

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND
MIKROBIOLOOGIA INSTITUUT

Maarja Sadam

**CCL3L1 GEENI KOOPIAARV EESTI SÜSTIVATEL
NARKOMAANIDEL**

Magistritöö

Juhendaja: Tõnis Karki, PhD

TARTU 2008

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
2.1. HIV infektsioon ning selles osalevad makroorganismi rakupinna retseptorid	6
2.2. HIV sisenemine rakku	7
2.3. Kemokiinretseptorid	8
2.3.1. Kemokiinretseptor CXCR4	9
2.3.2. Kemokiinretseptor CCR5	10
2.4. Polümorfismid CCR5 kodeerivas geenis.....	12
2.5. Kemokiinretseptori CCR5 ligand CCL3L1/MIP-1 α P	13
2.6. CCL3L1 roll HIV infektsioonil	15
2.7. HIV ja HCV koinfektsioon.....	17
2.8. HIV epideemia omapära Eestis – süstivad narkomaanid	18
3. TÖÖ EESMÄRGID.....	21
4. MATERJAL JA METOODIKA.....	22
4.1. Uuritavad	22
4.2. A431 rakuliin.....	24
4.3. Perifeerse vere monotsüütidest DNA eraldamine	25
4.4. <i>Real-time</i> PCR CCL3L1 geeni koopiaarvu määramiseks	25
4.5. CCL3L1 geeni koopiaarvu hindamine	29
4.6. Statistika	31
5. TULEMUSED	32
5.1. CCL3L1 geeni koopiaarv: HIV-positiivsed <i>versus</i> HIV-negatiivsed narkomaanid ja riskitegurid.....	32
5.2. HCV-positiivsed <i>versus</i> HCV-negatiivsed narkomaanid ja CCL3L1	36
5.3. HBV-positiivsed <i>versus</i> HBV-negatiivsed narkomaanid ja CCL3L1	37
5.4. CCL3L1 ja HCV või HBV koinfektsioon	38

6. ARUTELU	41
JÄRELDUSED	45
KOKKUVÕTE	46
TÄNUAVALDUSED	47
SUMMARY	48
KASUTATUD KIRJANDUS	50

KASUTATUD LÜHENDID

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> – inimese immuunpuudulikkuse viirus
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> – omandatud immuunpuudulikkuse sündroom
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i> – ahvide immuunpuudulikkuse viirus
HCV	<i>hepatitis C virus</i> – hepatiit C viirus
HBV	<i>hepatitis B virus</i> – hepatiit B viirus
TKI	tervisekaitseinspeksioon
Wt	<i>wild-type</i> – metsik tüüp
RANTES	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
CRF	<i>circulating recombinant form</i> – ringlev rekombinantne vorm
Kd	kilodalton
Gp	glükoproteiin
IDU	<i>intravenous drug user</i> – süstiv narkomaan

1. SISSEJUHATUS

1981. a. kirjeldati Los Angeles'es ja New York'is mitmeid seni väga haruldaseks osutunud *Pneumocystis carinii* poolt põhjustatud kopsupõletiku ja Kaposi sarkoomi juhtumeid. Haigestusid eeskätt homoseksuaalsed mehed, kusjuures nimetatud haiguste foonil esines rakuline immuunpuudulikkus. Kuna epidemioloogilise uuringu alusel olid haigusjuhud omavahel seotud, siis hakati kirjeldatud kliinilisi avaldusvorme nimetama omandatud immuunpuudulikkuse sündroomiks ehk AIDS-iks (*acquired immunodeficiency syndrome*). Hiljem selgus, et haiguse põhjustajaks on retroviiruste hulka kuuluv HIV (*human immunodeficiency virus*). Praegu arvatakse maailmas elavat rohkem kui 40 miljoni HIV-ga nakatanut, kusjuures mõnes Aafrika riigis on nakatunud ligi veerand täiskasvanud elanikkonnast.

Praeguseks on teada, et teatud inimeste nakatumine HI-viirusega toimub kergemini, samuti on haiguse progressioon AIDS-i staadiumi kas kiirem või aeglasem. Eeskätt viimastel aastatel on läbi viidud terve rida uuringuid, mille käigus on püütud selgitada permeesorganismi poolseid geneetilisi tegureid, mis mõjutavad nakatumist HI-viirusega ja selle viiruse edasist käitumist inimese organismis. Taoliste uuringute tulemusena on selgunud, et mõned polümorfismid HIV koretseptoreid kodeerivates geenides omavad HI-infektsiooni patogeneesi suhtes moduleerivat toimet, aeglustada teatud juhtudel haiguse progressiooni, teistel juhtudel aga kiirendades seda. Lisaks geenid esinevatele polümorfismidele on näidatud, et HI-viiruse koretseptorite ligandidel on väga oluline roll HI-viirusinfektsiooni mõjutamisel. Näiteks HI-viiruse koretseptori CCR5-e (kemokiinireseptor 5) ligandi CCL3L1 kodeeriva geenikoopite arv võib omada HI-viirusega nakatumisele ja infektsiooni kulule moduleerivat efekti.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida Eesti elanike hulgas HI-viiruse koretseptori CCR5-e ligandi CCL3L1 determineerivat geeni koopiate arvu ja selgitada geeni koopiate arvu võimalik seos HIV infektsiooniga ning hepatiit C ja B esinemisega süstivate narkomaanide hulgas.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. HIV infektsioon ning selles osalevad makroorganismi rakupinna retseptorid

HIV ehk inimese immuunpuudulikkuse viirus ehk AIDS-i (inglis k. *acquired immunodeficiency syndrome* - omandatud immuunpuudulikkuse sündroom) põhjustaja nakatab inimesi ja mõningaid ahve, kuid erinevalt inimesest ei kaasne ahvidel nakkusega immuunpuudulikkust. Viirus levib veres ja lümfiteedes monotsüütides ning T-lümfotsüütides. Esmane nakkus tõrjutakse tavaliselt keha immuunsüsteemi poolt, misjärel viirus jääb persistentseks lümfisõlmedes. Persistentse ajal on immuunsüsteem ja viiruse paljunemine tasakaalus. Teatud aja möödudes (50%-il 10 aasta jooksul) tekib tavaliselt AIDS. Viiruse aktiveerumise ja peremeesrakkude kahjustumise molekulaarsed põhjused pole veel päris täpselt selged. Oma osa selles on kindlasti viiruse muutlikkusel ja tänu sellele “põgenemisele” organismi immuunsüsteemi eest. Nakatunud peremeesorganismi rakkude hävimise kõige tõenäolisem põhjus on viiruse poolt indutseeritud apoptoos. Peale lümfotsüütide ja vereloomerakkude võib HIV kahjustada ka närvisüsteemi rakke, eelkõige mikroglia ja aju kapillaarseid endoteeli rakke, põhjustades dementsust (Price jt, 1988). AIDS-i staadiumi jõudnud haigete keskmine elulemus on alla kahe aasta. Tüüpilised haigusnähud akuutses staadiumis on kandidoos suu limaskestades, Kaposi sarkoom nahal ja limaskestadel, muude viirusnakkuste ägenemine ja haruldaste vähevirulentsete bakternakkuste teke. Kõik need nähtused on tingitud T-lümfotsüütide arvu vähenemisest organismis (Ameerika Ühendriikide Tervisekaitse Instituut, 08.04.2008).

Rakupinna retseptoreid kasutavad rakud teineteisega seostumiseks, väliskeskkonnast signaalide vastuvõtmiseks, toitainete omastamiseks jne. Retseptoreid klassifitseeritakse väga mitmete tunnuste järgi, näiteks lähtudes ligandi sidumisest või retseptorite lokalisatsioonist rakus. Ligandiks nimetatatakse retseptoriga seostuvat ühendit. Peale õige ligandi seovad retseptorid veel mõningaid tema analooge või ka hoopis teise struktuuriga ühendeid. Need on vastava retseptori agonistid või antagonistid. Agonistid seostuvad retseptoriga ja aktiveerivad selle. Eri-

nevalt õigest ligandist seostuvad nad sageli pöördumatult ja aktiveerivad retseptori pikaks ajaks. Antagonistid seostuvad retseptoriga, ei aktiveeri seda ja ei lase ka õigel ligandil seostuda, inaktiveerivad retseptori (Ann Kilk, 08.04.2008).

HIV kasutab rakku sisenemisel retseptorina peremeesraku pinnal asuvat glükoproteiini CD4 (ingl. k. *cluster of differentiation 4*). CD4 molekul kuulub immunoglobuliinide perekonda. Selle molekuli peamiseks funktsiooniks on makrofaagide aktiveerimine, näiteks mikroorganismide fagotsütoosi käigus. CD4 ekspresseerub T-helper rakkude, suppressor-T rakkude, monotsüütide, makrofaagide ja dentriitrakkude pinnal. Selleks, et HIV saaks rakku siseneda, ei piisa ainult ühest retseptorist, vajalik on ka täiendava peremeesraku pinnal ekspresseeruva retseptori ehk koretseptori olemasolu. Valdavalt on taoliseks koretseptoriks kemokiinretseptor CCR5, mõningatel juhtudel ka kemokiinretseptor CXCR4 (Clapham jt, 2002; Moore jt, 2004).

2.2. HIV sisenemine rakku

HIV viiruspartikkel ehk virion on ikosaeedrilise kujuga. Pealt katab virioni kapsiid, mis on kaetud lipiidse membraaniga. Viimane on pärit peremeesraku membraanist. Sellest ulatuvad välja „pulgakommi-kujulised“ glükoproteiinid (koosnevad 41 kDa suurusest „tüviosast“ ja 120 kDa suurusest „peast“). Kapsiid ja lipiidümbris kaitsevad HI-viirust väliskeskkonna mõjude eest ning aitavad tal kinnituda peremeesraku pinnale. (Berger jt, 1998)

Selleks, et HI-viirus saaks rakku siseneda peab virioni pinnal olev glükoproteiin gp120 seonduma raku pinnal oleva CD4 retseptoriga. Selle tulemusena toimub gp120 konformatsioonis muutus ning esile tulevad seni varjus olnud gp120 domäänid. Need domäänid omakorda interakteeruvad kemokiinretseptoriga. gp120/CD4 kompleksi seondumine kemokiinretseptoriga stabiliseerib viiruse seondumise ning põhjustab viiruse gp41 valgu konformatsioonis muutuse. Selle tulemuseks on virioni ja peremeesraku omavaheline liitumine ning virioni nukleokapsiid siseneb peremeesraku tsütoplasmasse (Moore jt, 1993).

Mitmeid kemokiinretseptoreid nagu CCR2, CCR3, CCR8, CCR9, CXCR6, CXCR1, ChemR23, APJ, Bob/GPR15, GPR1 ja RDC1 on kirjeldatud kui koretseptoreid HIV rakku si-

senemisel *in vitro*. (Loetscher jt, 1997; Littman jt, 1998; Berger jt, 2006; Shimizu jt, 2000). *In vivo* on siiski näidatud, et HIV-1 kasutab koretseptoritena peamiselt siiski vaid retseptoreid CCR5 ja CXCR4. See, millist koretseptorit viirus kasutab, tuleneb tema tropismist ehk suundumusest nakatada vaid teatud tüüpi rakke, antud juhul teatud kemokiinretseptoreid omavaid rakke. Selle järgi jagatakse viirust kahte klassi: M-troopsed ja T-troopsed. M-troopilised viirused ehk R5 viirused nakatavad rakke, mille pinnal tugevasti ekspresseerub CCR5 molekulid. Taolised rakud on tavaliselt makrofaagid. T-troopsed HIV tüved ehk X4 tüved nakatavad rakke, mille pinnal ekspresseerub CXCR4 ehk siis T-lümfotsüüte. On näidatud, et infektsiooni algstaadiumis on prevaleeruvad M-troopsed tüved, kuid hilises staadiumis on paljudel patsientidel täheldatud T-troopsete tüvede esinemist. (Berger jt, 1998; Clapham jt, 2002; Moore jt, 2004). Mõned HIV tüved võivad kasutada mõlemat tüüpi koretseptoreid samaeagselt ning neid nimetatakse dualtroopseteks ehk R5X4 viirusteks (Doranz jt, 1996).

See, millist troopsust üks või teine HI-viirus omab, tuleneb eelkõige tema kapsiidi valku Env (*envelope glycoprotein*) kodeeriva geeni järjestusest. Env geeni produktideks on gp120 ja gp41 valgud. gp120 koosneb viiest konstantsest regioonist C₁-C₅ ja viiest hüpervariaabel lingust V₁-V₅. Just hüpervariaabel lingude aminohappeline primaarjärjestus määrabki ära viiruse troopsuse (Dragic, 2001).

2.3. Kemokiinretseptorid

Kemokiinid ehk kemotaktsed tsütokiinid on madalmolekulaarsed (8–10 kDa), imetajatel esinevad signaalvalgud, mis osalevad rakkude migratsioonis ja aktivatsioonis nii homeostaasis kui põletike ja infektsioonide korral (Ustina jt, 2000). Nimetus kemotaktsed tsütokiinid tuleb sellest, et tegemist on tsütokiinidega, mis aktiveeruvad kindla keemilise ühendi kontsentratsiooni tõustes või langedes. Tegemist on G-valkude perekonda kuuluvate ehk G-valguga seotud retseptoritega, mis tähendab, et need retseptorid kasutavad signaali edasi andmiseks ja metabolismi käivitamiseks G-valke. Kemokiinid klassifitseeritakse nelja perekonda vastavalt kahe esimese tsüsteiinijäägi (Cys, tähis C) paiknemisele valgus. Kaks suuremat kemokiiniperekonda on CXC, milles esimesed Cys-jäägid on eraldatud ühe aminohappe (X) poolt ja CC, milles

esimesed Cys-jäägid järgnevad üksteisele. Kaks väiksemat kemokiiniperekonda on C- ja CX3C-perekond. Kemokiinde seostumise rakuga määrab ära kemokiini ja tema retseptori struktuurne sarnasus. Retseptoriteks on raku pinnal paiknevad molekulid, mis jaotatakse vastavalt nendega seonduvatele signaalainetele (liganditele) CXC-, CC-, C- ja CX3C-retseptoriteks. Praeguseks on inimesel tuvastatud 28 CC-retseptorit (CCL1–CCL28), 17 CXC-retseptorit (CXCL1–CXCL17), 2 C-retseptorit (XCL1 ja XCL2) ja 1 CX3C-retseptor (CX3CL1) (Laing, 2004).

2.3.1. Kemokiinretseptor CXCR4

CXCR4 avastati kui esimene HIV koretseptor (Feng Y, 1996), millel on tänaseni teada vaid üks ligand SDF-1/CXCL12 (Oberlin jt, 1996; Bleul jt, 1996). Molekulid, mis on võimelised seonduma CXCR4-le on võimelised takistama ka X4 HIV tüvede sisenemist peremeesrakku okupeerides CXCR4 retseptori (Murakami jt, 1997; Schols, 1997; Doranz jt, 1997; Heveker, 1998).

Kemokiinretseptor CXCR4 ekspresseerub väga paljude rakkude pinnal: enamikel hematopoeetilistel rakkudel (Bleul jt, 1997), veresoonte endoteelrakkude pinnal (Gupta, 1998), neuronitel (Hesselgesser jt, 1997), mikroglia rakkudel ning astrotsüütide pinnal (He jt, 1997). CXCR4 valku iseloomustab 7 membraani läbivat regiooni ning 6 ühele ja teisele poole membraani jäävat lindu. CXCR4 peamisteks funktsiooniks on hematopoeetiliste tüvi rakkude mobilisatsiooni tagamine läbi ligandi SDF-1 (Dalakas jt, 2005; Lapidot jt, 2005).

Senini ei ole kirjeldatud ühtegi CXCR4 ja SDF-1 valgu primaarstruktuuri mõjutavat polümorfismi. Seda eelkõige tänu nende valkude üliolulisele rollile normaalses arengus (Ma jt, 1998; Tachibana jt, 1998; Nagasawa jt, 1996). On teada, et CXCR4 “*knock-out*” genotüüp on hiirtele surmav. On kirjeldatud vaid ühte polümorfismi SDF-1 β transkripti mittekodeerivas regioonis A vahetus G-ks (genotüüp SDF1-3’A). Nimetatud polümorfism ei mõjuta SDF-1 aminohappelist primaarstruktuuri. Erinevates populatsioonides on leitud sellel erivev esinemissagedus. Kõige sagedamini esineb genotüüpi SDF1-3’A asiaatide populatsioonis sagedusega 25-35%,

seada eriti just Okeania piirkonnas, kus esinemissagedus jääb vahemikku 50-70% (Su jt, 1998). Esimesed läbiviidud uuringuid väitsid, et selle alleeli suhtes homosügootsetel patsientidel progresseerub AIDS aeglasemalt (Arya jt, 1999). Järgnevad uuringud väitsid aga vastupidist, et pigem on tegu haigust kiirendava kui pidurdava efektiga (Mummidi jt, 1998, Singh jt, 2003, Daar jt, 2005). Kõik hilisemad uuringud on näidanud, et antud polümorfismil puudub igasugune seos AIDS-i progressiooniga (Hendel jt, 1998, Magierowska jt, 1999; Easterbrook jt, 1999).

Küll aga on täheldatud, et haiguse kiirem progressioon ja kiire CD4+ T rakkude hävinemine võib olla seotud CXCR4 retseptorit kasutava viiruse ilmnemisega. Seega on CXCR4 retseptoril on väga oluline roll osade patsientide haiguse progresioonis. Tänapäevani on siiski CXCR4 retseptorit kasutava viiruse ilmnemise täpne põhjus veel teadmata ning sellega seostatud haiguse kiirem progressioon vaid hüpotees (Clapham jt, 2002; Moore jt, 2004).

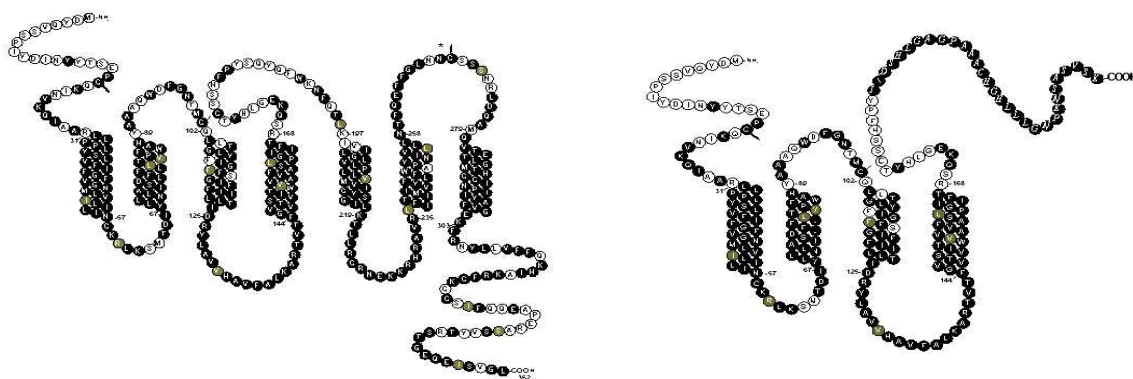
2.3.2. Kemokiinretseptor CCR5

CCR5 oli avastamise järjekorras viies CC-kemokiinretseptor, millest tuleneb ka tema tähis. CCR5 kirjeldati esialgu kui kemokiinde CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β (ingl.k - *macrophage inflammatory protein 1 α and 1 β*), ja CCL5/RANTES (ingl.k - *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) retseptorit (Samson jt, 1996). MIP-1 α ja MIP-1 β on peamisteks signaalvalkudeks krooniliste põletike korral, RANTES aga allergilistes reaktsioonides (Stites jt, 1994) Hiljem selgus, et lisaks eelpool nimetatud ligandidele seondub CCR5-ga veel MCP-1 (ingl.k - *monocyte chemoattractant protein 1*), mis on vastutav monotsüütide migratsiooni eest. Samuti seonduvad CCR5 retseptoriga veel CCL3L1(MIP-1 α P) ja CCL4L1. Mõlemad valgud on tekkinud ühise eellase geenides toimunud duplikatsioonide tulemusena (Menten jt, 2002). Seda, et CCR5 võiks olla HIV koretseptor avastati, kui leiti, et MIP-1 α , MIP-1 β ja RANTES on ühed tõhusamad HIV infektsiooni mahasuruvad faktorid (Cocchi jt, 1995; Alkhatib jt, 1996; Choe jt, 1996; Deng jt, 1996, Doranz jt, 1996; Dragic jt, 1996).

Inimesel asub β -kemokiinde CCR1–CCR5 retseptorite geeniklaster 3. kromosoomis lookuses p21.3–p24 (Maho jt, 1999). Arvatakse, et arenguliselt on klaster tekkinud ühe ürgse geeni

kordistumise teel. Kemokiinde retseptorite geenid määravad G-valku siduvate ja seitsme transmembraanse ehk membraani läbiva segmendiga retseptorvalkude tekke. Retseptori rakuväliline osa funktsioneerib kemokiinde seostamisel, rakusisene osa aga signaali ülekandel. Kemokiini seondumine retseptori rakuvälise osaga aktiveerib retseptori ja see kontakteerub G-valguga. G-valk omakorda aktiveerib fosfolipaaaside ja membraansete fosfolipiidide metabolismi, mille tulemusena aktiveeritakse mitmed kinaaside kaskaadid. Kokkuvõttes põhjustab ligandi seondumine retseptoriga raku metaboolse aktiivsuse muutusi, liikuvust ja migratsiooni (tavaliselt mööda kemokiinide gradienti) (19 Murdoch jt, 2000).

CCR5 on 352 aminohappest koosnev valk molekulmassiga 40 600 Da ning omab ühte glükosüülimisaiti valgu aminoterminaalses otsas (Joonis 2.1). CCR5 ekspresseerub monotsüütidel, makrofaagidel, T-mälurakkudel, dendriitrakkudel ja närvisüsteemis mikrogliaarakkudel. Ekspressioonis esineb sooline erinevus: naistel on retseptori tihedus CD4+ T-rakkude pinnal väiksem kui meestel (Moore jt, 2004). Ligikaudu 20–30% perifeersetest T-rakkudest ja 10% monotsüütidest on CCR5-positiivsed (Berger jt, 1998).



Joonis 2.1. Funktsionaalne CCR5 valk (vasakul) ja sama valk $\Delta 32$ mutatsiooniga (paremal).

2.4. Polümorfismid CCR5 kodeerivas geenis

Geneetilised faktorid mõjutavad suuremal või väiksemal määral väga mitmeid inimese haigusi, kas põhjustades vastuvõtlikust haigusele, resistentsust haigustekitajate suhtes või põhjustades haigusfenotüüpi otseselt (Collins jt, 1997). Seni tehtud uurimustööde põhjal on näidatud, et ühed inimesed nakatuvad HI-viirusega suurema tõenäosusega kui teised. Samuti on näidatud, et osadel nakatunutel progresseerub haigus AIDS-iks tunduvalt kiiremini kui teistel. Selle põhjuseks võivadki olla erinevad geneetilised faktorid. Alljärgnevalt on kirjeldatud erinevaid näiteid selle kohta, kuidas teatud polümorfismid individuaalselt või polümorfismiga alleelide kombinatsioonid võivad takistada või raskendada HI-viiruse sisenemist rakku ning juba nakatunutel, kas kiirendada haiguse kulgu või vastupidi, aeglustada seda.

Seni on CCR5 kodeerivas geenis avastatud 22 erinevat mutatsiooni (Carrington jt, 1999). Nendest 16 on asendusmutatsioonid, mille korral üks nukleotiid DNA ahelas on asendunud teisega. Olulisemaks mutatsiooniks CCR5 geenis on 32 aluspaari kadu ehk deletsioon ($\Delta 32$) geeni kodeerivas järjestuses, regioonis, mis vastab retseptori teisele rakuvälisele lingule. Deletsioon tingib lugemisraami nihke, mille tagajärjel läheb valgu aminohappelises järjestuses kaotsi 168 aminohappejääki ja karboksüterminaalsesse lõppu lisandub 31 uut jääki. Sellised muutused valgu koostises põhjustavad seitsmest transmembraansest segmendist kolme viimase kadumise, rakusisese tsütoplasmaatilise karboksüterminaalse "saba" puudumise ning seoses sellega retseptori ekspressiooni ja funktsiooni häireid (Joonis 2.1) (Samson jt, 1996).

Juhul, kui mutatsioon on homosügootses olekus, see tähendab - esineb mõlemal kromosoomil, on kogu produtseeritav CCR5 mittefunktsionaalne, mis tähendab, et vastavat valku ei ekspresseerita raku pinnal. Seetõttu ei pääse ka HIV-1 rakku, kuna tal puudub võimalus seonduda raku pinnale ning organism on suure tõenäosusega HIV-1 R5 tüve nakkuse eest kaitstud (Paxton jt, 1998) Kaitse püsib ka pikaajalisel ja sagedasel kokkupuutel viirusega (Quillent jt, 1998). Kirjandusest on teada üksikud nakatumisjuhtumid, kuid arvatavasti on nakatumine toimunud siiski X4 tüvega (Michael jt, 1998; O'Brien jt 1997).

Kui mutatsioon esineb vaid ühel kromosoomil, see tähendab on heterosügootses olekus, ei takista see HIV-1 nakkust, kuid aeglustab serokonversioonijärgse AIDS-i arengut, sest raku pin-

nal ekspresseerub vähem kui 50% CCR5 retseptoreist. Ka on heterosügootid enam kaitstud AIDS-i seoseliste lümfoomide (*non-Hodgkin's B cell malignancy*) eest (Carrington jt, 1999; Rabkin jt 1999; Dean jt, 1999). Paradoksaalselt on aga heterosügootidel AIDS-i diagnoosimise järel haiguse kulg kiirem kui muteerumata retseptoriga homosügootidel (McNicholl jt, 1997). Selle kohta on ka väga mitmeid vastuoluliste tulemustega töid, kus on näidatud, et *ccr5Δ32* genotüübiga haigetel on haiguse progressioon hoopiski aeglasem (Visco-comandini jt, 1998; Barroga jt, 2000).

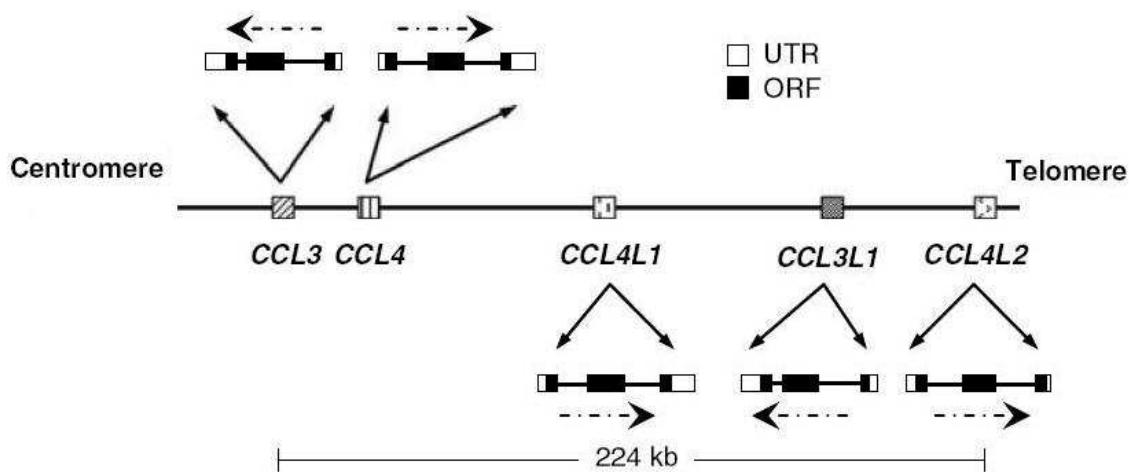
Eesti populatsioonis on näidatud *ccr5Δ32* esinemissageduseks 14,8% (Kalev jt, 2003). Hiljuti Adojaani ja kaastöötajate poolt avaldatud uuringus võrreldi genotüübi *ccr5Δ32* suhtes HIV positiivseid ja HIV negatiivseid isikuid. Leiti, et HIV positiivsetel patsientidel esineb genotüüpi *ccr5 wt/Δ32* 23,5%-il ning HIV negatiivsetel isikutel 23,2%. Saadud tulemuste põhjal võib arvata, et omades genotüüpi *ccr5 wt/Δ32*, ei anna see meile kaitset HIV-ga nakatumise eest (Adojaan jt, 2007). Lisaks $\Delta32$ -le on CCR5 geenis leitud veel mitmeid teisi polümorfisme, kuid paljud neist esinevad erinevates populatsioonides erineva sagedusega.

2.5. Kemokiinretseptori CCR5 ligand CCL3L1/MIP-1 α P

MIP-1 valgud (ingl. k. - *macrophage inflammatory protein 1*) on väiksed (8-10 kDa) CC-kemokiinide perekonda kuuluvad kemokiinid. Selle perekonna kaks olulisemat esindajat on kemokiinid CCL3 ja CCL4. Mõlemad kemokiinid on indutseeritavad enamikes küpsetes hematopoeetilistes rakkudes vastusena erinevatele põletikulistele reaktsioonidele (Maurer jt, 2004). CCL4 kemokiinil esineb kaks isovormi: CCL4L1 ja CCL4L2 ning CCL3 geenil üks isovorm, CCL3L1, ja üks pseudogeenne vorm, CCL3L2 (Joonis 2.2). Mõiste isovorm tähendab, et nimetatud valkudel on sama funktsioon, kuid nad on kodeeritud erinevate geenide poolt ning nende primaarjärjestuses võib esineda väikseid erinevusi (MedicineNet, 08.04.2008).

CCL3L1 on valgu järjestuselt 90% identne kemokiiniga CCL3, erinedes vaid 3 aminohappe poolest (Irving jt, 1990). Mõlemaid kemokiine transkribeeritakse vastavalt põletikuliste tsütokiinide stimulatsioonile. CCL3L1 geeni produkt nagu ka CCL3 geeni produkt on võimeli-

ne kasutama signaali vahendajana kemokiin retseptorit CCR5, kuid erinevalt CCL3-st seondub CCL3L1 CCR5-ga palju suurema afiinsusega. Seetõttu on CCL3L1 ka palju tõhusam R5 troopsusega HIV-1 infektsiooni inhibiitor. See on tingitud sellest, et CCL3L1 valgu aminohappelises järjestuses asub teises positsioonis proliin, CCL3-el aga seriin. Prolini esinemine mõjutab oluliselt CCL3L1 afiinsust CCR5-e suhtes (Nibbs jt, 1999; Aquaro jt, 2001; Xin jt, 1999).



Joonis 2.2. MIP-1 geenide paigutus genoomis, 17q11-q12. Katkendlike nooltega on tähistatud transkriptsiooni suund. UTR – ingl. k. *untranslated region*, mitte transleeritav piirkond; ORF – ingl. k. *open reading frame*, avatud lugemisraam (Shao jt, 2007).

CCL3L1 geeni tekkepõhjuseks peetakse segmentalseid duplikatsioone. CCL3, CCL4 asuvad koos CCL3L1 ja CCL4L1 geenidega 17 kromosoomi pikas õlas. CCL3 ja CCL4 geene on haploidse genoomi kohta üks koopia, kuid CCL3L1 ja CCL4L1 geenide koopiaarv on indiviiditi erinev. See on tingitud asjaolust, et CCL3L1 ja CCL4L1 asuvad segmentaalsete duplikatsioonide kuumas punktis (ingl. k. – *hot spot*). Enamikel inimestel jääb CCL3L1 ja CCL4L1 geeni koopiaarv vahemikku 1-6 koopiat, vähematel võib see olla väiksem kui 1 ning suurem 6-st (Menten jt, 2002; Shao jt, 2007; Gonzalez jt, 2005; Modi jt, 2004; Miyakawa jt, 2002; Townson jt, 2002; Howard jt, 2004).

Kuna võis imetajate evolutsioonis CCL3L1 geeni duplikatsioon aset leida ning mis tingimustes võis selekteeruda kõrgem koopiaarv? Ühe tsenaariumi kohaselt võis miljoneid aastaid tagasi olla HIV, SIV (ingl.k - *simian immunodeficiency virus*, ahvide immuunpuudulikkuse viirus) või mõni muu sarnane viirus, mille infektsioon käib läbi CCR5 retseptori. Ellujäämiseelise an-diski kõrgem CCL3L1 geeni koopiaarv, kuna CCL3L1 suudab blokeerida taolise infektsiooni.

2.6. CCL3L1 roll HIV infektsioonil

Nagu eespool mainitud on CCL3L1 väga tõhus inhibiitor HIV-1 (R5 tüvede) raku sisenemisel. Seda tänu tugevale affiinsusele CCR5 retseptori suhtes (Menten jt, 2002). Siinkohal on mitmeid võimalusi, kuidas täpselt CCL3L1 tõkestab HIV-1 R5 tüvede infektsiooni. Esiteks, otseselt - CCL3L1 vabad molekulid blokeerivad steeriliselt HIV-1 gp120 seondumise CCR5-ga.

Teiseks, CCL3L1 võib mõjutada CCR5 ekspressiooni. T rakkudel ekspresseeruva CCR5 molekulide hulk korreleerub võimalusega nakatuda M troopilise HIV-1-ga. See tähendab, et mida vähem ekspresseerub T-rakkudel CCR5 molekule, seda väiksem on tõenäosus nakatuda. Seega kõik, mis mõjutab CCR5 ekspressiooni mõjutab ka HIV-1 infektsiooni. Pealegi, on näidatud, et suurem CCL3L1 geeni koopiaarv resulteerub ka suurema hulga CCL3L1 valgu ekspressiooniga (Gonzalez jt, 2005).

Mitmed uurimisgrupid on oma tööde tulemusena kinnitanud, et CCL3L1 koopiaarv tõesti varieerub indiviidi ning koopiaarvul on oluline roll HIV infektsioonis (Gonzalez jt, 2005; Shao jt, 2007; Townson jt, 2002; Pilotti jt, 2007; Ketas jt, 2007). Üks suurejoonelisemaid töid tehti Gonzales'e uurimisgrupi poolt, milles võeti uurimisobjektideks 1000 isikut, kes omakorda kuulusid veel 57 erinevasse inimpopulatsiooni. Uuringu tulemusena selgus, et CCL3L1 koopiaarv ei ole tõesti konstantne, vaid ilmneb erinevusi nii indiviiditi kui ka erinevat päritolu inimpopulatsioonide vahel (Gonzalez jt, 2005). Koopiaarv varieerus 2 – 10 koopiani, Aafrika päritolu populatsioonidel kõrgem ning mitte-aafrika päritolu populatsioonidel madalam. Gonzales'e uurimisgruppi töö tulemusena selgus huvitav fenomen - nimelt, omades populatsiooni keskmisest suuremat CCL3L1 geeni koopiaarvu võib see tõesti anda kaitsva toime HIV infektsiooni

suhtes. Näiteks, HIV⁻ Argentiina laste populatsioonis oli keskmine CCL3L1 geeni koopiaarv 2, HIV⁻ aafrika päritolu ameeriklaste populatsioonis 4, HIV⁻ euroopa päritolu ameeriklaste populatsioonis 2 ja HIV⁻ hispaania päritolu ameeriklaste populatsioonis 3. Populatsiooni keskmisest väiksemat CCL3L1 geeni koopiaarvu seostatakse juba suurenenud riskiga nakatuda HIV- viirusega. Seevastu aga, HIV⁺ aafrika päritolu ameeriklastel 3, HIV⁺ hispaania päritolu ameeriklastel ja HIV⁺ euroopa päritolu ameeriklastel 2, mida seostatakse haiguse kiirema progressiooniga (Gonzalez jt, 2005).

CCL3L1 valgu kaitsvat efekti seletab asjaolu, et suurema koopiaarvu korral suureneb ka CCL3L1 valgu ekspressioon (Townson jt, 2002). Seda kinnitab ka Gonzales'e töö, milles selgus, et CCL3L1 koopiaarvu suurenemine on positiivses korrelatsioonis CCL3/CCL3L1 sekretsiooniga ning omakorda negatiivses korrelatsioonis CCR5 ekspresseerivate CD4⁺ T rakkude hulga (Gonzalez jt, 2005). Madalamat CCL3L1 geeni koopiaarvu seostati kõrgema viirus koopiatega arvuga ning kiirema T-rakkude hävinemisega. Gonzales'e uurimisgruppi arvates seletabki see asjaolu, miks madalama CCL3L1 geeni koopiaarvuga isikutel on suurem tõenäosus nakatuda HIV-ga ning samuti asjaolu miks nakatunutel progresseerub haigus AIDS-iks kiiremini. Kemokiinid omavad HIV-d supresseerivat toimet blokeerides CCR5 koretseptori ja virioni gp120 interaktsiooni. CCL3L1 seondub CCR5-ga ning setõttu on virioni pinnal oleval glükoproteiin 120-l võimatu omakorda interakteeruda CCR5-ga. Kõrge CCR5 ligandi olemasolu või madal CCR5 ekspressioon korreleerub HIV/AIDS-i vastase kaitsega (Gonzalez jt, 2005).

Gonzales arutles, et kumb võiks olla HIV infektsiooni seisukohast olulisem: kas CCL3L1 koopiaarv või CCR5 genotüüp. Selle teadasaamiseks grupeeris ta isikud vastavalt CCL3L1 koopiaarvule ja CCR5 genotüübile. CCR5 genotüübid jagati vastavalt polümorfismide kombinatsioonile CCR5 promootor alal või kodeerivate regioonides, mis mõjutasid CCR5 ekspressiooni. Selgus, et omades populatsiooni keskmisest kõrgemat CCL3L1 koopiaarvu ning CCR5 ekspressiooni vähendavat CCR5 genotüüpi on risk nakatuda HIV-ga kõige väiksem. Küll, aga vastupidises olukorras, omades populatsiooni keskmisest väiksemat CCL3L1 geeni koopiaarvu ning CCR5 ekspressiooni soodustavat CCR5 genotüüpi on risk nakatuda 3 korda suurem ning nakatudes progresseerub AIDS kiiremini (Gonzalez jt, 2005). Gonzales arvab lausa,

et CCL3L1 koopiaarvul on tunduvalt suurem efekt HIV infetsioonis, kui on seda CCR5 genotüübil (välja arvatud *ccr5Δ32* genotüüp).

2.7. HIV ja HCV koinfektsioon

Ägedat C-viirushepatiit põhjustab hepatiit C viirus. Hepatiit C viirus (HCV - ingl. k. *hepatitis C virus*) kandub edasi sarnaselt HIV-viirusega, mistõttu on paljud HIV-positiivsed patsiendid nakatunud ka HCV-ga. Ka meie esialgsed andmed viitavad sellele, et HIV nakkusega koos esineb suhteliselt sageli HCV infektsiooni. HCV levib peamiselt nakatunud vere kaudu (Hepatiit.Net, 08.04.2008). Haiguse sugulisel teel levimist ning nakatunud emalt lapsele viiruse ülekandumist sünnitusel esineb harva (~5% juhtudest). C-hepatiidi epidemioloogilist protsessi iseloomustavad Eestis viimasel aastakümnel uued suundumused. Vaatamata HCV piiratud ravi võimalustele suureneb haigestumus mitte ainult ägedatesse, vaid ka kroonilistesse haigusvormidesse. Uurimistulemused näitasid väga kõrget C-hepatiidiviirustega nakatumise taset Tallinna ja Ida-Virumaa narkomaanidel. HCV esinemine oli tõepäraselt sagedasem vangistuses viibivate HIV-positiivsete narkomaanide seas (Tefanova jt, 2004). Patsientidel kellel on lisaks HCV nakkusele ka HIV nakkus arenevad kiiremini välja erinevad maksa patoloogiad. Makshaigused on praegu HIV positiivsete patsientide surma põhjuste seas esimesel kohal (Koziel jt, 2006).

Lümfotsüüdid, mis läbivad HCV infitseeritud maksa ekspresseerivad suuremal hulgal kemokiin retseptorit CCR5, millega seonduvad CC kemokiinid CCL3, CCL4 ja CCL5. Need kemokiinid on olulised komponendid immuunsüsteemi funktsioneerimisel, sest seonduvad CCR5 retseptorile mõjutavad nad T-lümfotsüütide (Th1) migratsiooni. On näidatud, et kroonilise hepatiit C infektsiooni korral väheneb CCR5 ekspressioon perifeerse vere T-lümfotsüütidel (Lichterfeld jt, 2002). See omakorda toob kaasa muutused T lümfotsüütide migratsioonis. Arvatakse, et rakud, mille pinnal ekspresseerub suurel hulgal CCR5 retseptorit, võitlevad HCV infektsiooni vastu palju jõulisemalt (Vincet jt, 2005). Kuidas ja miks mõjutab HCV infektsioon CCR5 ekspressiooni? Kirjanduses on välja pakutud mitmeid mehhanisme.

Nii väidetakse, et HCV valgu E2 interaktsioon CD81-ga põhjustab RANTES valgu suurenenud sekretsiooni CD8+ lümfotsüütidel, mis omakorda põhjustab CCR5 ekspressiooni vähenemist ja lümfotsüütide migratsiooni vähenemist (Nattermann jt, 2004). On ka leitud, et HCV valgud „core“ ja NS5A võivad modifitseerida CCL5 sekretsiooni mõjutades CCR5 promotori aktiivsust. Mida enam CCL5 kemokiini seontub CCR5 retseptoriga, seda enam väheneb CCR5 ekspressioon (tänu retseptori internalisatsioonile) (Nattermann jt, 2004; Soo jt, 2002).

CCR5 Δ 32 mutatsioon CCR5 retseptorit kodeerivas geenis põhjustab mittefunktsionaalse retseptori tekkimise. Woitas'e uurimisgrupp arvas, et selline CCR5 kadu rakupinnal on kuidagi seotud kroonilise HCV infektsiooni ja kõrge viirusosakeste arvuga, sest HCV positiivsetel patsientidel, kellel on mõlemal kromosoomil CCR5 Δ 32 mutatsioon (homosügoidid) on tunduvalt suurema viirus koopiaste arvuga võrreldes patsientidega, kellel seda mutatsiooni ei esine või on ainult ühel kromosoomil (Woitas jt, 2002). Promrat'i uurimisgrupp on näidanud, et CCR5 ja CCL5 vähenenud ekspressioon põhjustab akuutset põletiku maksas (Promrat jt. 2003a; Promrat jt. 2003b).

Kas ja kuidas mõjutab CCR5 Δ 32 mutatsioon hepatiit C infektsiooni ja selle vastast ravi pole veel täpselt teada. Siiani avaldatud töid on erinevaid. Näiteks, on näidanud Goyal'i uurimisgrupp, et CCR5 Δ 32 mutatsioon ei mõjuta tundlikust HCV infektsioonile ega ka selle vastast ravi (Goyal jt, 2006) Seevastu, näitas Hellier'i uurimisgrupp et CCR5 Δ 32 mutatsioonil võib ikkagi olla oluline roll HCV infektsioonil ja erinevate maksa patoloogiate kujunemisel (Hellier jt, 2003). Ühesõnaga, tegelik mehhanism ja tagajärjed ootavad veel avastamist. Samuti pole teada, kas ja kuidas mõjutavad teised CCR5 ligandid (näiteks CCL3L1) HIV ja HCV koinfektsiooni ning sellest tulenevaid patoloogiaid.

2.8. HIV epideemia omapära Eestis – süstivad narkomaanid

1988. aastal registreeriti Eestis esimene HIV-nakkuse kandja. Kuni aastani 2000 püsis HIV-nakkusesse haigestumine stabiilselt madalal tasemel. Eesti oli HIV-infektsiooni suhtes üks väikseima esinemissagedusega riik: 6,5 juhuga 1 miljoni inimese kohta, samal ajal kui naaber-

riikides oli infitseeritus märgatavalt suurem (14–67 juhtu 1 miljoni inimese kohta) (Ustina jt, 2000).

Olukord Eestis muutus drastiliselt 2000. aastal, kui sai alguse HI-viiruse epideemia seoses veenisiseid narkootikume tarvitavate noorukite nakatumisega Ida-Virumaal, algul Narvas, seejärel ka teistes Ida-Virumaa linnades. 2000. aastal avastati Eestis 390 uut nakkusjuhtu. 2001. aasta viis Eesti Euroopas esikohale nakatunute kiire juurdekasvu tõttu: avastati 1474 uut juhtu, s.o üle 1000 juhu 1 miljoni inimese kohta. Järgnevatel aastatel on uute nakatunute arv stabiliseerunud, näidates vähest langustendentsi (vastavalt 899, 840, 743, 621, 688, 633 uut nakatunut). 2008 aasta 31. märtsi seisuga on 141 uut nakatunut, neist 12 kinnipeetavad. Kokku on hetkel Eestis (31 märts 2008 seisuga) diagnoositud 6505 HIV-nakatunut, sh AIDS 198 inimesel. Vaatamata uute nakkusjuhtude arvu aeglasele langusele on Eesti siiski endiselt kõrgeima nakkustasemega riik Euroopas, edastades kahekordselt nii Venemaad kui ka Ukrainat (MTÜ AIDS-i Ennetuskeskus., 08.04.2008; Tervisekaitseinspeksioon, 08.04.2008).

Enne 2000 aastat oli põhilisteks nakkuse levikuteeks suguline kontakt, praegu domineerib süstivate narkootikumide tarvitamisel kaasnev HIV (IDU - ingl. k. *intravenous drug use*). Nakatunud narkomaanide arvu tõus algas juba 1994.-1995 ning jätkus järgnevatel aastatel drastilise kiirusega. 2005 aasta seisuga moodustab narkootikume tarvitavate noorte osakaal 79% kõikidest nakatumisjuhtudest. 21% juhtude osas on tõenäoline nakatumistee teadmata, kuid üksikute pöördujate anamneesist selgub, et valdav osa patsientidest tarvitab ikkagi süstitavaid narkootikume. Veenisiseid narkootikume tarvitavate narkomaanide domineerimine HIV-positiivsete hulgas eristab meid teistest Euroopa ja ka Põhja-Ameerika riikidest. Epideemia-aastatel on probleemiks muutunud ka HIV-nakkus kinnipeetavate hulgas. 26% positiivseks osutunud testidest on kinnipeetavatelt. Eestis viibib kinnipidamisasutustes aastas keskmiselt 5000 isikut. Aastatel 2000–2004 on seal avastatud HIV-nakkus 2006 korral. Nendest 58%-l (1172 isikul) on positiivsus avastatud vanglas. Peamiseks riskirühmaks kinnipidamisasutustes on süstivad narkomaanid (Zilmer jt, 2005; Tervisekaitseinspeksioon, 08.04.2008)

Eesti HIV-epideemia domineerivaks viirustüveks on HIV-1 rekombinantne vorm - CRF06_cpx. See subtüüp on erinev Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas tavapärasest HIV-1 subtüübist B. Eestile omast HI-viiruse subtüüpi on lisaks Eestile kirjeldatud vaid mõnes Lääne-Aafrika riigis. Samuti on Eestis kirjeldatud vähest subtüüp A esinemist ning rohkemal määral

subtüüp A ja CRF06_cpx subtüüpide rekombineerumise tulemusena tekkinud rekombinantse vormi esinemist (Adojaan jt, 2005).

3. TÖÖ EESMÄRGID

- Määrata CCL3L1 geeni koopiate arv Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis ning hinnata CCL3L1 geeni koopiate arvu võimalikku mõju nakatumisele HI-viirusega.
- Hinnata peremeesorganismi CCL3L1 geeni koopiate arvu võimalikku seost HIV-infektsiooniga sageli kaasuvate HCV ja HBV nakkustega.

4. MATERJAL JA METOODIKA

4.1. Uuritavad

Käesolevasse uuringusse kaasati 374 HIV-positiivset ja HIV-negatiivset isikut (Tabel 4.1 ja Tabel 4.2.), kes osalesid meie poolt läbi viidud uuringus vabatahtlikult, olles eelnevalt andnud raviarstile või nõustajale kirjaliku informeeritud nõusoleku. Uuringu läbiviimiseks oli loa andnud Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee.

Tabel 4.1. Käesolevas töö osalenud HIV-positiivsete ja HIV-negatiivsete inimeste uuringusse lülitumise koht.

<i>Uuringusse sisenemise koht:</i>	<i>Mehed</i>	<i>Naised</i>	<i>Kokku</i>
HIV-negatiivsed			
MTÜ "Me Aitame Sind"	28	3	49
MTÜ "Convictus Eesti"	86	13	99
MTÜ "AIDSi Ennetuskeskus"	12	6	18
HIV-positiivsed			
Tartu vangla	57	5	62
Ämari vangla	24	0	24
Harku vangla	0	15	15
Ida-Viru Keskhaigla	3	1	4
Tartu Ülikooli Kliinikum	1	0	1
MTÜ "Meie Aitame Sind"	20	5	25
MTÜ "Convictus Eesti"	70	7	77

Pärast informeeritud nõusoleku saamist täideti ankeet, mis sisaldas andmeid haige demograafiliste ja epidemioloogiliste näitajate ning eelneva haiguse kulu kohta. Mittetulundusühingutes (MTÜ) anonüümsel testimisel käinud isikud loovutasid verd, mis saadeti HIV-referentlaborisse HIV-testimisele ja mille alusel uuritavad jagati hiljem HIV-positiivseteks ja HIV-

negatiivseteks. Hilisemal uuritavate alagruppidesse jaotamisel lähtuti lisaks ka haige poolt ankeedi täitmisel antud informatsioonist (riskikäitumine *a la* narkootikumide tarvitamine, kontaktid HIV positiivsetega jt). Tulenevalt veeni manustatavate narkootikumide tarvitamisest ja HIV-staatusest jagunesid uuringus osalenud kahte alagruppi:

1. HIV-positiivsed süstivad narkomaanid;
2. HIV-negatiivsed süstivad narkomaanid.

HIV-positiivsed süstivad narkomaanid. HIV-positiivsete isikute populatsioon koosnes 208 uuritavast. Selle grupi moodustasid Ida-Viru Keskhaigla ja TÜ Kliinikumi nakkushaiguste osakonnas arvel olevad HIV-positiivsed isikud (5 isikut) ning Tartu, Ämari ja Harku vanglas viibivad HIV-positiivsed isikud (vastavalt 62, 24 ja 15 isikut). Lisaks veel AIDS-i ennetusega tegelevates süstlavahetuspunkte MTÜ "Meie aitame sind" Jõhvis (25 inimest) ja MTÜ "Convictus Eesti" Tallinnas (77 inimest) külastanud isikud, kes hilisemal testimisel HIV referentlaboris osutusid HIV-positiivseteks. Neist 33 olid (15,87%) naised ja 175 (84,13%) mehed vanuses 19 – 48 aastat (keskmine vanus 26 a.). Uuringusse lülitamise kriteeriumiteks oli: (i) varem või käesoleva uuringu vältel diagnoositud ja HIV referentlaboris kinnitatud HIV infektsiooni olemasolu; (ii) patsiendi ankeetküsitlusest lähtuvalt on patsient varem tarbinud või tarbib ka hetkel süstitavaid narkootikume. Seega loeti intravenoosselt nakkuse saanuteks HIV-positiivsed isikud, kes identifitseerisid end uuringu toimumise hetkel süstivate narkomaanide-na või varem kasutasid süstitavaid narkootikume. HIV-positiivsetest uuritavatest 177 olid nakatunud hepatiit C viirusega ning 47 hepatiit B viirusega. 167 uuritavat olid CCR5 *wild type* (*wt*) genotüübiga, 39 *wt/Δ32* genotüübiga (ülejäanud kahe uuritava kohta andmed puuduvad) (Tabel 4.1 ja Tabel 4.2.).

Tabel 4.2. HCV, HBV infektsiooni ja CCR5 genotüübi jaotus narkomaanide populatsioonis sõltuvalt HIV staatusest.

	<i>HCV+</i>	<i>HCV-</i>	<i>HBV+</i>	<i>HBV-</i>	<i>CCR5 wt</i>	<i>CCR5 wt/d32</i>	<i>CCR5 Δ32/Δ32</i>
HIV+	177	31	47	160	167	29	0
HIV-	108	57	9	153	129	33	4

HIV-negatiivsed süstivad narkomaanid. CCL3L1 geeni koopiaarv määrati 166 HIV-1 negatiivsel uuritaval. Siia gruppi kuulusid isikud, kes pöördusid Tallinas MTÜ AIDS-i Ennetuskeskuse (18 inimest) ja MTÜ "Convictus Eesti" (99 inimest) või Jõhvis MTÜ "Meie aitame sind" (49 inimest) poole HIV-anonüümse testimise eesmärgil. HIV-negatiivsete mitte-narkomaanide gruppi lülitamise kriteeriumiteks oli: (i) HIV referentlaboris osutus HIV-test negatiivseks; (ii) patsiendi ankeetküsitlusest lähtuvalt on patsient varem tarbinud või tarbib ka hetkel süstitavaid narkootikume. HIV negatiivsetest isikutest 22 olid naised (13,25%) ja 126 mehed (75,9 %), 18 sugu määramata (10,84%). Vanuses 17 – 48 aastat (keskmine vanus 26 a.). HIV-negatiivsetest uuritavatest 108 olid nakatunud hepatiit C viirusega ja 9 hepatiit B viirusega. 129 uuritavat olid CCR5 *wild type* (*wt*) genotüübiga, 33 *wt*/Δ32 genotüübiga ning 4 Δ32/Δ32 genotüübiga (Tabel 4.1 ja Tabel 4.2).

HIV, HCV ja HBV infektsioon tehti kindlaks Lääne-Tallinna Keskhaigla referentlaboris. CCR5 Δ32 määramiseks amplifitseeriti mutatsiooni sisaldava CCR5 geeni piirkond suurusega 183 bp (Samson jt, 1996). Mutatsiooni olemasolu tehti kindlaks visuaalselt, analüüsides PCR produkte UV valguses 2,0%-lisel agarosgeelil, peale geelelektroforeesi ja DNA värvimist etiidiumbromiidiga.

4.2. A431 rakuliin

A431 rakud saadi professor Ismo Virtanen'i käest (Helsinki Ülikooli Biomeditsiini Instituut) ning transporditi Eestisse söötmega madratsis. A431 rakud kasvatati Iscove'i poolt modifitseeritud Dulbecco söötmes IMDM (*Isocove modified Dulbecco medium*), millele lisati 10% veise loote seerumit FCS (*foetal calf serum*) ning 100 mM streptomütsiini ja 100 mM penitsilliini. Rakuliini kasvatati 5% CO₂ atmosfääris 37°C juures 2-3 nädalat. Suuremast osast rakkudest eraldati DNA edasiste uuringute tarbeks ning ülejäänud rakud külmutati külmutussegus, milleks oli 90% FCS ja krüoprotektorina 10% DMSO (dimetüülsulfoksiid). Säilitamiseks asetati rakuliin lühikeseks ajaks vedelasse lämmastikku (-195°C) ning seejärel säilitati sügavkülmikus temperatuuril -70°C. A431 rakuliini rakkudest DNA eraldamiseks kasutati

DNA *Qiamp DNA Mini kit*'i (*QIAGEN*; Saksamaa). DNA isoleerimine toimus vastavalt tootja protokollile ning eraldatud DNA säilitati -20°C juures.

4.3. Perifeerse vere monotsüütide DNA eraldamine

Igalt uuringus osalejalt koguti ~8-10 ml verd EDTA antikoagulati sisaldavatesse katsutitesse (*Vacutainer Cell Preparation tube*; CPT; *Beckton Dickinson*) ja säilitati jääl kuni edasise töötlemiseni maksimaalselt 4 tunni vältel. Järgnevalt eraldati perifeerse vere monotsüüdid ning vereplasma tsentrifugides 3500 p/min Ficoll'i tihedus gradiendis 20 minutit. Tsentrifugimiseks kasutati tsentrifuugi OC-6M *swing-out* tüüpi rootorit. Peale tsentrifugimist jäid perifeerse vere monotsüüdid katsutis oleva polümeeri ning vereplasma vahelisse kihti, kust nad eemaldati *Pasteur*'i pipeti abil. Monotsüüdid jaotati 500 μl kaupa võrdsete osadena (aliquoodid) ning säilitati -20°C juures edasisteks uuringuteks.

Perifeerse vere monotsüütide DNA eraldamiseks sulatati jääl 500 μl monotsüüte ning eraldati DNA *Qiamp DNA Mini kit*'iga (*QIAGEN*; Saksamaa) vastavalt tootja protokollile. Eraldatud monotsüütide DNA säilitati -20°C juures.

4.4. Real-time PCR CCL3L1 geeni koopiaarvu määramiseks

Geeni CCL3L1 koopiaarvu määramiseks kasutati reaal-aja polümeraasi ahelreaktsiooni (*real-time PCR*) meetodit, mis baseerub fluorogeense reporteri kvantiteedi detekteerimisel (Lee jt, 1993; Livak jt, 1995). Reporteriga signaali intensiivsus on otseses sõltuvuses PCR produkti hulgaga. Iga tsükli möödudes mõõdeti reporteriga fluoressentsi emissiooni. Sedasi on võimalik jälgida PCR reaktsiooni eksponentsiaalse faasi ajal. Just selles faasis toimub märkimisväärselt kiire PCR produkti hulga suurenemine, mis omakorda korreleerub algse sihtmärki DNA hulgaga. Mida suurem on algse uuritava DNA hulk, seda kiiremini jõuab PCR-i reaktsioon eksponentsiaalsesse faasi.

Real-time PCR viidi läbi ABI/PRISM 7500 *Sequence Detector System* termotsükleril (*Applied Biosystems*). Normaliseerijana kasutati β -globiini geeni, kuna on teada, et igal inimesel on diploidse genoomi kohta kaks koopiat β -globiini kodeerivat geeni. Referentrakkudeks valiti inimese tupe epidermaalse kartsinoomi rakuliini A431 rakud. A431 rakuliinil on diploidse genoomi kohta kaks koopiat CCL3L1 kodeerivat geeni ning kaks koopiat β -globiini kodeerivat geeni. CCL3L1 geeni koopia arvu määramiseks kasutati alljärgnevaid *TaqMan* sonde ja praimereid ning *real-time* PCR'i parameetreid (vaata Tabel 4.3, Tabel 4.4 ja Tabel 4.5).

Tabel 4.3. β -globiini ja CCL3L1 geenide amplifitseerimiseks kasutatud praimerid ja sondid

Geen	Praimerid	Sond
β -globiin	5'-ggcaaccctaaggtgaaggc-3' 5-ggtgagccaggccatcacta-3'	5'-VIC-catggcaagaaagtgcctgcct-TAMRA-3'
CCL3L1	5'-tctccacagcttctaaccaaga-3' 5'-ctggaccactcctcactgg-3'	5'-FAM-aggccggcaggtctgtgctga-TAMRA-3'

Tabel 4.4. *Real-time* PCR-i amplifikatsioonireaktsiooni komponendid

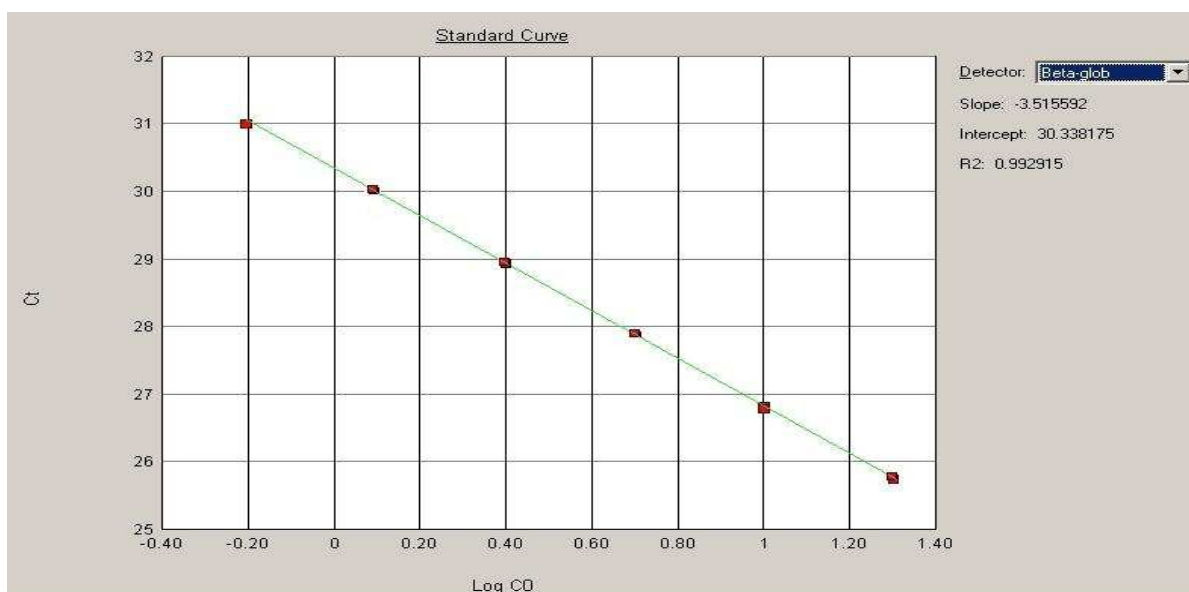
Komponendid	Löpp-kontsentratsioon (25 μ l-s)
Praimerid	500 nM
Sond	200 nM
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	1X
DNA	2-10 ng
Vesi	

Tabel 4.5. *Real-time* PCR-i reaktsiooni parameetrid.

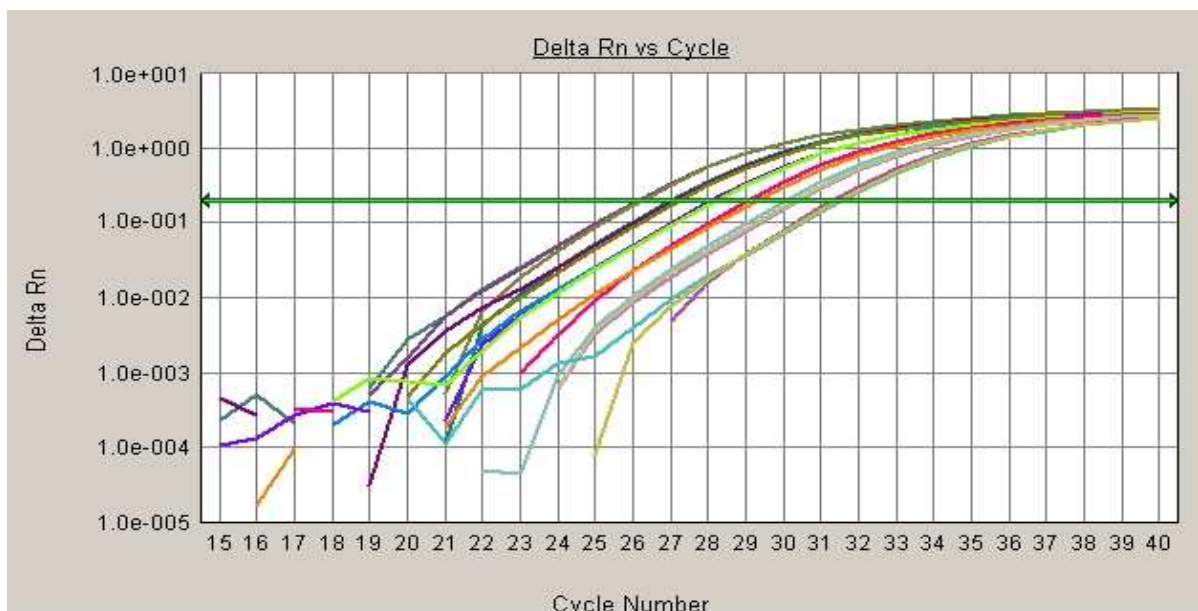
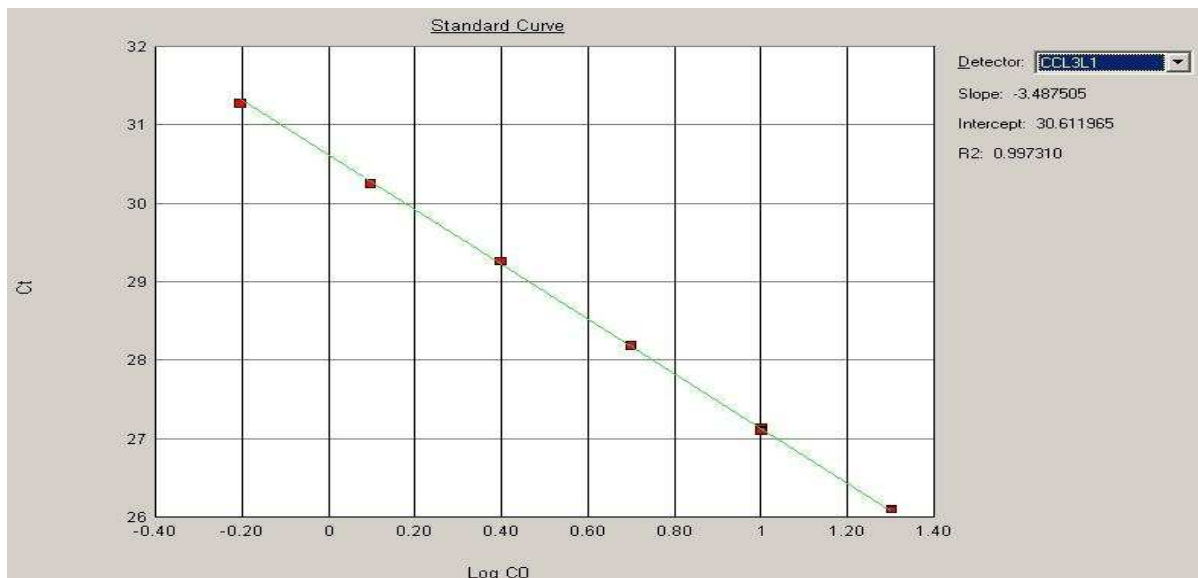
	UNG inkubatsioon	AmpliTaq Gold aktivatsioon	PCR 40 tsükli	
			Denaturatsioon	Aniiling/Ekstensioon
Temperatuur	50°C	95 °C	95 °C	60 °C
Aeg	2 min	10 min	15 sek	1 min

Real-time PCR-i tulemusena määrati kindlaks tsükliite arv, mille juures reporteri fluorestsents ületab etteantud künnise (C_t – ingl. k. *threshold cycle*). C_t väärtus on proportsionaalne reaktsioonis olnud algse sihtmärk DNA hulga. Standardkövera koostamiseks tehti A431 rakkude

genoomsest DNA-st 1:2 lahjenduste rida (20, 10, 5, 2.5, 1.25 ja 0.625 ng/μl; DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga Nanodrop (mudel ND-1000)). Iga patsiendi puhul määrati kindlaks CCL3L1 geeni C_t ja β -globiini geeni C_t . Kasutades A431 rakkudest tehtud standardkõveraid, määrati kindlaks meid huvitavates proovides CCL3L1 geeni koopiaarv, milleks on CCL3L1 geeni kvantiteet jagatud β -globiini geeni kvantiteediga ning korrutatud kahega. DNA kogus, mis reaktsiooni lisati jäi vahemikku 2-10 ng.



Joonis 4.1. A431 rakuliini genoomsest DNA-st valmistatud (1:2 lahjenduste seeria) standardkõver (ülemine pilt) ja selle amplifikatsiooni pilt (analüüsituna β -globiini geeni suhtes).



Joonis 4.2. A431 rakuliini genoomsest DNA-st valmistatud (1:2 lahjenduste seeria) standard kõver (ülemine pilt) ja selle amplifikatsiooni pilt (analüüsituna CCL3L1 geeni suhtes).

Igat standardkõvera jaoks tehtud A431 rakkude genoomse DNA lahjendust analüüsiti kolmes korduses nii CCL3L1 geeni kui ka β -globiini geeni suhtes. Kui Pearsoni korrelatsiooni koefitsent (R^2) standardkõverate puhul oli väiksem kui 96%, siis loeti tulemus ebaadekvaatseks ning seda korrati. Standardkõverate illustratsioon on toodud joonistel 4.1. ja 4.2. *Realtime-PCR*'i efektiivsust hinnati järgmise valemi abil, kus „E” tähistab PCR-i efektiivsust ja „Tõus” standardkõvera tõusu väärtust.

$$E = 10^{-(1/T\delta_{us})} - 1$$

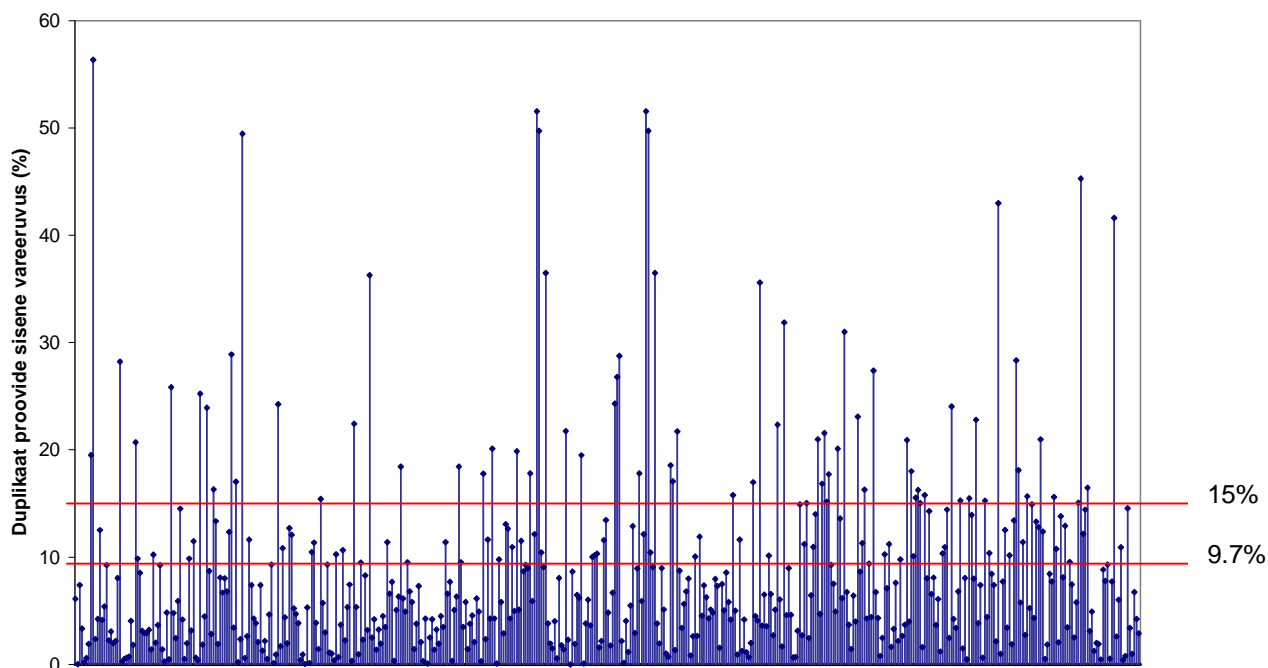
PCR-i efektiivsus peab jääma vahemikku 90-100%. Joonisel 4.1 on PCR-i efektiivsus 92,5% ja joonisel 4.2. 93,5%.

4.5. CCL3L1 geeni koopiaarvu hindamine

Kõik uuritavad proovid analüüsiti kaks korda. Duplikaatanalüüsidest hinnati ühe patsiendi proovide sisene varieeruvus järgneva valemiga.

$$V_i (\%) = 100 * |(R_{i1} - R_{i2}) / R_i|$$

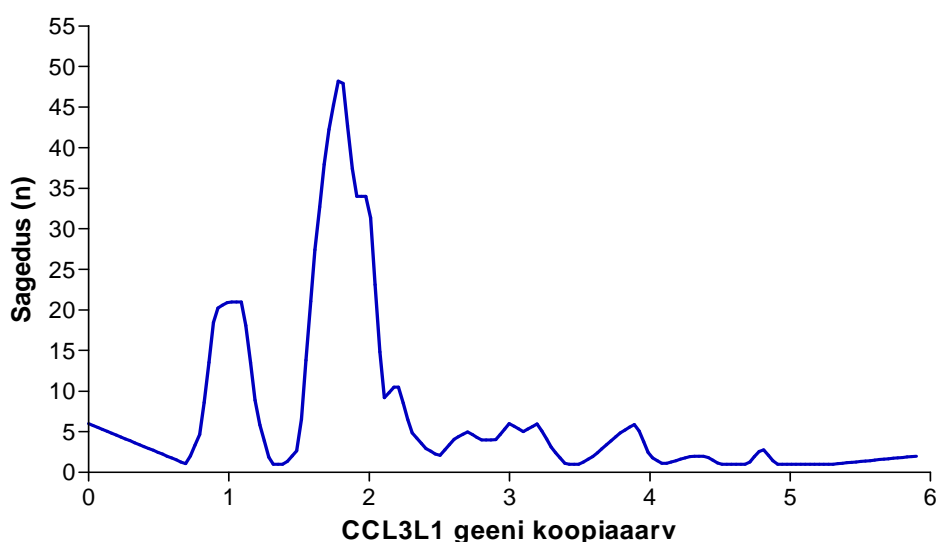
Selles valemis R_{i1} ja R_{i2} tähistavad i proovi kvantiteeti ja R_i tähistab duplikaat proovide keskmist väärtust. Saadud tulemuste põhjal konstrueeriti graafik indentifitseerimaks liiga kõrge väärtusega proove. Keskmiseks proovide sisemiseks variatsiooniks hinnati: 9,7% ning ülemiseks piiriks hinnati 15%. Kõik proovid, mis ületasid ülemise piiri V_i väärtust korrati (Joonis 4.3.) (Gonzalez jt, 2005).



Joonis 4.3. Duplikaatproovide sisene varieeruvus (%).

Kui V_i väärtus oli aksepteeritav ehk väiksem kui 15%, siis määrati kindlaks CCL3L1 geeni koopiaarv ümardades R_i (duplikaat proovide keskmise väärtuse) lähima täisarvuni. Ümardamise meetodika võib olla vaieldav, kuna see võib viia informatsiooni kadumisele. Meie kasutasime ümardamist kahel põhjusel. Esiteks, loogiliselt ja samas ka molekulaarbioloogilistel arusaamadel põhinedes - eeldatav on eelkõige täisarvuline geeni koopia arv, kuna genoomis on geeni koopia arv täisarv, see tähendab, et saab olla 2 või 3, mitte aga 2,5 koopiat. Teiseks on täisarvuline geeni koopiaarv intuitiivselt paremini interpreteeritav ning kuna ümardamise tagajärjel tekkiv informatsiooni kadu ei ole oluline, siis võib kasutada ümardamist tulemuste interpreteerimise lihtsustamiseks (Gonzalez jt, 2005).

Võttes arvesse ümardamise mõju tulemustele, viisime läbi veel kaks erinevat analüüsi. Esmalt, joonestasime graafiku koopia arvu esinemise sagedustega uuritud populatsioonides ning leidsime, et sagedusjaotuse piigid on täisarvuliste väärtuste lähedal (Joonis 4.4). Teiseks, summeerisime ümardatud ja ümardamata tulemused erinevates populatsioonides ja nägime, et ümardamisel pole olulist mõju tulemuste täpsusele (Tabel 4.6) (Gonzalez jt, 2005). Seetõttu leiti CCL3L1 geeni koopiaarv ümardades duplikaat tulemuste keskmine lähima täisarvulise väärtuseni.



Joonis 4.4. CCL3L1 geeni koopiaarv uuritavas populatsioonis.

Tabel 4.6. Ümardamise efekt CCL3L1 geeni koopiaarvu määramisel.

Populatsioon (n)	Ümardamata		Ümardatud	
	Keskmine	SD	Keskmine	SD
HIV positiivsed (208)	1.87	0.839	1.97	0.839
HIV-negatiivsed (166)	2.15	1.075	2.19	1.057
KOKKU (374)	1.99	0.960	2.07	0.948

4.6. Statistika

HIV-infektsiooni riskitegurite puhul arvutati standardimata ja standarditud šansside suhe ja selle 95% usalduspiirid; riskitegurite esinemissageduse arvulist jaotust erinevates rühmades hinnati χ^2 testi abil (*GraphPad Prism 3.03, GraphPad Software 2002*). Narkomaanide HIV staatuse (negatiivne/positiivne) kui lõpptulemi ja riskitegurite vaheliste seoste hindamiseks konstrueeriti logistilise regressiooni mudel, kasutades tarkvarapaketti *Stata (Stata Corporation 1999)*.

5. TULEMUSED

5.1. CCL3L1 geeni koopiaarv: HIV-positiivsed versus HIV-negatiivsed narkomaanid ja riskitegurid

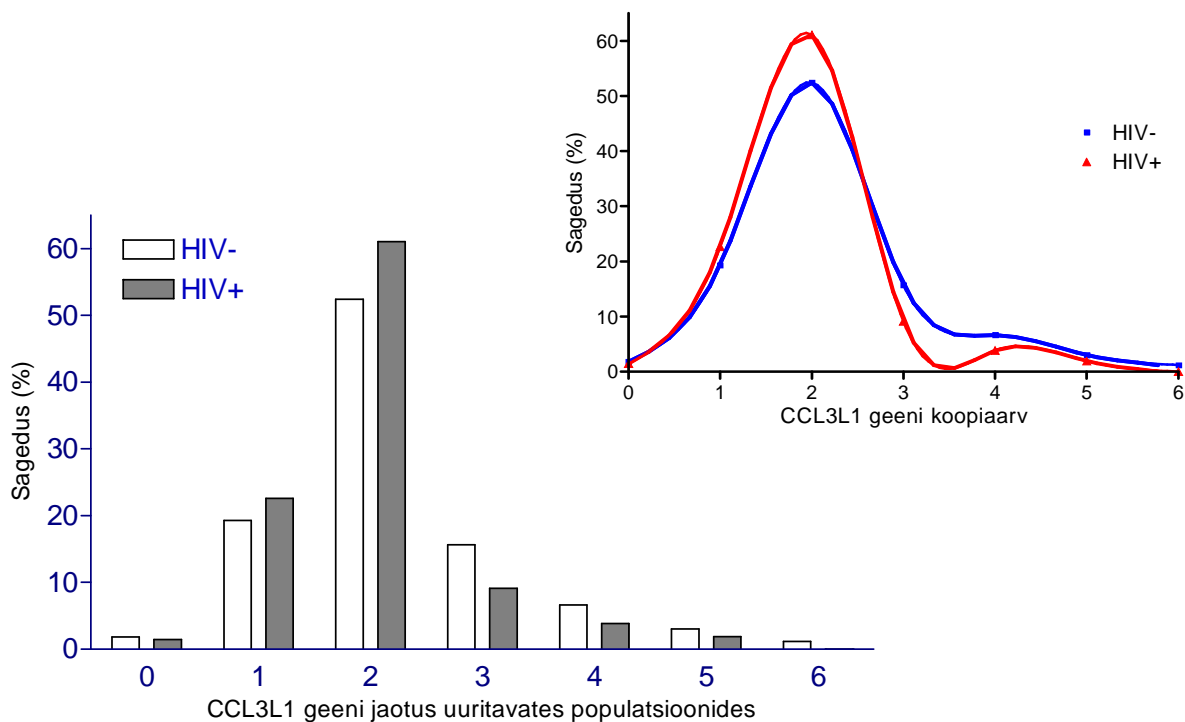
HIV-positiivsete uuritavate populatsioonis varieerus CCL3L1 geeni koopiaarv 0-st 5-ni. Suhteliselt sarnane oli CCL3L1 geeni koopiaarvu ulatus ka HIV-negatiivsete uuritavate hulgas, jäädes 0 ja 6 vahele. Mõlemas grupis oli CCL3L1 geenikoopiate arvu mediaan 2 (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. HIV-infektsioon ja CCL3L1 geeni koopiaarv uuritavates süstivate narkomaanide populatsioonides (SD – standardhälve).

	<i>Uuritavad (n)</i>	<i>Keskmine</i>	<i>SD</i>	<i>Mediaan</i>	<i>Vahemik</i>
Kõik uuritavad	374	2.07	0.95	2	0-6
HIV+	208	1.971	0.84	2	0-5
HIV-	166	2.19	1.06	2	0-6

Uuritavaid isikuid geenikoopiate arvuga 1 või 2 esines rohkem HIV-positiivsete narkomaanide hulgas. Seevastu mediaanist suuremat geenikoopiate arvu 3 - 6 oli rohkem HIV-negatiivsetel narkomaanidel (Joonis 5.1). Uuritavate populatsioonis mediaaniga võrdne või sellest väiksem (0-2) CCL3L1 geenikoopiate arv esines 85,1% HIV-positiivsetel süstivate narkomaanidel, HIV-negatiivsetel oli vastav levimuse protsent 73,5%.

CCL3L1 geenikoopiate sageduskõverate analüüs näitas olulist erinevust HIV-positiivsete ja HIV-negatiivsete narkomaanide hulgas ($\chi^2 = 4.994$ $p=0,0254$; Joonis 5.1).



Joonis 5.1. CCL3L1 geeni koopiaarvu esinemine HIV-positiivsete ja HIV-negatiivsete narkomaanide populatsioonis modelleeritud histogrammina (vasakul) ja *cubic-spline* meetodil (paremal). $\chi^2 = 4.994$ $p=0.0254$

Kuna CCL3L1 geeni koopiaarvu sageduskõverad sõltuvalt HIV infektsiooni staatusest erinevad, siis hinnati HIV-infektsiooni nakatumise šansse, rühmitades (stratifitseerides) HIV-positiivsed ja HIV-negatiivsed isikud lähtuvalt geenikoopiate arvust (Tabel 5.2). Selgus, et CCL3L1 geeni koopia arv 0 ja 1 eraldi võetuna ei olnud seotud suurenenud šansiga olla nakatunud HIV-1 viirusega. Seevastu narkomaanidel, kellel CCL3L1 geeni koopiaarv oli 3, oli väiksem šans olla nakatunud HIV-1 viirusega kui neil, kelle CCL3L1 geeni koopiaarv oli 0-2. (OR = 0,501; 95% CI = 0,262-0,960; p = 0,037). Koopiaarvul 4 ja 5 analüüsist tulenevalt protektiivne toime puudus (see võib olla tingitud ka asjaolust, et koopiaarvuga 4-5 uuritavaid oli liiga vähe).

Tabel 5.2. CCL3L1 geeni koopiaarvust tulenev narkomaanide šanss olla HIV-positiivne võrreldes CCL3L1 geeni mediaanväärtust omava grupiga (OR – šansside suhe; 95% CI – 95% usaldusvahemik).

Geeni koopiaarv	OR	p	95% CI
0	0.685	0.648	0.135-3.473
1	1.006	0.982	0.595-1.702
2*	1.000		
3	0.501	0.037	0.261-0.960
4	0.498	0.151	0.193-1.289
5-6	0.391	0.144	0.111-1.378

* mediaan

Läbiviidud analüüsi üheks puuduseks oli asjaolu, et teatud geenikoopia arvuga (näiteks 0, 5, 6 geenikoopiat) narkomaane oli antud uuringus vähe. Seetõttu jagati järgnevas analüüsiks statistilise jõudluse suurendamiseks uuritavad isikud kahte gruppi: (i) narkomaanid, kellel CCL3L1 geeni esines populatsiooni mediaaniga võrdne või sellest väiksem arv (0-2 geenikoopiat); (ii) narkomaanid, kellel CCL3L1 geenikoopiate arv oli mediaanist suurem, s.o. 3-6 geenikoopiat. Analüüs näitas, et narkomaanidel, kes omasid CCL3L1 geeni koopiaarvu 0-2, oli suurem šanss olla nakatunud HIV-1 viirusega, võrreldes uuritavatega, kellel oli 3-6 CCL3L1 geeni koopiat. (OR = 2,059; 95% CI = 1,231-3,443; p = 0.006) (Tabel 5.3). Väljundparameetri „HIV-positiivne või HIV-negatiivne” suhtes hinnati veel järgnevaid potentsiaalseid riskifaktoreid: kaasuv HCV või HBV infektsioon, narkomaanide sugu, vanus ja CCR5 kemokiini retseptori mutatsiooni $\Delta 32$ deletsiooni esinemist (Tabel 5.3). Viimase korral grupeeriti ühte gruppi nii heterosügootsed wt/ $\Delta 32$ kui ka homosügootsed $\Delta 32/\Delta 32$ narkomaanid.

Ühemõõtmelise analüüsi tulemusena selgus, et eraldi võetuna (standardimata teiste riskifaktorite suhtes) oli HBV infektsiooni esinemine väga tugev riskifaktor HIV-infektsiooni suhtes - OR = 4,994 (95% CI = 2,366-10,538; p<0,001). Sama võib ütelda ka HIV-positiivsusele kaasuva HCV infektsiooniga - OR = 3,013 (95% CI = 1,830-4,961; p<0,001). Seevastu narkomaanide sugu ja CCR5 retseptori $\Delta 32$ deletsioon riskifaktori rolli ei omanud. Kuna narkomaanide vanuse puhul oli märgata, et vanuse kasvades suurenes ka tõenäosus olla nakatunud HIV-viirusega ja võis arvata, et vanus on tegelikult narkootikumide kasutamise kestuse (staaž) „surrogaatmarker”, siis hindasime ka narkootikumide kasutamise staaži kui võimalikku riskifaktorit.

Staaži mõju oli samasuunaline uuringus osalenute vanusega, šansside suhe oli suurem pikema staažiga narkomaanidel (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Standardimata risk nakatuda HI-viirusega tulenevalt erinevatest riskiteguritest Eesti süstivate narkomaanide hulgas.

<i>Riskitegurid</i>	OR	95% CI	p
CCL3L1 geeni koopiaarv			
0-2	2.059	1.231-3.443	0.006
3-6 [†]	1.0		
HCV infektsioon			
HCV- [†]	1.0		
HCV+	3.013	1.830-4.961	<0.0001
HBV infektsioon			
HBV-	1.0		
HBV+ [†]	4.994	2.366-10.538	<0.0001
Sugu			
Naine	1.0		
Mees	0.926	0.515-1.663	0.797
Vanus (aastates)			
≤20 [†]	1.0		
21-30	3.692	1.657-8.226	0.006
≥31	2.574	1.020-6.496	0.045
Süstimise staaž (aastates)			
0-5 [†]	1.0		
6-10	2.043	1.095-3.812	0.025
>10	2.279	1.102-4.714	0.026
CCR5 Δ32 deletsioon			
wt/wt [†]	1.0		
wt/Δ32 või Δ32/ Δ32	1.23	0.741-2.035	0.425

[†] - standardgrupp

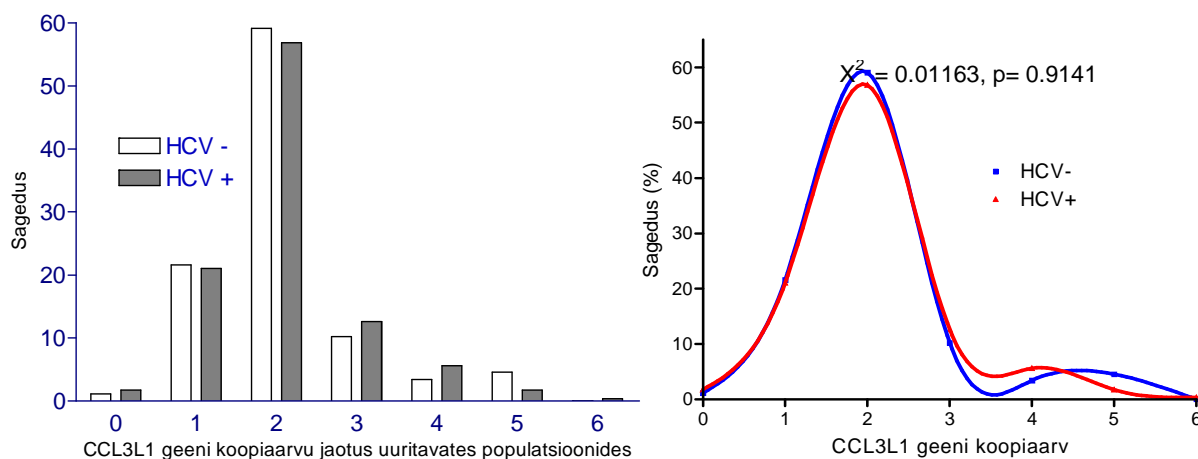
Δ32 – delta 32 deletsioon

5.2. HCV-positiivsed versus HCV-negatiivsed narkomaanid ja CCL3L1

Analüüsitavas narkomaanide populatsioonis kaasus 85,1%-il isikutel lisaks HIV-nakkusele veel C hepatiit (HCV). Sellest lähtuvalt hinnati HCV infektsiooni ja CCL3L1 geeni koopiaarvu ning teiste võimalike riskitegurite vahelist seost. HCV-positiivsete narkomaanide arv oli 285 ja HCV-negatiivsete isikute arv 88. Tabelis 5.4 on esitatud CCL3L1 geeni koopiaarvu levimus HCV-positiivsetel ja HCV-negatiivsetel narkomaanidel. CCL3L1 geenikoopiate histogrammide ja sageduskõveratelt on näha oluliste erinevuste puudumist HCV-positiivsete ja HCV-negatiivsete narkomaanide vahel (Joonis 5.2). Sama tulemuse saime, kui võrdlesime geenikoopiate arvu mediaanist lähtuvat CCL3L1 mõju HCV infektsioonile (OR = 0,88; 95% CI = 0,477-1,63; p=0.69).

Tabel 5.4. HCV-infektsioon ja CCL3L1 geeni koopiaarv uuritavas süstivate narkomaanide populatsioonis (SD – standardhälve).

	<i>Uuritavad (n)</i>	<i>Keskmine</i>	<i>SD</i>	<i>Mediaan</i>	<i>Vahemik</i>
Kõik uuritavad	373	2.06	0.93	2	0-6
HCV+	285	2.06	0.92	2	0-6
HCV-	88	2.07	0.96	2	0-5



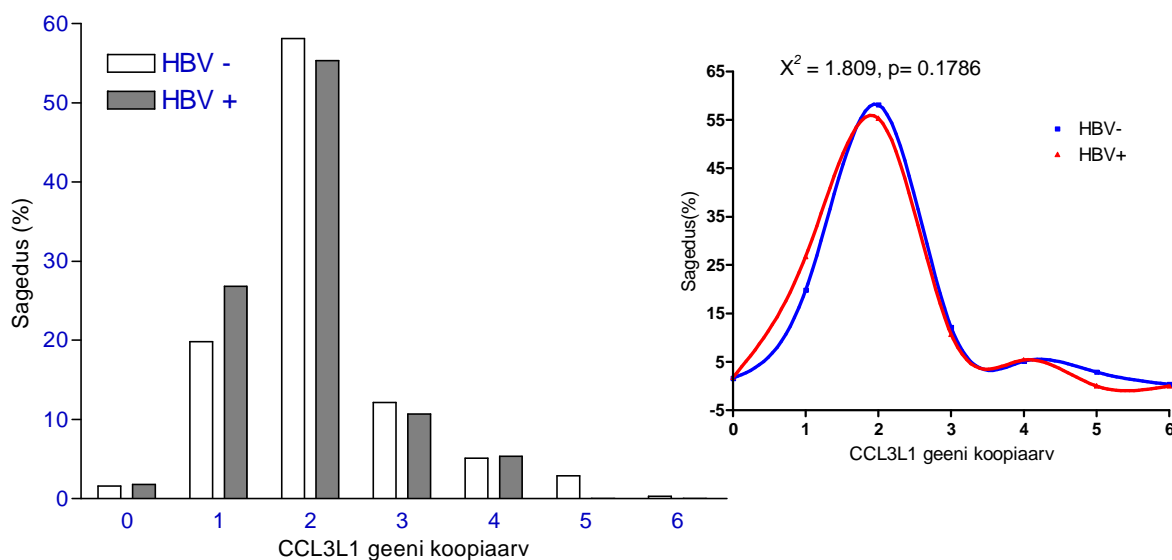
Joonis 5.2. CCL3L1 geeni koopiaarvu esinemine HCV-positiivsete ja HCV-negatiivsete narkomaanide populatsioonis modelleeritud histogrammina (vasakul) ja *cubic-spline* meetodil (paremal).

5.3. HBV-positiivsed versus HBV-negatiivsed narkomaanid ja CCL3L1

Järgnevalt hinnati CCL3L1 geeni koopiaarvu ja HBV infektsiooni vahelist võimalikku seost narkomaanidel. HBV-positiivsete narkomaanide arv oli 57 ja HBV-negatiivsete narkomaanide arv oli 313. Tabelis 5.5 on esitatud CCL3L1 geeni koopiaarvu levimus HBV-positiivsetel ja HBV-negatiivsetel narkomaanidel. CCL3L1 geenikoopiate histogrammide ja sageduskõveratel on näha oluliste erinevuste puudumist HBV-positiivsete ja HBV-negatiivsete narkomaanide vahel (Joonis 5.3). Sama tulemuse saime, kui võrdlesime geenikoopiate arvu mediaanist lähtuvat CCL3L1 mõju HCV infektsioonile.

Tabel 5.5. HBV-infektsioon ja CCL3L1 geeni koopiaarv uuritavas süstivate narkomaanide populatsioonis (SD – standardhälve).

	<i>Uuritavad (n)</i>	<i>Keskmine</i>	<i>SD</i>	<i>Mediaan</i>	<i>Vahemik</i>
Kõik uuritavad	370	2.06	0.93	2	0-6
HBV+	57	1.9	0.82	2	0-4
HBV -	313	2.09	0.9	2	0-6



Joonis 5.3. CCL3L1 geeni koopiaarvu esinemine HBV-positiivsete ja HBV-negatiivsete narkomaanide populatsioonis modelleeritud histogrammina (vasakul) ja *cubic-spline* meetodil (paremal).

5.4. CCL3L1 ja HCV või HBV koinfektsioon

Standardimata šansside hindamisel selgus, et kõige olulisemaks riskiteguriks HIV-positiivsuse suhtes osutus samaaegne narkomaani HBV-positiivne staatus, HCV positiivsetel narkomaanidel on šansside suhe väiksem. Statistiliselt oluliseks osutus ka narkomaani vanus või eelnev süstimise kestus, kus alla 20 aastastel või vähem kui 5 aastat süstinutel oli šanss olla HIV-positiivne väiksem kui vanematel või pikema süstimise staažiga isikutel.

Eraldi riskitegurite osa analüüsimiseks hinnati neid tegureid logistilise regressiooni mudelis, kus üksikud riskitegurid standarditi üksteise suhtes. Kuna CCR5 retseptori Δ32 deletsiooniga mutatsioon ja narkomaani sugu ei osutunud ühemõõtmelisel analüüsil olulisteks riskifaktoriteks, siis jäeti need lõpliku analüüsi mudeli koostamisel välja.

Mitmemõõtmelise logistilise regressioon analüüsi tulemused erinesid ühemõõtmelise analüüsi tulemustest (Tabel 5.6). Kaasuv HBV infektsioon ja vanem iga muutusid statistiliselt ebaolulisteks teguriteks. Kohandatud logistilise regressiooni mudeli alusel oli HIV nakkuse olulisemaks riskiteguriks kaasuv HCV infektsioon – šansside suhe OR = 3,673 (95% CI = 1,820-7,412). Lisaks suurenes mudelis CCL3L1 geenikoopiate arvu riskišanss 2,059-lt 2,705-ni.

Table 5.6. Standarditud risk nakatuda HIV-infektsiooniga tulenevalt erinevatest bioloogilistest ja sotsiaalsetest riskiteguritest Eesti süstivate narkomaanide hulgas.

<i>Riskitegurid</i>	OR	95% CI	p
CCL3L1 geeni koopiaarv			
0-2	2.705	1.450-5.048	0.002
3-6 [†]			
HCV infektsioon			
HCV- [†]			
HCV+	3.673	1.820-7.412	<0.0001
HBV infektsioon			
HBV-			
HBV+ [†]	1.998	0.833-4.971	0.121
Vanus (aastates)			
≤20 [†]			
21-30	3.022	1.294-7.057	0.011
≥31	2.176	0.814-5.811	0.121

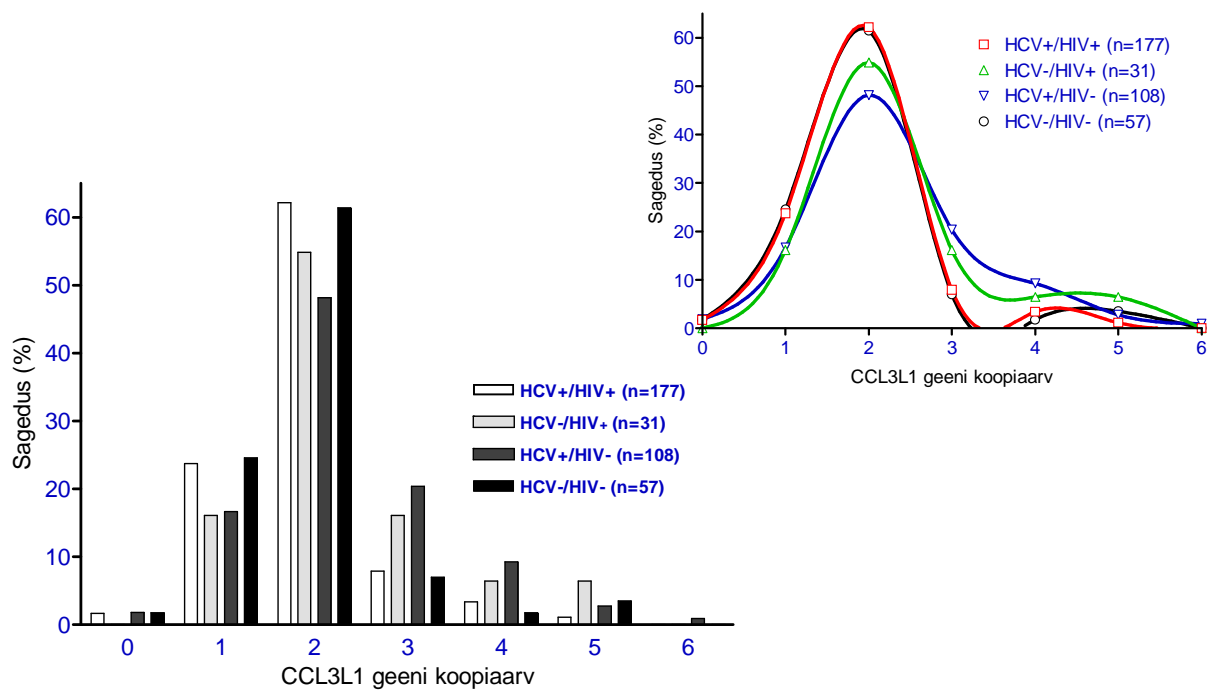
[†] standardgrupp

Analüüsil selgus tugev interaktsioon kahe HIV-positiivset staatust mõjutava teguri suhtes – ühelt poolt HCV-positiivsus ja teisalt CCL3L1 geenikoopiate arv (*log likelihood ratio test*; $\chi^2 = 13,10$; $p = 0,0003$). Viimasest võib järeldada, et CCL3L1 geenikoopiate arvus tulenev mõju HIV staatusel on mingil määral mõjutatud HCV staatusel. Seetõttu teostasime analüüsi, hindamaks seost ekspositsiooni (antud juhul CCL3L1 geenikoopiate arv) ja väljundi (HIV staatus) vahel kofaktori (HCV staatus) juuresolekul (Tabel 5.7).

Tabel 5.7. Narkomaanide HIV-positiivsuse šansside suhe ja usalduspiirid CCL3L1 geenikoopia arvu ja HCV-staatuse interaktsiooni korral.

	OR	95% CI	p
HCV-			
0-2 CCL3L1 geenikoopiat	0.342	0.113-1.036	0.058
3-6 CCL3L1 geenikoopiat	1.0		
HCV+			
0-2 CCL3L1 geenikoopiat	3.522	1.934-6.416	<0.001
3-6 CCL3L1 geenikoopiat	1.0		

HCV-positiivsetel narkomaanidel, kellel on populatsiooni mediaani keskmisest madalam CCL3L1 geeni koopiaarv on suurem tõenäosus nakatuda HIV viirusega (OR = 3,522; 95% CI = 1,934-6,416; $p < 0,001$). HCV-negatiivsetel narkomaanidel on tõenäosus nakatuda HIV viirusega suurem, omades populatsiooni keskmisest madalamat CCL3L1 geeni koopiaarvu (OR = 0,342; 95% CI = 0,113-1,036; $p = 0,058$); Joonis 5.4). HCV-negatiivsetel on tõenäosus nakatuda HIV-ga madalam kui HCV-positiivsetel isikutel.



Joonis 5.4. CCL3L1 geeni koopiaarvu jaotus HIV/HCV mono- ja koinfektsiooniga uuritavatel.

6. ARUTELU

Meie uuring näitas, et Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis oli keskmine CCL3L1 geeni koopiarv 2. Taoline leid sarnaneb Gonzales'e ja kaasautorite poolt esitatatule (2006), kes samuti leidsid valgete rassil sarnase CCL3L1 geenikoopiate mediaani. Võrdluseks olgu toodud, et afro-ameeriklastel ja aafriklastel on keskmine geenikoopiate arv tavaliselt suurem. Samas tuleb märkida, et geenikoopiate arvu individuaalne varieeruvus narkomaanide populatsioonis ei olnud väga suur, ulatudes 0-st 6-ni, kusjuures ligi 50% uuritutel oli see võrdne 2-ga. Analoogsed vähesed uuringud mujal maailmas on maksimaalseks CCL3L1 geenikoopiate arvuks toonud 10-12 koopiat (Gonzalez jt, 2005; Shao jt, 2007).

Kuigi HIV-positiivsete ja HIV-negatiivsete narkomaanide hulgas on keskmine geenikoopiate number „2”, siis HIV-positiivsete narkomaanide hulgas esines oluliselt rohkem populatsiooni keskmisest väiksema CCL3L1 geenikoopia arvuga isikuid kui HIV-negatiivsete narkomaanide hulgas. Selline tulemus viitab CCL3L1 geeni produkti võimalikule rollile HIV-infektsiooni haigestumisel. HIV-infektsiooni vastane toime võiks eelkõige seisneda suuremas CCL3L1 geeni produkti st valgu hulgas. Rohkem CCL3L1 valku seondub CCR5 retseptoriga, mis raskendab oluliselt HI-viiruse virionide interaktsiooni CCR5 retseptoriga ja sellega HIV peremeesrakku sisenemist. *In vitro* on Townson'i uurimisgrupp näidanud, et rakukultuuris korreleerub kõrgem CCL3L1 geeni koopiarv suurema CCL3L1 mRNA ja valgu hulgaga (Townson jt, 2002). Sama tulemust näitas ka Gonzalez'e uurimisgrupp *in vivo* (Gonzalez jt, 2005).

Teise võimaliku mehhanismina on näidatud, et HIV vastane kaitse ei seisne üldsegi selles, et CCL3L1 produkt blokeerib CCR5 retseptori ja HIV virionid sellega seonduda, vaid hoopis selles, et suurend CCL3L1 kontsentratsioon organismis vähendab CCR5 ekspressiooni. Seda eelkõige tänu sellele, et CCL3L1 stimuleerib INF- γ (interferoon- γ) tootmist T-rakkudes, mis omakorda inhibeerib CCR5 retseptori ekspressiooni (Choe jt, 2001; Kinter jt, 2000; Losana jt, 2002; Creery jt, 2004). Siit võibki oletada, et väiksema CCL3L1 geenikoopia arvu korral,

transkribeeritakse ja transleeritakse vähem CCL3L1 kemokiini (Townson jt, 2002), mis omakorda vähemal määral mõjutab INF- γ tootmist T-rakkudes ning see omakorda CCR5 ekspressiooni. Selle tulemusena on raku pinnal rohkem CCR5-e ekspresseeritud ning rakk on vastuvõtlikum HIV infektsioonile.

Kirjanduses leidub ka andmeid selle kohta, et CCL3L1 geenikoopia arvul ja HIV-infektsiooni vahel pole mingisugust seost (Shao jt, 2007). Ka meie uuring ei andnud päris ühest vastust. Statistiliselt oluline erinevus tulenes eeskätt mediaanväärtuste sageduste erinevuses HIV-positiivsete ja HIV-negatiivsete populatsioonis. Samas ei täheldanud me oma uuringus, et erinevus oleks ilmnenu geeni koopia arvu mõjust HIV-infektsioonile tuginevad eeskätt uuringutel, kus nakatumine toimus kas seksuaalsel või homoseksuaalsel teel. Käesoleva töö uuringus oli nakatumise teeks süstimine, mille korral nakatav HIV-virionide doos on oluliselt suurem kui seksuaalsel või homoseksuaalsel teel saadud infektsiooni korral, mistõttu organismi sattunud viiruse kogus võib olla niivõrd suur, et CCL3L1 geenikoopia arvu mõju ei pääse esile ja seega ka CCL3L1 geeni koopia arvu ja HIV vaheline seos ei tule väga reljeefselt esile.

Meie poolt uuritud narkomaanid olid sageli nakatunud HCV ja HBV nakkusega. Sage nakatumine nimetatud viirustega polnud üllatuslik, kuna riskikäitumine ja nakatumise teed kõigi kolme viirusinfektsiooni korral on sarnased. Seda on leidnud ka teised (Chung, 2006; Gaeta jt, 2006). Sellest tulenevalt püüdsime hinnata ka CCL3L1 geenikoopia arvu kui võimalikku riskitegurit omandada HCV või HBV infektsioon. Erinevalt HIV nakkusest olid šansid omandada HCV või HBV infektsiooni CCL3L1 geeni koopiaarvust sõltumatud, mistõttu võime väita, et HCV ja HBV infektsioonis CCL3L1 olulist rolli ei mängi.

Kuna ühemõõtmelise analüüsi tulemusena ilmnis HIV ja CCL3L1 geenikoopia arvu vahel seos, siis koostasime logistilise regressiooni mudeli, kus püüdsime hinnata CCL3L1 geenikoopia arvu võimalikku seost teiste potentsiaalsete HIV infektsiooni riskitegurite vahel: $\Delta 32$ deletsioon CCR5 retseptoril, HCV ja HBV koinfektsioon, vanus (narkootikumide tarvitamise kestuse surrogaatmarker) või narkootikumide tarvitamise kestus.

Üllatuslikult selgus, HCV-koinfektsioon koos madala CCL3L1 geenikoopia arvuga soodustab HIV infektsiooni süstivate narkomaanide hulgas. HIV/HCV koinfektsiooniga uuritavatel esines CCL3L1 geenikoopiaarvu 0-2 tunduvalt sagedamini kui näiteks ainult kas HIV või HCV monoinfektsiooniga uuritavatel – vastvalt 88%, 71% ja 67%. Kas CCL3L1 geeni koopiaarvul võib olla mõju ka HIV-nakkusele läbi HCV-koinfektsiooni? Meie teadmise kohaselt ei ole selle kohta seni ühtegi tööd avaldatud.

Ühe võimaliku mõjurina tuli nii HIV/HCV koinfektsiooni kui ka ainult HIV-monoinfektsiooni hindamisel arvesse võtta kirjanduses hästi tuntud CCR5 $\Delta 32$ mutatsiooni protektiivset toimet. Suhteliselt palju on arutletud teemal, kas CCR5-e $\Delta 32$ mutatsiooniga alleelil on mingi osa HCV-infektsioonis või mitte. Woitas'e uurimisgrupp (Woitas jt, 2002) on näidanud, et HCV-positiivsetel patsientidel esineb CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$ genotüüpi tunduvalt sagedamini kui HCV-negatiivsetel uuritavatel. Siit tehti järeldus, et CCR5-el võib olla oluline roll HCV infektsioonis. Goulding'i töögrupp võrdles HCV-positiivseid HCV-negatiivse populatsiooniga ning näitas, et HCV-positiivsete uuritavate grupis omasid *wt/\Delta 32* genotüübiga uuritavad märkimisväärselt paremat spontaanset HCV eliminatsiooni kui *wt/wt* genotüübiga uuritavad (Goulding jt, 2005). Samal teemal on läbiviidud mitmeid teisi uuringuid, kuid nende tulemused seda leidu ei kinnita (Wasmuth jt, 2003; Glas jt, 2003; Promrat jt, 2003a; Promrat jt, 2003b). Hilisemad uuringud on seda seletanud siiski pigem kui CCR5 $\Delta 32$ alleeli kaitsvat efektiga HIV infektsiooni eest, eitades CCR5 $\Delta 32$ alleeli rolli HCV infektsioonis (Wasmuth jt, 2003; Glas jt, 2003; Promrat jt, 2003a; Promrat jt, 2003b). Ka meie analüüs näitas, et kui võrrelda CCR5 $\Delta 32$ alleeli sagedust HCV infektsiooniga populatsioonis ja ilma HCV infektsioonita populatsioonis, siis statistiliselt tõestatud seost HCV ja CCR5 $\Delta 32$ alleeli vahel ei ilmne. $\Delta 32$ protektiivne toime ei ilmnud ei ühemõõtmelise ega ka mitmemõõtmelise mudeli korral. Ühe võimalusena võib jälle spekuloida, et süstivatel narkomaanidel on organismi viidava HIV viiruse kogus niivõrd suur, et mutatsiooni protektiivne toime uuritud populatsiooni mahu juures ei avaldu. Teise võimalusena, et HCV ei kasutagi CCR5 retseptorit ja eelnevad leiud on seotud pigem sarnase levikutee kui geneetilise eelsoodumusega.

Kemokiinil CCL3L1 võib olla roll ka HCV-infektsioonis INF- γ stimuleerimise kaudu. INF- γ sekreteerivad Th1 rakud domineerivad maksas kroonilise HCV-infektsiooni ajal, mistõttu kemokiinid, mis seonduvad Th1 rakkudele võivad omada olulist rolli maksa kahjustuste

progressioonis. Uuringud on näidanud, et Th1 rakkude migratsioon maksa on põhjustatud kemokiinretseptori ja tema ligandi interaktsiooni tulemusena (Charo jt, 2006). On näidatud, et kroonilise hepatiit C infektsiooniga patsientidel põhjustavad INF- γ sekreteerivad T rakud maksas aeglasemat haiguse kulgu, mis tähendab, et INF- γ -1 võib olla väga oluline roll ka maksakahjustuste ärahoidmisel (Bonilla jt, 2006). Antud töös nägime tugevat korrelatsiooni populatsiooni keskmisest madalama CCL3L1 geeni koopiaarvu (0-2) ja HIV/HCV-koinfektsiooni vahel, mis lubab diskuteerida CCL3L1 võimalikul rollil HIV/HCV-koinfektsioonis. Kas see täpne mehhanism on just selline, nagu eelpool kirjeldatud, vajab edasisi uuringuid.

Peab mainima, et CCL3L1 geeni ekspressiooni võivad mõjutada ka mõned teised viirused. Näiteks, CCL3L1 geeni ekspressiooni suurenemist on kirjeldatud HTLV-1/HIV-1 koinfektsiooni puhul. HTLV-1 ehk inimese T-lümfotroopne viirus tüüp 1 levib sarnaselt HIV ja HCV-ga. HTLV-1 põhjustab CCL3L1 ekspressiooni tõusu nii monoinfektsiooni korral, st. ilma HIV nakkuseta isikutel, kuid ka koinfektsiooni korral. Viimasel juhul aeglustab CCL3L1 ekspressiooni tõus haiguse progressiooni AIDS-iks (Pilotti jt, 2007). Osade autorite väitel on ka GB viirus C (GBV-C) on võimeline vähendama CCR5 ekspressiooni T rakkudes, indutseerides CCL5 vabanemist, mis omakorda inhibeerib CCR5 ekspressiooni (Nattermann jt, 2003; Xiang jt, 2004) ja selle kaudu vastuvõtlikust HIV-infektsiooni suhtes. Antud töös kasutatud populatsiooni puhul puudusid andmed HTLV-1 ja GBV-C infektsioonide kohta, mistõttu ei ole teada, kas nimetatud viirused võisid käesoleva töö uuritavatel muuta CCR5 või CCL3L1 ekspressioonitaset ning seeläbi mõjutada ka HIV-infektsiooni.

Antud töö põhjal selgus, et on ka isikuid kellel CCL3L1 geeni koopiaarv on null, mis tähendab, et selline geen kromosoomis on deleteerunud. CCL3L1 geeni puudumise võivad osaliselt kompenseerida CCL3 ja teised põletikulistes reaktsioonides osalevad kemokiinid. Ka ei saa käesoleva töö juures täiesti välistada praimer/sondi aluse mutatsiooni esinemist, kuna töös kasutati vaid ühte omalaadset praimerit/sondi.

Käesoleva töö tulemused on kinnituseks sellele, et segmentaalsed duplikatsioonid võivad tõepoolest võimendada liigi adapteerumisvõimet ümbritsevas keskkonnas ja tõsta vastupanuvõimet HIV-1 infektsiooni ja võimalik, et ka HCV-infektsiooni vastu. Kuigi täpsed mehhanismid selleks on veel teadmata ning ootavad edasist selgitamist.

JÄRELDUSED

- Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis on CCL3L1 geenikoopiate mediaan 2, varieerudes HIV-positiivsete uuritavate populatsioonis 0-st 5-ni ja HIV-negatiivsete uuritavate populatsioonis 0-st 6-ni.
- Süstivate narkomaanide populatsioonis on populatsiooni keskmisest väiksema CCL3L1 geenikoopiate arvuga isikutel suurem risk nakatuda HIV viirusega, mis näitab et CCL3L1 geeni produktil saab olla HIV-infektsiooni protsessis oluline roll.
- HIV/HCV koinfektsiooniga uuritavatel esines CCL3L1 geenikoopiaarvu 0-2 tunduvalt sagedamini kui ainult HIV või HCV monoinfektsiooniga uuritavatel, mis viitab sellele, et populatsiooni keskmisest madalamal CCL3L1 geenikoopiaarvul võib olla oluline osa ka HIV/HCV infektsioonis.
- HIV/HBV koinfektsiooni ja CCL3L1 geeni koopiaarvu vahel statistiliselt olulist seost ei täheldatud.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös määrati CCL3L1 geeni koopiate arv Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis ning hinnati CCL3L1 koopiate arvu võimalikku mõju nakatumisele HIV viirusega. Lisaks eelnimetatule hinnati peremeesorganismi CCL3L1 geeni koopiate arvu võimalikku seost HIV-infektsiooniga sageli koos esinevate HCV ja HBV infektsioonidega.

Keskmiseks CCL3L1 geeni koopiarvuks Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis oli 2. HIV-positiivsete uuritavate populatsioonis varieerus CCL3L1 geeni koopiarv 0-st 5 koopiani ning HIV-negatiivsete uuritavate hulgas 0-st 6-ni. Uuritavaid isikuid geenikoopiate arvuga 1 või 2 esines rohkem HIV-positiivsete narkomaanide hulgas. Seevastu mediaanist suurem geenikoopiate arv 3 - 6 oli sagedasem HIV-negatiivsetel narkomaanidel. Selline tulemus viitab CCL3L1 geeni produkti võimalikule rollile HIV-infektsiooni kulus, viidates asjaolule, et väiksema CCL3L1 geenikoopiate arvuga isikutel võib olla suurem risk nakatuda HIV viirusega.

Töö tulemusena selgus ka, et HIV positiivsetel isikutel HCV-koinfektsioon koos madala CCL3L1 geenikoopia arvuga suurendab infektsiooniriski süstivate narkomaanide hulgas, sest HIV/HCV koinfektsiooniga uuritavatel esines CCL3L1 geenikoopiaarvu 0-2 tunduvalt sagedamini kui näiteks ainult kas HIV või HCV monoinfektsiooniga uuritavatel.

Käesoleva töö tulemused on kinnituseks sellele, et segmentaalsed duplikatsioonid võivad tõepoolest võimendada liigi adapteerumisvõimet ümbritsevas keskkonnas ja tõsta vastupanuvõimet HIV-1 infektsiooni ja võimalik, et ka HCV-infektsiooni vastu. Kuigi täpsed mehhanismid selleks on veel teadmata ning ootavad edasist selgitamist.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin kogu südamest tänada oma juhendajat Tõnis Karki't toetuse ja nõuannete eest. Suur tänu ka Irja Lutsar'ile, Kristi Huik'ile, Radko Avi'le ning Sulev Ingerpuu'le osutatud abi ja ideede eest. Tänuõnad ka kõigile teistele abistajatele ja Mikrobioloogia Instituudi inimestele meeldiva koostöö eest.

SUMMARY

Segmental copy-number polymorphisms represent a significant component of human genetic variation and are likely to contribute to disease susceptibility. Chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1), is a member of the chemokine family and encoded by a variable copy-number of genes. It is a natural ligand of CCR5 and thereby plays an important role HIV-1/AIDS susceptibility. Previous studies have shown that low gene copy-number of CCL3L1 is associated with lower chemokine concentrations, a higher proportion of CCR5-expressing CD4+ cells, an increased risk of HIV acquisition, higher viral loads and accelerated rate of disease progression. Individuals with greater gene-copies of CCL3L1 than their population median have been found to be less susceptible to HIV infection than those with higher than population median of gene-copies. CCL3 and other chemokines may also play an important role in the development of inflammation in HCV infection as some previous studies have shown an increase in CCL3 levels in serum and in the liver.

Whether in HCV infections CCL3L1 gene-copy number is correlated with the pathogenesis of the disease is not known. Also, previous studies when looking at the correlations between CCL3L1 gene-copy numbers and prevalence of the HIV infection did not distinguish between various populations (perinatally or heterosexually acquired HIV infections, intravenous drug users) and thus the role of such important risk factors has not been studied.

We aimed to study the CCL3L1 gene copy numbers in IDU population in Estonia and to describe associations between these gene copy numbers and presence of HIV-1, HCV and HBV infection.

In HIV-positive and HIV-negative subjects the CCL3L1 copy numbers ranged between 0 & 5 and 0 & 6, respectively with the median value of 2 in both populations. More HIV-positive subjects (85,1%) had 0-2 CCL3L1 gene copies than HIV-negative (73,5%) subjects. Also more HIV-positive subjects who were co-infected with HCV (88%) had 0-2 CCL3L1 gene copies

compared to HCV mono-infected (67%) or HIV mono-infected (71%) subjects. It means that in the high risk IDU population the subjects who display smaller number of copies of CCL3L1 gene than their population median have increased risk of acquiring HIV. Also HCV infection may be an additional risk factor which is associated with increased risk of acquiring HIV infection due to low CCL3L1 gene copy number. In conclusion, this work indicates that this chemokine may play an essential role in protective immunity.

KASUTATUD KIRJANDUS

Adojaan M, Kivisild T, Mannik A, Krispin T, Ustina V, Zilmer K, Liebert E, Jaroslavtsev N, Priimagi L, Tefanova V, Schmidt J, Krohn K, Villems R, Salminen M, Ustav M. Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Aug 15;39(5):598-605.

Adojaan M, Molder T, Mannik A, Kivisild T, Villems R, Krispin T, Ustav M. High prevalence of the CCR5Delta32 HIV-resistance mutation among Estonian HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:193-7.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955–8.

Ameerika Ühendriikide Tervisekaitse Instituut (inglisk. National Institute of Health (NIH)). HIV infektsioon ja AIDS. Kättesaadav: <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/hivinf.htm> (8.04.2008).

Aquaro S, Menten P, Struyf S, Proost P, Van Damme J, De Clercq E, et al. The LD78beta isoform of MIP-1alpha is the most potent CC-chemokine in inhibiting CCR5 dependent human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages. *J Virol* 2001;75:4402–6.

Arya SK, Ginsberg CC, Davis-Warren A, D'Costa J. In vitro phenotype of SDF1 gene mutant that delays the onset of human immunodeficiency virus disease in vivo. *J Hum Virol* 1999;2:133–8.

Barroga CF, Raskino C, Fangon MC, Palumbo PE et al.. The CCR5D32 Allele Slows Disease Progression of Human Immunodeficiency Virus–1–Infected Children Receiving Antiretroviral

Treatment. *J. Infect. Dis.* 2000;182:413–9.

Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998;391:240.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999;17:657–700. 398 F. Arenzana-Seisdedos, M. Parmentier / *Seminars in Immunology* 18 (2006) 387–403

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829–33.

Bleul CC, Wu LJ, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:1925-30

Bonilla N, Barget N, Andrieu M, Roulot D, Letoumelin P, Grando V, Trinchet JC, Ganne-Carrié N, Beaugrand M, Deny P, Choppin J, Guillet J, Ziol M. Interferon gamma-secreting HCV-specific CD8+ T cells in the liver of patients with chronic C hepatitis: relation to liver fibrosis--ANRS HC EP07 study. *J Viral Hepat.* 2006 Jul;13(7):474-81.

Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien S. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Gen* 1999;8:1939–45.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006 Feb 9;354(6):610-21.

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135–48.

Choe W, Volsky DJ, Potash MJ. Induction of rapid and extensive beta-chemokine synthesis in macrophages by human immunodeficiency virus type 1 and gp120, independently of their coreceptor phenotype. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10738-45.

Chung RT. Hepatitis C and B viruses: the new opportunists in HIV infection. *Top HIV Med.* 2006 Jun-Jul;14(2):78-83. Review.

Clapham PR, McKnight A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* 2002;83:1809–29.

Cocchi F, DeVico A, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV suppressive factors produced by CD8 $^{+}$ T cells. *Science* 1995;270: 1811–5.

Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science.* 1997 Nov 28;278(5343):1580-1.

Creery D, Weiss W, Lim WT, Aziz Z, Angel JB, Kumar A. Down-regulation of CXCR-4 and CCR-5 expression by interferon-gamma is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency virus (HIV) replication but not HIV entry into human monocytes. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jul;137(1):156-65.

Daar ES, Lynn HS, Donfield SM, Lail A, O'Brien SJ, Huang W, et al. Stromal cell-derived factor-1 genotype, coreceptor tropism, and HIV type 1 disease progression. *J Infect Dis* 2005;192:1597–605.

Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J.* 2005;19(10):1225-31.

Dean M, Jacobson LP, McFarlane G, Margolick JB, Jenkins FJ, Howard OM, et al. Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5- Δ 32 mutation. *Cancer Res*

1999;59:3561–4.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661–6.

Doranz BJ, Grovit-Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, et al. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J Exp Med* 1997;186:1395–400.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the betachemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149–58.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667–73.

Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J. Gen. Virol.* 2001;82:1807–1814.

Easterbrook PJ, Rostron T, Ives N, Troop M, Gazzard BG, Rowland-Jones SL. Chemokine receptor polymorphisms and human immunodeficiency virus disease progression. *J Infect Dis* 1999;180:1096–105.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872–7.

Gaeta GB, Precone DF, Cozzi-Lepri A, Cicconi P, D'Arminio Monforte A. Multiple viral infections. *J Hepatol.* 2006;44(1 Suppl):S108-13. Epub 2005 Nov 28. Review.

Glas J, Török HP, Simperl C, König A, Martin K, Schmidt F, Schaefer M, Schiemann U, Folwaczny C. The Delta 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated

with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon-alpha and ribavirin. *Clin Immunol.* 2003 Jul;108(1):46-50.

Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 2005;307:1434–40.

Goulding C, McManus R, Murphy A, MacDonald G, Barrett S, Crowe J, Hegarty J, McKiernan S, Kelleher D. The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut.* 2005 Aug;54(8):1157-61. Epub 2005 Apr 29. Erratum in: *Gut.* 2005 Oct;54(10):1508. McManus, R

Goyal A, Suneetha PV, Kumar GT, Shukla DK, Arora N, Sarin SK. CCR5Delta32 mutation does not influence the susceptibility to HCV infection, severity of liver disease and response to therapy in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2006 Aug 7;12(29):4721-6.

Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 1998;273: 4282-7.

He JL, Chen YZ, Farzan M, Choe HY, Ohagen A, Gartner S, et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature.* 1997;385:645-9.

Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology.* 2003 Dec;38(6):1468-76.

Hendel H, Henon N, Lebuane H, Lachgar A, Poncelet H, Caillat-Zucman S, et al. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;19:381–6. *Infect* 1999;38:9–11.

Hepatiit.Net. C hepatiit. Kättesaadav: <http://www.hepatiit.net/index.php?id=11>] (8.04.2008).

Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, et al. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: Functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol*. 1997;7:112-21.

Heveker N, Montes M, Germeroth L, Amara A, Trautmann A, Alizon M, et al. Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1- derived small peptides. *Curr Biol* 1998;8:369–76.

Howard OM, Turpin JA, Goldman R, Modi WS. Functional redundancy of the human CCL4 and CCL4L1 chemokine genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 927–931.

Irving SG, Zipfel PF, Balke J, McBride OW, Morton CC, Burd PR, et al. Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res* 1990;18: 3261–70.

Kalev I, Oselin K, Parlist P, Zilmer M, Rajasalu T, Podar T, Mikelsaar AV. CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes. *J Diabetes Complications*. 2003;17(6):387-91.

Ketas TJ, Kuhmann SE, Palmer A, Zurita J, He W, Ahuja SK, Klasse PJ, Moore JP. Cell surface expression of CCR5 and other host factors influence the inhibition of HIV-1 infection of human lymphocytes by CCR5 ligands. *Virology*. 2007 Aug 1;364(2):281-90. Epub 2007 Apr 10.

Kinter A, Arthos J, Cicala C, Fauci AS. Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:88-98. Review. 52.

Koziel MJ. Influence of HIV co-infection on hepatitis C immunopathogenesis. *J Hepatol.* 2006;44(1 Suppl):S14-8. Epub 2005 Nov 21. Review.

Laing K, Secombes C. "Chemokines". *Dev Comp Immunol* 2004;28 (5): 443-60.

Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 2005;15;106(6):1901-10.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug 11;21(16):3761-6.

Lichterfeld M, Leifeld L, Nischalke HD, Rockstroh JK, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1803-7. Epub 2002 May 20.

Littman DR. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 1998;93:677–80.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995 Jun;4(6):357-62.

Loetscher M, Amara A, Oberlin E, Brass N, Legler D, Loetscher P, et al. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr Biol* 1997;7:652–60.

Losana G, Bovolenta C, Rigamonti L, Borghi I, Altare F, Jouanguy E, Forni G, Casanova JL, Sherry B, Mengozzi M, Trinchieri G, Poli G, Gerosa F, Novelli F. IFN-gamma and IL-12 differentially regulate CC-chemokine secretion and CCR5 expression in human T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2002 Oct;72(4):735-42.

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9448–53.

Magierowska M, Lepage V, Lien TX, Lan NT, Guillotel M, Issafras H, et al. Novel variant of the CCR5 gene in a Vietnamese population. *Microbes Infect* 1999;1:123–4.

Maho A, Bensimon A, Vassart G, Parmentier M. Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome. *Cytogenet Cell Genet* 1999;87:265–8.

Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1882-6. Review.

McNicholl JM, Smith DK, Shoukat HQ, Hodge T. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele ($\Delta 32$ CCR5). *Emerg Inf Dis* 1997;3(3).

MedicineNet. Termini „isovorm” seletus. Kättesaadav: <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=38302> (8.04.2008).

Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:455–81.

Michael NL, Nelson JA, KewalRamani VN, Chang G, O'Brien SJ, Mascola JR, Volsky B, Louder M, White GC 2nd, Littman DR, Swanstrom R, O'Brien TR. Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta32. *J Virol*. 1998 Jul;72(7):6040-7.

Miyakawa T, Obaru K, Maeda K, Harada S, Mitsuya H. Identification of amino acid residues critical for LD78beta, a variant of human macrophage inflammatory protein-1alpha, binding to CCR5 and inhibition of R5 human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Biol Chem*

2002; 277: 4649–4655.

Modi WS. CCL3L1 and CCL4L1 chemokine genes are located in a segmental duplication at chromosome 17q12. *Genomics*. 2004 Apr;83(4):735-8.

Moore JP, Jameson BA, Weiss RA, Sattentau QJ. The HIV±cell fusion reaction. In *Viral Fusion Mechanisms*, pp. 233±289;1993 Edited by J. Bentz. Boca Raton: CRC Press

Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors-central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:111–26.

MTÜ AIDS-i Ennetuskeskus. 2008 aasta HIV/AIDS statistika Eestis. Kättesaadav: http://aids.ee/main_est.php?id=66 (8.04.2008).

Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 1998;4:786–93.

Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, et al. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* 1997;186:1389–93.

Murdoch C, Finn A. "Chemokine receptors and the role in inflammation and infectious disease". *Journal of the American Society of Hematology* 2000;95(10):3032-3043.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635–8.

Nattermann J, Nischalke HD, Feldmann G, Ahlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U. Binding

of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat.* 2004 Nov;11(6):519-26.

Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS.* 2003 Jul 4;17(10):1457-62.

Nibbs RJ, Yang J, Landau NR, Mao JH, Graham GJ. LD78_, a non-allelic variant of human MIP-1_ (LD78_), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J Biol Chem* 1999;274:17478–83.

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana- Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833–5.

O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, White GC 2nd. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet.* 1997 Apr 26;349(9060):1219.

Paxton WA, Liu R, Kang S, Wu L, Gingeras TR, Landau NR, et al. Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of betachemokines. *Virology* 1998;244:66–73.

Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, Bertazzoni U, Re MC, Allibardi S, Poli G, Casoli C. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1850-6.

Price RW. The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 239; 586-591 (1988)

Promrat K, Liang TJ. Chemokine systems and hepatitis C virus infection: is truth in the genes of the beholders? *Hepatology.* 2003 Dec;38(6):1359-62.

Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003 Feb;124(2):352-60. Erratum in: *Gastroenterology*. 2003 Apr;124(4):1168.

Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Conzales- Canali G, Metais P, et al. HIV-1 resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998;351:14-8.

Rabkin CS, Yang Q, Goedert JJ, Nguyen G, Mitsuya H, Sei S. Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999;93:1838-42.

Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 1996;35:3362-7.

Schols D, Struyf S, VanDamme J, Estq JA, Henson G, DeClercq E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* 1997;186:1383-8.

Shao W, Tang J, Song W, Wang C, Li Y, Wilson CM, Kaslow RA. CCL3L1 and CCL4L1: variable gene copy number in adolescents with and without human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Genes Immun*. 2007 Apr;8(3):224-31.

Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, et al. A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 2000;74: 619-26.

Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, Chen J, Raskino C, McKinney RE, et al. Genetic

influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2003;188:1461–72.

Soo HM, Garzino-Demo A, Hong W, Tan YH, Tan YJ, Goh PY, Lim SG, Lim SP. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology*. 2002 Nov 25;303(2):253-77.

Stites DP, Terr AJ, Parslow TG. *Basic and clinical immunology*. 8th ed. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange; 1994.

Su B, Chakraborty R, Jin L, Xiao J, Lu D. An HIV-resistant allele is exceptionally frequent in New Guinean highlanders. *JAMA* 1998;280:1830.

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591–4.

Tartu Ülikooli Biomeditsiinitehnoloogia arenduskeskuse erakorralise vanemteaduri Ann Kilk'i signaalülekande loengu I osa. Kättesaadav: <http://www.ebc.ee/loengud/ann/osa1.htm#1.4> (8.04.2008).

Tefanova V, Tallo T, Jaroslavtsev N, Kikoš G, Krupskaja L, Lisitsina S, Kutsar K, Priimägi L. B- ja C-viirushepatiitid – aktuaalne epidemioloogiline probleem Eestis viimasel aastakümnel *Eesti Arst* 2004(11).

Tervisekaitseinspeksioon. 2008. aastal Eestis diagnoositud HIV-positiivsed. Kättesaadav: <http://www.tervisekaitse.ee/?page=102> (8.04.2008).

Townson JR, Barcellos LF, Nibbs RJ. Gene copy number regulates the production of the human chemokine CCL3-L1. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3016–3026.

Ustina V, Zilmer K, Tammai L, Raukas M, Andersson A-L, Lilja E, jt. HIV-nakkuse levimus Eestis. Eesti Arst 2000;(10);602–7.

Vincent T, Portales P, Baillat V, de Boever CM, Le Moing V, Vidal M, Ducos J, Clot J, Reynes J, Corbeau P. T-Cell surface CCR5 density is not correlated with hepatitis severity in hepatitis C virus/HIV-coinfected individuals: implications for the therapeutic use of CCR5 antagonists. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005 Mar 1;38(3):305-9.

Visco-comandini U, Hultgren C, Brostro C, Birk M, Kim S, Sällberg M. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease Progression, CCR5 Genotype, and Specific Immune Responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:463–466.

Wasmuth HE, Werth A, Mueller T, Berg T, Dietrich CG, Geier A, Schirin-Sokhan R, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, Lammert F. CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in two independent cohorts of hepatitis C virus infected patients without hemophilia. *J Mol Med.* 2004 Jan;82(1):64-9. Epub 2003 Dec 13.

Woitak RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology.* 2002 Jun;122(7):1721-8.

Xiang J, George SL, Wunschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet.* 2004 Jun 19;363(9426):2040-6.

Xin X, Shioda T, Kato A, Liu H, Sakai Y, Nagai Y. Enhanced anti-HIV-1 activity of CC-chemokine LD78beta, a non-allelic variant of MIP-1alpha/LD78alpha. *FEBS Lett.* 1999 Aug 27;457(2):219-22.

Zilmer K, Ustina V, Aug T. HIV infektsioon Eestis. Eesti Arst 2005; (4); 244-248