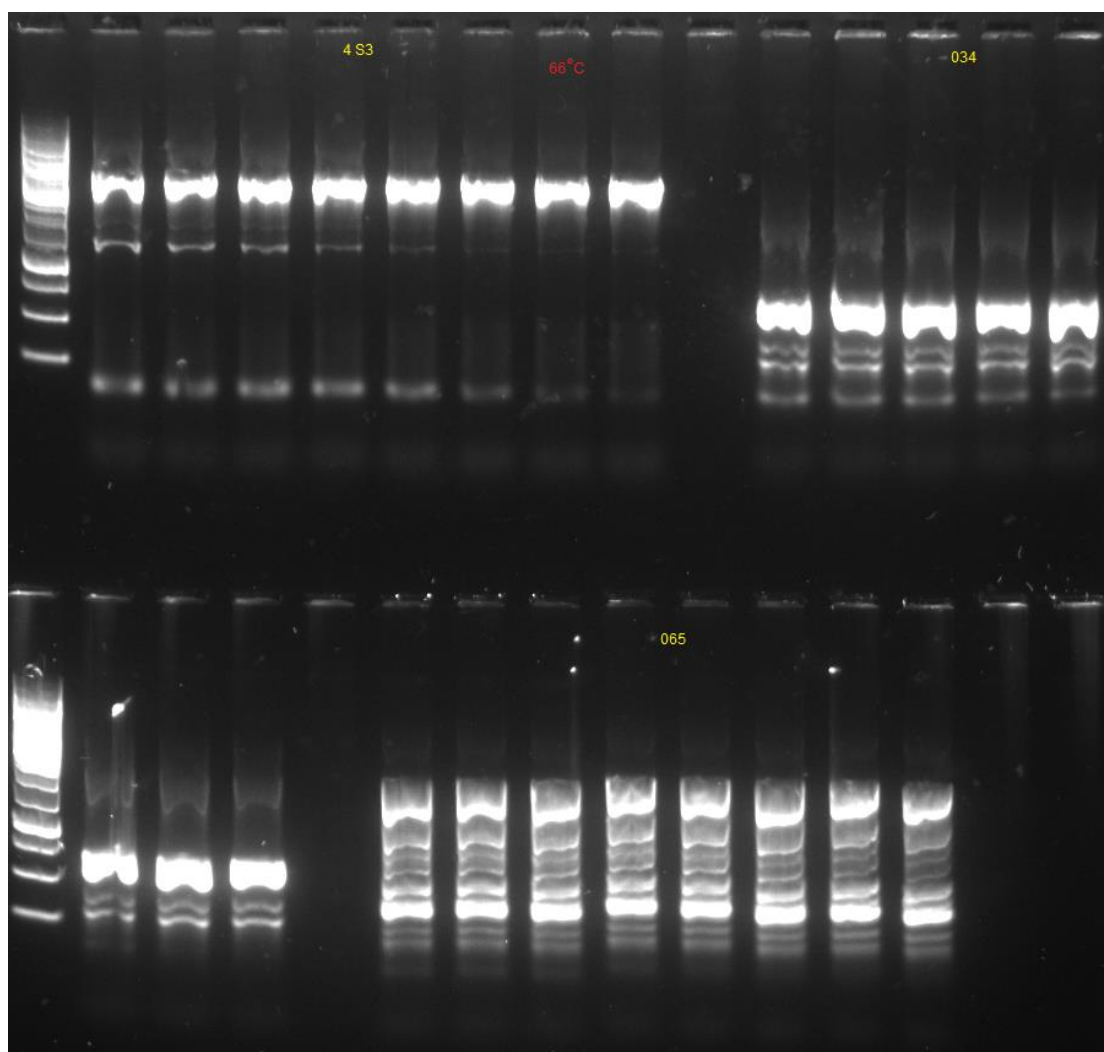
Από την αντίδραση του ασθενούς 034 καθαρίστηκαν τα προϊόντα με θερμοκρασίες 62, 64,5 και 67,6°C και επελέγησαν 3 ζώνες προς εξαγωγή από το πήκτωμα και χρήση ως υπόστρωμα για έναν 2ο γύρο PCR με εκκινητές E00 και E03. Οι ζώνες που απομονώθηκαν είναι μέσα σε κόκκινα πλαίσια στην Εικόνα 3.4.3.2.2. Τα αποτελέσματα του 2ου γύρου της nested PCR απεικονίζονται στην Εικόνα 3.4.3.2.3. Υπάρχει ένδειξη μόλυνσης και η PCR αδυνατεί να πολλαπλασιάσει το επιθυμητό τμήμα του τρίτου κόκκινου πλαισίου.



Εικόνα 3.4.3.2.3: Ηλεκτροφόρηση 2ου γύρου nested PCR με θερμοκρασία υβριδισμού 63,5°C με δείγματα από την αντίδραση με διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού του ασθενούς 034.

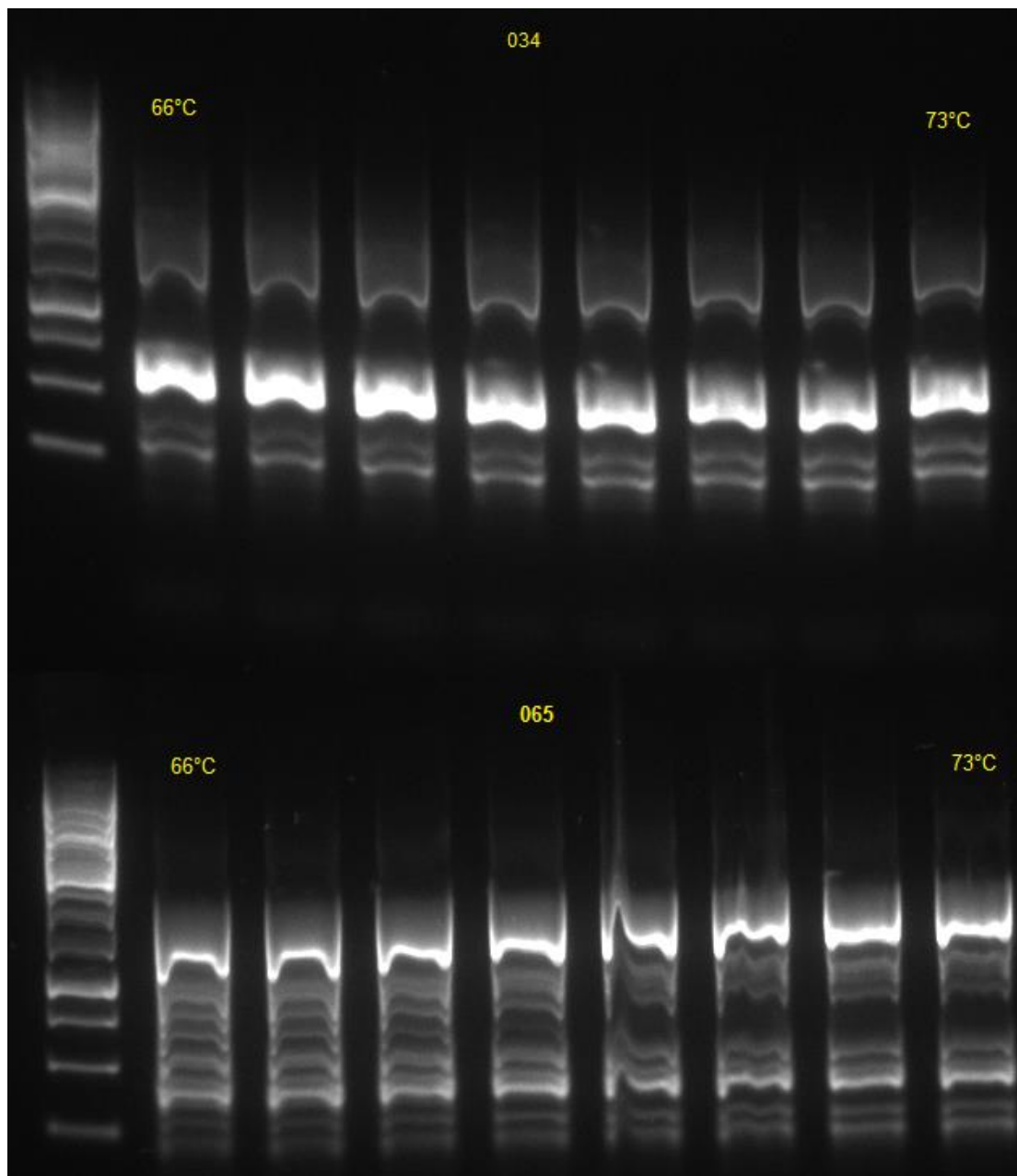
3.4.3.3 Επιλογή Βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού 2ου γύρου

Πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση διαβάθμισης θερμοκρασίας υβριδισμού για τους εκκινητές του 2ου γύρου της nested PCR, E00 και E03, με καθαρισμένα προϊόντα των ασθενών «4 S3», 034 και 065. Το προϊόν «4 S3» προέρχεται από 1ο γύρο με 5957hin και E00. Βλέπουμε στην Εικόνα 3.4.3.3.1 ότι στην περίπτωση του δείγματος «4 S3» στη θερμοκρασία 66°C παραμένει μόνο το επιθυμητό τμήμα, σε αντίθεση με τα άλλα δύο δείγματα που δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των θερμοκρασιών.



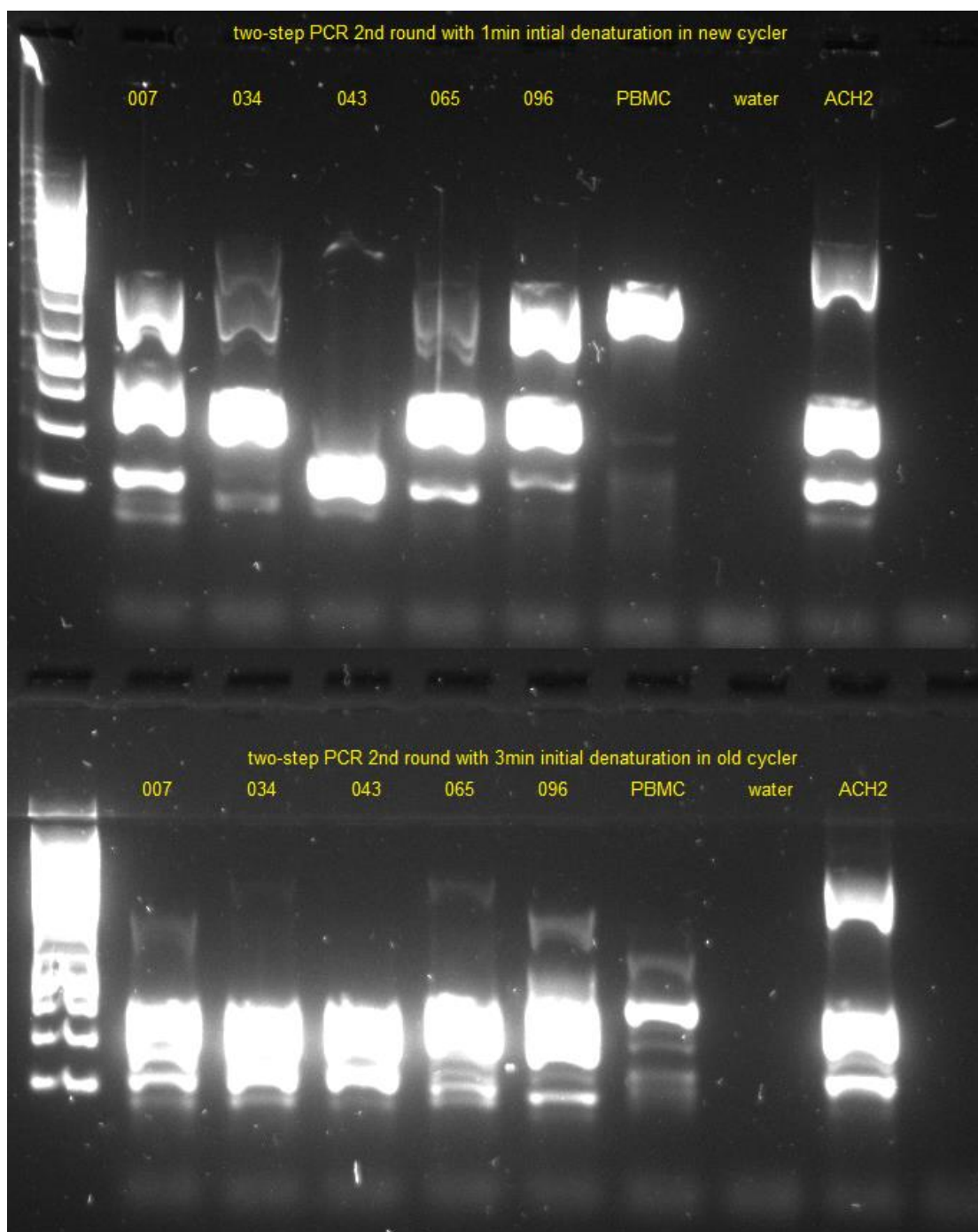
Εικόνα 3.4.3.3.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR 2ου γύρου με E00 & E03 με τα δείγματα 4 S3, 034 και 065 και διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού 59,5-66,5°.

Ακολούθησε και μία επαναληπτική αντίδραση nested PCR 2ου γύρου με τα καθαρισμένα προϊόντα 034 και 065 και με διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού 66-73°C (Εικόνα 3.4.3.3.2).



Εικόνα 3.4.3.3.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR 2ου γύρου με E00 & E03 με τα δείγματα 034 και 065 και διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού 66-73°.

Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ούτε στη θερμοκρασία 73°C, και επομένως έγινε μία αντίδραση two-step PCR με τα 2 δείγματα (034 και 065) και 3 άλλων θετικών δειγμάτων (007, 043 και 096). Τα αποτελέσματα ήταν όμοια με την εκτέλεση ενός three-step nested PCR 2ου γύρου και απεικονίζονται στην Εικόνα 3.4.3.3.3.



Εικόνα 3.4.3.3.3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων two-step nested PCR 2ου γύρου και σύγκριση 2 διαφορετικών χρόνων αρχικής αποδιάταξης. Στο επάνω μέρος απεικονίζονται τα προϊόντα με το χρόνο αρχικής αποδιάταξης 1 λεπτού και στο κάτω μέρος με το χρόνο αρχικής αποδιάταξης 3 λεπτών.

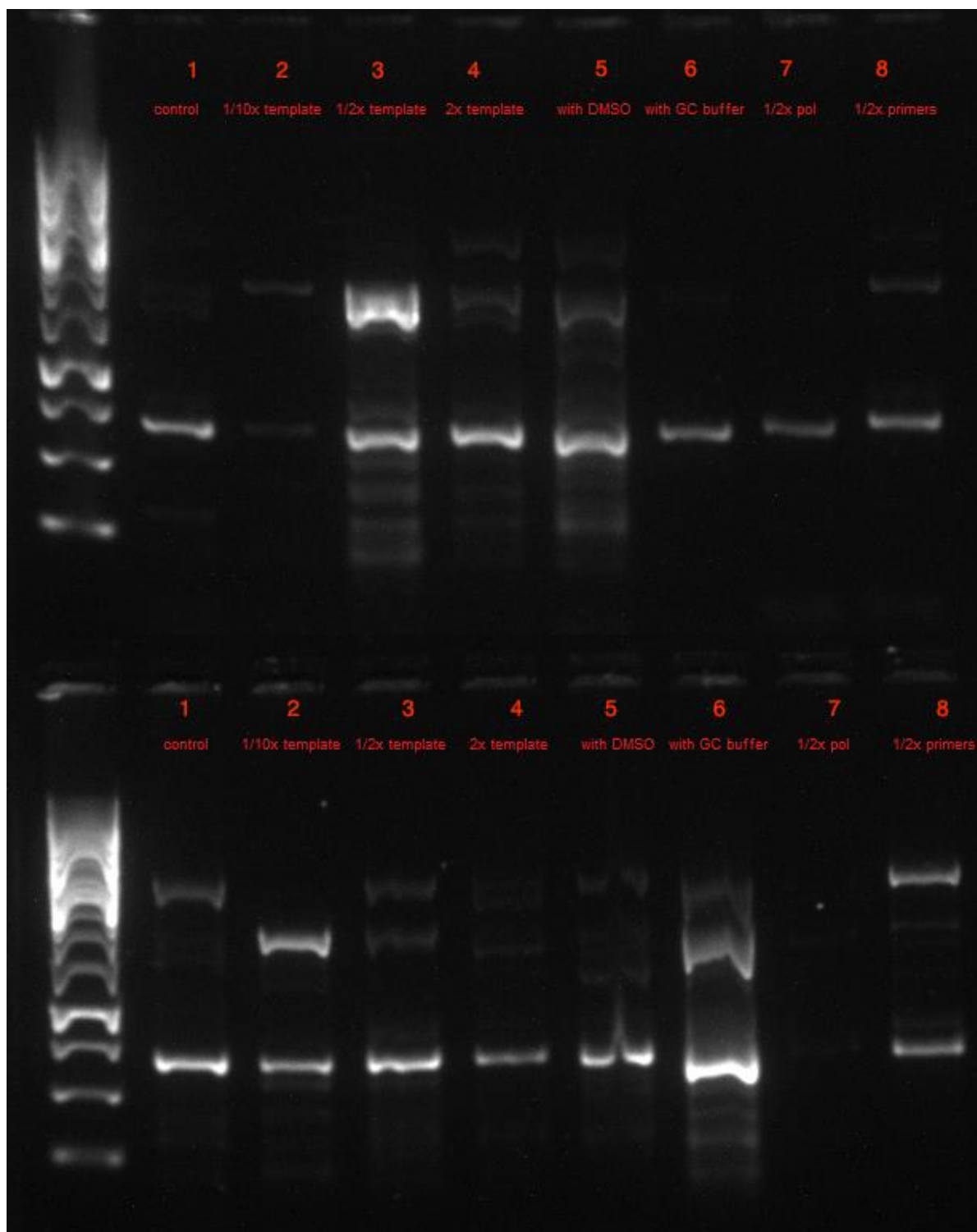
3.4.3.4 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεων αντιδρώντων 1ου γύρου

Θεωρώντας μετά τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η σωστή θερμοκρασία υβριδισμού είναι αυτή που συστήνει η εταιρία, οι αλλαγές επικεντρώθηκαν στις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Επιλέχθηκαν ξανά τα θετικά δείγματα 034 και 065 λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει μετά τις PCR. Σε κάθε αντίδραση άλλαζε η συγκέντρωση μόνο ενός αντιδρώντος. Ο Πίνακας 3.4.3.4.1 δείχνει τις αλλαγές σε κάθε αντίδραση. Το buffer GC χρησιμοποιείται σε αλληλουχίες υψηλού ποσοστού GC. Το γονίδιο *Env* έχει ποσοστό GC = 41 %.

Πίνακας 3.4.3.4.1: Πίνακας με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των δοκιμαστικών αντιδράσεων nested PCR 1ου γύρου. Στην αντίδραση 6 το buffer που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GC, ιδανικό για πλούσιες σε GC αλληλουχίες.

MasterMix	Buffer (μL)	H ₂ O (μL)	dNTP (μM)	Primer E00 (μM)	Primer E01 (μM)	DMSO	Pol (U/μL)	Template (μL)
1	4	12,4	200	0,5	0,5		0,02	1
2	4	12,4	200	0,5	0,5		0,02	diluted x10
3	4	12,9	200	0,5	0,5		0,02	0,5
4	4	11,4	200	0,5	0,5		0,02	2
5	5	11,8	200	0,5	0,5	3%	0,02	1
6	(GC) 4	12,4	200	0,5	0,5		0,02	1
7	4	12,5	200	0,5	0,5		0,01	1
8	4	13,4	200	0,25	0,25		0,02	1

Και στα δύο δείγματα η χαμηλότερη συγκέντρωση των εκκινητών έχει θετικά αποτελέσματα προς τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος (Εικόνα 3.4.3.4.1). Η ύπαρξη DMSO στο μίγμα της αντίδρασης αυξάνει την ποσότητα του επιθυμητού τμήματος, αλλά παράγει και μη επιθυμητά προϊόντα.



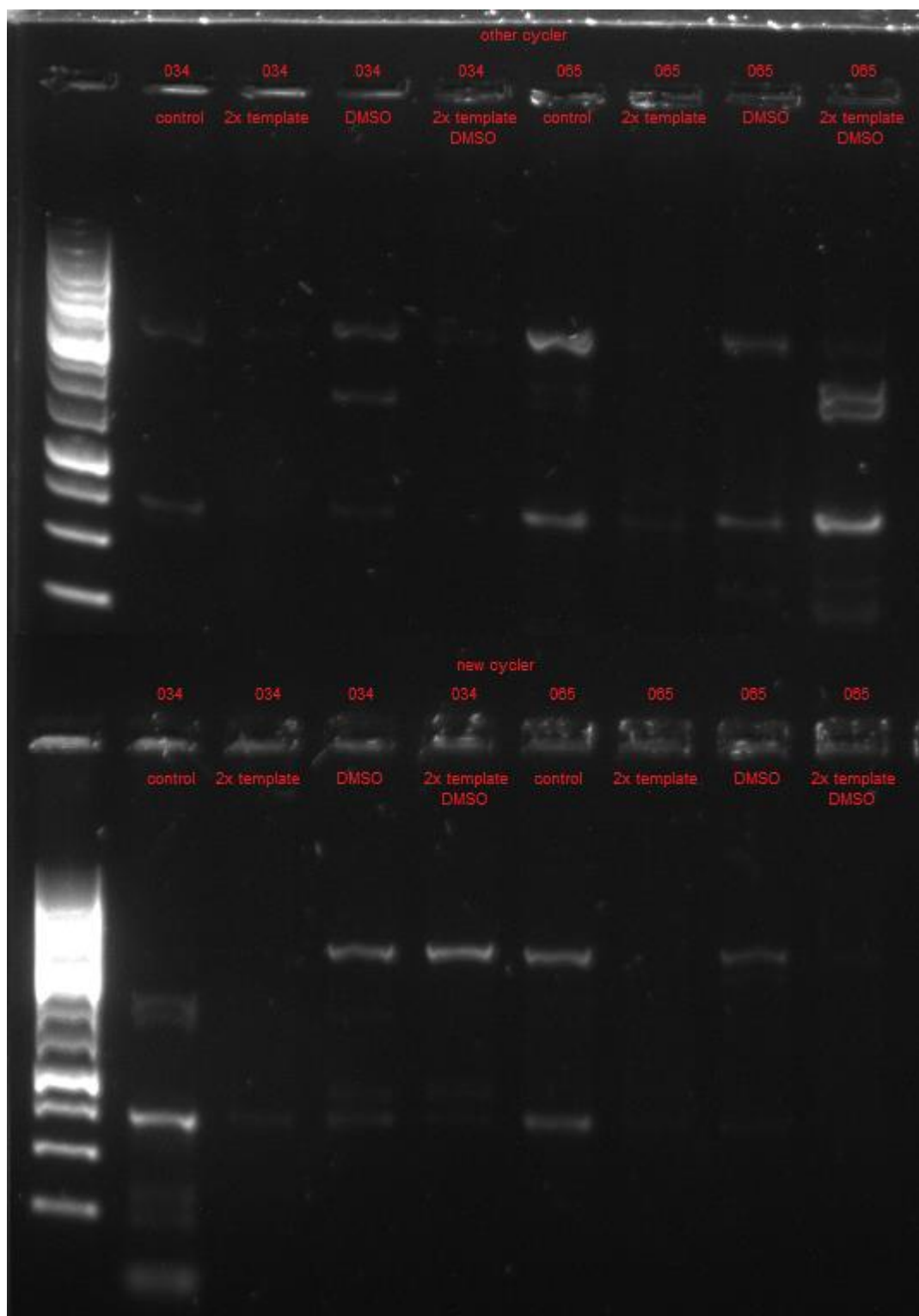
Εικόνα 3.4.3.4.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των δοκιμαστικών αντιδράσεων PCR του πίνακα 3.4.3.4.1. Στο επάνω μέρος απεικονίζονται τα αποτελέσματα του ασθενούς 034 και στο κάτω μέρος του 065.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τελική συγκέντρωση εκκινητών 0,25 μM σε όλα τα μίγματα, έγιναν δοκιμές με συνδυασμούς των θετικών αλλαγών που παρατηρήθηκαν στο προηγούμενο πείραμα. Οι ποσότητες των αντιδρώντων φαίνονται στην παρακάτω λίστα.

- 1) 034, $\frac{1}{2}$ primers, 1 μL template
- 2) 034, $\frac{1}{2}$ primers, 2 μL template
- 3) 034, $\frac{1}{2}$ primers, 1 μL template, DMSO
- 4) 034, $\frac{1}{2}$ primers, 2 μL template, DMSO
- 5) 065, $\frac{1}{2}$ primers, 1 μL template
- 6) 065, $\frac{1}{2}$ primers, 2 μL template
- 7) 065, $\frac{1}{2}$ primers, 1 μL template, DMSO
- 8) 065, $\frac{1}{2}$ primers, 2 μL template, DMSO

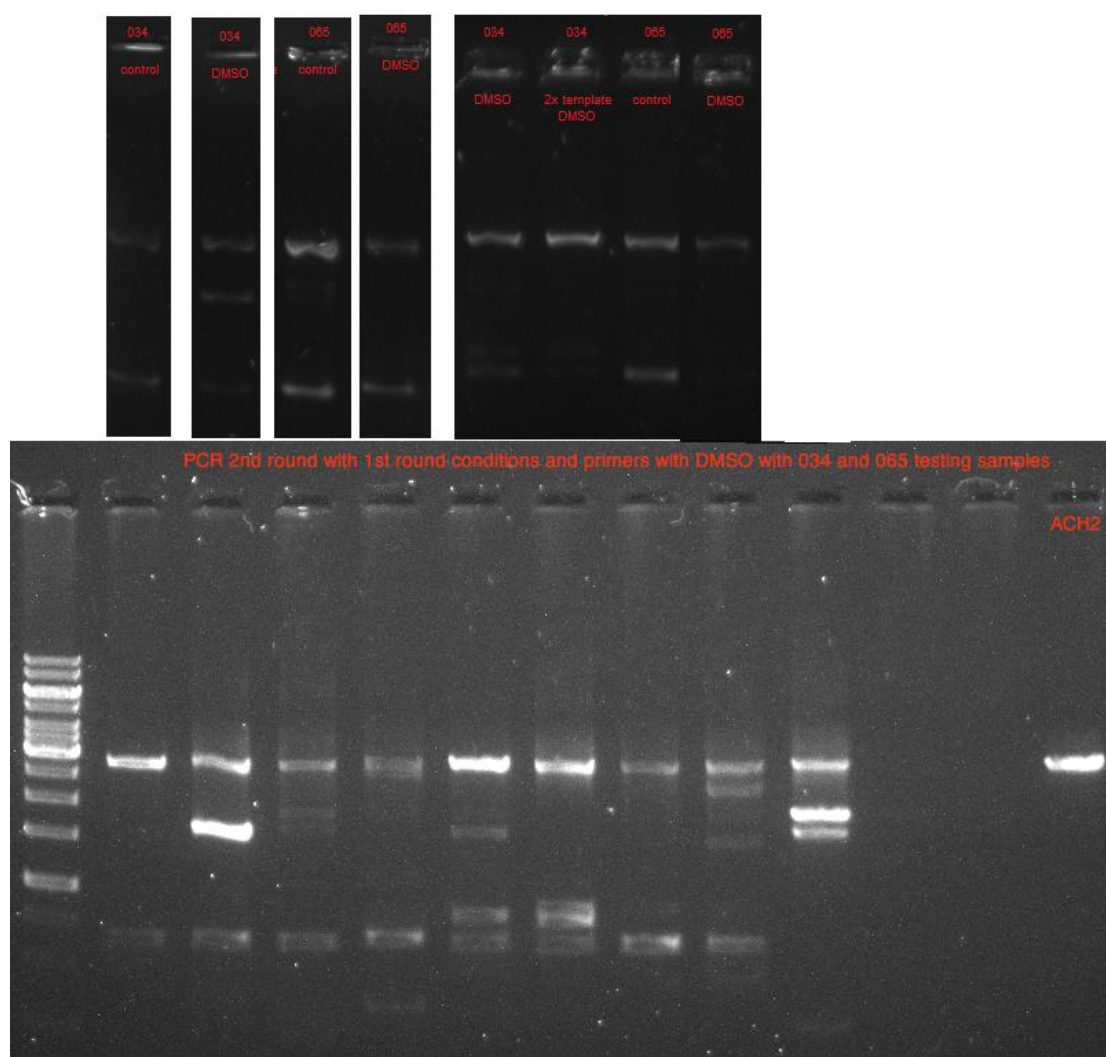
Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων στους δύο θερμοκυκλοποιητές, BIO-RAD και Eppendorf, φαίνονται στην Εικόνα 3.4.3.4.2.

Φαίνεται πως το DMSO οδηγεί σε παραγωγή του επιθυμητού τμήματος, αλλά όχι πάντα μεγαλύτερη από αυτή του control. Επίσης, παρατηρείται και διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ δύο διαφορετικών PCR cyclers. Δεν παραλείπεται να αναφερθεί και η διαφορά μεταξύ των δύο θερμοκυκλοποιητών.



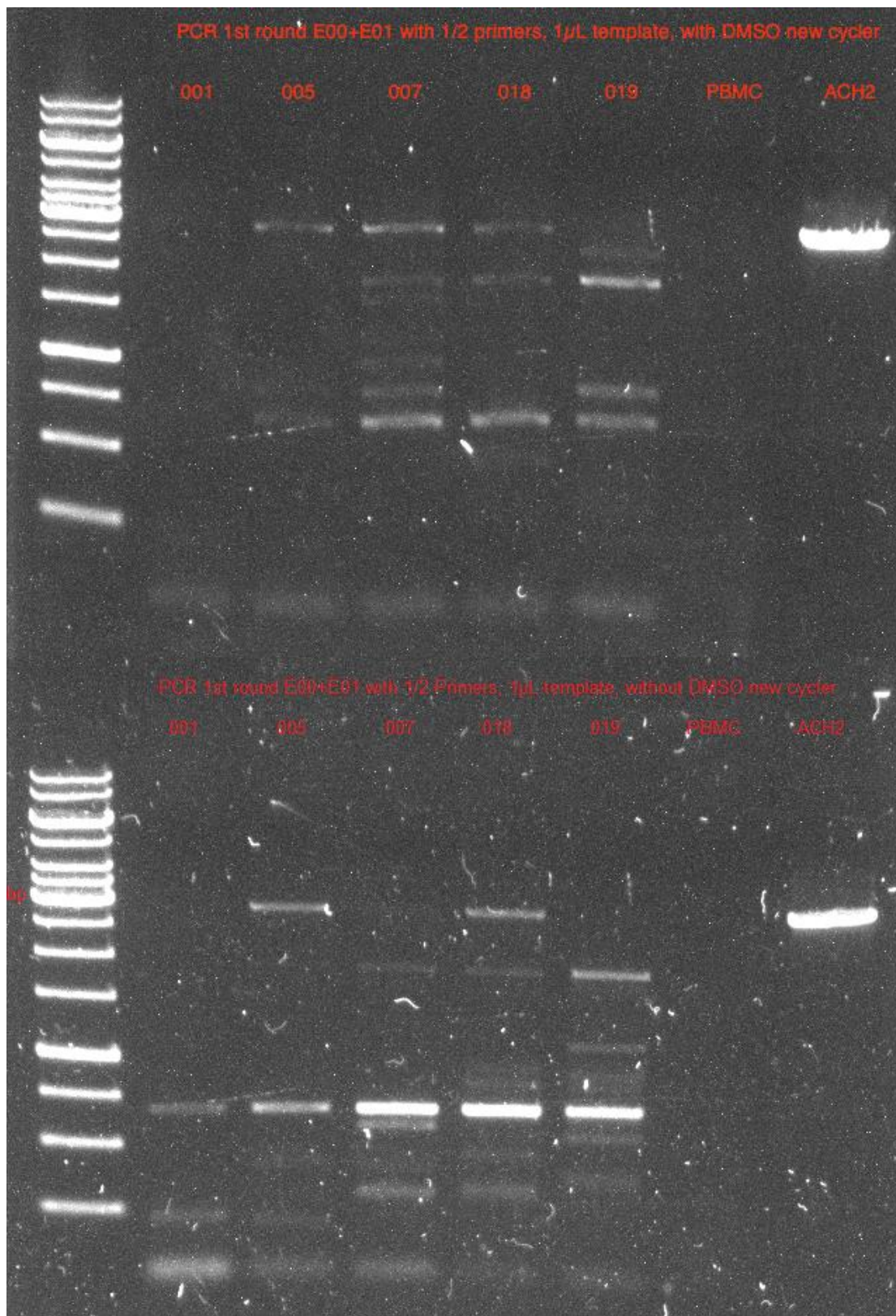
Εικόνα 3.4.3.4.2: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των δοκιμαστικών αντιδράσεων με 0,25 μ M εκκινήτων. Στο πάνω μέρος απεικονίζονται τα προϊόντα του BIO-RAD θερμοκυκλοποιητή και στο κάτω του Eppendorf.

Καθαρίζοντας τα προϊόντα των αντιδράσεων 1, 5, 7 από την πάνω σειρά και 3, 4, 5 από την κάτω σειρά της Εικόνας 3.4.3.4.2, πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση PCR με εκκινητές E00 και E01, τα αποτελέσματα της οποίας είναι εμφανή στην Εικόνα 3.4.3.4.3. Με την επανάληψη του 1ου γύρου της nested PCR, παρατηρείται μία ενίσχυση των ήδη παραχθέντων τμημάτων και σε μερικές περιπτώσεις μείωση των μη ειδικών ζωνών.



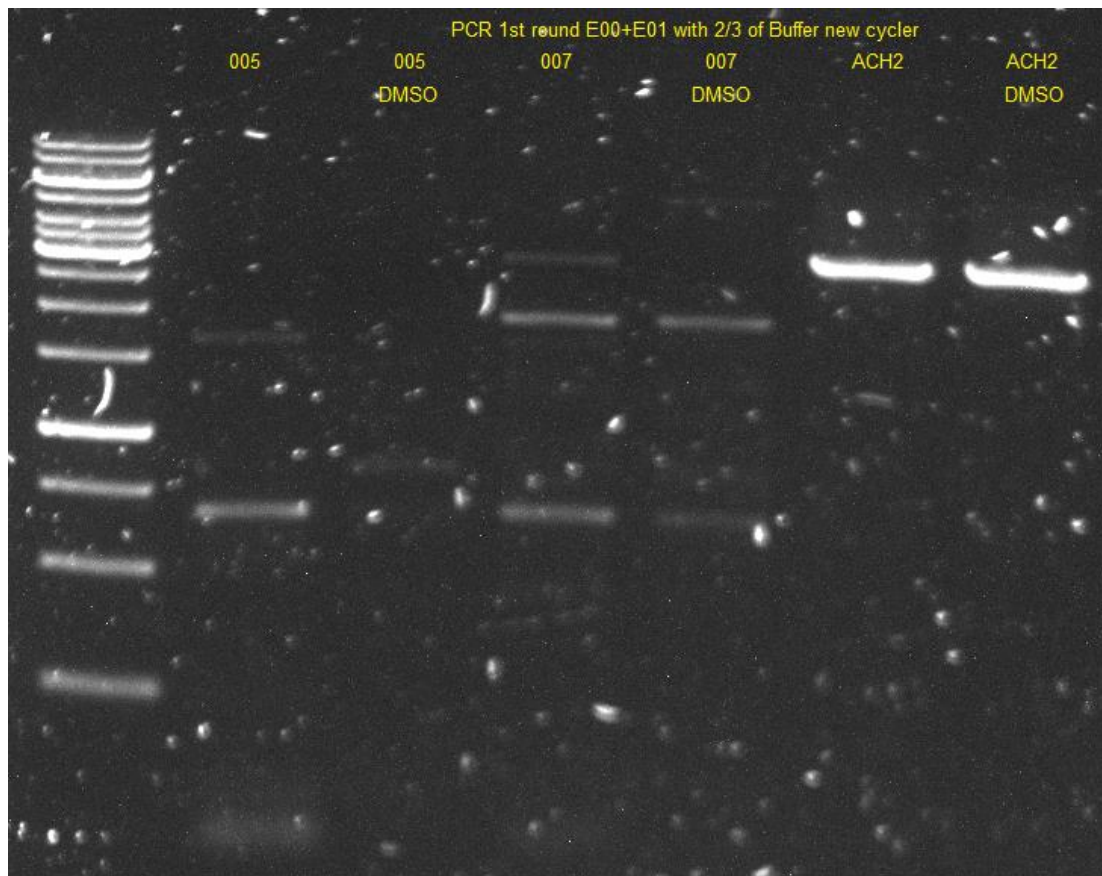
Εικόνα 3.4.3.4.3: Στην επάνω ηλεκτροφόρηση απεικονίζονται τα προϊόντα του 1ου γύρου της nested PCR τα οποία καθαρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR, της οποίας τα προϊόντα απεικονίζεται στο κάτω μέρος της Εικόνας.

Ένα δεύτερο πείραμα για την διαλεύκανση της επίπτωσης του DMSO στην PCR με τις συνήθεις συνθήκες έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 3.4.3.4.4.



Εικόνα 3.4.3.4.4: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR από τη σύγκριση για την επίπτωση του DMSO. Στο επάνω μέρος είναι οι αντιδράσεις με DMSO και στο κάτω χωρίς DMSO.

Μια προσπάθεια μείωσης των μη ειδικών προϊόντων έγινε με τη μείωση της ποσότητας του buffer, άρα και της συγκέντρωσης του μαγνησίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.4.3.4.5. Το μόνο δείγμα με το επιθυμητό τμήμα ήταν του ασθενούς 007 χωρίς DMSO που όταν εξετάστηκε στο προηγούμενο πείραμα δεν είχε θετικά αποτελέσματα.

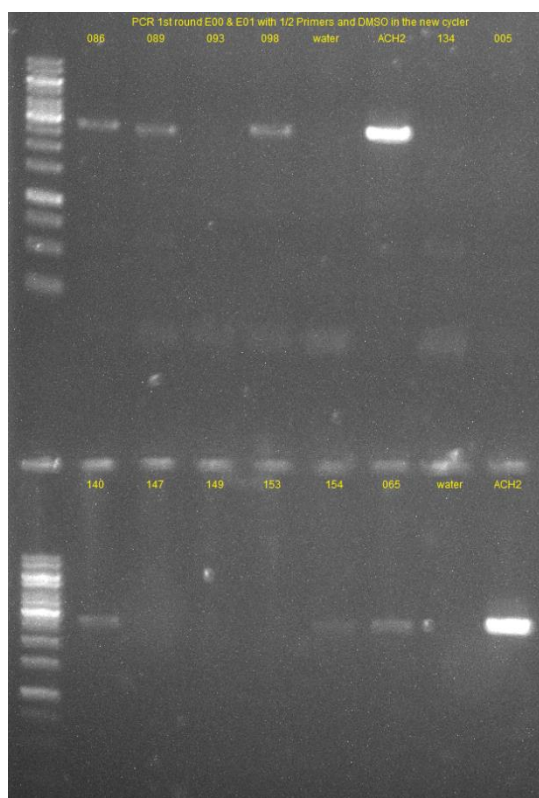


Εικόνα 3.4.3.4.5: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR από τις αντιδράσεις με τη μειωμένη ποσότητα του buffer.

Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 10% και 5% γλυκερόλης, καθώς σύμφωνα με τους Lu και Negre [148] και τους Cheng και συνεργάτες του [149] η γλυκερόλη αυξάνει την ειδικότητα της PCR. Τα αποτελέσματα ωστόσο έδειξαν πως δεν πολλαπλασιάστηκε το επιθυμητό προϊόν ούτε στον θετικό μάρτυρα.

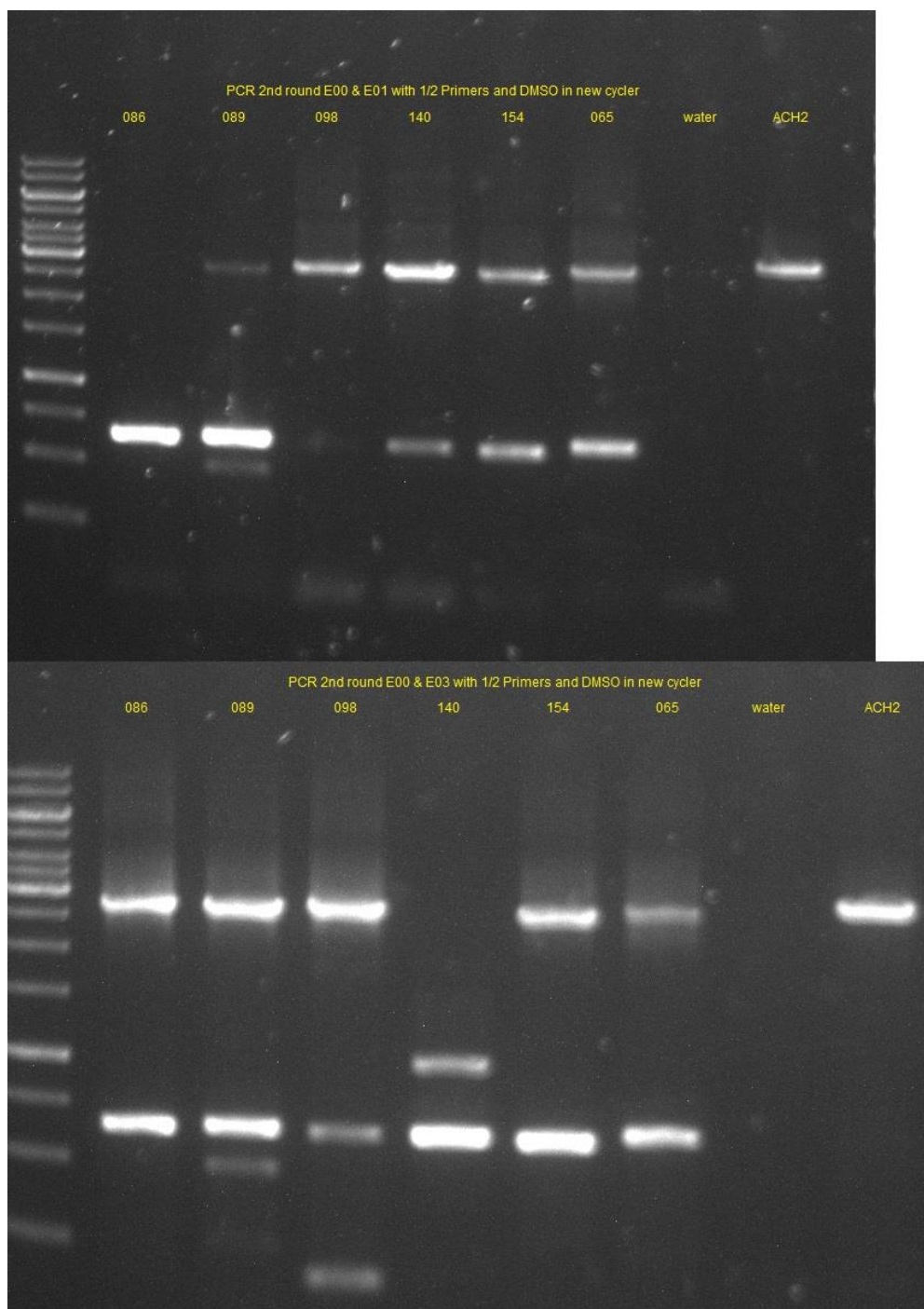
3.4.3.5 Αλλαγή του πρωτοκόλλου της nested PCR

Περαιτέρω αντιδράσεις με τις ίδιες συνθήκες έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα για κάποιους ασθενείς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.3.5.1. Αυτά τα αποτελέσματα δε μπόρεσαν να επαναληφθούν.



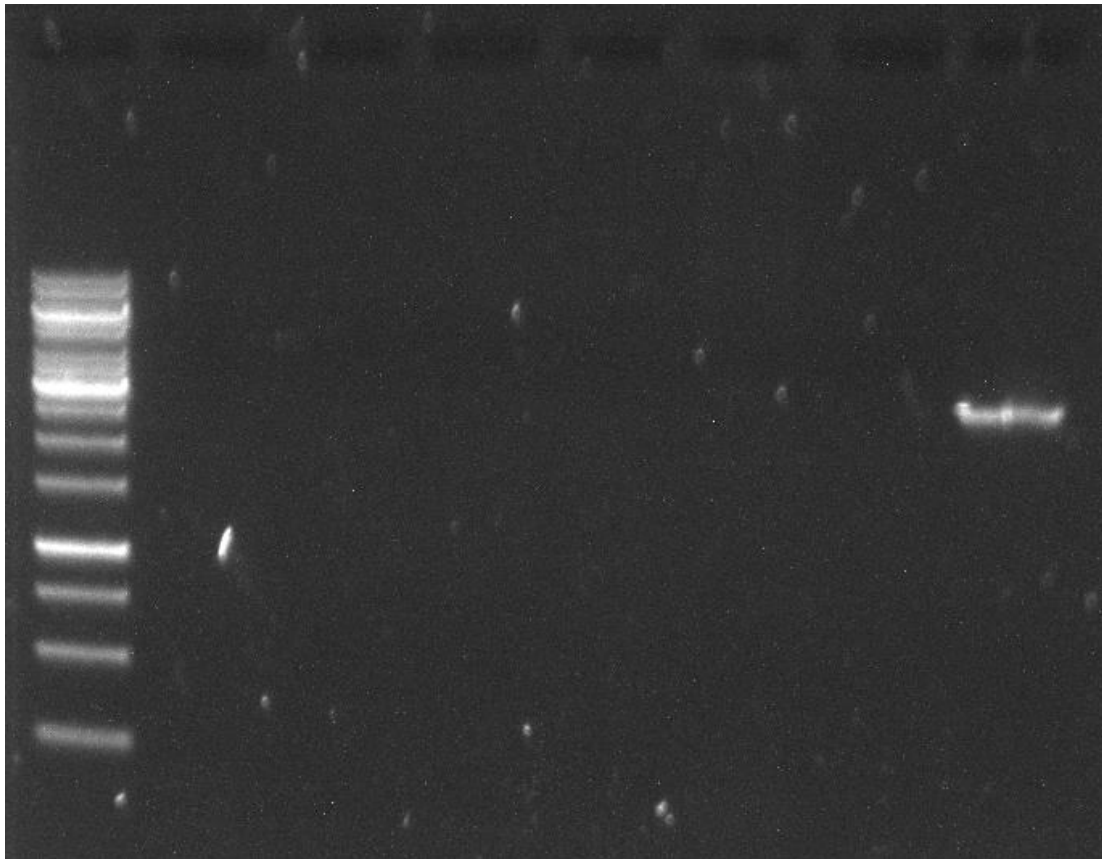
Εικόνα 3.4.3.5.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR αντιδράσεων με τις συνήθεις συνθήκες για κάποια δείγματα ασθενών.

Εκτέλεση ενός 2ου γύρου της nested PCR με τις συνθήκες και τους εκκινητές του 1ου γύρου με τα καθαρισμένα θετικά προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης οδήγησε σε πολλαπλασιασμό μη ειδικών προϊόντων. Ένας 2ος γύρος nested PCR με τους εκκινητές E00 και E03 οδήγησε σε παρόμοια προϊόντα. Τα αποτελέσματα και των δύο αντιδράσεων απεικονίζονται στην Εικόνα 3.4.3.5.2.



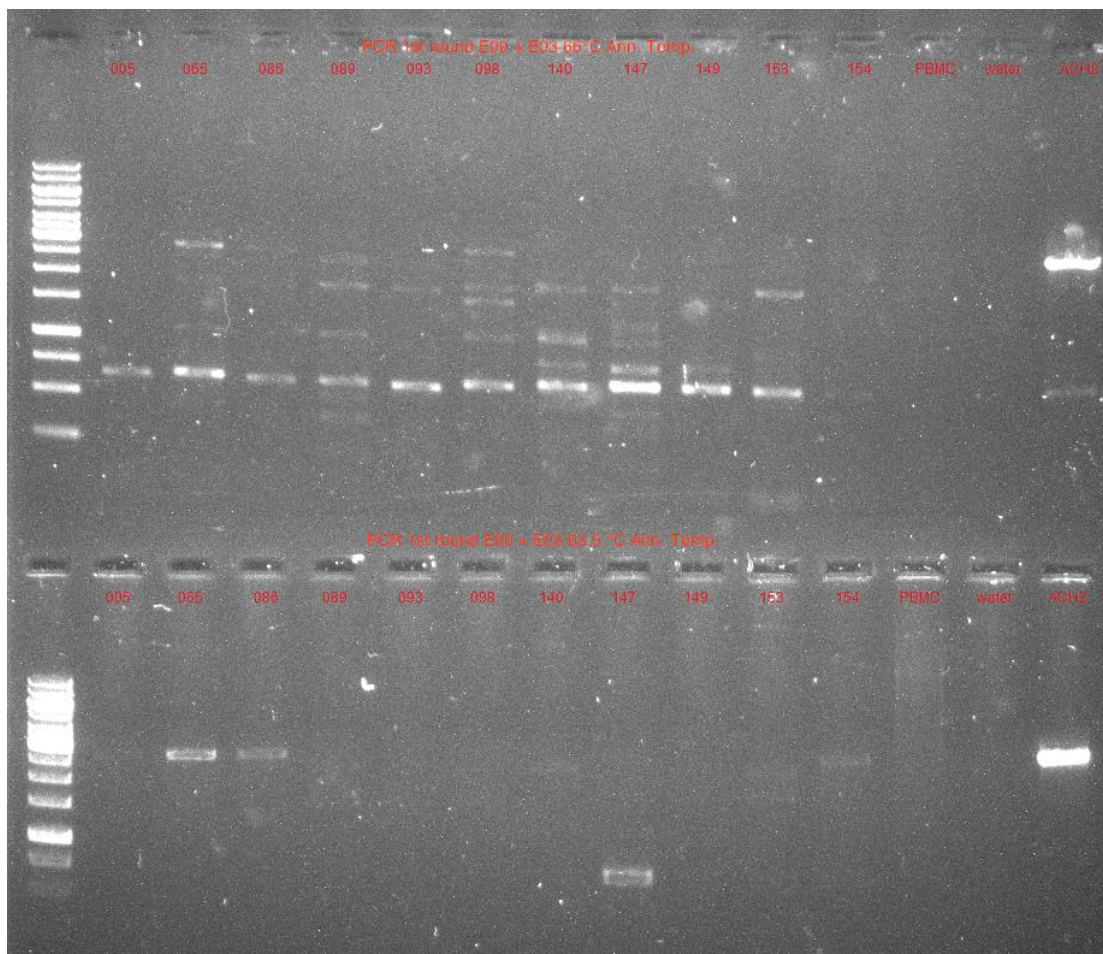
Εικόνα 3.4.3.5.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων 2ου γύρου nested PCR. Στο επάνω μέρος απεικονίζονται τα αποτελέσματα με τους εκκινητές E00 & E01 (επανάληψη 1ου γύρου nested PCR) και στο κάτω μέρος τα αποτελέσματα με τους εκκινητές E00 & E03.

Μια προσπάθεια μείωσης των μη ειδικών προϊόντων ήταν η μείωση των συνολικών κύκλων. Η εκτέλεση μιας 1ου γύρου nested PCR με μόνο 25 κύκλους έδειξε πως οι 25 κύκλοι δεν είναι αρκετοί για να πολλαπλασιαστεί αρκετά ώστε να είναι εμφανές στην ηλεκτροφόρηση κανένα προϊόν (ειδικό και μη ειδικό), εκτός από τον θετικό μάρτυρα (Εικόνα 3.4.3.5.3).



Εικόνα 3.4.3.5.3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR από την αντίδραση 25 κύκλων.

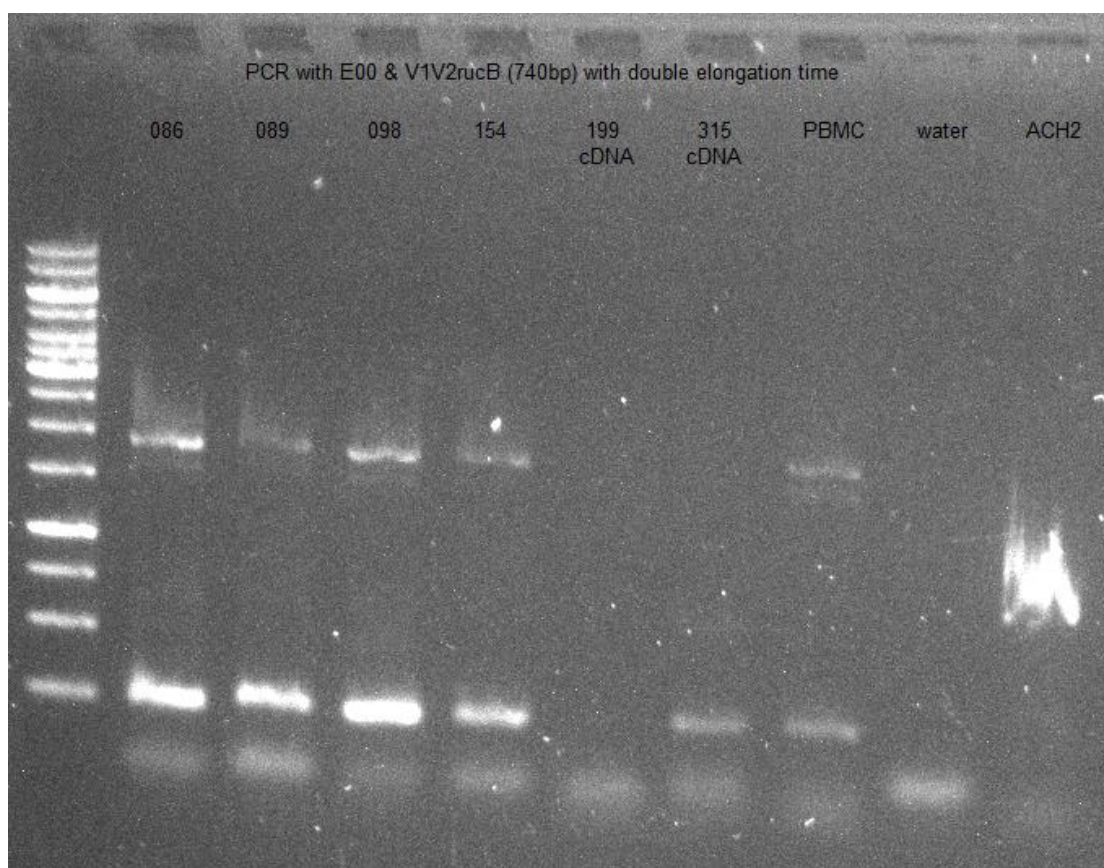
Απόπειρα εκτέλεσης 1ου γύρου nested PCR με τους εκκινητές E00 και E03 με δύο διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού 66°C και 63,5°C (η θερμοκρασία υβριδισμού που συστήνεται από την εταιρεία) κατέληξε στην παραγωγή επιθυμητών αποτελεσμάτων σε 3 από τα 12 δείγματα που εξετάστηκαν με τη θερμοκρασία 63,5°C, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.3.5.4. Παρατηρείται το παράδοξο πως με χαμηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού παράγονται λιγότερα μη ειδικά προϊόντα με τη χρήση του ίδιου BIO-RAD θερμοκυκλοποιητή. Σε επόμενη επανάληψη το θετικό δείγμα 086 ήταν αρνητικό.



Εικόνα 3.4.3.5.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR 1ου γύρου με εκκινητές E00 & E03. Στο επάνω μέρος απεικονίζονται οι αντιδράσεις με θερμοκρασία υβριδισμού 66°C και στο κάτω με θερμοκρασία υβριδισμού 63,5°C.

3.4.3.6 Αλλαγή τμήματος προς πολλαπλασιασμό

Μετά την παρατήρηση πως σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει μία ζώνη ~700 bp σε αντιδράσεις πολλαπλασιασμού τμήματος ~2,8 bp, έγινε επιλογή εκκινητών για πολλαπλασιασμό ενός επιθυμητού τμήματος 740 bp. Το αποτέλεσμα ήταν ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος 250 bp στα 6 από τα 7 δείγματα και επίσης στο δείγμα PBMC που υποδηλώνει τη μη ειδικότητα των εκκινητών. Στην επανάληψη της αντίδρασης, υπήρχε επίσης και ένα τμήμα μήκους ~1,4 kbp στα 5 από τα 7 δείγματα. Το αποτέλεσμα της επαναληπτικής αντίδρασης απεικονίζεται στην Εικόνα 3.4.3.6.1.



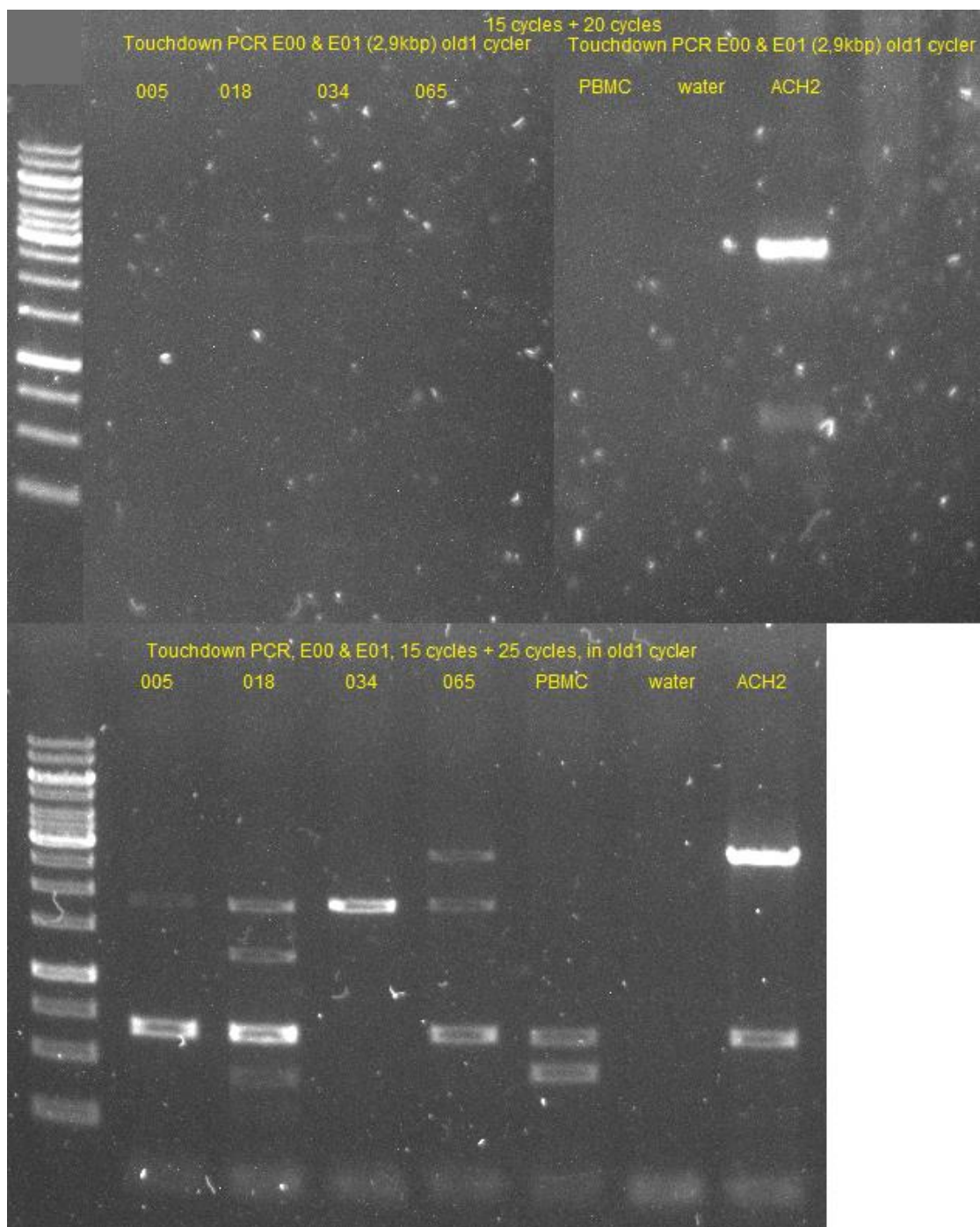
Εικόνα 3.4.3.6.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR από επαναληπτική αντίδραση πολλαπλασιασμού τμήματος 740 b.

3.4.3.7 Touchdown PCR

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Touchdown PCR με εκκινητές E00 και E01, ώστε να αντιγραφούν αρχικά λίγα επιθυμητά τμήματα και στη συνέχεια με την πτώση της θερμοκρασίας υβριδισμού να αυξηθεί ο υβριδισμός των εκκινητών και κατ' επέκταση και η δράση της πολυμεράσης. Στην αρχή εκτελέστηκε ένα πρωτόκολλο με 15 αρχικούς κύκλους και 20 κύκλους στη συνέχεια, με το επιθυμητό τμήμα να είναι εμφανές στην ηλεκτροφόρηση μόνο στον θετικό μάρτυρα και στα 3 από τα 4 δείγματα να υπάρχει μία πολύ αχνή ζώνη. Οι συνθήκες της PCR παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.3.7.1. Στη συνέχεια, έγινε επανάληψη του πρωτοκόλλου με αύξηση των κύκλων της δεύτερης φάσης κατά 5 στον ίδιο θερμοκυκλοποιητή. Τα αποτελέσματα και των δύο προσπαθειών απεικονίζονται στην Εικόνα 3.4.3.7.1. Μία τρίτη προσπάθεια Touchdown PCR με μόνο 10 κύκλους στην αρχική φάση και 25 κύκλους στη δεύτερη έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τη δεύτερη προσπάθεια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4.3.7.2. Οι συνθήκες της τρίτης προσπάθειας παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.3.7.2.

Πίνακας 3.4.3.7.1: Οι συνθήκες της 1ης TD-PCR με εκκινητές E00 και E01.

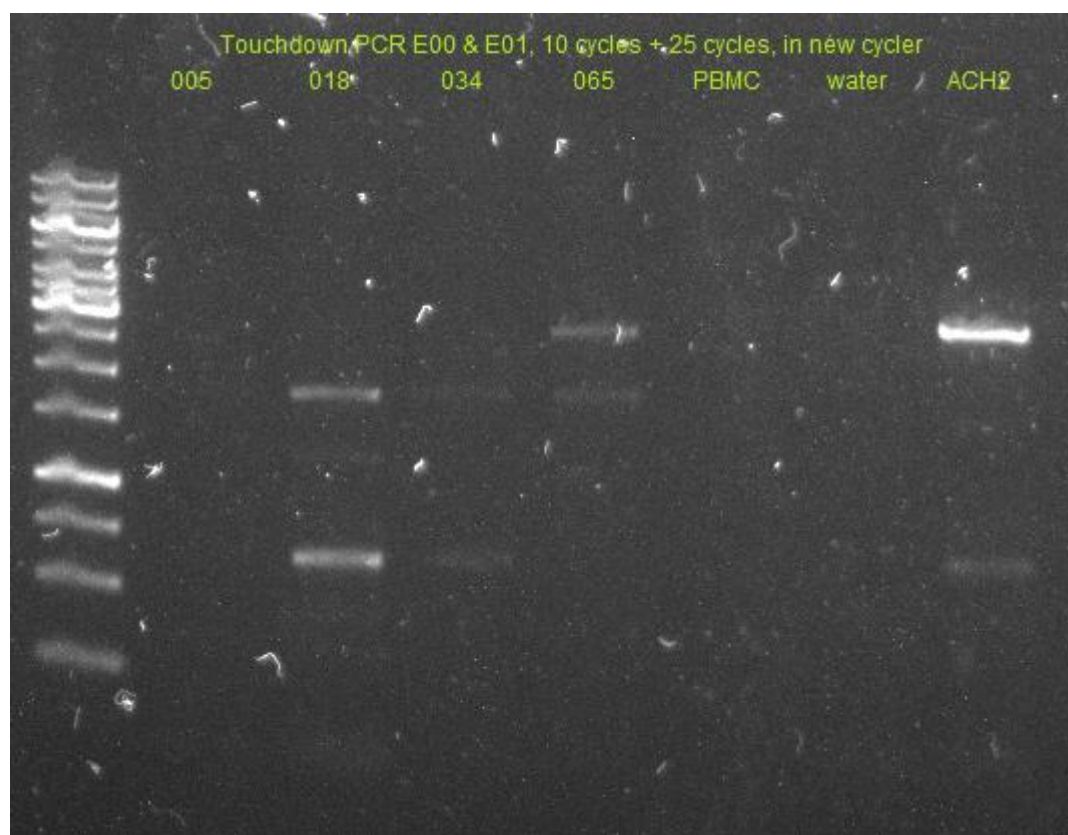
Φάσεις	Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
1η Φάση	Αρχική Αποδιάταξη	98°C	1 λεπτό	1
	Αποδιάταξη	98°C	0,167 λεπτά	15
	Υβριδισμός	76°C (-1°C ανά κύκλο)	0,334 λεπτά	
	Επιμήκυνση	72°C	0,72 λεπτά	
2η Φάση	Αποδιάταξη	98°C	0,167 λεπτά	20
	Υβριδισμός	61°C	0,334 λεπτά	
	Επιμήκυνση	72°C	0,72 λεπτά	
3η Φάση	Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	1



Εικόνα 3.4.3.7.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Touchdown PCR. Στο επάνω μέρος απεικονίζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης με τους 20 κύκλους στη 2η φάση της αντίδρασης και στο κάτω μέρος της αντίδρασης με τους 25 κύκλους στη 2η φάση της αντίδρασης.

Πίνακας 3.4.3.7.2: Οι συνθήκες της 3ης TD-PCR με εκκινήτες E00 και E01.

Φάσεις	Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
1η Φάση	Αρχική Αποδιάταξη	98°C	1 λεπτό	1
	Αποδιάταξη	98°C	0,167 λεπτά	10
	Υβριδισμός	72°C (-1°C ανά κύκλο)	0,334 λεπτά	
	Επιμήκυνση	72°C	0,72 λεπτά	
2η Φάση	Αποδιάταξη	98°C	0,167 λεπτά	25
	Υβριδισμός	61°C	0,334 λεπτά	
	Επιμήκυνση	72°C	0,72 λεπτά	
3η Φάση	Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	1



Εικόνα 3.4.3.7.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Touchdown PCR με 10 κύκλους στην 1η φάση της αντίδρασης και 25 κύκλους στη 2η.

3.4.3.8 Απόπειρες για έλεγχο της επαναληψιμότητας και των διακυμάνσεων της PCR

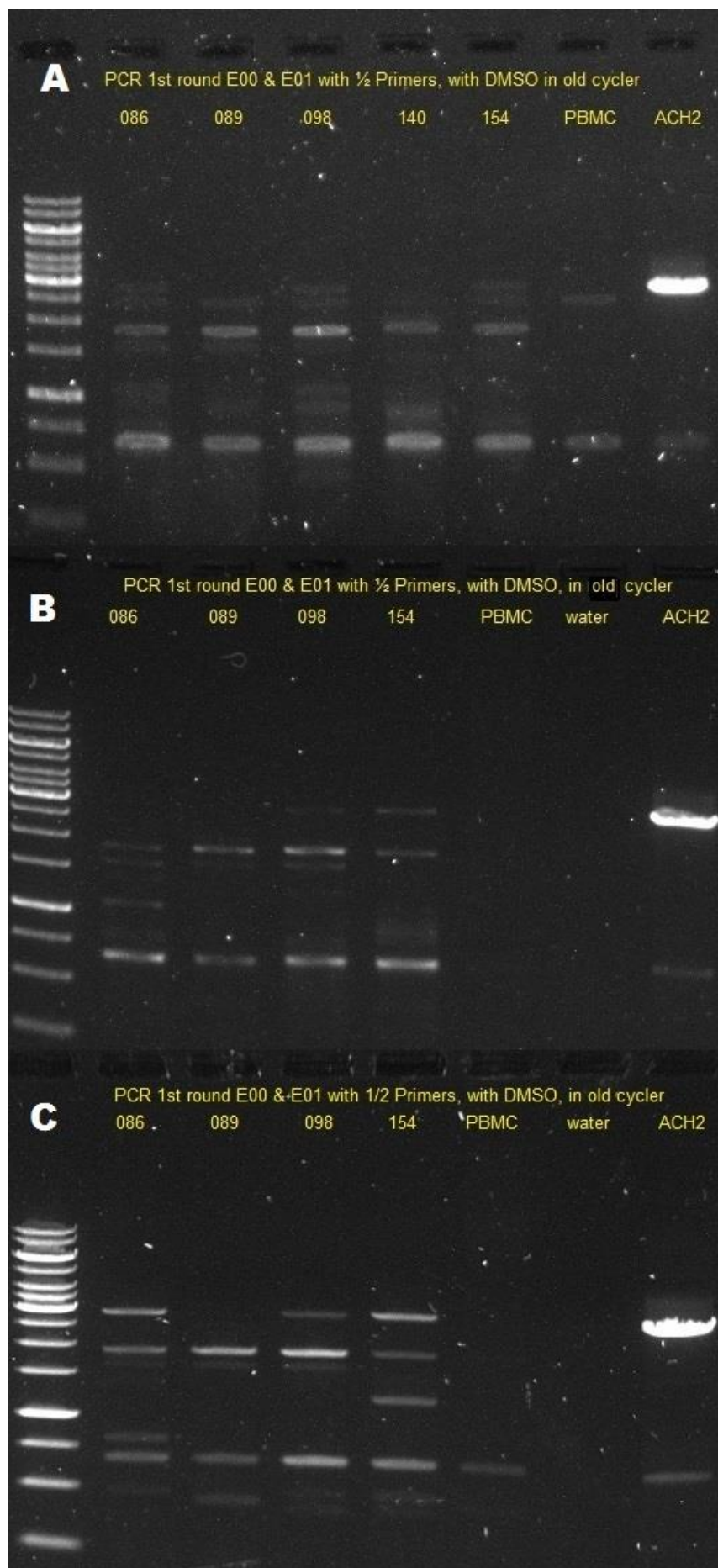
Έγιναν 3 κατά σειρά δοκιμές μιας αντίδρασης PCR με εκκινητές E00 και E01 και πανομοιότυπες συνθήκες (πίνακες 3.4.3.8.1 και 3.4.3.8.2) και δείγματα για να εκτιμηθεί η διακύμανση των αποτελεσμάτων και η επαναληψιμότητά τους. Μεταξύ των αποτελεσμάτων υπήρχαν διαφορές (Εικόνα 3.4.3.8.1). Στην 1η απόπειρα το δείγμα των υγιών PBMC είχε ένα πολλαπλασιασμένο τμήμα μεγαλύτερου μήκους σε σχέση με το τμήμα στις άλλες δύο απόπειρες. Το δείγμα 086 στη 2η απόπειρα δεν είχε το επιθυμητό τμήμα. Μεταξύ των αποπειρών υπήρχαν και διαφορές στα άλλα μη ειδικά τμήματα.

Πίνακας 3.4.3.8.1: Η λίστα των αντιδραστηρίων της αντίδρασης Phusion PCR κατά τον έλεγχο της επαναληψιμότητας.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
5x Buffer	4 μ L
dNTP	200 μ M το καθένα
F εκκινητής	0,25 μ M
R εκκινητής	0,25 μ M
DMSO	3 %
Πολυμεράση Phusion	0,4 U
Template	1 μ L (20-100 ng)
H ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 20 μ L
Τελικός όγκος	20 μ L

Πίνακας 3.4.3.8.2: Οι συνθήκες της αντίδρασης Phusion PCR κατά τον έλεγχο της επαναληψιμότητας.

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	35 κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	98°C	1 λεπτό	
Αποδιάταξη	98°C	0,167 λεπτά	
Υβριδισμός	66°C	0,334 λεπτά	
Επιμήκυνση	72°C	0,717 λεπτά	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	



Εικόνα 3.4.3.8.1: Όλες οι απόπειρες έγιναν από ένα άτομο, με τις ίδιες συνθήκες, με διαφορά μίας ημέρας.

A) 1η απόπειρα,
 B) 2η απόπειρα,
 C) 3η απόπειρα.

3.5 Κατασκευή πρωτοκόλλου RT-PCR

Στα περιεχόμενα του QIAGEN OneStep RT-PCR Kit είναι και το Q-Solution® που με βάση το εγχειρίδιο χρήσης χρησιμοποιείται όταν το δείγμα RNA έχει υψηλό ποσοστό GC ή έχει πολύπλοκη δευτεροταγή δομή. Έγινε μία σύγκριση αντιδράσεων όπου η μία περιείχε Q-Solution και η άλλη όχι. Οι αντιδράσεις έγιναν με τους εκκινητές V1V2_{rucB} και V1V2_{rucA} προς πολλαπλασιασμό τμήματος 307 bp. Τα περιεχόμενα των αντιδράσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.5.1. Οι συνθήκες των αντιδράσεων παρατίθενται στον Πίνακα 3.5.2. Η σύγκριση απεικονίζεται στην Εικόνα 3.5.1.

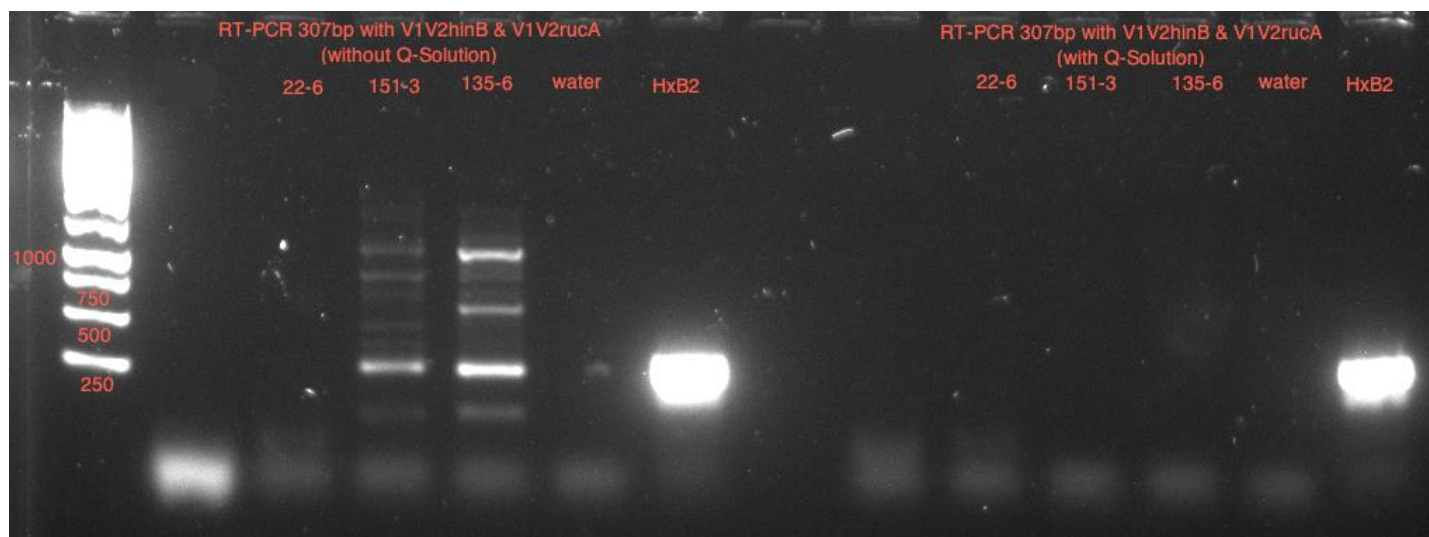
Πίνακας 3.5.1: Η λίστα των αντιδρώντων και οι ποσότητές τους στις συγκριτικές αντιδράσεις RT-PCR με Q-Solution και χωρίς. Το Q-Solution προστέθηκε μόνο στην αντίδραση με το Q-Solution.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
5x Buffer	4 μ L
dNTP	400 μ M από το καθένα
(5x Q-Solution)	(0,8 μ L)
F Εκκινητής	0,5 μ M
R Εκκινητής	0,5 μ M
Enzyme Mix	0,8 μ L
dH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 20 μ L
RNA Template	1 μ L (1 pg – 2 μ g)
Τελικός όγκος	20 μ L

Πίνακας 3.5.2: Οι συνθήκες των συγκριτικών αντιδράσεων RT-PCR με Q-Solution και χωρίς.

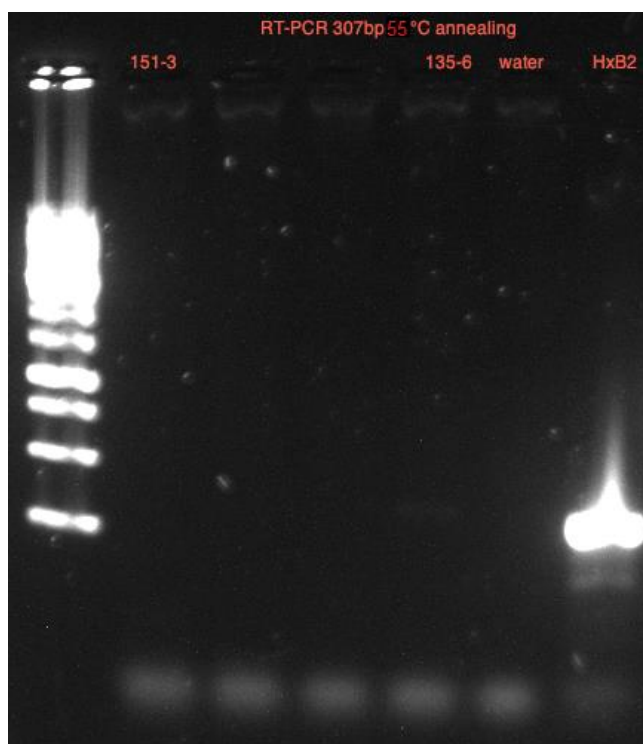
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	35 κύκλοι
Αντίστροφη Μεταγραφή	50°C	30 λεπτά	
Ενεργοποίηση PCR	95°C	15 λεπτά	
Αποδιάταξη	94°C	0,5 λεπτά	
Υβριδισμός	53°C	0,5 λεπτά	
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτά	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	

Παρατηρούμε ότι το Q-Solution δεν επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό τμημάτων, μεταξύ των οποίων και πολλά μη ειδικά. Επίσης, ο θετικός μάρτυρας στην αντίδραση χωρίς Q-Solution έχει μία ειδική ζώνη μεγαλύτερης έντασης από αυτής της αντίδρασης με Q-Solution. Αυτό σημαίνει πως το Q-Solution εμπόδισε σε μικρό βαθμό την DNA πολυμεράση να πολλαπλασιάσει το επιθυμητό τμήμα. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως το Q-Solution δεν είναι επιθυμητό σε αυτές τις αντιδράσεις RT-PCR για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος που περιέχει την περιοχή V1V2.



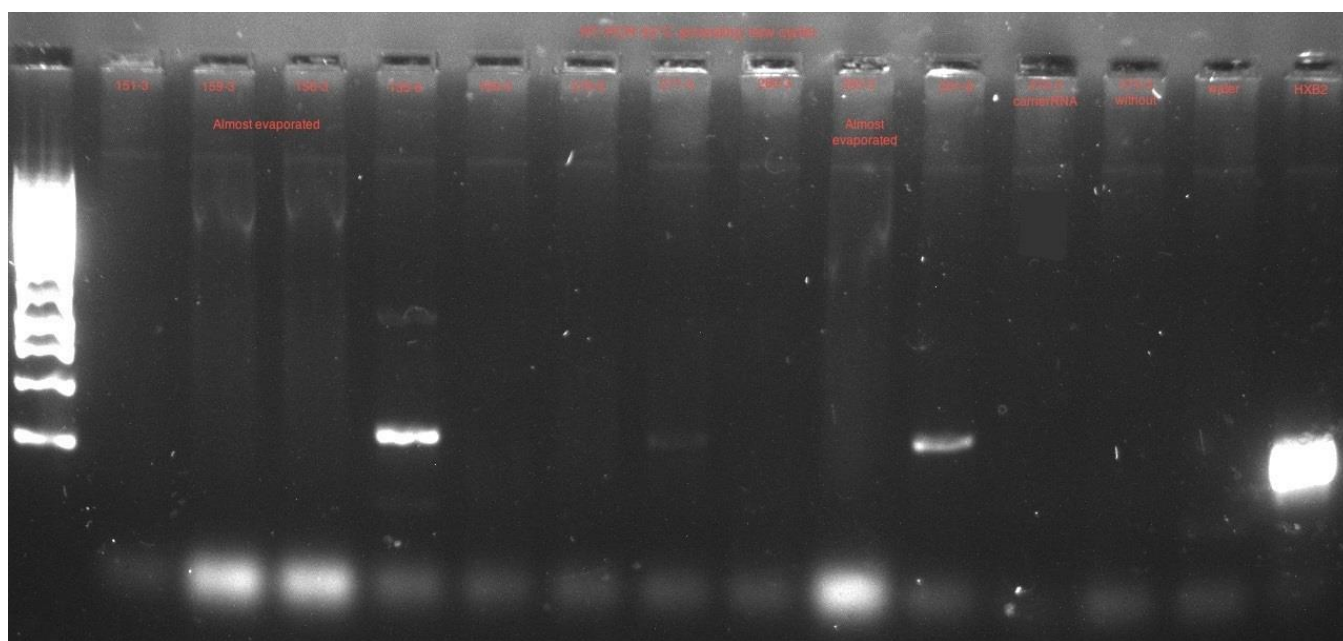
Εικόνα 3.5.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT-PCR από τις αντιδράσεις σύγκρισης. Αριστερά απεικονίζονται οι αντιδράσεις χωρίς Q-Solution και δεξιά με Q-Solution.

Εξαιτίας των πολλών μη ειδικών προϊόντων στην προηγούμενη αντίδραση, εκτελέστηκε μία αντίδραση RT-PCR με υψηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού. Αυτή η αντίδραση ονομάστηκε «2» και έγινε με θερμοκρασία υβριδισμού 55°C. Σε αυτή την αντίδραση, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5.2, δεν υπάρχει κανένα προϊόν από τα δείγματα των ασθενών, παρά μόνο μία πολύ μικρής έντασης ζώνη στο δείγμα 135-6.



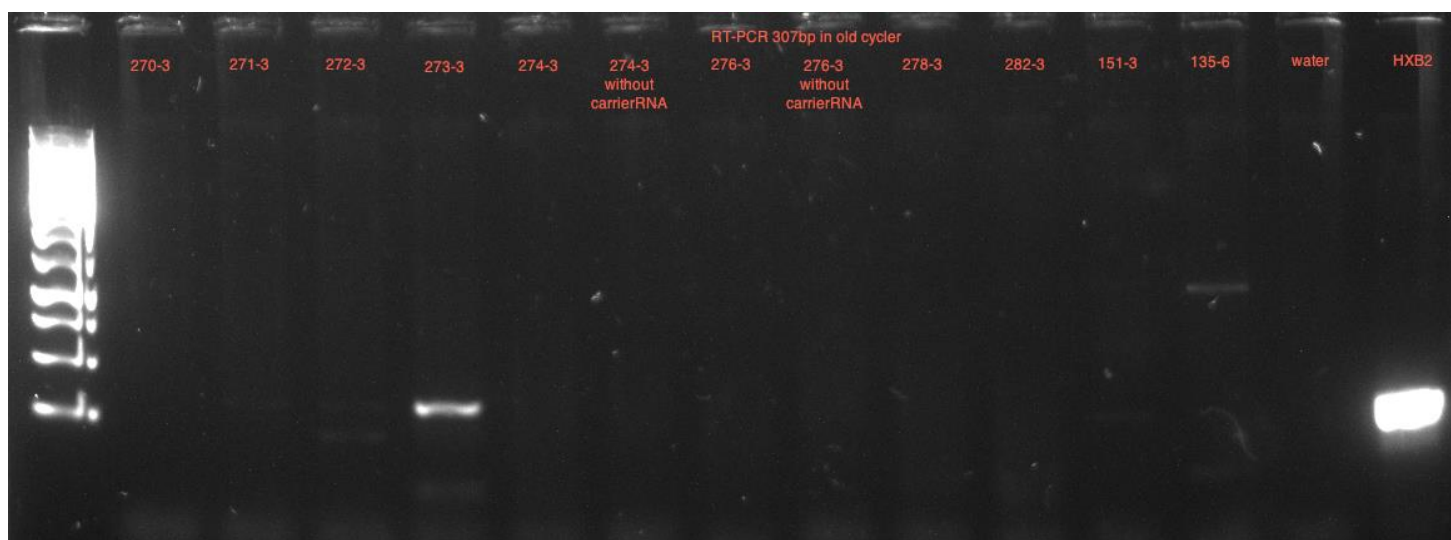
Εικόνα 3.5.2: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT-PCR από την αντίδραση «2».

Συνεχίστηκαν πειράματα σε άλλα δείγματα ασθενών με τις ίδιες συνθήκες με την αντίδραση «2» αλλά με 40 κύκλους. Η αντίδραση «3» πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή BIO-RAD και τα προϊόντα της απεικονίζονται στην Εικόνα 3.5.3. Παρατηρούμε πως αυτή τη φορά οι 40 κύκλοι έκαναν τη ζώνη στο δείγμα 135-6 πιο έντονη και παρατηρούμε επίσης την ύπαρξη ζώνης στο δείγμα 301-8 καθώς και μία πολύ μικρής έντασης ζώνη στο δείγμα 271-3. Το δείγμα 151-3 που στην προηγούμενη αντίδραση ήταν θετικό με πολλά μη ειδικά προϊόντα, εδώ είναι αρνητικό. Αργότερα αποδείχθηκε πως το θετικό δείγμα 135-6 είχε υποστεί μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα.



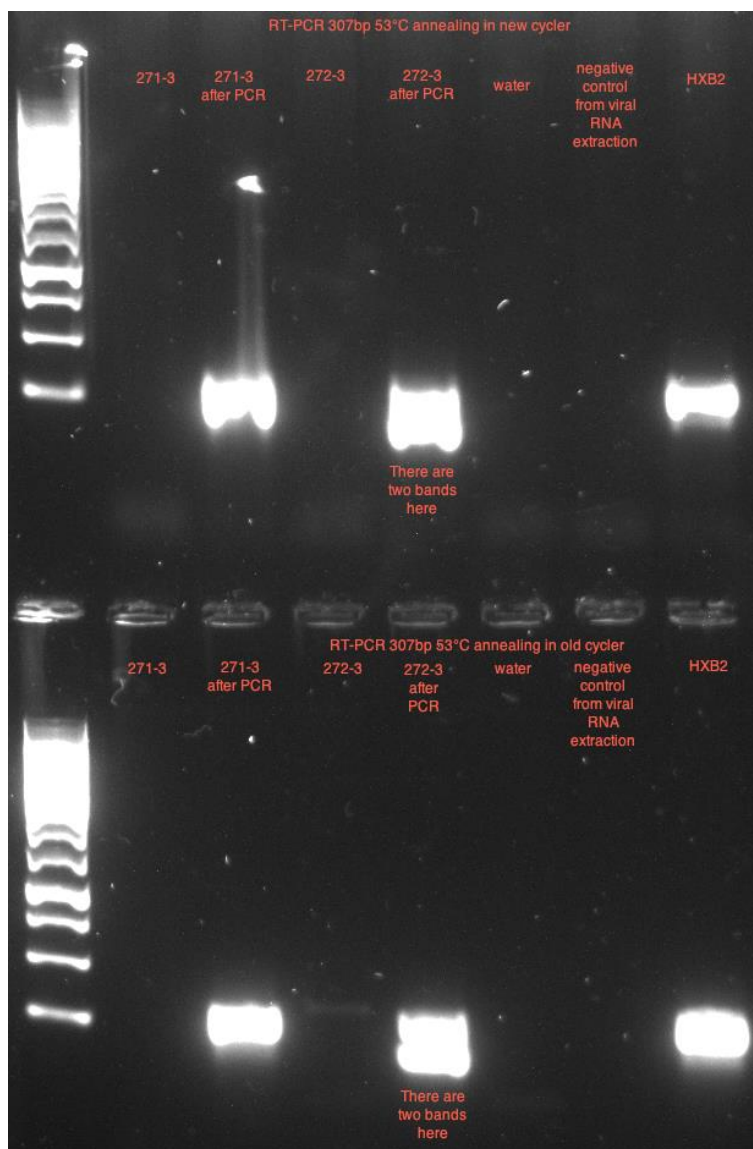
Εικόνα 3.5.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT-PCR από την αντίδραση «3».

Μία αντίδραση με αριθμό «4» στον θερμοκυκλοποιητή Eppendorf με τις ίδιες συνθήκες με την αντίδραση «3» και με νέα δείγματα ασθενών, αλλά και τα θετικά δείγματα από τις αντιδράσεις σύγκρισης, 151-3 και 135-6, φαίνεται στην Εικόνα 3.5.4. Παρατηρούμε ότι το έως τώρα πάντα θετικό δείγμα λόγω μόλυνσης 135-6 είναι αρνητικό και το 151-3 παρουσιάζει μία πολύ μικρής έντασης ζώνη του επιθυμητού τμήματος. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μικροδιαφορές μεταξύ των θερμοκυκλοποιητών. Ένα νέο δείγμα, το 273-3, είναι θετικό χωρίς μη ειδικά προϊόντα. Αργότερα αποδείχθηκε πως είχε υποστεί μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα. Επίσης, παρατηρούνται στα δείγματα 271-3 και 272-3 πολύ μικρής έντασης ζώνες του επιθυμητού μήκους.



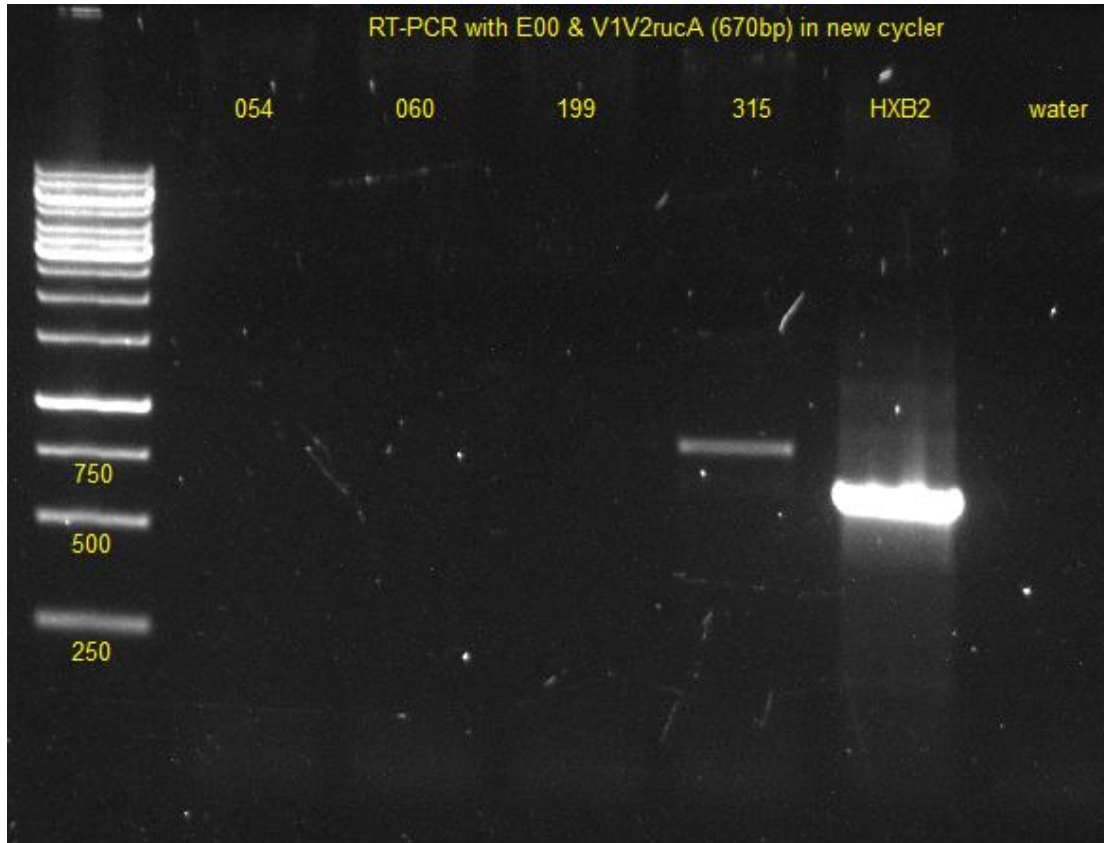
Εικόνα 3.5.4: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT-PCR από την αντίδραση «4».

Στα δύο νέα θετικά προϊόντα, 271-3 και 272-3, έγινε καθαρισμός και χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα για μια επαναληπτική αντίδραση με τις ίδιες συνθήκες με την αντίδραση «4» και στους δύο θερμοκυκλοποιητές. Σε αυτές τις αντιδράσεις προστέθηκαν και τα αρχικά δείγματα 271-3 και 272-3. Τα προϊόντα των αντιδράσεων «5» και «6» φαίνονται στην Εικόνα 3.5.5. Στα καθαρισμένα δείγματα παρατηρούμε ειδικές ζώνες έντασης όμοιας με του θετικού μάρτυρα. Μετά την αλληλούχιση αυτών των δειγμάτων αποδείχθηκε πως είχαν υποστεί μόλυνση από τον θετικό μάρτυρα.



Εικόνα 3.5.5: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT-PCR από τις αντιδράσεις «5» και «6» όπου γίνεται σύγκριση των δύο θερμοκυκλοποιητών. Στο επάνω μέρος απεικονίζονται τα προϊόντα του θερμοκυκλοποιητή BIO-RAD και στο κάτω μέρος του Eppendorf.

Η αντίδραση «7» με νέο συνδυασμό εκκινητών, E00 και V1V2_{rucA}, (Εικόνα 3.5.6) δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς οι εκκινητές πολλαπλασίασαν ένα τμήμα γονιδίου φωσφοδιεστεράσης του ανθρώπινου γονιδιώματος.



Εικόνα 3.5.6: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT-PCR από την αντίδραση «7».

3.6 Αλληλουχίες από PCR και RT-PCR

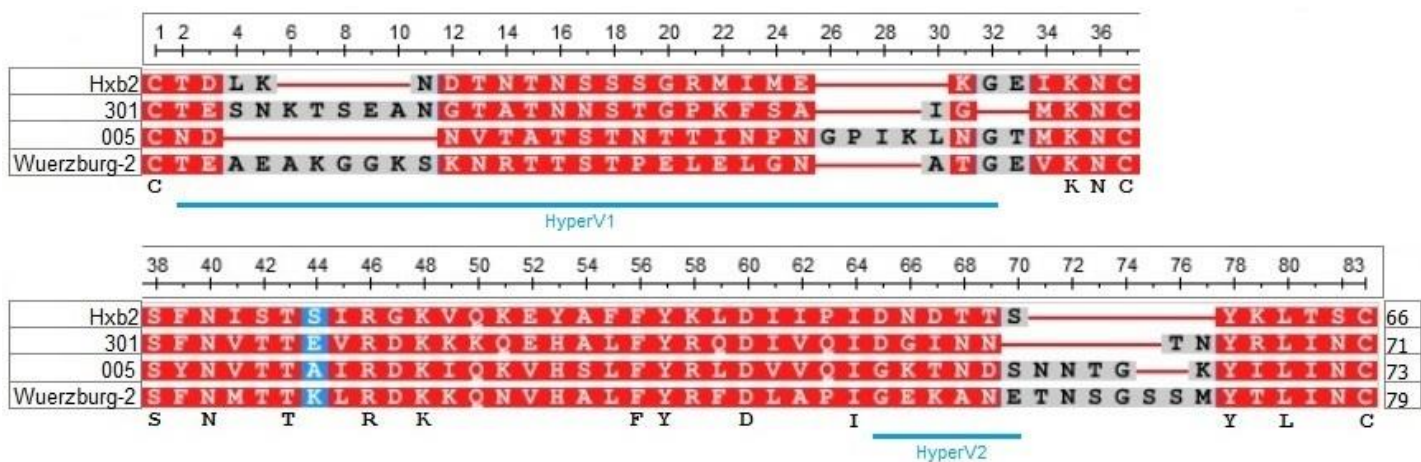
Από την PCR αποκτήθηκαν 3 αλληλουχίες (005, Wuerzburg-2, 4S3) και από την RT-PCR αποκτήθηκε 1 αλληλουχία της V1V2 (301). Η μία αλληλουχία από την PCR δε μπορεί να αξιοποιηθεί, καθώς περιέχει πολλά κωδικόνια λήξης και δεν περιέχει κάποιο ORF που να καλύπτει όλο το γονίδιο. Από τη στοίχιση των τριών αξιοποιήσιμων αλληλουχιών της V1V2 μπορούμε να δούμε πως υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία με αντικαταστάσεις, προσθήκες και ελλείψεις αμινοξέων (Εικόνα 3.6.1).

Ο Hxb2 έχει στην περιοχή V1V2 66 αμινοξέα και 5 PNGS (7,58 %).

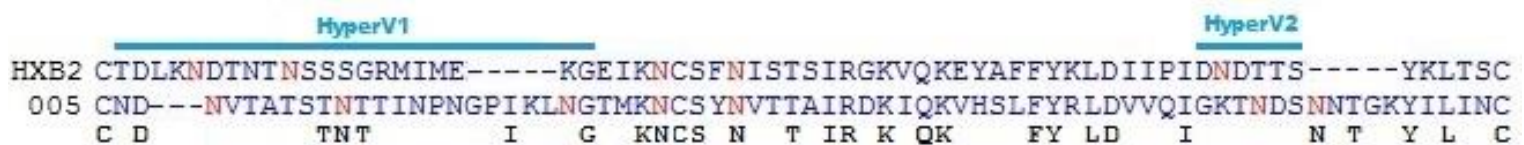
Ο ιός του ασθενούς 301 (γυναίκα, prednisolone, CD4+ T > 200/mL) έχει μία προσθήκη 5 αμινοξέων στην αρχή της υπερμεταβλητής περιοχής της V1, μία προσθήκη 1 αμινοξέος στο τέλος της υπερμεταβλητής περιοχής της V1, μία έλλειψη 2 αμινοξέων στο τέλος της υπερμεταβλητής περιοχής της V1 και καταρροϊκά της υπερμεταβλητής περιοχής της V2 έχει μία έλλειψη και μία προσθήκη. Η αλληλουχία V1V2 αποτελείται από 71 αμινοξέα και 6 PNGS (8,45 %).

Ο ιός του ασθενούς από το Wuerzburg έχει μία προσθήκη 5 αμινοξέων στην αρχή της υπερμεταβλητής περιοχής της V1 και μία προσθήκη 1 αμινοξέος στο τέλος της υπερμεταβλητής περιοχής της V1. Η αλληλουχία V1V2 αποτελείται από 79 αμινοξέα και 5 PNGS (6,33 %).

Στην αμινοξική αλληλουχία της V1V2 του ιού του ασθενούς 005 (γυναίκα, prednisolone, CD4+ T > 200/mL) υπάρχει μία έλλειψη 3 αμινοξέων στην αρχή της υπερμεταβλητής περιοχής της V1, μία προσθήκη 5 αμινοξέων στο τέλος της υπερμεταβλητής περιοχής της V1 και μία προσθήκη 5 αμινοξέων καταρροϊκά της υπερμεταβλητής περιοχής της V2 συγκριτικά με τον Hxb2. Η αλληλουχία V1V2 αποτελείται από 73 αμινοξέα και 7 PNGS (9,59 %). Συγκριτικά με τον Hxb2, ο ιός του ασθενή 005 έχει στην περιοχή V1V2 2 περισσότερες PNGS (Εικόνα 3.6.2), οι οποίες προκύπτουν μετά από προσθήκη αμινοξέων. Από αυτούς τους 4 ασθενείς μόνο για τον ασθενή 005 υπάρχουν πληροφορίες για το ιικό φορτίο του και την ικανότητα των αντισωμάτων του. Το ιικό φορτίο του είναι 53.400 αντίγραφα/mL, υψηλότερο από τη μέση τιμή (47.000 αντίγραφα/mL) των ασθενών της μελέτης. Η EC₅₀ των αντισωμάτων του είναι 1:137, μικρότερη από το 25% των ασθενών της μελέτης και η 10η χαμηλότερη. Αυτό σημαίνει ότι τα αντισώματά του είναι πιο αποτελεσματικά έναντι του Hxb2 συγκριτικά με τον μέσο όρο των ασθενών αυτής της εργασίας.



Εικόνα 3.6.1: Πολλαπλή στοίχιση (με το BLASTp του NCBI) του Hxb2 και των τριών αλληλουχιών της V1V2 που αποκτήθηκαν από τις μεθόδους PCR και RT-PCR. Οι αριθμημένοι ασθενείς είναι από την κλινική μελέτη και ο ασθενής Wuerzburg-2 είναι από το διαγνωστικό τμήμα στο Wuerzburg της Γερμανίας. Οι θέσεις με κόκκινο φόντο είναι πολύ συντηρημένες και οι θέσεις με γαλάζιο χρώμα είναι μέτρια συντηρημένες. Οι θέσεις με γκρι φόντο αποτελούν προσθήκες αμινοξέων. Στο επάνω μέρος βρίσκεται η στοίχιση της περιοχής V1 και στο κάτω μέρος της V2. Στην Εικόνα φαίνονται με γαλάζιες γραμμές οι υπερμεταβλητές περιοχές της V1V2.



Εικόνα 3.6.2: Οι στοιχισμένες περιοχές V1V2 του Hxb2 και του ιού του ασθενούς 005 στις οποίες είναι εμφανείς οι PNGS (κόκκινο γράμμα N). Με γαλάζιες γραμμές απεικονίζονται οι υπερμεταβλητές περιοχές των V1 και V2.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής οι ασθενείς είχαν κυρίως ιούς υποτύπων A και C [150]. Μετά από συλλογή από τη βάση δεδομένων Los Alamos HIV Databases 20 αλληλουχιών της πρωτεΐνης Env ιών υποτύπων A και C, έγινε υπολογισμός των ποσοστών PNGS των V1V2 περιοχών τους. Η μέση τιμή αριθμού αμινοξέων της V1V2 είναι 67,45, η μέση τιμή των PNGS είναι 5,5 και η μέση τιμή του % PNGS είναι 8,03%. Ο ασθενής 005 έχει 5,55 περισσότερα αμινοξέα, 1,5 περισσότερες PNGS και 1,56% διαφορά στο ποσοστό PNGS σε σχέση με τις μέσες τιμές των αλληλουχιών της Τανζανίας από τη βάση δεδομένων Los Alamos HIV Databases.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIV απασχολεί την επιστημονική κοινότητα αρκετά χρόνια και ακόμα μετά από πολυάριθμες προσπάθειες δεν έχει εφευρεθεί ένα προστατευτικό εμβόλιο ή μία θεραπεία που θα εξουδετερώνει εξ ολοκλήρου τον ιό στο ανθρώπινο σώμα. Οι σημερινές ισόβιες συνδυαστικές αντιρετροϊκές θεραπείες είναι ικανοποιητικές στο να μειώνουν το ιικό RNA στο αίμα σε μη ανιχνεύσιμο από τις κλινικές μεθόδους επίπεδο. Αυτό επιτρέπει τις ασφαλείς σεξουαλικές επαφές [2]. Αν όμως διακοπεί η θεραπεία, ο ιός πολλαπλασιάζεται ξανά σε έντονο βαθμό μέσα σε λίγες εβδομάδες [5], [6]. Τα κλινικά συμπτώματα μετά τη μόλυνση ομοιάζουν αυτά της γρίπης και δεν εμφανίζονται σε όλους τους ασθενείς. Αυτό καθιστά δύσκολη την ανακάλυψη της λοίμωξης [2].

Οι HIV-1, HIV-2 και οι ομάδες τους προέκυψαν στην Κεντροδυτική Αφρική από στελέχη SIV από ανεξάρτητα εξελικτικά γεγονότα. Αυτό υποστηρίζεται και από το πόρισμα της εργασίας αυτής πως ο HIV-1M είναι πλησιέστερος συγγενής με κάποιες αλληλουχίες του SIVcrp παρά με τον HIV-1O. Και οι τέσσερις ομάδες του HIV-1 προέκυψαν από κοινούς προγόνους με το σημερινό στέλεχος SIVcrp που μολύνει χιμπατζήδες. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι κάποιο άλλο άγνωστο μέχρι στιγμής πρωτεύον ήταν ο αρχικός ξενιστής του HIV-1 [11]–[15]. Ο HIV-2 πιστεύεται ότι προέκυψε από έναν κοινό πρόγονο με το στέλεχος SIVsmm που μολύνει ένα είδος κερκοκήβου (sooty mangabey monkey) [16].

Ο HIV-1 είναι ο πιο διαδεδομένος ιός επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας και οι υποτύποι του βρίσκονται σε όλο τον κόσμο. Ο HIV-2 παρουσιάζει χαμηλότερη μολυσματικότητα, χαμηλότερο ιικό φορτίο στα υγρά του σώματος [26], [27] και λίγοι HIV-2+ ασθενείς θα εμφανίσουν συμπτώματα AIDS [28]. Αυτά τα χαρακτηριστικά εμπόδισαν τον HIV-2 να επεκταθεί εκτός της Δυτικής Αφρικής όπου και προέκυψε.

Η διάγνωση του HIV γίνεται μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του ιού ή μέσω PCR σε δείγματα αίματος για την εντόπιση μοναδικών αλληλουχιών του ιού [2].

Ο HIV-1 καλύπτεται από φάκελο με ελάχιστα μόρια της πρωτεΐνης Env στη επιφάνειά του (~14) [39]. Τα ενζυματικώς αποκομμένα τμήματα της Env (gp160) σχηματίζουν σύμπλοκα που αποτελούνται από τριμερή της gp120 που βρίσκονται στο εξωτερικό του ιού και τριμερή της gp41 που είναι διαμεμβρανικά [1]. Το σύμπλοκο gp120/gp41 κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία εισόδου του ιού στα κύτταρα [45]. Το τμήμα gp120 προβάλλει στην κορυφαία πλευρά του τις διαδοχικές περιοχές V1 και V2 που αποτελούν περιοχές υψηλής μεταλλαξιμότητας. Οι περιοχές αυτές καλύπτουν την θέση πρόσδεσης του ιού με το μόριο CD4

των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων [104]. Οι V1 και V2 αποτελούν συχνούς επιτόπους για τα ανθρώπινα εξουδετερωτικά αντισώματα [88]. Οι μεταλλαγές στην περιοχή V1V2 προκαλούν αλλαγές στην ευαισθησία εξουδετέρωσης του ιού από τα αντισώματα [109], [111]–[113]. Η πρωτεΐνη Επν αποτελεί στόχο έντονης γλυκοζυλίωσης από τους μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή [99]. Οι πολυσακχαρίτες καθιστούν ακόμα πιο δύσκολη την εξουδετέρωση του ιού από τα αντισώματα [123], γεγονός που αποτέλεσε το κύριο θέμα αυτής της εργασίας. Η γλυκοζυλίωση γίνεται στις PNGS που είναι πρότυπα Asn-X-Ser\Thr (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός της Pro). Μετά την είσοδο στο κύτταρο, ο ιός ενσωματώνεται μόνιμα στο πυρηνικό DNA και ονομάζεται προϊός [51]. Τα μολυσμένα T κύτταρα μνήμης αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των ρεζερβουάρ του ιού. Ο προϊός τους προστατεύεται από τα φάρμακα και τα αντισώματα. Υπάρχουν διάφοροι αμυντικοί μηχανισμοί του κυττάρου για να αποτραπεί η μόλυνση, οι οποίοι συνήθως δεν είναι αρκετοί [2]. Λόγω της έντονης μεταλλαξιμότητάς του [7], το στέλεχος του ιού που επικρατεί κάθε στιγμή στον οργανισμό-ξενιστή είναι ανθεκτικό στα αντισώματα που έχουν παραχθεί.

Σε αυτή την εργασία έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της επίδρασης της γλυκοζυλίωσης στην παθογένεια του HIV και στην ικανότητα εξουδετέρωσης των αντισωμάτων των ασθενών. Η σύγκριση πολλών ρετροϊών με βάση τη γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης Επν έδειξε πως ο HIV-1 έχει το υψηλότερο ποσοστό PNGS από όλους του υπόλοιπους ρετροϊούς, χωρίς όμως οι διαφορές να είναι στατιστικώς σημαντικές σε κάποιους ιούς. Επίσης, ο HIV-1 και ο HIV-2 είχαν τον υψηλότερο CV του ποσοστού PNGS από του υπόλοιπους ιούς, ενδεικτικό της μεγάλης ποικιλομορφίας της πρωτεΐνης Επν, εξαιτίας της έντονης μεταλλαξιμότητας των δύο ιών.

Από τους ιούς που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο, οι HTLV-I και HTLV-II είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο ποσοστό PNGS της πρωτεΐνης Επν. Οι HTLV αποτελούν ιούς που σπάνια θα προκαλέσουν συμπτώματα σε κάποιον μολυσμένο άνθρωπο και η λανθάνουσα περίοδος του HTLV-I για πρόκληση λευχαιμίας είναι 40 έτη και 10-20 έτη για μυελοπάθεια [151]–[153]. Το προϊκό φορτίο του, επίσης, είναι υψηλότερο από των άλλων ρετροϊών με μολυσμένα το 0,1-1% των PBMC ενός ασθενούς χωρίς συμπτώματα [154]. Οι ασθενείς που έχουν μολυνθεί με HTLV-I αναπτύσσουν αρχικά anti-p24 αντισώματα και αργότερα anti-Επν [154], γεγονός που σημαίνει ότι η Επν δεν είναι ο πρωταρχικός στόχος των αντισωμάτων, αν και δεν υπάρχει έντονη γλυκοζυλίωση που να εμποδίζει την αποκάλυψη των επιτόπων.

Ο ιός της λευχαιμίας των βοοειδών (Bovine Leukemia Virus - BLV) που είχε χαμηλότερο ποσοστό PNGS αλλά όχι στατιστικώς σημαντικό προκαλεί μία ισόβια λοίμωξη

στα βοοειδή που ονομάζεται ενζωτική λεύκωση βοοειδών (enzootic bovine leukosis - EBL). Ο ιός σπάνια θα προκαλέσει κάποια συμπτώματα στα μολυσμένα ζώα [155]. Κάποια ζώα εμφανίζουν ανωμαλίες, όπως μειωμένη παραγωγή γάλακτος [156]. Λιγότερο από το 5% των μολυσμένων ζώων θα αναπτύξουν λέμφωμα των Β κυττάρων σε ηλικία 4-5 ετών [157]. Το DNA του ιού και αντισώματα έναντι αυτού έχουν ανιχνευθεί σε ανθρώπινο αίμα και έχουν συσχετισθεί με τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα [158]–[160]. Ο ιός ίσως προκαλεί την ανάπτυξη καρκίνου μέσω της πρωτεΐνης Tax που αναστέλλει την μέσω αφαίρεσης βάσης επιδιόρθωση του DNA στα κύτταρα [161]. Η μετάδοση του ιού στον άνθρωπο είναι πιθανό να συμβαίνει μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου κρέατος ή γάλακτος.

Οι SIVs σπάνια προκαλούν συμπτώματα σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα και δεν επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής τους αν και έχουν υψηλά επίπεδα ιικού φορτίου. Τα μη ανθρώπινα πρωτεύοντα δεν εμφανίζουν μεγάλη αντίσταση στον SIV με το ανοσοποιητικό τους σύστημα να μην ενεργοποιείται στο βαθμό που ενεργοποιείται το ανθρώπινο [162].

Η εμφανής διαφορά του HIV-1 στην ένταση των συμπτωμάτων και στη γρήγορη πρόοδο της ασθένειας (μέση τιμή λανθάνουσας περιόδου = 9 έτη [163]), αποτελούν φαινόμενα που σχετίζονται με την Επν. Η πρωτεΐνη Επν είναι υπεύθυνη για τη είσοδο του ιού στα κύτταρα και σε ασθενείς με AIDS έχει παρατηρηθεί αύξηση των FasL και TRAIL και των υποδοχέων τους στα Τ κύτταρα, μόρια που αυξάνουν τον κυτταρικό θάνατο αυτών των κυττάρων [164]. Ο HIV προκαλεί απόπτωση των κυττάρων μέσω σύνδεσης της gp120 με τον CD4 [164]. Μία ερευνητική ομάδα αν και απέδειξε πως η αμινοξική αλληλουχία της Επν κατέχει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των bystander Τ κυττάρων από δύο ανασυνδυασμένους SHIVs, κατέληξε στο συμπέρασμα πως η διαφορά στην αποτελεσματικότητα των δύο αυτών ιών είναι ανεξάρτητη της γλυκοζυλίωσης [165]. Μία άλλη ερευνητική ομάδα παρατήρησε πως η ενεργοποίηση των bystander Τ κυττάρων συσχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των PNGS στην πρωτεΐνη Επν [166]. Επίσης, ο HIV-2 με παρόμοια του HIV-1 ποσοστά γλυκοζυλίωσης έχει πολύ χαμηλότερη παθογένεια [28]. Από τη σύγκριση του HIV-1 με τους 5 ρετροϊούς που προκαλούν ασθένειες ή έχουν συσχετισθεί με ασθένειες στον άνθρωπο ως προς το ποσοστό PNGS και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, συμπεραίνουμε ότι το υψηλότερο ποσοστό γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης Επν του HIV-1 αποτελεί τυχαίο φαινόμενο και δεν επηρεάζει την παθογένεια του ιού, σε αντίθεση με την αμινοξική αλληλουχία.

Τα δύο φυλογενετικά δέντρα διαφορετικών μεθόδων που κατασκευάστηκαν με βάση την πρωτεΐνη Επν σε αυτή την εργασία είχαν μικρές αποκλίσεις. Οι διαφορές τους έγκεινται στη διαφορά της εξελικτικής απόστασης, όπου η μέθοδος ML υπολόγισε έως και 5 φορές μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ των ειδών, και στη διαφορετική εξελικτική σχέση του απλού

ρετροϊού HERV-K (HML2), όπου η μέθοδος ML τον τοποθέτησε με χαμηλή επαναληψιμότητα (47%) κοντύτερα στους πολύπλοκους Spumaviruses, παρά στον MMTV με τον οποίον είναι εξελικτικά κοντά με βάση τη βιβλιογραφία [167], [168] και το δέντρο της μεθόδου NJ. Τα δύο δέντρα τοποθετούν το γένος *Deltaretrovirus* αρκετά μακριά από το *Lentivirus* των HIV-1 και HIV-2, εξελικτική σχέση που δε συνάδει με φυλογενετικό δέντρο με βάση την πρωτεΐνη Pol [168]. Όπως ήταν αναμενόμενο οι HIV-1 και HIV-2 είναι εξελικτικά πιο κοντά με τα στελέχη του SIV από τα οποία θεωρείται ότι προέκυψαν απ' ό,τι μεταξύ τους. Αυτή η σχέση συνάδει με τα ποσοστά γλυκοζυλίωσης που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.1. Το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει με τους ιούς BLV και HTLV, όπου αν και ανήκουν στο ίδιο γένος, τα ποσοστά γλυκοζυλίωσης διαφέρουν, με τη σύγκριση HTLV-I και BLV να είναι στατιστικώς σημαντική. Στα δύο δέντρα παρατηρήθηκε πως η ομάδα M του HIV-1 είναι πιο όμοια με αλληλουχίες του SIVcpz απ' ό,τι με την αλληλουχία της ομάδας O. Ο RSV που σε φυλογενετικά δέντρα με βάση την πρωτεΐνη Pol είναι πιο όμοιος με το γένος *Lentivirus* και το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα πρότυπα γλυκοζυλίωσης, στα δέντρα της εργασίας αυτής είναι πιο συγγενικός με το γένος *Deltaretrovirus* [168]. Οι MMTV, MLV, SFVcpz, BFV έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο ποσοστό γλυκοζυλίωσης με τον HIV-1 και παρατηρείται πως έχουν μεγάλη εξελικτική απόσταση από τον HIV-1 στα δύο φυλογενετικά δέντρα. Τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα του HIV-1 και τα αποτελέσματα μεταξύ HIV και SIV της σύγκρισης της γλυκοζυλίωσης, καθώς και οι εξελικτικές σχέσεις των δύο φυλογενετικών δέντρων της εργασίας συμφωνούν ως προς την εξελικτική σχέση των ρετροϊών. Γνωρίζοντας πως το γονίδιο *Pol* είναι πιο συντηρημένο από το *Env*, το φυλογενετικό δέντρο με τη χρήση της αλληλουχίας του *Pol* είναι πιο αντιπροσωπευτικό για τις εξελικτικές σχέσεις των ρετροϊών, αφού οι ομοιότητες στο *Env* μπορεί να οφείλονται σε συγκλίνουσα εξέλιξη, λόγω πίεσης από τα αντισώματα των ξενιστών.

Οι ασθενείς της κλινικής δοκιμής είχαν μεγάλο εύρος ιικού φορτίου και τα αντισώματά τους μεγάλο εύρος EC₅₀. Από τη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε σημαντική διαφορά ως προς το φύλο ή τη θεραπείας με το ιικό φορτίο ή την EC₅₀. Η EC₅₀ όμως είχε στατιστικώς πολύ σημαντική αρνητική γραμμική συσχέτιση με το ιικό φορτίο ($p=0,0024$) (Εικόνα 3.3.2). Αυτό σημαίνει πως όσο πιο αποτελεσματικά είναι τα αντισώματα ενός ασθενούς, τόσο υψηλότερο είναι και το ιικό φορτίο αυτού του ασθενή. Αυτή η συσχέτιση επαληθεύεται από τη βιβλιογραφία, αφού συνήθως οι ασθενείς που αναπτύσσουν bNAbs έχουν υψηλό ιικό φορτίο στο αίμα τους [78].

Η EC₅₀ των αντισωμάτων του ασθενούς 005 (1:137) είναι η 10η χαμηλότερη μεταξύ των ασθενών που εξετάστηκαν και ο ιός του έχει 7 περισσότερα αμινοξέα και 2 περισσότερες

PNGS στην περιοχή V1V2 συγκριτικά με τον tier-1A Hxb2. Αυτό το φαινόμενο συμφωνεί με την υπόθεση πως η συνεχόμενη πίεση του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγεί σε αποτελεσματικότερα αντισώματα και σε ιούς με πιο περίπλοκη περιοχή V1V2, η οποία στηρίζεται και από τη βιβλιογραφία αφού οι tier 3 ιοί έχουν περισσότερα αμινοξέα και PNGS στην V1V2 περιοχή [135]. Είναι προφανές πως απαιτούνται περισσότερα δείγματα για την επαλήθευση της υπόθεσης.

Από τις αλληλουχίες που αποκτήθηκαν, η αλληλουχία του ιού του ασθενούς «4 S3» που προέρχεται από μολυσμένα PBMC έχει πολλά κωδικόνια λήξης σε όλο το μήκος του γονιδίου *Enn*. Αυτό οφείλεται στο ένζυμο APOBEC3G του κυττάρου που προκαλεί την μετάλλαξη της κυτιδίνης σε ουριδίνη μέσω απαμίνωσης στη μη κωδική αλυσίδα κατά την αντίστροφη μεταγραφή. Η αλλαγή στην κωδική αλυσίδα από γουανιδίνη σε αδενοσίνη προκαλεί την αλλαγή του κωδικονίου της Trp σε κωδικόνιο λήξης (TGG → TGA/TAA/TAG) που οδηγεί σε πρόωρη λήξη της μετάφρασης [169]. Γι' αυτό η απομόνωση RNA από το πλάσμα για την αλληλούχιση μόνο των λειτουργικών ιών αποτελεί πιο αξιόπιστη μεθοδολογία.

Κατά την προσπάθεια απομόνωσης του γονιδίου *Enn* με τη μέθοδο PCR υπήρχε μεγάλη απόκλιση των αποτελεσμάτων, γεγονός που καθιστά κάθε πόρισμα από τις προσπάθειες βελτιστοποίησης συγκεντρώσεων ή θερμοκρασιών αμφισβητήσιμο και ίσως οι διαφορές να οφείλονταν σε τυχαία γεγονότα. Πιθανώς δεν είχαν επιλεγεί οι κατάλληλοι εκκινητές. Στα πρώτα πειράματα είχαν χρησιμοποιηθεί σε 1ο γύρο nested PCR ο εμπρόσθιος 5957hin και οι ανάστροφοι 9555R και E01 με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό ολόκληρου του γονιδίου *Enn* στα δείγματα από το Wuerzburg με λίγα έως καθόλου μη ειδικά προϊόντα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε τυχαίο γεγονός, όπως συνέβαινε και στο ζεύγος εκκινητών E00 και E01. Σχεδόν όμοιοι εκκινητές με τους E00 και E01 έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στον πολλαπλασιασμό του *Enn* [123], [147]. Μπορεί να οφείλεται η ποιότητα του DNA ή RNA στα απομονωμένα δείγματα των ασθενών για την αποτυχία πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, τα δείγματα DNA από PBMC ασθενών ίσως είχαν πολύ λίγα ικά τμήματα και η PCR ήταν συνήθως ανεπιτυχής Σε μία μελέτη 21 ασθενών ο μέσος όρος του προϊκού φορτίου ήταν 215 αντίγραφα ανά εκατομμύριο PBMC με εύρος από <10 έως 8.381 αντίγραφα [170]. Αν υποθέσουμε ότι τα δείγματα PBMC της κλινικής δοκιμής είχαν ~3 εκατομμύρια κύτταρα, τότε ο όγκος 100 μL του διαλύματος του απομονωμένου DNA έχει 645 προϊούς και το 1 μL που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις PCR περιείχε 6,45 προϊούς. Είναι πιθανό τα 6-7 αντίγραφα του προϊού να μην είναι αρκετά για τον πολλαπλασιασμό τους από την PCR. Όμως και σε περιπτώσεις 2ου γύρου nested PCR με καλής ποιότητας και ποσότητας εκμαγεία DNA, υπήρχαν πολλά μη ειδικά προϊόντα. Το γονίδιο *Enn* έχει ποσοστό GC 41 %, παρ' όλα αυτά η προσθήκη DMSO στο

μίγμα είχε θετικά αποτελέσματα σε κάποια δείγματα ασθενών, όμως δεν αποκλείεται αυτό το φαινόμενο να αποτελούσε τυχαίο γεγονός. Οι Lu και Negre [148] προτείνουν προσθήκη 10 % γλυκερόλης για την αύξηση της ειδικότητας της PCR και ο Cheng και οι συνεργάτες του [149] βελτίωσαν το πρωτόκολλό τους προσθέτοντας 8 % γλυκερόλη. Η προσθήκη 10 % και ύστερα 5 % γλυκερόλης στο δείγμα είχε ως αποτέλεσμα την αποτυχία της PCR ακόμα και για τον θετικό μάρτυρα. Αξιολογώντας τα μέχρι τώρα αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως οι εκκινητές E00 και E01 δεν είναι οι ιδανικοί για την απομόνωση του *Ενν* από τους ασθενείς της Μουάνζα. Προτείνεται η χρήση του πρόσθιου 5957hin και του ανάστροφου 9555R ή του E01 σε μία αντίδραση 1ου γύρου nested PCR και μετά η χρήση του πρόσθιου E00 και του ανάστροφου E01 ή του E03 σε μία αντίδραση 2ου γύρου nested PCR.

Εν κατακλείδι, ο HIV-1 είναι ο πιο έντονα γλυκοζυλιωμένος στην πρωτεΐνη *Ενν* ρετροϊός, χωρίς στατιστική σημαντικότητα έναντι κάποιων πολύ συγγενικών ρετροϊών του, και αυτό το χαρακτηριστικό του δεν ευθύνεται για την παθογένεια και τη γρήγορη πρόοδο προς το AIDS. Πιθανότατα η αλληλουχία της *Ενν* και η γενική δράση του ιού προκαλεί αυτά τα πολύ έντονα συμπτώματα που δεν παρατηρούνται σε μόλυνση από άλλον ρετροϊό. Ο HIV-1 έχει τη υψηλότερη μεταλλαξιμότητα και ποικιλομορφία από κάθε άλλο ρετροϊό και οργανισμό και καταφέρνει σε κάθε πίεση των αντισωμάτων να δημιουργεί νέα ανθεκτικά στελέχη. Οι έρευνες δείχνουν πως οι ασθενείς με υψηλό ιικό φορτίο παράγουν τα πιο αποτελεσματικά αντισώματα (bNAbs) [78], και σε αυτή τη εργασία παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς με υψηλό ιικό φορτίο τείνουν να έχουν πιο αποτελεσματικά αντισώματα έναντι του tier-1A Hxb2. Απαιτείται η συσχέτιση του ιικού φορτίου και της αποτελεσματικότητας των αντισωμάτων με την αλληλουχία της πρωτεΐνης *Ενν* για την εξαγωγή περαιτέρω και πιο έγκυρων συμπερασμάτων. Αυτό απαιτεί την τελειοποίηση της μεθόδου PCR για την απόκτηση μεγαλύτερου πλήθους δεδομένων για ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα.

Στο μέλλον θα αποκτηθούν περισσότερες αλληλουχίες ιών των ασθενών της κλινικής δοκιμής NCT01299948, ώστε να σχηματισθεί μια πλήρης εικόνα για την επίδραση της γλυκοζυλίωσης της V1V2 αλλά και ολόκληρης της πρωτεΐνης *Ενν* στα αυτόλογα αντισώματα του κάθε ασθενούς.

IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J. Flint, V. R. Racaniello, G. F. Rall, and A. M. Skalka, *Principles of Virology, Fourth Edition, Bundle*. American Society of Microbiology, 2015.
- [2] W.-S. Ryu, *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Boston: Academic Press, 2017.
- [3] C. A. Sabin and J. D. Lundgren, “The natural history of HIV infection,” *Curr. Opin. HIV AIDS*, vol. 8, no. 4, pp. 311–317, Jul. 2013.
- [4] “Global HIV & AIDS statistics.” [Online]. Available: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
- [5] “UNAIDS explainer,” 2018. [Online]. Available: <https://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2018/july/undetectable-untransmittable>.
- [6] R. W. Eisinger, C. W. Dieffenbach, and A. S. Fauci, “HIV Viral Load and Transmissibility of HIV Infection: Undetectable Equals Untransmittable,” *JAMA*, vol. 321, no. 5, pp. 451–452, Feb. 2019.
- [7] J. M. Cuevas, R. Geller, R. Garijo, J. López-Aldeguer, and R. Sanjuán, “Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo,” *PLoS Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. e1002251–e1002251, Sep. 2015.
- [8] J.-C. Plantier *et al.*, “A new human immunodeficiency virus derived from gorillas,” *Nat. Med.*, vol. 15, no. 8, pp. 871–872, Aug. 2009.
- [9] M. Tongo and W. A. Burgers, “Challenges in the design of a T cell vaccine in the context of HIV-1 diversity,” *Viruses*, vol. 6, no. 10, pp. 3968–3990, Oct. 2014.
- [10] P. M. Sharp and B. H. Hahn, “Origins of HIV and the AIDS pandemic,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. a006841–a006841, Sep. 2011.
- [11] B. F. Keele *et al.*, “Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1,” *Science*, vol. 313, no. 5786, pp. 523–526, Jul. 2006.
- [12] F. Van Heuverswyn *et al.*, “SIV infection in wild gorillas,” *Nature*, vol. 444, no. 7116, p. 164, 2006.
- [13] T. Huet, R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson, “Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1,” *Nature*, vol. 345, no. 6273, pp. 356–359, 1990.
- [14] M. Peeters *et al.*, “Isolation and partial characterization of an HIV-related virus

- occurring naturally in chimpanzees in Gabon.,” *AIDS*, vol. 3, no. 10, pp. 625–630, Oct. 1989.
- [15] M. M. VANDEN HAESEVELDE *et al.*, “Sequence Analysis of a Highly Divergent HIV-1-Related Lentivirus Isolated from a Wild Captured Chimpanzee,” *Virology*, vol. 221, no. 2, pp. 346–350, 1996.
 - [16] V. M. Hirsch, R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson, “An African primate lentivirus (SIVsmclosely related to HIV-2,” *Nature*, vol. 339, no. 6223, pp. 389–392, 1989.
 - [17] A. F. Aghokeng *et al.*, “Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 10, no. 3, pp. 386–396, Apr. 2010.
 - [18] S. Locatelli and M. Peeters, “Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population.,” *AIDS (London, England)*, vol. 26, no. 6. England, pp. 659–673, Mar-2012.
 - [19] M. Peeters, M. Jung, and A. Ayoub, “The origin and molecular epidemiology of HIV,” *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 11, no. 9, pp. 885–896, Sep. 2013.
 - [20] T. Zhu, B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp, and D. D. Ho, “An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic,” *Nature*, vol. 391, no. 6667, pp. 594–597, 1998.
 - [21] B. Korber *et al.*, “Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains,” *Science (80-.)*, vol. 288, no. 5472, pp. 1789 LP – 1796, Jun. 2000.
 - [22] M. Worobey *et al.*, “Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960,” *Nature*, vol. 455, no. 7213, pp. 661–664, Oct. 2008.
 - [23] N. Vidal *et al.*, “Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa,” *J. Virol.*, vol. 74, no. 22, pp. 10498–10507, Nov. 2000.
 - [24] M. T. P. Gilbert, A. Rambaut, G. Wlasiuk, T. J. Spira, A. E. Pitchenik, and M. Worobey, “The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 47, pp. 18566–18570, Nov. 2007.
 - [25] T. I. de Silva, M. Cotten, and S. L. Rowland-Jones, “HIV-2: the forgotten AIDS virus,” *Trends Microbiol.*, vol. 16, no. 12, pp. 588–595, Dec. 2008.
 - [26] C. van Tienen *et al.*, “Two Distinct Epidemics: The Rise of HIV-1 and Decline of HIV-2 Infection Between 1990 and 2007 in Rural Guinea-Bissau,” *JAIDS J. Acquir.*

- Immune Defic. Syndr.*, vol. 53, no. 5, 2010.
- [27] G. S. Gottlieb *et al.*, “Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission,” *AIDS*, vol. 20, no. 6, pp. 895–900, Apr. 2006.
 - [28] S. L. Rowland-Jones and H. C. Whittle, “Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1?,” *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 4, pp. 329–331, 2007.
 - [29] “Nobel award opens old wounds,” *Lancet*. [Online]. Available: <https://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473309908702354.pdf>.
 - [30] “HXB2 - Los Alamos HIV Databases,” *Los Alamos HIV Databases*, 2017. [Online]. Available: https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/asearch/query_one.comp?se_id=K03455.
 - [31] D. C. Montefiori, M. Roederer, L. Morris, and M. S. Seaman, “Neutralization tiers of HIV-1,” vol. 13, no. 2, 2018.
 - [32] A. J. Cann, *Principles of Molecular Virology*, Fifth. Boston: Academic Press, 2012.
 - [33] Uniprot, “Gag polyprotein,” 2019. [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/P04591>.
 - [34] E. O. Freed, “HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle,” *Virology*, vol. 251, no. 1, pp. 1–15, 1998.
 - [35] B. Chen, “HIV Capsid Assembly, Mechanism, and Structure,” *Biochemistry*, vol. 55, no. 18, pp. 2539–2552, May 2016.
 - [36] S. ‘Assessment of P. T. by B. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), “Human Immunodeficiency Virus (HIV),” *Transfus. Med. Hemother.*, vol. 43, no. 3, pp. 203–222, May 2016.
 - [37] M. Gentile *et al.*, “Determination of the size of HIV using adenovirus type 2 as an internal length marker,” *J. Virol. Methods*, vol. 48, no. 1, pp. 43–52, Jun. 1994.
 - [38] J. S. Klein and P. J. Bjorkman, “Few and far between: how HIV may be evading antibody avidity,” *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 5, pp. e1000908–e1000908, May 2010.
 - [39] M. Yamaguchi, R. Danev, K. Nishiyama, K. Sugawara, and K. Nagayama, “Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus,” *J. Struct. Biol.*, vol. 162, no. 2, pp. 271–276, May 2008.
 - [40] C. Charpentier, T. Nora, O. Tenaillon, F. Clavel, and A. J. Hance, “Extensive Recombination among Human Immunodeficiency Virus Type 1 Quasispecies Makes

- an Important Contribution to Viral Diversity in Individual Patients,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 5, pp. 2472 LP – 2482, Mar. 2006.
- [41] K. M. Kitrinos, J. A. E. Nelson, W. Resch, and R. Swanstrom, “Effect of a protease inhibitor-induced genetic bottleneck on human immunodeficiency virus type 1 env gene populations,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 16, pp. 10627–10637, Aug. 2005.
 - [42] E. M. Bunnik *et al.*, “Adaptation of HIV-1 envelope gp120 to humoral immunity at a population level,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 9, pp. 995–997, Sep. 2010.
 - [43] Z. Euler *et al.*, “Activity of broadly neutralizing antibodies, including PG9, PG16, and VRC01, against recently transmitted subtype B HIV-1 variants from early and late in the epidemic,” *J. Virol.*, vol. 85, no. 14, pp. 7236–7245, Jul. 2011.
 - [44] Q. Sattentau, “Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, p. 815, Nov. 2008.
 - [45] M. Permanyer, E. Ballana, and J. A. Esté, “Endocytosis of HIV: anything goes,” *Trends Microbiol.*, vol. 18, no. 12, pp. 543–551, Dec. 2010.
 - [46] V. Maréchal, M. C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J. M. Heard, and O. Schwartz, “Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 22, pp. 11166–11177, Nov. 2001.
 - [47] B. L. Wei, P. W. Denton, E. O’Neill, T. Luo, J. L. Foster, and J. V. Garcia, “Inhibition of lysosome and proteasome function enhances human immunodeficiency virus type 1 infection,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 9, pp. 5705–5712, May 2005.
 - [48] J. Daecke, O. T. Fackler, M. T. Dittmar, and H.-G. Kräusslich, “Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 3, pp. 1581–1594, Feb. 2005.
 - [49] K. Miyauchi, Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov, and G. B. Melikyan, “HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes,” *Cell*, vol. 137, no. 3, pp. 433–444, May 2009.
 - [50] A. Rein, “RNA Packaging in HIV,” *Trends Microbiol.*, 2019.
 - [51] J. A. Smith and R. Daniel, “Following the Path of the Virus: The Exploitation of Host DNA Repair Mechanisms by Retroviruses,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 217–226, May 2006.
 - [52] L. Jeanson *et al.*, “Effect of Ku80 Depletion on the Preintegrative Steps of HIV-1 Replication in Human Cells,” *Virology*, vol. 300, no. 1, pp. 100–108, 2002.
 - [53] M. Comas-Garcia, R. S. Davis, and A. Rein, “On the Selective Packaging of Genomic RNA by HIV-1,” *Viruses*, vol. 8, no. 9, 2016.

- [54] A. Delannoy, M. Poirier, and B. Bell, “Cat and Mouse: HIV Transcription in Latency, Immune Evasion and Cure/Remission Strategies,” *Viruses*, vol. 11, no. 3, 2019.
- [55] C. L. Day *et al.*, “PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression,” *Nature*, vol. 443, no. 7109, pp. 350–354, 2006.
- [56] C. Petrovas *et al.*, “PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection,” *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 10, pp. 2281–2292, Oct. 2006.
- [57] L. Trautmann *et al.*, “Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction,” *Nat. Med.*, vol. 12, no. 10, pp. 1198–1202, 2006.
- [58] A. Jordan, P. Defechereux, and E. Verdin, “The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation,” *EMBO J.*, vol. 20, no. 7, pp. 1726–1738, Apr. 2001.
- [59] A. Jordan, D. Bisgrove, and E. Verdin, “HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 8, pp. 1868–1877, Apr. 2003.
- [60] M. K. Lewinski *et al.*, “Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 11, pp. 6610–6619, Jun. 2005.
- [61] J. Blazkova *et al.*, “CpG methylation controls reactivation of HIV from latency,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 8, pp. e1000554–e1000554, Aug. 2009.
- [62] Y. Han *et al.*, “Resting CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 12, pp. 6122–6133, Jun. 2004.
- [63] L. Colin and C. Van Lint, “Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies,” *Retrovirology*, vol. 6, p. 111, Dec. 2009.
- [64] R. F. Siliciano and W. C. Greene, “HIV latency,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. a007096–a007096, Sep. 2011.
- [65] Q. Yu, R. Yu, and X. Qin, “The good and evil of complement activation in HIV-1 infection,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 7, no. 5, pp. 334–340, Sep. 2010.
- [66] M. Alqudah, M. Yaseen, and M. M. S. Yaseen, “HIV-1 strategies to overcome the immune system by evading and invading innate immune system,” *HIV AIDS Rev.*, vol. 15, pp. 1–12, Jan. 2016.
- [67] V. Tjomsland *et al.*, “Complement opsonization of HIV-1 results in a different

- intracellular processing pattern and enhanced MHC class I presentation by dendritic cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1470–1483, Jun. 2013.
- [68] R. Ellegård *et al.*, “Complement opsonization of HIV-1 results in decreased antiviral and inflammatory responses in immature dendritic cells via CR3,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 9, pp. 4590–4601, Nov. 2014.
- [69] Y. Pillay, J. Moodley, and T. Naicker, “The role of the complement system in HIV infection and preeclampsia,” *Inflamm. Res.*, vol. 68, no. 6, pp. 459–469, 2019.
- [70] R. A. Pantophlet, “Antibody Epitope Exposure and Neutralization of HIV-1,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 16, no. 33, pp. 3729–3743, 2010.
- [71] J. Overbaugh and L. Morris, “The Antibody Response against HIV-1,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 1, pp. a007039–a007039, Jan. 2012.
- [72] P. J. Klasse and Q. J. Sattentau, “Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses,” *J. Gen. Virol.*, vol. 83, no. 9, pp. 2091–2108, 2002.
- [73] R. Kumar, H. Qureshi, S. Deshpande, and J. Bhattacharya, “Broadly neutralizing antibodies in HIV-1 treatment and prevention,” *Ther. Adv. vaccines Immunother.*, vol. 6, no. 4, pp. 61–68, Aug. 2018.
- [74] P. W. Parren *et al.*, “Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by antibody to gp120 is determined primarily by occupancy of sites on the virion irrespective of epitope specificity,” *J. Virol.*, vol. 72, no. 5, pp. 3512–3519, May 1998.
- [75] D. N. Forthal and C. Moog, “Fc receptor-mediated antiviral antibodies,” *Curr. Opin. HIV AIDS*, vol. 4, no. 5, pp. 388–393, Sep. 2009.
- [76] J. R. Mascola and B. F. Haynes, “HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature’s pathways,” *Immunol. Rev.*, vol. 254, no. 1, pp. 225–244, Jul. 2013.
- [77] M. Medina-Ramirez *et al.*, “Broadly cross-neutralizing antibodies in HIV-1 patients with undetectable viremia,” *J. Virol.*, vol. 85, no. 12, pp. 5804–5813, Jun. 2011.
- [78] N. A. Doria-Rose *et al.*, “Breadth of Human Immunodeficiency Virus-Specific Neutralizing Activity in Sera: Clustering Analysis and Association with Clinical Variables,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 3, pp. 1631 LP – 1636, Feb. 2010.
- [79] M. Pancera *et al.*, “Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env,” *Nature*, vol. 514, no. 7523, pp. 455–461, Oct. 2014.
- [80] C. Moog, H. J. Fleury, I. Pellegrin, A. Kirn, and A. M. Aubertin, “Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals,” *J. Virol.*, vol. 71, no. 5, pp. 3734–3741, May 1997.

- [81] D. R. Burton *et al.*, “HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem,” *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 233–236, Mar. 2004.
- [82] P. F. Zhang, X. Chen, D. W. Fu, J. B. Margolick, and G. V. Quinnan, “Primary Virus Envelope Cross-Reactivity of the Broadening Neutralizing Antibody Response during Early Chronic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection,” *J. Virol.*, vol. 73, no. 6, pp. 5225 LP – 5230, Jun. 1999.
- [83] R. Pan, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and X.-P. Kong, “The V1V2 Region of HIV-1 gp120 Forms a Five-Stranded Beta Barrel,” *J. Virol.*, vol. 89, no. 15, pp. 8003 LP – 8010, Aug. 2015.
- [84] T. Zhou *et al.*, “Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120,” *Nature*, vol. 445, no. 7129, pp. 732–737, Feb. 2007.
- [85] D. A. Calarese *et al.*, “Antibody Domain Exchange Is an Immunological Solution to Carbohydrate Cluster Recognition,” *Science (80-.)*, vol. 300, no. 5628, pp. 2065 LP – 2071, Jun. 2003.
- [86] M. Braibant *et al.*, “Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity,” *AIDS*, vol. 20, no. 15, pp. 1923–1930, Oct. 2006.
- [87] P. W. H. I. Parren, D. R. Burton, and Q. J. Sattentau, “HIV-1 antibody — debris or virion?,” *Nat. Med.*, vol. 3, no. 4, pp. 366–367, 1997.
- [88] L. M. Walker *et al.*, “Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target,” *Science*, vol. 326, no. 5950, pp. 285–289, Oct. 2009.
- [89] M. Pancera *et al.*, “Crystal Structure of PG16 and Chimeric Dissection with Somatically Related PG9: Structure-Function Analysis of Two Quaternary-Specific Antibodies That Effectively Neutralize HIV-1,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 16, pp. 8098 LP – 8110, Aug. 2010.
- [90] J. M. Binley *et al.*, “Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 23, pp. 13232–13252, Dec. 2004.
- [91] D. H. Barouch *et al.*, “Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys,” *Nature*, vol. 503, no. 7475, pp. 224–228, Nov. 2013.
- [92] X. Wu *et al.*, “Maturation and Diversity of the VRC01-Antibody Lineage over 15 Years of Chronic HIV-1 Infection,” *Cell*, vol. 161, no. 3, pp. 470–485, Apr. 2015.

- [93] Z. Sheng *et al.*, “Effects of Darwinian Selection and Mutability on Rate of Broadly Neutralizing Antibody Evolution during HIV-1 Infection,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. e1004940–e1004940, May 2016.
- [94] J. N. Bhiman *et al.*, “Viral variants that initiate and drive maturation of V1V2-directed HIV-1 broadly neutralizing antibodies,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 11, pp. 1332–1336, Nov. 2015.
- [95] F. Gao *et al.*, “Cooperation of B cell lineages in induction of HIV-1-broadly neutralizing antibodies,” *Cell*, vol. 158, no. 3, pp. 481–491, Jul. 2014.
- [96] M. Bonsignori *et al.*, “Maturation Pathway from Germline to Broad HIV-1 Neutralizer of a CD4-Mimic Antibody,” *Cell*, vol. 165, no. 2, pp. 449–463, Apr. 2016.
- [97] M. Bonsignori *et al.*, “Antibody-virus co-evolution in HIV infection: paths for HIV vaccine development,” *Immunol. Rev.*, vol. 275, no. 1, pp. 145–160, Jan. 2017.
- [98] “HIV-1 Gene Map,” *Los Alamos HIV Databases*. [Online]. Available: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>.
- [99] R. Wyatt and J. Sodroski, “The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens,” *Science (80-.)*, vol. 280, no. 5371, pp. 1884 LP – 1888, Jun. 1998.
- [100] J.-P. Julien *et al.*, “Crystal Structure of a Soluble Cleaved HIV-1 Envelope Trimer,” *Science (80-.)*, vol. 342, no. 6165, pp. 1477 LP – 1483, Dec. 2013.
- [101] S. Beitari, Y. Wang, S.-L. Liu, and C. Liang, “HIV-1 Envelope Glycoprotein at the Interface of Host Restriction and Virus Evasion,” *Viruses*, vol. 11, no. 4, 2019.
- [102] Uniprot, “Env polyprotein,” 2019. .
- [103] “Variable Region Characteristics Explanation,” *Los Alamos HIV Databases*, 2019. [Online]. Available: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VAR_REG_CHAR/variable_region_characterization_explanation.html.
- [104] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson, “Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody,” *Nature*, vol. 393, no. 6686, pp. 648–659, Jun. 1998.
- [105] R. J. O’Connell, J. H. Kim, and J.-L. Excler, “The HIV-1 gp120 V1V2 loop: structure, function and importance for vaccine development,” *Expert Rev. Vaccines*, vol. 13, no. 12, pp. 1489–1500, Dec. 2014.
- [106] C. K. Leonard, M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory, “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.*, vol. 265, no. 18, pp. 10373–10382, Jun. 1990.
- [107] M. Rolland *et al.*, “Increased HIV-1 vaccine efficacy against viruses with genetic signatures in Env V2,” *Nature*, vol. 490, no. 7420, pp. 417–420, 2012.
- [108] T. Yuan, J. Li, and M.-Y. Zhang, “HIV-1 envelope glycoprotein variable loops are indispensable for envelope structural integrity and virus entry,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. e69789–e69789, Aug. 2013.
- [109] C. J. Saunders *et al.*, “The V1, V2, and V3 Regions of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Differentially Affect the Viral Phenotype in an Isolate-Dependent Manner,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 14, pp. 9069 LP – 9080, Jul. 2005.
- [110] R. E. Haaland *et al.*, “Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 1, pp. e1000274–e1000274, Jan. 2009.
- [111] M. E. Curlin *et al.*, “HIV-1 envelope subregion length variation during disease progression,” *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 12, pp. e1001228–e1001228, Dec. 2010.
- [112] M. K. Gorny *et al.*, “Functional and immunochemical cross-reactivity of V2-specific monoclonal antibodies from HIV-1-infected individuals,” *Virology*, vol. 427, no. 2, pp. 198–207, Jun. 2012.
- [113] E. S. Gray *et al.*, “Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 12, pp. 6187–6196, Jun. 2007.
- [114] A. Pinter, W. J. Honnen, Y. He, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and S. C. Kayman, “The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 10, pp. 5205–5215, May 2004.
- [115] J. J. Beintema, “Do asparagine-linked carbohydrate chains in glycoproteins have a preference for β -bends?,” *Biosci. Rep.*, vol. 6, no. 8, pp. 709 LP – 714, Aug. 1986.
- [116] I. Mononen and E. Karjalainen, “Structural comparison of protein sequences around potential N-glycosylation sites,” *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 788, no. 3, pp. 364–367, 1984.
- [117] M. Zhang *et al.*, “Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin,” *Glycobiology*, vol. 14, no. 12, pp. 1229–1246, Jun. 2004.
- [118] J. S. McLellan *et al.*, “Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly

- neutralizing antibody PG9.,” *Nature*, vol. 480, no. 7377, pp. 336–43, Nov. 2011.
- [119] N. Wood *et al.*, “HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 5, pp. e1000414–e1000414, May 2009.
- [120] B. Korber, B. Gaschen, K. Yusim, R. Thakallapally, C. Kesmir, and V. Detours, “Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation,” *Br. Med. Bull.*, vol. 58, no. 1, pp. 19–42, Sep. 2001.
- [121] L. K. Pritchard, D. J. Harvey, C. Bonomelli, M. Crispin, and K. J. Doores, “Cell- and Protein-Directed Glycosylation of Native Cleaved HIV-1 Envelope,” *J. Virol.*, vol. 89, no. 17, pp. 8932–8944, Jun. 2015.
- [122] G. Pollakis, S. Kang, A. Kliphuis, M. I. M. Chalaby, J. Goudsmit, and W. A. Paxton, “N-Linked Glycosylation of the HIV Type-1 gp120 Envelope Glycoprotein as a Major Determinant of CCR5 and CXCR4 Coreceptor Utilization,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 16, pp. 13433–13441, Apr. 2001.
- [123] X. Wei *et al.*, “Antibody neutralization and escape by HIV-1,” *Nature*, vol. 422, no. 6929, pp. 307–312, 2003.
- [124] B.-J. Ma *et al.*, “Envelope deglycosylation enhances antigenicity of HIV-1 gp41 epitopes for both broad neutralizing antibodies and their unmutated ancestor antibodies,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 9, pp. e1002200–e1002200, Sep. 2011.
- [125] K. J. Doores and D. R. Burton, “Variable loop glycan dependency of the broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies PG9 and PG16,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 20, pp. 10510–10521, Oct. 2010.
- [126] L. M. Walker *et al.*, “Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies,” *Nature*, vol. 477, no. 7365, pp. 466–470, Sep. 2011.
- [127] R. Pejchal *et al.*, “A Potent and Broad Neutralizing Antibody Recognizes and Penetrates the HIV Glycan Shield,” *Science (80-.)*, vol. 334, no. 6059, pp. 1097 LP – 1103, Nov. 2011.
- [128] S. G. Turville *et al.*, “Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 975–983, 2002.
- [129] L. de Witte *et al.*, “Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells,” *Nat. Med.*, vol. 13, p. 367, Mar. 2007.
- [130] Y. Watanabe, T. A. Bowden, I. A. Wilson, and M. Crispin, “Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, May 2019.

- [131] J. Tian *et al.*, “Effect of Glycosylation on an Immunodominant Region in the V1V2 Variable Domain of the HIV-1 Envelope gp120 Protein,” *PLOS Comput. Biol.*, vol. 12, no. 10, p. e1005094, Oct. 2016.
- [132] W. Wang *et al.*, “A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization,” *Retrovirology*, vol. 10, no. 1, p. 14, 2013.
- [133] K. S. Cole, J. D. Steckbeck, J. L. Rowles, R. C. Desrosiers, and R. C. Montelaro, “Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 3, pp. 1525–1539, Feb. 2004.
- [134] M. Sagar, X. Wu, S. Lee, and J. Overbaugh, “Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 19, pp. 9586–9598, Oct. 2006.
- [135] M. J. van Gils *et al.*, “Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies,” *J. Virol.*, vol. 85, no. 14, pp. 6986–6995, Jul. 2011.
- [136] Y. Li *et al.*, “Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 9, pp. 1032–1034, Sep. 2007.
- [137] R. A. Ogert, M. K. Lee, W. Ross, A. Buckler-White, M. A. Martin, and M. W. Cho, “N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 13, pp. 5998–6006, Jul. 2001.
- [138] N. Saitou and M. Nei, “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425, Jul. 1987.
- [139] J. Felsenstein, “CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP,” *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783–791, Jul. 1985.
- [140] V. Bryson and H. J. Vogel, “Evolving Genes and Proteins,” *Science (80-.)*, vol. 147, no. 3653, pp. 68 LP – 71, Jan. 1965.
- [141] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549, Jun. 2018.
- [142] D. T. Jones, W. R. Taylor, and J. M. Thornton, “The rapid generation of mutation data

- matrices from protein sequences.,” *Comput. Appl. Biosci.*, vol. 8, no. 3, pp. 275–282, Jun. 1992.
- [143] E. Sanders-Buell, M. Salminen, and F. McCutchan, “Sequencing primers for HIV-1,” *Hum. retroviruses AIDS*, Jan. 1995.
- [144] T. M. Folks *et al.*, “Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 7, pp. 2365–2368, Apr. 1989.
- [145] T. Folks *et al.*, “Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 13, pp. 4539–4543, Jul. 1985.
- [146] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, and A. Bairoch, “ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3784–3788, Jul. 2003.
- [147] H. F. Njai *et al.*, “The predominance of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02 (CRF02_AG) in West Central Africa may be related to its replicative fitness,” *Retrovirology*, vol. 3, no. 1, p. 40, 2006.
- [148] Y. Hai Lu and S. Nègre, “Use of glycerol for enhanced efficiency and specificity of PCR amplification,” *Trends Genet.*, vol. 9, no. 9, p. 297, 1993.
- [149] S. Cheng, C. Fockler, W. M. Barnes, and R. Higuchi, “Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 12, pp. 5695–5699, Jun. 1994.
- [150] L. Rudovick *et al.*, “Prevalence of pretreatment HIV drug resistance in Mwanza, Tanzania,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 73, no. 12, pp. 3476–3481, Aug. 2018.
- [151] J. J. Yabes, “Human T-Lymphotropic Viruses,” *Medscape*, 2019. [Online]. Available: <https://emedicine.medscape.com/article/219285-overview>.
- [152] IARC, “Human T-Lymphotropic Virus Type I,” *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304341/?report=classic>.
- [153] Office of Alcoholism and Substance Abuse Services, “Human T-Lymphotropic Virus (HTLV),” *Office of Alcoholism and Substance Abuse Services*. [Online]. Available: <https://www.oasas.ny.gov/AdMed/FYI/HTLV-FYI.cfm>.
- [154] C. R. M. Bangham, “HTLV-1 infections,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 53, no. 8, pp. 581 LP – 586, Aug. 2000.
- [155] M. Polat, S.-N. Takeshima, and Y. Aida, “Epidemiology and genetic diversity of

- bovine leukemia virus,” *Virol. J.*, vol. 14, no. 1, p. 209, Nov. 2017.
- [156] O. Nekouei, J. VanLeeuwen, H. Stryhn, D. Kelton, and G. Keefe, “Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows,” *Prev. Vet. Med.*, vol. 133, pp. 1–9, Oct. 2016.
- [157] J. F. Ferrer, R. R. Marshak, D. A. Abt, and S. J. Kenyon, “Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma,” *Ann. Rech. Vet.*, vol. 9, no. 4, pp. 851–857, 1978.
- [158] G. C. Buehring *et al.*, “Bovine leukemia virus discovered in human blood,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, p. 297, Apr. 2019.
- [159] D. Schwingel, A. P. Andreolla, L. M. S. Erpen, R. Frandoloso, and L. C. Kreutz, “Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 2949, Feb. 2019.
- [160] L. A. Robinson *et al.*, “Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung,” *Br. J. Cancer*, vol. 115, p. 497, Jul. 2016.
- [161] S. Y. Kao and S. J. Marriott, “Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein,” *J. Virol.*, vol. 73, no. 5, pp. 4299–4304, May 1999.
- [162] G. Silvestri, “Immunity in natural SIV infections,” *J. Intern. Med.*, vol. 265, no. 1, pp. 97–109, Jan. 2009.
- [163] UNAIDS, “FAQ about HIV and AIDS,” *UNAIDS*, 2019. [Online]. Available: <https://www.unaids.org/en/frequently-asked-questions-about-hiv-and-aids>.
- [164] N. W. Cummins and A. D. Badley, “Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010,” *Cell Death Dis.*, vol. 1, no. 11, pp. e99–e99, Nov. 2010.
- [165] T. Mehmetoglu-Gurbuz, A. Joshi, and H. Garg, “Differential Pathogenicity of SHIV KB9 and 89.6 Env Correlates with Bystander Apoptosis Induction in CD4⁺ T cells,” *Viruses*, vol. 11, no. 10, 2019.
- [166] A. Joshi *et al.*, “Genetic signatures of HIV-1 envelope-mediated bystander apoptosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 5, pp. 2497–2514, Jan. 2014.
- [167] L. Vargiu *et al.*, “Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common,” *Retrovirology*, vol. 13, p. 7, Jan. 2016.
- [168] P. Jern, G. O. Sperber, and J. Blomberg, “Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy,” *Retrovirology*, vol. 2, p. 50, Aug. 2005.
- [169] U. Neogi *et al.*, “Human APOBEC3G-mediated hypermutation is associated with

antiretroviral therapy failure in HIV-1 subtype C-infected individuals,” *J. Int. AIDS Soc.*, vol. 16, no. 1, p. 10.7448/IAS.16.1.18472, Jan. 2013.

- [170] N. Desire *et al.*, “Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay.,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 4, pp. 1303–1310, Apr. 2001.

V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIV απασχολεί την επιστημονική κοινότητα αρκετά χρόνια και ακόμα μετά από πολυάριθμες προσπάθειες δεν έχει εφευρεθεί ένα προστατευτικό εμβόλιο ή μία θεραπεία που θα εξουδετερώνει εξ ολοκλήρου τον ιό στο ανθρώπινο σώμα. Ο ιός εγκαθίσταται μόνιμα στο πυρηνικό γονιδίωμα των κυττάρων. Τα κλινικά συμπτώματα μετά τη μόλυνση ομοιάζουν αυτά της γρίπης και δεν εμφανίζονται σε όλους τους ασθενείς. Οι HIV-1, HIV-2 και οι ομάδες τους πιστεύεται ότι προέκυψαν στην Κεντροδυτική Αφρική από τα στελέχη SIVcpz και SIVsmm, αντίστοιχα. Η διάγνωση του HIV γίνεται μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του ιού ή μέσω PCR σε δείγματα αίματος για την εντόπιση μοναδικών αλληλουχιών του ιού.

Ο HIV-1 καλύπτεται από φάκελο με ελάχιστα μόρια της πρωτεΐνης *Env* στη επιφάνειά του. Τα αποκομμένα τμήματα της *Env*, gp120 και gp41, αποτελούν στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Η έντονη γλυκοζυλίωση αυτών των τμημάτων εμποδίζει την αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Οι έντονα γλυκοζυλιωμένες περιοχές V1 και V2 της gp120 μειώνουν την ευαισθησία του ιού στα αντισώματα.

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση και στατιστική ανάλυση των PNGS διάφορων ρετροϊών για συσχέτιση των PNGS με την παθογένειά τους. Επίσης, έγιναν δοκιμασίες εξουδετέρωσης του Hxb2 από αντισώματα ασθενών και συσχέτισή τους με το ιικό φορτίο του κάθε ασθενούς. Η προσπάθεια κατασκευής ενός *in house* πρωτοκόλλου PCR για την απομόνωση του γονιδίου *Env* θα βοηθούσε στον εντοπισμό των PNGS μέσω αλληλούχισης των ιών ασθενών και στη συσχέτισή τους με την ικανότητα εξουδετέρωσης των αντισωμάτων του κάθε ασθενούς.

Το υψηλότερο ποσοστό PNGS της πρωτεΐνης *Env* στον HIV-1 μεταξύ διάφορων ρετροϊών φαίνεται πως δεν αποτελεί παράγοντα της υψηλής παθογένειας του HIV-1. Υπήρξε συσχετισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης των αντισωμάτων με το υψηλό ιικό φορτίο. Για την απόκτηση συμπερασμάτων της σχέσης μεταξύ του ποσοστού PNGS και της αποτελεσματικότητας των αντισωμάτων χρειάζονται περισσότερα δεδομένα.

VI. ABSTRACT

HIV concerns the scientific community several years and, even after countless attempts, there is no protective vaccine or a definite cure which will clean the virus from the human body. The virus is permanently inserted into the nuclear genome of the cell. The clinical symptoms of HIV infection are similar to those of a common flu and are not present in every patient. HIV-1, HIV-2 and their groups are speculated to have derived in Western-Central Africa from the strains SIVcpz and SIVsmm, respectively. HIV diagnosis is performed via detection of anti-HIV antibodies or by PCR which amplifies specific conserved sequences of the virus. HIV-1 is covered by an envelope which has very few Env molecules on its surface. The enzymatically cut peptides of Env, gp120 and gp41, are targets of neutralizing antibodies. The intensive glycosylation of these peptides obstructs the binding of antibodies on them. The intensively glycosylated V1 and V2 regions of gp120 reduce the sensitivity of the virus to antibodies.

In this study, a phylogenetic analysis and a statistical analysis of the PNGS of various retroviruses was performed in order to correlate PNGS with pathogenicity of retroviruses. Also, neutralization assays of Hxb2 were performed with antibodies derived from AIDS patients and were correlated with the viral load of each patient. The effort to generate an in-house PCR protocol for the amplification of the *Env* gene, would have helped in the localization of PNGS, through sequencing the viral gene of patients, and in correlating these results with the neutralizing activity of the antibodies of each patient.

The highest percentage of PNGS at the protein Env of HIV-1 among various retroviruses seems to be irrelevant to the high pathogenicity of HIV-1. There was a correlation between sufficient neutralizing activity of antibodies against Hxb2 with high viral load in patients. In order to draw safe conclusions regarding the association between the percentage of PNGS and the neutralizing activity of the antibodies, more data need to be produced.

VII. ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

Ημερομηνία: _____ Υπογραφή: _____