

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Mikrobioloogia Instituut

Helen Uibopuu

**HIV-1 CRF06_cpx *env* V3 PIIRKONNA
MITMEKESISUS JA SELLE SEOS CCR5 JA
TEMA LIGANDIDE GENOTÜÜPIDEGA**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendaja: prof Irja Lutsar, MD, PhD

Tartu 2010

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus.....	5
1 Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 HIV levik	6
1.2 HIV infektsiooni olukord Eestis	7
1.3 Inimese immuunpuudulikkuse viirus.....	8
1.4 Viiruse seondumisvalk.....	10
1.5 HIV troopsus.....	12
1.6 Inimesepoolsed faktorid.....	13
1.6.1 Rakuline CD4 retseptor.....	13
1.6.2 Kemokiini retseptorid	14
1.6.2.1 CC kemokiini retseptor 5	15
1.6.2.2 CXC kemokiini retseptor 4	16
1.6.3 CCR5 Δ 32 deletsioonmutatsioon.....	17
1.6.4 CCR5 haplotüübid	18
1.6.5 CCL3 geeniklaster	18
1.6.6 CCL5.....	19
1.7 Viiruse troopsuse määramine.....	20
1.7.1 Viiruse troopsuse määramine fenotüübiliste testidega	20
1.7.2 Viiruse troopsuse määramine genotüübi järgi	21
1.7.2.1 Wetcat.....	22
1.7.2.2 webPSSM.....	25
1.7.2.3 Fortinbras PSSM.....	25
1.7.2.4 Geno2pheno (Genafor)	25
1.7.3 Genotüübiliste testidega troopsuse määramine HIV rekombinantsete tüvede puhul	26
2 Eksperimentaalne osa.....	28
2.1 Uurimustöö eesmärgid	28
2.2 Materjal ja meetodika	29
2.2.1 Uuritavad patsiendid ja proovid.....	29

2.2. Nukleinhapete eraldamine	29
2.2.3 Viiruse V3 piirkonna amplifikatsioon ja sekveneerimine	30
2.2.3.1 Pöördtranskriptsioon	30
2.2.3.2 Nested PCR	31
2.2.3.3 Sekveneerimine.....	32
2.2.4 HIV V3 järjestuste analüüs	32
2.2.5 Viiruse troopsuse hindamine genotüübiliste meetoditega	33
2.2.5.1 V3 piirkonna troopsuse hindamine „lihtsate reeglite“ abil	33
2.2.5.2 Troopsuse hindamine klassifikaatoritega.....	33
2.2.5.2.1 Wet Cat algoritmid.....	33
2.2.5.2.2 WebPSSM	34
2.2.5.2.3 Fortinbras PSSM.....	34
2.2.5.2.4 Geno2pheno	34
2.2.6 Geneetiliste markerite määramine	35
2.2.7 Statistiline analüüs	36
2.3 Tulemused.....	37
2.3.1 HIV V3 järjestuse sekveneerimine	37
2.3.1.1 Mutatsioonid V3 konserveerunud järjestuses	37
2.3.2 Viiruse troopsuse hindamine.....	39
2.3.2.1 Viiruste troopsused vastavalt 11/25 ja 11/24/25 reeglitele	39
2.3.2.2 Üldise laengu reegel.....	40
2.3.2.3 Viiruse troopsuse hindamine klassifikaatoritega	40
2.3.2.4 Troopsuse määramise meetodite võrdlus.....	41
2.3.3 Geneetiliste markerite määramine	43
2.3.4 Assotsiatsioonianalüüs	45
2.4 Arutelu	46
Järeldused.....	51
Kokkuvõte.....	52
Tänuavaldused	52
Summary	53
Kasutatud kirjandus	55

Kasutatud lühendid

AIDS	omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ARV	antiretroviirus-, retroviirusvastane
CCL	CC kemokiini ligand (<i>CC chemocine ligand</i>)
CCR	CC kemokiini retseptor (<i>CC chemokine receptor</i>)
CD4	differentseerumise klaster, raku pinnaretseptor (<i>cluster of differentiation</i>)
CRF	rekombinantne vorm (<i>circulating recombinant form</i>)
CXCR	CXC kemokiini retseptori (<i>CXC chemokine receptor</i>)
D/M	Kaksik – segu (<i>dual/mixed</i>)
DEPC	dietüülpürokarbonaat
DNA	desoksüribonukleiinhape (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
gp	Glükoproteiin
GPCR	G-valguga seotud retseptor (<i>G protein-coupled receptor</i>)
HIV	inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	inimese leukotsüüdi antigeen (<i>human leucocyte antigen</i>)
MHC	peamine koesobivuskompleks (<i>major histocompatibility complex</i>)
MSM	mehed, kes seksivad meestega (<i>men having sex with men</i>)
MuLV-RT	hiire leukeemia viiruse pöördtranskriptaas (<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>)
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	ribonukleiinhape (<i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	pöördtranskription-polümeraas-ahelreaktsioon (<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>)
SRF	sekundaarne rekombinantne vorm (<i>secondary recombinant form</i>)
SVM	tugivektor masin (<i>support vector machine</i>)
TCR	T-raku retseptor (<i>T-cell receptor</i>)

Sissejuhatus

Inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) nakkust iseloomustab haiguskulu suur varieeruvus nakatunute seas. Viiruse latentse faasi pikkus võib ulatuda paarist aastast aastakümneteni.

Seejuures põhjused, miks ning kuidas toimub aastakümneid kestva asümptomaatilise faasi puhul organismi poolt nakkuse kontroll, ei ole teada. Samuti ei ole selge kui suur osa selles on inimese geenidel ning kui suur viiruse omadustel.

HIV tüved jagunevad järjestuse alusel gruppideks ning alatüüpideks. Lisaks on võimalik jagada viiruseid vastavalt nende võimele nakatada erinevaid rakke ehk viiruste troopsusele. Mitmetes uuringutes on näidatud, et viiruse troopsus võib mõjutada HIV nakkuse prognoosi.

Inimese geneetilise faktori olulist näitab viirusele eksponeeritud inimeste erinev HIV-iga nakatumise tõenäosus.

Varasemalt on näidatud Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis HIV nakatumise sõltuvust CCL3L1 geenikoopiaarvust ning CCR5 ja CCL5 haplotüüpidest.

Antud töö eesmärgiks on uurida, kas HIV nakatumist ning nakkuskulgu mõjutavad geneetilised markerid võivad olla seotud viiruse erineva troopsusega.

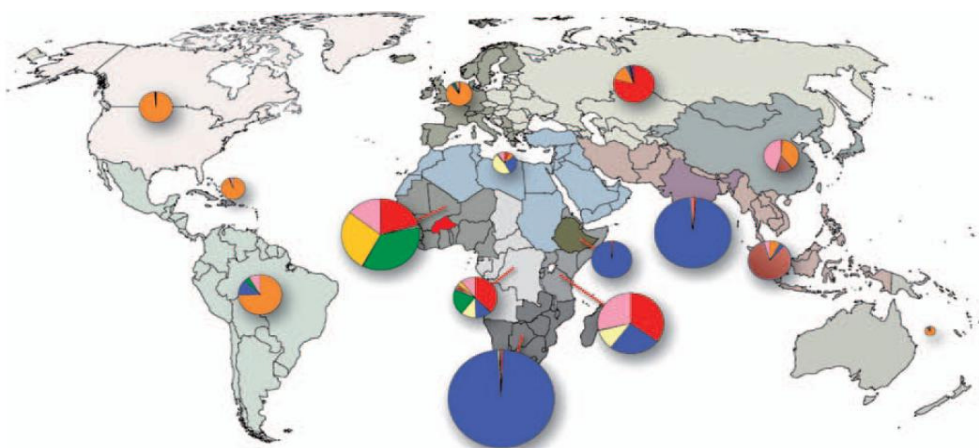
1 Kirjanduse ülevaade

1.1 HIV levik

Ülemaailmse HIV-i epideemia peamiseks põhjustajaks on HIV-1. HIV-2 nakatamisvõime on oluliselt madalam ja viiruse poolt põhjustatud haiguse kulg on kergem ning seetõttu on HIV-2 nakatunute hulk ning leviala, võrreldes HIV-1-ga, marginaalne (Gilbert *et al.*, 2003).

HIV-1 tüvede levik maailma piirkondade vahel on erinev. Euroopas on enamlevinud M grupi B alatüüpi kuuluvad HIV-1 tüved, kuid viimastel aastatel on suurenenud mitte-B alatüüpi kuuluvate HIV-1 tüvede hulk (joonis 1)(De Mendoza *et al.*, 2009).

Aafrika päritolu immigratsiooni tõttu on Euroopas viimasel ajal suurenenud mitte-B alatüüpi viiruste ning B alatüüpi kuuluvate viiruste rekombinatsioonil tekkinud rekombinantsete tüvede (CRF) levik. Piirkondades, kus on rekombinantide sagedus kõrge, on tekkinud omakorda peamiselt B-alatüüpi viiruste ning CRF-ide rekombinatsioonil sekundaarsed rekombinantsed vormid (SRF) (Galimand *et al.*, 2010).



Joonis 1. HIV alatüüpide ja rekombinantsete vormide levik. Vastavalt HIV-1 levikule on riigid arvestatud kokku piirkondadeks, mis on joonisel värvitud sama tooni ning nende piirkondade HIV-1 alatüüpide ning rekombinantsete vormide jaotus on märgitud juurde sektordiagrammil. Sektordiagrammi läbimõõt näitab HIV nakatunute hulka piirkonnas. Eraldi on punasega tähistatud Burkina Faso, kus on määratud Eestis enamlevinud CRF06_cpx rekombinantset tüve enne HIV-1 epideemia algust Eestis. Alatüübid: A-punane, B-kollane, C-sinine, D-helekollane, F,G, H, J, K – roheline; CRF01_AE-pruun; CRF02_AG-beež; CRF03_AB-tumelilla; teised rekombinantsed tüved-roosa ((Hemelaar *et al.*, 2006) järgi).

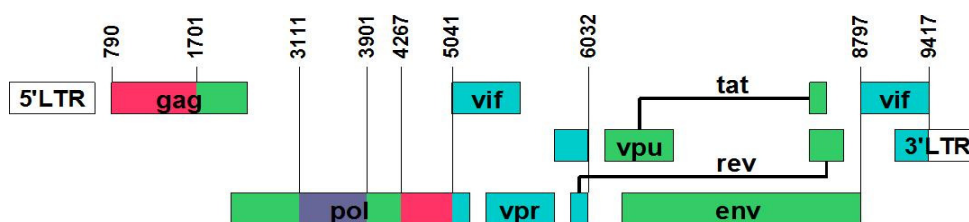
1.2 HIV infektsiooni olukord Eestis

Kuni 2000. aastani olid diagnoositud Eestis vaid üksikud HIV nakkuse juhud. 2000. aasta augustis aga toimus Ida-Virumaal ja Tallinnas plahvatuslik registreeritud haigusjuhtude kasv süstivate narkomaanide hulgas (Uuskula *et al.*, 2002). Järgmise aasta lõpuks oli HIV nakkuse sagedus tõusnud 1053 uue juhuni miljoni elaniku kohta (Ustina *et al.*, 2001; Zetterberg *et al.*, 2004). Kui varasemad Eestis diagnoositud HIV juhud olid sarnaselt Lääne Euroopaga põhjustatud B-alatüüpi kuuluvate viiruste poolt ning nakatumine oli toimunud meeste, kes seksivad meestega (MSM) riskirühmas, siis süstivate narkomaanide seas oli epideemia põhjustatud uue rekombinantse HIV tüve CRF06_cpx poolt (joonis 1).

CRF06_cpx tüvi on keerukas mosaiik A, G, K ja J alatüüpi kuuluvatest tüvedest (joonis 2), mille koretseptoriga seondumist määrav piirkond on sarnane G alatüüpi kuuluvatele viirustele (Zetterberg *et al.*, 2004; Adojaan *et al.*, 2005).

Lisaks on määratud Eestis vähesel määral A alatüüpi HIV-1 tüvesid, mis on peamiselt levinud Ida-Euroopas ning Venemaal ning A-alatüüpi ning CRF06_cpx mosaiikviiruseid (Adojaan *et al.*, 2005; Avi *et al.*, 2009; Bobkov *et al.*, 2004).

Alates HIV epideemia algusest on Eesti olnud Euroopas esmanakatunute hulgaga miljoni elaniku kohta esimesel kohal (van de Laar *et al.*, 2009)(van de Laar and Likatavicius 2009). 2009. aastal registreeriti Eestis 306 HIV nakatumise juhtu 1 miljoni elaniku kohta. 2009. aasta lõpuks oli Eestis diagnoositud kokku 7320 HIV nakatumist (www.terviseamet.ee).



Joonis 2. CRF06_cpx viiruse genoomi struktuur. Erinevate värvidega on märgitud HIV-1 alatüüpidele omased järjestused, millest rekombinant koosneb. ■ A-alatüüp; ■ G alatüüp; ■ K-alatüüp; ■ J-alatüüp (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> järgi).

1.3 Inimese immuunpuudulikkuse viirus

Omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*) on põhjustatud kahte tüüpi inimese immuunpuudulikkuse viiruste poolt – HIV-1 ja HIV-2 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Clavel *et al.*, 1986).

HIV-1 ning HIV-2 kuuluvad retroviiruste perekonna lentiviiruste alam perekonda. Lentiviiruseid iseloomustab nende võime nakatada immuunsüsteemi rakke, nakkuse pikk inkubatsiooni aeg, viiruse DNA sisenemine peremeesorganismi genoomi, ning seetõttu pikk püsivus organismis ja samas kõrge muutlikkus, mis on tingitud viiruse RNA-lt DNA sünteesil ehk pöördtranskriptsioonil tehtud vigadest. Peremeesrakku tungimiseks seondub HIV immuunrakkudel oleva CD4 retseptori ning CCR5 või CXCR4 koretseptoriga, seejärel toimub kapsiidis viiruse RNA-lt proviiruse DNA süntees, mis integreeritakse viiruse integraasi poolt raku DNA-sse. Kuna viiruse valkude ning RNA tootmine toimub koos rakuliste protsessidega eelistab viirus DNA-sse sisenemisel genoomi aktiivseid piirkondi (Mitchell *et al.*, 2004).

Antiretroviirusvastase raviga (ARV) on võimalik suruda viiruse replikatsioon aastateks alla tasemeni, kus viirus ei ole patsiendi plasmast määratav. Antiretroviirusravimeid on loodud peaaegu kõikide HIV elutsükli etappide blokeerimiseks. Ravirežiimi rikkumisel tekivad viiruse muutlikkuse tõttu kiirelt ravimile resistentsed tüved. Siiani pole lõplik viiruse väljaravimine organismist veel võimalik, peamiseks põhjuseks peetakse viiruste säilimist puhkavates CD4+ rakkudes (Alexaki *et al.*, 2008).

HIV-1 tüüpi viirused jagatakse viiruse *env* geeni järjestuse fülogeneetilise analüüsi alusel gruppidesse M (*major*), N (*non-M, non-O*), O (*outlier*) ja P (puudub sõnaline vaste)(Leitner *et al.*, 1995; Plantier *et al.*, 2009).

M gruppi kuuluvad viirused jagunevad omakorda alatüüpideks A-D, F-H ja J-K. Esmalt eraldi alatüüpideks nimetatud E ja I tüüpi viiruste puhul on hiljem avastatud, et tegu on rekombinantsete viirustega, mis on tekkinud erinevatesse alatüüpidesse kuuluvate viiruste järjestuste rekombineerumisel. I alatüüpi viirus on tekkinud A ja G alatüübi rekombineerumisel ning sisaldab lisaks veel unikaalset I järjestust. Varasemalt E-alatüübiks nimetatud viirus on tekkinud A ning teadmata päritolu E

alatüüpi kuuluvate viiruste rekombinatsioonil (Gao *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2000).

Tsirkuleerivad rekombinantsed vormid ehk mosaiikviirused on mitmesse erinevasse HIV alatüüpi kuuluva viiruse rekombinatsioonil tekkinud viirustüved, mis on olulised HIV nakkuse levikul ja on avastatud vähemalt kolmelt isikult, kes ei ole üksteisega epidemioloogiliselt seotud (www.hiv.lanl.gov).

Unikaalsed rekombinantsed vormid (URF- *unique recombinant form*) eristuvad CRF-idest selle poolest, et on tekkinud vaid ühe indiviidi siseselt mitme erineva viirusega nakatumise ehk superinfektsiooni tulemusel organismi sattunud viiruste rekombinatsioonil, ning ei ole kandunud teistele isikutele (www.hiv.lanl.gov).

1.4 Viiruse seondumisvalk

Viiruse rakule seondumiseks vajalikud retseptorvalgud sünteesitakse viiruse *env* geenilt. *Env* geen on HIV genoomis kõige varieeruvam piirkond, mis on umbes 2-3 korda kõrgema järjestuse varieeruvusega kui *pol* geen (Gaschen *et al.*, 2002).

Viiruse seondumisvalgu tootmiseks sünteesitakse nakatunud rakus 845 kuni 870 aminohappe pikkune prekursor-valk gp160, mis glükosüleeritakse. Glükosüleeritud valk moodustab rakus trimeerid. Seejärel lõigatakse trimeeri koosseisus gp160 rakulise proteaasi poolt kaheks osaks ja moodustub ümbrisvalk gp120 ja transmembraanne glükoproteiin gp41. Gp120 ja gp41 jäävad trimeeri koostises omavahel seotuks labiilse mittekovalentse sidemega (Wyatt and Sodroski 1998).

Gp120 koosneb kahest domeenist, sisemisest ja välimisest ning neist ühendavast β -lehest. Trimeeri sisemuses paiknev sisemine osa on seotud gp41-ga. Välimine osa on tugevalt glükosüleeritud ja selle kaudu toimub kinnitumine rakulistele retseptoritele (Kwong *et al.*, 1998).

Gp120 valgu ektodomeeni V3 piirkond koosneb kahest konserveerunud järjestuse ning ehitusega osast - tipust ning tuumast, mis on olulised koretseptoriga seondumisel. V3 järjestuse tipu struktuur koosneb kahest antiparalleelsest beeta lehest, mis moodustavad juuksenõela struktuuri. V3 tipu ja tuuma osa vahele jääb varieeruva järjestusega tüve piirkond (joonis 3).

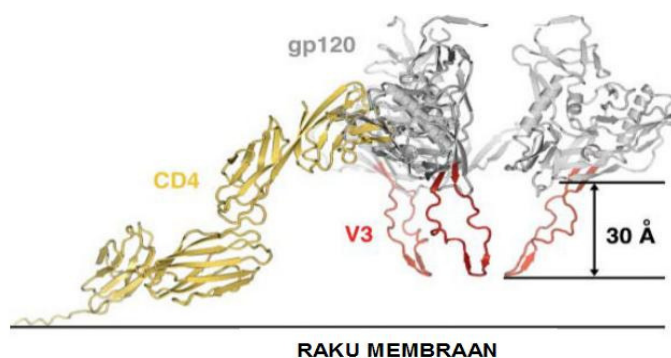
V3 järjestus koosneb keskmiselt 35-st aminohappest varieerudes 31-st kuni 39-ni. V3 piirkonna iseloomustamiseks kasutatakse üldise laengu mõistet, mis tähendab V3 aminohappejärjestuses paiknevate positiivse laenguga aminohapete arvu, millest on lahutatud negatiivse laenguga aminohapete arv.

Aminohapete üldine kogulaeng on V3 piirkonnas positiivne, ulatudes +2 kuni +10-ni. Järjestuste analüüsil on täheldatud, et koretseptori valik viiruse sisenemisel on seotud V3 üldise laenguga, mida suurem on V3 järjestuste laeng, seda tõenäosusemalt kasutab viirus rakule seondumisel CXCR4 koretseptorit (Fouchier *et al.*, 1992; Lwembe *et al.*, 2009).

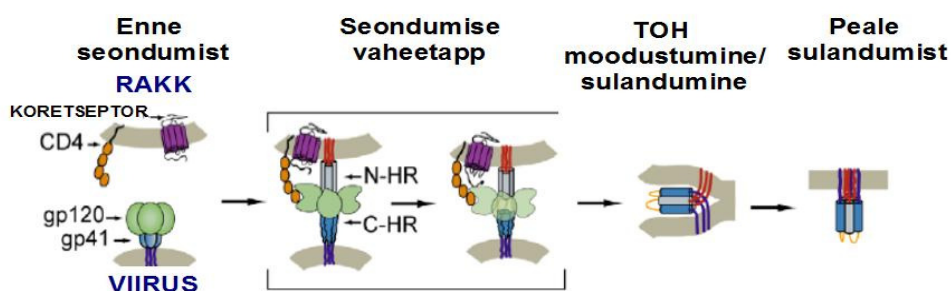
V3 piirkonna tipu struktuur koosneb kolmest konserveerunud aminohappest – kahest glütsiinist, ning nende vahel asuvast proliinist. V3 piirkonna tuuma struktuur koosneb konserveerunud aminohappepaarist – arginiinist ja proliinist. Varieeruvast tüve piirkonnas paiknevad järjestused, millest sõltub millise koretseptoriga on viirus

suuteline seonduma. Järjestuste analüüs on näidanud, et V3 järjestuses on koretseptori valikul olulised positsioonid 11 ja 25, kus paiknevad aminohapped seonduvad spetsiifiliselt koretseptori erinevate piirkondadega ning seeläbi määravad koretseptori valiku (de Jong *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2005).

Viiruse sisenemine rakku toimub läbi mitme etapi. Esiteks seondub CD4 viiruse gp120-ga põhjustades viiruse retseptori konformatsioonilised muutused. Järgnevalt toimub seondumine rakulise koretseptoriga, CCR5 või CXCR4-ga (joonis 4)(Feng *et al.*, 1996). Viiruse sisenemiseks seondub samaaegselt viiruse seondumisvalgu V3 piirkonna tuumaosa koretseptori N-terminusega ja tipu osa koretseptori teise ekstratsellulaarse osaga (Huang *et al.*, 2005).



Joonis 3. V3 struktuur (punane) gp120 trimeeris (hall) sihtmärkraku pinnale seondununa. Gp120-ga on seondunud neljast domeenist koosnev CD4 retseptor (kollane). V3 järjestuse varieeruvad osad, mis on seotud koretseptori valikuga paiknevad vertikaalselt ning on märgitud peenema joonega. Konserveerunud tipu ja tuuma piirkonnad on märgitud paksu noolega (Huang *et al.*, 2005 järgi).



Joonis 4. Viiruse antireseptori seondumine rakulisele retseptorile. Env valgu alühik gp120 (roheline) seondub rakulise CD4-ga (oranž), mis põhjustab gp41 N-terminuse (punane) liikumise sihtmärk raku membraanini. Sellele järgneb gp120 seondumine kemokiini koretseptorile (lilla), mis viib ektodomeeni kokkupakkumiseni ning membraanide üksteisele vastu liikumiseni. Järgneb membraanide sulandumine ((Kahle *et al.*, 2009)järgi).

1.5 HIV troopsus

Juba enne koretseptorite avastamist täheldati HIV-1 võimet nakatada nakkuse algaasis makrofaage ning monotsüüte ning AIDS-i faasis T-rakke (Schuitemaker *et al.*, 1992). Sellist viiruse võimet nakatada kindlat tüüpi rakke nimetatakse troopsuseks ning see on seotud monotsüütide ning makrofaagide pinnal ekspresseeritud CCR5 ning T-rakkude pinnal ekspresseeritud CXCR4 retseptori kasutamisega rakku sisenemiseks viiruse poolt (Alkhatib *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996).

HIV-1 vajab rakku tungimiseks kahe rakulise retseptori, peamisena CD4 retseptori ning koretseptorina kemokiini retseptori olemasolu. *In vivo* on HIV-1 võimeline seonduma CC kemokiini retseptoriga 5 (CCR5) ja CXC kemokiini retseptoriga 4 (CXCR4)(Alkhatib *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996).

Vastavalt viiruse võimele kasutada koretseptorina CCR5, CXCR4 retseptorit või mõlemat, jagatakse viiruseid R5, X4 ja R5X4 ehk kaksiktroopseteks. Viiruse populatsioonide ehk reaalselt uuritavast materjalist eraldatud viiruste kogumite puhul, mis suudavad seonduda mõlema retseptoriga, võib olla tegu seguga kõigist kolmest viiruse tüübist ning seega nimetatakse selliseid viiruspopulatsioone kaksik/seguviirusteks (D/M – *dual/mixed*)(Berger *et al.*, 1999; Whitcomb *et al.*, 2007).

In vitro katsetes on näidatud, et ka väikesest muutusest viiruse genoomses järjestuses piisab viiruse troopsuse muutuseks, mis võimaldab viirusel siseneda rakku CCR5 retseptori asemel CXCR4 retseptori abil (Boyd *et al.*, 1993). Üldine arvamus on siiski, et X4, R5 ja R5X4 viiruste troopsus ei muutu pidevalt mutatsioonide tulemusel. Organismis olevas viiruskogumis on olemas segu erineva troopsusega viirustest, milles algselt on ülekaalus ühe troopsusega tüvi, kuid aja möödudes võib kasvada välja teine ning seetõttu muutuda viiruspopulatsioonis prevaleeriv troopsus (Arien *et al.*, 2006).

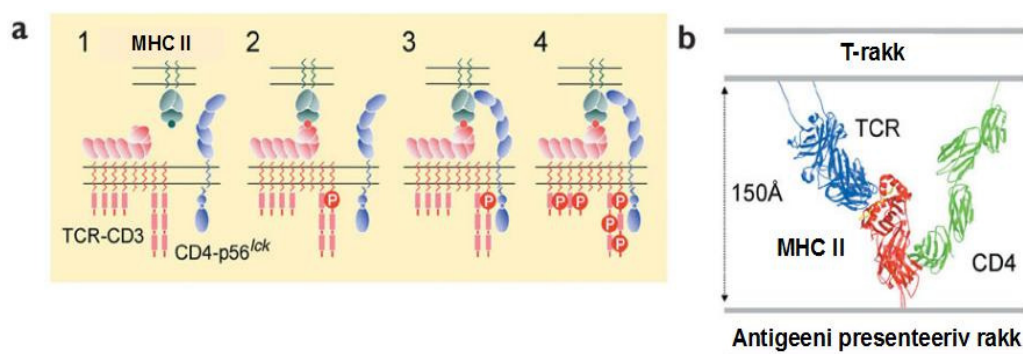
In vitro on näidatud X4 viiruste puhul suuremat tsütopaatilisust võrreldes R5 viirustega (Herbein *et al.*, 1998).

1.6 Inimesepoolsed faktorid

1.6.1 Rakuline CD4 retseptor

CD4 (differentseerumisklaster 4) on glükoproteiin, mis kuulub immunoglobuliinide superperekonda ning on kodeeritud 12. kromosoomi lühikeses õlas (12p3.1) paiknevalt geenilt. CD4 on ekspresseeritud peamiselt helper T-lümfotsüütide, kuid ka makrofaagide, monotsüütide, Langerhansi rakkude, B-lümfotsüütide, dendriitrakkude, eosinofiilide ja teiste rakkude pinnal. Inimese immuunpuudulikkuseviirusega nakatumisel on CD4 esmaseks retseptoriks viiruse seondumisel raku pinnale (Wood *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1999).

T-lümfotsüüdid ei ole suutelised iseseisvalt ära tundma antigeeni ning seetõttu vajavad nad aktiveerumiseks antigeeni esitlemist teiste rakkude poolt peamise koosobivuskompleksi (MHC – *major histocompatibility complex*) abil. Antigeeni äratundmise protsessis funktsioneerib CD4 T-raku antigeeni retseptori (TCR) koretseptorina seondudes MHCII membraani lähedal paikneva mittepölmorfse piirkonnaga (joonis 5) (Kwong *et al.*, 1998).



Joonis 5. CD4 seondumine MHC-le (a) Kui MHC-I on esitletud ebaoluline molekul (roheline), siis seondumist ei toimu (1). Ainult TCR seondumine agonisti molekuli esitlevale MHC-le, põhjustab TCR-i nõrga fosforüleerumise (2). Signaali ülekandeks peavad seonduma omavahel retseptorite MHC II ja TCR rakuvälised ning raku sisesed osad (3). Stabiilse seondumise tulemusel toimub türosiinide fosforüleerimine retseptorite rakusisestes osades, mis on vajalikud signaali ülekandeks. (b) CD4 seondub MHCII molekuli konserveerunud piirkonnaga, mis paikneb eraldi kohast, kus toimub molekulide esitlemine TCR-ile (Davis *et al.*, 2003).

1.6.2 Kemokiini retseptorid

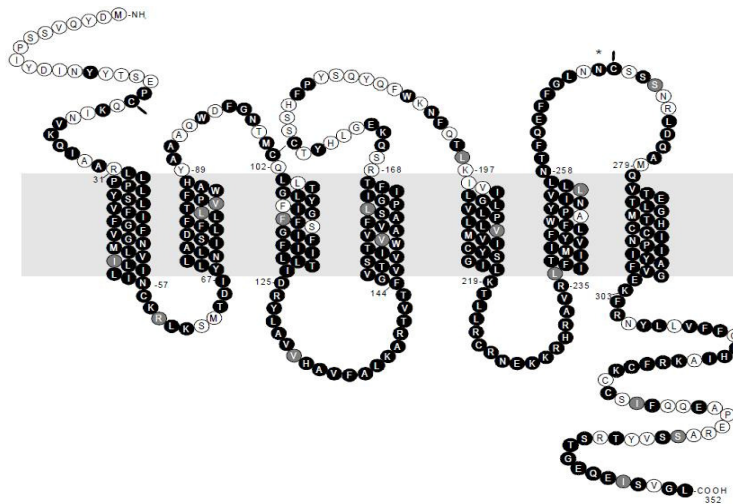
Viiruse sisenemisel rakku on HIV-1 koretseptoriteks kemokiini retseptorid, mis kuuluvad G-valguga seotud retseptorite perekonda (GPCR – *G protein-coupled receptor*) (joonis 6). GPCR perekond on suurim membraanivalkude perekond, moodustades 3% inimese genoomi geenidest ning osaledes paljudes organismis toimuvates protsessides. Kokku ligi 800 GPCR-i jagunevad olfaktorseteks, mis on seotud kõikide aistmisprotsessidega ning mitteolfaktorseteks GPCR-ideks. Paljude GPCR-ide funktsioon on veel selgusetu (Fredriksson *et al.*, 2003). GPCR-id ning nendest lähtuvad signaalirajad on head ravimi märklauad ning neile on suunatud umbes 50% mitte-antimikroobsetest ravimite (Takeda *et al.*, 2002; Kroeze *et al.*, 2003).

Põletikuliste protsesside puhul toimub leukotsüütide aktiveerimine ja nende suunamine põletikukoldesse kemokiinide seondumisel leukotsüütide pinnal olevatele kemokiinireseptoritele (Feng 2000).

Erinevad kemokiinid võivad sõltuvalt retseptorist, kontsentratsioonist ning sihtmärkrakust toimida retseptorite suhtes endogeensete agonistidena, mis viivad retseptori aktivatsioonile ning signaali ülekandele või endogeensete antagonistidena, mis takistavad retseptorilt signaali ülekannet (Proudfoot *et al.*, 1999; Ansari *et al.*, 2007).

Sarnaselt kemokiini retseptori loomuliku ligandi seondumisele põhjustab HIV seondumine retseptori aktivatsiooni, ning suudab seeläbi mõjutada raku signaaliradu (Davis *et al.*, 1997).

Samas suudavad HIV-iga nakatumist mõjutada ka kemokiinid, seondudes HIV koretseptoritele ning seeläbi takistades viiruse sisenemist rakku (Menten *et al.*, 2002).



Joonis 6. Kemokiini retseptori struktuur CCR5 näitel. Hall horisontaalne ala märgib raku membraani, sellest üleval paiknevad retseptori kolm ekstratsellulaarset osa ning N-terminaalne ots. Allpool paiknevad retseptori rakusisesed osad. Eriti konserveerunud piirkonnad on heledat värvi. CCR5 retseptori ainuke glükosüleerimiskoht on märgitud tärniga. (McNicholl *et al.*, 1997).

1.6.2.1 CC kemokiini retseptor 5

CCR5 (tuntud ka kui CD195) on kemokiini retseptor, mis on kodeeritud 3. kromosoomi lühikeses õlas (3p21.31) paikneva *ccr5* geeni poolt ning on ekspresseeritud peamiselt T-rakkude ning makrofaagide pinnal ning HIV nakkuse puhul toimub selle abil R5 tüüpi viiruste sisenemine rakku (Atchison *et al.*, 1996).

CCR5-ga on suutelised seonduma mitmed kemokiinid. CCR5 agonistid jagunevad järjestuse sarnasuse järgi kaheks grupiks. Esimesse gruppi kuuluvad CCL3 (*chemokine ligand 3*, teise nimetusega MIP-1 alfa - *macrophage inflammatory protein 1 alpha*), CCL4 (MIP-1 beeta - *macrophage inflammatory protein 1 beta*) ja CCL5 (RANTES - *regulated on activation normal T expressed and secreted protein*), mis seonduvad retseptorile tugevalt ning põhjustavad tugeva retseptori aktivatsiooni.

Teise grupi moodustavad CCL7 (MCP-3 – *monocyte chemotactic protein-1*), CCL8 (MCP-2) ja CCL13 (MCP-4), mis on osalised agonistid, mille affiinsus ja efektiivsus retseptoriga seandumisel on madalam kui täielikel agonistidel (Blanpain *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2006).

HIV nakkuse puhul omavad viiruse koretseptorite loomulikud ligandid, kemokiinid, enamasti viiruse replikatsiooni takistavat mõju - seonduvad kemokiini retseptorile hõivavad nad selle, mistõttu ei ole viirusel võimalik retseptorile seonduda ning

seetõttu rakku siseneda. Samas esineb ka erandeid. Nii on näidatud, et CCL2 võib soodustada HIV replikatsiooni ning CCL2 allasurumine põhjustab viiruse hulga vähenemise (Ansari *et al.*, 2007). HIV nakkust mõjutab oluliselt CCR5 retseptori ekspressiooniga seotud CCR5 Δ 32 mutatsioon. Antud mutatsiooni suhtes homosügootidel ei ekspresseerita CCR5 retseptoreid raku pinnale ning see annab osalise resistentsuse HIV-1 suhtes (McNicholl *et al.*, 1997).

1.6.2.2 CXC kemokiini retseptor 4

CXCR4 on kemokiini retseptor, mis on kodeeritud 2. kromosoomi pikas õlas (2q21) paiknevalt geenilt. CXCR4 retseptor on ekspresseeritud mitmetel rakkudel (lisa 1), kuid peamiselt T-lümfotsüütide pinnal. CXCR4 ligandiks on CXCL4 (CXC ligand 4 ehk ka SDF-1 – *stromal cell-derived factor 1*). CXCR4 retseptor on koretseptoriks HIV X4 troopsusega viiruste rakku sisenemisel (Balter 1996).

CXCR4 retseptor ning CXCL4 on seotud peamiselt vereloome, närvisüsteemi arengu ning angiogeneesiga. CXCR4 ning ka CXCL4 ekspressiooni puudumine põhjustab loote surma, mis näitab nende olulisust organismi funktsioneerimisel (Zou *et al.*, 1998).

CXCR4 on rakkude pinnal ekspresseeritud erineval tasemel, samuti esineb palju posttranslatsioonilisi modifikatsioone. Erinevate rakkude puhul esinevad CXCR4 retseptori erinevalt glükosüleeritud vormid ehk glükovormid. See võib olla seotud HIV võimega nakatada rakke erineva efektiivsusega. Samuti on näidatud, et kui eemaldada CXCR4 retseptorilt N-seoselised glükosüleerimiskohad, on võimelised sellise retseptoriga seonduma ka R5 troopsusega viiruse tüved (Chabot *et al.*, 2000).

1.6.3 CCR5Δ32 deletsioonmutatsioon

CCR5 delta 32 deletsioonimutatsioon on enimuuritud geneetiline muutus, mis mõjutab viirusega nakatumist ning nakkuse kulgu. CCR5Δ32 mutatsioon on 32 aluspaari pikkune deletsioon CCR5 geeni kodeerivas alas, mis põhjustab raaminihke ning seetõttu varajase stoppkoodoni (TGA).

Karboksü-terminaalselt lühenenud CCR5 retseptorit ei ekspresseerita raku pinnal. Muteerunud retseptoril puudub funktsioneerimisvõime, kuna valgus järjestusest on kadunud kolm transmembraanset domeeni, neist kaks välist domeeni ning üks sisene, mis osaleb G-valguga seondumisel ja seeläbi signaali ülekandel (Martinson *et al.*, 1997; McNicholl *et al.*, 1997).

Inimesed, kellel esineb CCR5Δ32 mutatsioon mõlemas CCR5 geeni alleelis, ehk on antud mutatsiooni suhtes homosügootsed, on resistentsed R5 troopse HIV nakkuse suhtes (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996). Kuna viirus võib organismi siseneda kasutades koretseptorina CXCR4 retseptorit, on täheldatud üksikutel juhtudel CCR5Δ32 mutatsiooni suhtes homosügootsetel isikutel X4 troopse tüvega infektsiooni. Sellised juhud on aga väga harvad kuna valdav enamus HIV populatsioonist on R5 troopsed (Gorry *et al.*, 2002).

CCR5Δ32 mutatsiooni suhtes heterosügootide puhul on täheldatud pikemat asümptomaatilist faasi ning madalamat viiruskoormust peale serokonversiooni (Meyer *et al.*, 1997; Chalmet *et al.*, 2008), kuid on ka uuringud, kus pole mutatsiooni suhtes heterosügootsuse ja haiguse kulu vahel seost leitud (Adojaan *et al.*, 2007).

CCR5Δ32 mutatsioonil ei ole organismi funktsioneerimisele erilist mõju sobib see hästi markeriks HIV vastase ravi väljatöötamisel. 2007. aastal tuli turule esimene antiretroviirusravim Maraviroc, mis blokeerib CCR5 retseptorit ning seeläbi inhibeerib viiruse sisenemist rakku (Samson *et al.*, 1996; Fatkenheuer *et al.*, 2005).

CCR5Δ32 mutatsiooni esinemissagedus euroopiidses populatsioonis on suhteliselt kõrge ulatudes 10 – 20%. Eestlastel on delta 32 muteerunud alleeli sagedus keskmiselt 14,8%, kuid Aafrika ning Aasia päritolu populatsioonides on alleeli sagedus alla 1% (Martinson *et al.*, 1997; Kalev *et al.*, 2003).

1.6.4 CCR5 haplotüübid

CCR5 retseptorit kodeeriva geeni järjestuses leidub palju mutatsioone. Lisaks CCR5 Δ 32 mutatsioonile on leitud CCR5 geenist 303 T>A muutus (ka m303 või C101X), mis põhjustab varajase stoppkoodoni tekke ja mittefunktsionaalse CCR5 retseptori tootmise (Blanpain *et al.*, 2000).

DNA järjestuste varieeruvuse ning järjestuste võrdleva genoomika alusel on võimalik jagada CCR5 kodeerivad järjestused haplotüüpideks (Mummidi *et al.*, 2000).

CCR5 haplotüübi analüüs näitas, et Aafrika ning Euroopa päritolu inimestel on HIV nakkuse kas raskem või kergem kulg mõjutatud erinevate CCR5 haplotüüpide poolt. On arvatud, et CCR5 haplotüüpide erinev levik ning sagedus piirkondade vahel võib olla mõjutatud teiste CCR5 retseptoriga seotud haiguste poolt tingitud selektiivsest survest (Gonzalez *et al.*, 1999).

1.6.5 CCL3 geeniklaster

17. kromosoomi pikas õlas paiknevad erinevates kordustes kemokiine kodeerivad geenid, mis on olulised nakkushaiguste vastase immuunvastuse väljakujunemisel. CCL3 geeniklastrisse kuuluvad CCL3, CCL3L1, CCL3L2 ning CCL3L3 geenid, mis paiknevad väga lähestikku ning on oma järjestustelt 95% homoloogsed. CCL3 ja CCL3L3 eksonite järjestused on identsed. CCL3 geeniklastri geenid on tekkinud ilmselt CCL3 geeni koopiaarvu muutuse tõttu ebavõrdse ristsiirde tõttu tandemsete duplikatsioonide tulemusena. CCL3L2, mida peetakse pseudogeeniks on tekkinud CCL3L1 või CCL3L3, reduplikatsioonil (Hirashima *et al.*, 1992; Modi 2004) (Shrestha *et al.*, 2010).

On näidatud, et CCR5 retseptorile seondub CCL3-tüüpi kemokiinidest kõige suurema afiinsusega CCL3L1, mida peetakse ka kõige olulisemaks kemokiiniks, mis mõjutab nakatumist HIV-iga takistades viiruse seondumist retseptoriga (Huik *et al.*, 2010; Nibbs *et al.*, 1999).

Kuigi CCL3 ja CCL3L1 kemokiinid erinevad teineteisest vaid kolme aminohappe poolest suudab CCL3L1 valk inhibeerida R5 troopsusega HIV-1 viirusnakkust CCL3-ga võrreldes peaaegu 30 korda paremini (Aquaro *et al.*, 2001).

CCL3L1 esineb genoomis erineva arvu koopiatena ning kõrgem CCL3L1 geenikoopiate arv võib olla seotud kõrgema CCL3L1 ekspressiooniga ja seeläbi omada HIV nakkuse suhtes kaitsvat efekti (Gonzalez *et al.*, 2005). Seda hüpoteesi kinnitab fakt, et šimpansidel, kelle organismis ei kujune SIV tulemusel välja AIDS-i esineb genoomis kõrge CCL3L1 geenikoopiate hulk. CCL3L1 geenikoopiate hulga mõju nakkusele on näidatud ka reesusmakaakide puhul (Degenhardt *et al.*, 2009; Gornalusse *et al.*, 2009).

Inimestel on CCL3L1 geenikoopiate hulk erinevates populatsioonides erinev. Aafrika päritolu populatsioonis on see kõrgem, keskmiselt 6 koopiat, võrreldes muu maailma populatsiooniga, kus CCL3L1 koopiate hulk on keskmiselt 2 diploidset koopiat (Gonzalez *et al.*, 2005). On näidatud, et madala CCL3L1 koopiate arvu puhul on suurem vastuvõtlikkus HIV-1 nakkusele ning kõrgem risk perinataalseks HIV-1 nakkuse omandamiseks (Gonzalez *et al.*, 2005; Meddows-Taylor *et al.*, 2006). HIV nakkuse seos CCL3L1 geenikoopia arvuga on leidnud kinnitust ka Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis (Huik *et al.*,).

1.6.6 CCL5

CCL5 on interleukiin 8 perekonda kuuluv kemokiin. CCL5 toimib leukotsüütide kemoatraktandina ja seondub CCR5-ga, kuid ka CCR3 ja CCR1-ga.

In vitro supresseerib CCL5 HIV replikatsiooni. Uuringutes on leitud, et AIDS-i haigetel patsientidel on CCL5 ekspressioon CD4+ rakkudes täielikult maha surutud. Samas pikaajaliste mitteprogresseerujate puhul toodavad nende CD4+ rakud keskmisest suuremas hulgas CCL5 kemokiini. CCL5 takistab CCR5-le seondudes HIV gp120 seondumist ning lisaks vähendab CCR5 ekspressiooni taset raku pinnal (Mack *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 1998; Saha *et al.*, 1998).

CCL5 ning HIV seoste uurimiseks on viidud läbi peamiselt assotsiatsiooniuuringud, kus haplotüüpe markeerivateks polümorfismideks on CCL5 promooteralas paiknevad kaks ühenukleotiidset polümorfismi (SNP) ning esimeses intronis paiknev SNP (In1.1)(McDermott *et al.*, 2000; An *et al.*, 2002).

On näidatud, et In1.1 paiknev C nukleotiid on seotud CCL5 ekspressiooni mahasurumise ning seetõttu kiirema AIDS-i progressiooniga (An *et al.*, 2002). Ka

promooteralas paiknevate polümorfismide puhul on täheldatud mõju HIV nakatumisele ning haiguse kulule (McDermott *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2001). Haplotüübi analüüs on näidanud, et CCL5 haplotüüpide levik varieerub oluliselt erinevatest maailmajagudest pärit inimeste vahel (Gonzalez *et al.*, 2001).

1.7 Viiruse troopsuse määramine

Inimese leukeemiaviirusega immortaliseeritud lümfotsüütide rakuliini MT-2 nakatamisel inimese immuunpuudulikkuse viirusega ning selle tulemusel osade viiruste poolt põhjustatud süntsüütsiumide tekke järgi avastati viiruste võime nakatada erinevaid rakke, ehk viiruste troopsus. Rakuliinis süntsüütsiumide moodustamise järgi jagatakse viiruseid süntsüütsiume moodustavateks (SI *syncytium-inducing*) ning süntsüütsiume mittemoodustavateks (NSI *non-syncytium-inducing*). Kuna MT-2 rakuliinil ei esine CCR-5 retseptoreid, siis NSI viirused on R5 tüüpi ning SI viirused X4 või R5X4 tüüpi (Tersmette *et al.*, 1988).

Kuna keskmiselt 20%-l HIV B alatüübi viirusega nakatunutest esineb HIV latentse faasi ajal veres X4 või D/M troopsusega viiruseid (de Mendoza *et al.*, 2008), kuid AIDS'i faasis tõuseb selliste viiruste esinemise sagedus kuni 50%-ni nakatunutest, on peetud X4 ja R5X4 viiruste esinemist halva prognoosi näitajaks (Brumme *et al.*, 2005).

Süntsüütsiumite moodustumise järgi viiruse troopsuse hindamine MT-2 rakuliinis on oli pikka aega peamine viis viiruste troopsuse välja selgitamiseks. Kuigi MT-2 test on väga tundlik ning suhteliselt robustne, ei ole seda võimalik kasutada tavapärastes diagnostikalaborites, kuna HIV-1 kultiveerimiseks on vajalik kolmanda ohuklassi nõuetele vastava labori olemasolu.

Seoses CCR5 antagonistide kasutuselevõtuga ARV ravis, mis eeldab enne ravi alustamist viiruse troopsuse hindamist, püütakse leida lihtsamaid, kuid sama usaldusväärseid meetodeid viiruste troopsuse määramiseks.

1.7.1 Viiruse troopsuse määramine fenotüübiliste testidega

Viiruse troopsuse määramisel fenotüübiliste testidega hinnatakse viiruse troopsust vastavalt selle võimele nakatada rakukultuuris CCR5 või CXCR4 retseptoriga rakke

(või mõlemaid). Rakukultuure nakatakse pseudoviirustega, millesse on sisestatud markergeen (näiteks lutsiferaasi geen) ja viiruse *env* järjestus, millelt toodetud viiruslikud seonumisvalgud on ekspresseeritud pseudoviiruse pinnal. Markergeeni aktiveerumine rakukultuuris näitab nakatamise efektiivsust ning viiruse troopsust (Whitcomb *et al.*, 2007).

Hetkel on ainukeseks kliiniliseks kasutuseks valideeritud testiks HIV troopsuse määramiseks Trofile test (Brumme *et al.*, 2005). 2008. aasta juunis vahetati võeti kasutusele Trofile testi uuem ning täpsem versioon ESTA (*Enhanced Sensitivity Trofile Assay*), mille tundlikkus kuni 0,3% D/M viiruspopulatsioonide puhul on 100% (McGovern *et al.*, 2010). Trofile testi miinuseks on tema kõrge hind ning suhteliselt halb kättesaadavus, kuna Trofile testi teostatakse ainult USA-s San Franciscos asuvas laboris. (www.monogrambio.com; www.trofileassay.com). Lisaks Trofile testile on loodud veel mitmeid viirusvektoril ning pseudoviirusega nakatamisel põhinevaid fenotüübilisi teste, kuid need ei ole valideeritud kliiniliseks kasutuseks (Raymond *et al.*,).

1.7.2 Viiruse troopsuse määramine genotüübi järgi

Lisaks fenotüübilistele testidele on võimalik viiruse troopsust hinnata *env* geeni DNA järjestuse ning sellest lähtuva aminohappe järjestuse analüüsil ehk genotüübiliste testidega (Jensen and van 't Wout 2003; Lengauer *et al.*, 2007; Poveda *et al.*, 2009).

Praeguseks on kasutusel kaks peamist lähenemissuunda. Ühel juhul püütakse aminohappejärjestuse abil modelleerida viiruse retseptori valgu sekundaarstruktuure eeldades, et koretseptoriga seondumisel peaks viiruse retseptor sarnanema ehituselt rakulise retseptori loomulikule ligandile (Sander *et al.*, 2007). Teisel juhul hinnatakse troopsust V3 aminohappejärjestuse alusel, kasutades selleks lihtsaid reegleid või klassifikaatoreid (de Jong *et al.*, 1992; Jensen and van 't Wout 2003). Teine lahendus on tavapraktikas kergemini rakendatav. Genotüübilised troopsuse klassifikaatorid on matemaatilised algoritmid, millesse on sisestatud teadaoleva X4, R5 kui R5X4 troopsusega viiruste järjestusi, mille alusel klassifikaator tuletab uuritavate viiruste troopsused. Ükski senini väljatöötatud klassifikaatoritest ei suuda eristada kaksiktroopseid tüvesid ning kõik klassifitseerivad need X4 troopsusega tüvedeks. (Lengauer *et al.*, 2007; Poveda *et al.*, 2009)

Genotüübiliste testide peamiseks eelisteks fenotüübiliste testide ees on nende odavus ja lihtsus. Genotüübiliste testidega on võimalik ennustada troopsust ka madala viiruse kontsentratsiooni puhul. Fenotüübilistel testidel peab viiruse kontsentratsioon uuritavas materjalis olema vähemalt 1000 viiruskoopiat/ml (Pou et al., 2010).

Genotüübiliste meetodite peamine puudus on seotud V3 piirkonna amplifikatsiooni ja sekveneerimisega. Kuna PCR-is amplifitseeritakse eelistatult DNA-d, mida leidub suuremas hulgas, siis toimub läbi selle etapi HIV tüvede seleksioon ning vähemuses olevad tüved kaovad. Sarnane seleksioon toimub veel ka tavapärase Sangeri sekveneerimise puhul. Seetõttu ei ole võimalik sellisel meetodil analüüsida V3 järjestusi, mida on uuritavas materjalis alla 20% kõikidest V3 järjestustest (Raymond et al., 2008).

Seleksiooni aitaks vältida troopsuse hindamisel viirusjärjestuste sekveneerimine kolmanda põlvkonna süvasekveneerimismeetodil, mille puhul ei eelne sekveneerimisele PCR etappi ning iga uuritava proovi puhul sekveneeritakse paralleelselt mitmeid viiruse järjestusi (Swenson et al.,).

Järgnevalt on kirjeldatud erinevaid klassifikaatoreid.

1.7.2.1 Wetcat

Wetcat on vanim matemaatilistel algoritmidel põhinev troopsuse hindamise klassifikaatorite kogum. Kokku on kogumikus viis erinevat klassifikaatorit. HIV troopsuse ennustamiseks sisestatakse klassifikaatoritesse V3 piirkonna aminohapete järjestus ettenähtud vormingus (vt. punkt 2.2.5.2.1). Klassifikaatorite väljatöötamisel on kasutatud vaid B-alatüüpi kuuluvate viiruste järjestusi (Pillai et al., 2003; Lengauer et al., 2007; Poveda et al., 2007).

Wet Cat klassifikaatorid on järgmised:

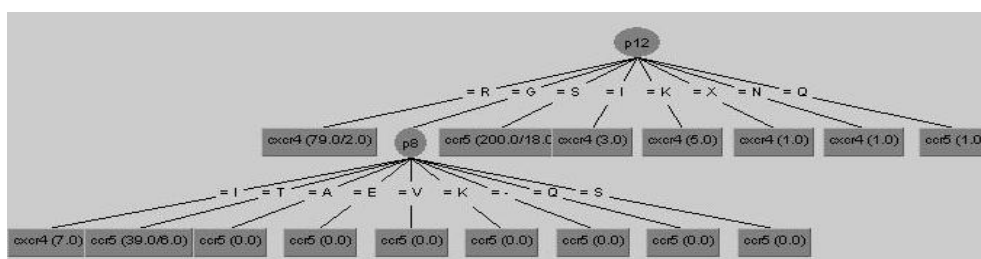
C4.5 – põhineb otsustuspuul (joonis 7)(R. Quinlan).

```

p12 = G
| p6 = E: cxcr4 (1.0)
| p6 = K: cxcr4 (5.0)
| p6 = N
| | p32 = I: ccr5 (17.0)
| | p32 = V
| | | p22 = A: ccr5 (6.0/1.0)
| | | p22 = H: cxcr4 (1.0)
| | | p22 = V: cxcr4 (2.0)
p12 = I: cxcr4 (3.0)
p12 = K: cxcr4 (4.0)
p12 = N: cxcr4 (1.0)
p12 = Q: ccr5 (1.0)
p12 = R: cxcr4 (69.0/2.0)
p12 = S
| p35 = -: ccr5 (1.0)
| p35 = I: ccr5 (156.0/14.0)
| p35 = M: cxcr4 (1.0)
| p35 = P: cxcr4 (2.0)
p12 = X: cxcr4 (1.0)
    
```

Joonis 7. C4.5 algoritmi skemaatiline selgitus. Kui V3 aminohappejärjestuse positsioonis 12 on G (glütsiin) ja positsioonis 6 on E (glutamiinhape) või K (lüsiin), siis on X4 troopne tüvi, kui 12. positsioonis on G (glütsiin) ja positsioonis 6 on N (asparagiin) ja 32. positsioonis I (isoleutsiin), siis on R5 troopsega tüvi jne. Sulgudes olev arv näitab mitu järjestust vastas klassifikaatori väljatöötamisel tingimustele ning peale kaldkriipsu on märgitud arv näitab, mitu neist klassifitseeriti valesti (<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wecat/v3.html>).

C4.5 – p8 ja p12 – algoritm on sama, mis C4.5 puhul, kuid troopse hindamisel lähtutakse vaid positsioonidest 8 ja 12 (joonis 8).



Joonis 8. C4.5 p8 ja 12 klassifikaatori skemaatiline selgitus. Kui V3 aminohappejärjestuse positsioonis 12 on R (arginiin), siis on X4 troopsega tüvi, kui positsioonis 12 on G (glütsiin) ja positsioonis 8 on I (isoleutsiin) siis on X4 troopsega tüvi, kui positsioonis 12 on G (glütsiin) ja positsioonis 8 on T (treoniin) siis on R5 troopsega tüvi jne. Sulgudes olev esimene number näitab klassifikaatori väljatöötamisel vastavaid tulemusi ning kaldkriipsu olev number valesti klassifitseeritud järjestusi (<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wecat/v3.html>).

PART - (*Projective Adaptive Resonance Theory*) on Yongqiang Cao ja Jianhong Wu poolt väljatöötatud algoritm, mis on aluseks viiruse troopsuse määramisel (joonis 9).

```
p12 = S AND
p35 = I: ccr5 (156.0/14.0)

p12 = R: cxcr4 (69.0/2.0)

p8 = T AND
p6 = N AND
p16 = - AND
p23 = F: ccr5 (21.0/1.0)

: cxcr4 (25.0/4.0)
```

Joonis 9. WetCat PART klassifikaatori skemaatiline seletus. Kui positsioonis 12 on S (seriin) ja positsioonis 35 on I (isoleutsiin), siis on R5 troopne tüvi, kui positsioonis 12 on R (arginiin) siis on X4 troopne tüvi, kui positsioonis 8 on T (treoniin) ja 6. positsioonis on N (asparagiin) ja 16. positsioonis lünk ja 23. positsioonis on F (fenüülalaniin), siis on R5 troopne tüvi. Kõikidel teistel juhtudel X4 troopne tüvi. Reeglid kehtivad suunaga ülevalt alla, olulisim reegel on esimene. Sulgudes olev esimene number näitab mitu järjestust klassifikaatori väljatöötamisel vastas antud tingimustele ning peale kaldkriipsu olev number näitab, kui mitu järjestust ei vastanud sellisele reeglile (<http://genomic2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.html>).

SVM – troopsuse hindamise aluseks olevaks algoritmiks on tugivektormasin (*support vector machine*). Lihtsustatult on tugivektormasina puhul tegu nn iseõppiva süsteemiga, millesse sisestatakse SVM-i väljatöötamisel mingi arv teadaolevate R5 või X4 troopsustega viirusjärjestusi. Sisestatud järjestuste aminohapped jaotatakse ruumiliselt gruppideks, millest üks vastab X4 troopsusega viirustele ning teine R5 troopsusega viirustele. Neid erinevaid gruppe eristatakse nende vahel paikneva vektori järgi. Kogu süsteem koosneb suurest hulgast erinevatest vektoritest, mis määratlevad viiruste troopsuseid kõikides positsioonides paiknevate erinevate aminohapete suhtes (Yang et al., 2003). Mida rohkem erinevaid järjestusi SVM-i väljatöötamisel on kasutatud, seda täpsemad on hiljem klassifikaatori tulemused (Seclen et al., 2010).

ChargeRule – viiruse troopsust hinnatakse V3 järjestuse positsioonides 11 ja 25 paiknevate aminohapete laengu järgi. Kui positsioonides 11 ja 25 on positiivse laenguga aminohape nagu arginiin, lüsiin või histidiin, on viirus X4 troopsusega.

1.7.2.2 webPSSM

PSSM (*position-specific scoring matrices*) on WetCat algoritmidest erinev matemaatiline mudel ning selle puhul ennustatakse viiruse troopsust eeldades järjestikustes positsioonides kindlate aminohapete esinemist vastavalt maatriksile. Maatriksid on välja töötatud eelnevalt teadaolevate troopsustega viiruste sisestamisel algoritmi.

Troopsuse hindamise tulemusel saadakse skoor, mis näitab tõenäosust, millisesse gruppi viirus kuulub. Mida kõrgem on skoor, seda enam sarnaneb viirus X4 troopsusega viirustele.

WebPSSM klassifikaatorite kogumisse kuulub kolm erinevat klassifikaatorit.

HIV B alatüübi viiruste troopsust on võimalik määrata kahte klassifikaatorit kasutades. WebPSSM_{SINSI} klassifikaatori puhul on X4 maatriksi aluseks võetud MT-2 rakuliinis süntsüütsiime moodustavate viiruste järjestused ja webPSSM_{R5X4} puhul on X4 maatriksi aluseks fenotüübilise testiga määratud X4 tüvede järjestused.

C-subtüüpi kuuluvate viiruste troopsust on võimalik ennustada süntsüütsiimi moodustamise võime järgi jagatud viiruste järjestustel põhineva maatriksiga klassifikaatoril webPSSM_{SINSI} (Jennsen *et al.*, 2003).

1.7.2.3 Fortinbras PSSM

Fortinbras PSSM klassifikaatorite puhul on võimalik ennustada troopsust viie erineva algoritmiga. Neist kolm põhinevad Jennsen *et al.*, 2003 tulemustel ning seega kattuvad webPSSM algoritmidega. Lisaks nendele kolmele on töötatud välja kaks klassifikaatorit Maraviroci kliiniliste katsete (EAP – *expanded access programme*) tulemuste järgi. Need klassifikaatorid põhinevad nii SI ja NSI maatriksitel kui ka X4 ja R5 maatriksitel (Poveda *et al.*, 2009).

1.7.2.4 Geno2pheno (Genafor)

Geno2pheno on SVM-il põhinev klassifikaator (Sing *et al.*, 2007), mille aluseks olev matemaatiline mudel on sama WetCat SVM klassifikaatoriga, kuid klassifikaatori väljatöötamisel on kasutatud suuremat hulka järjestusi, mis muudab Geno2pheno

oluliselt täpsemaks ning tundlikumaks meetodiks võrreldes WetCat SVM klassifikaatoriga (Seclen et al., 2010).

Geno2pheno klassifikaatoriga X4 ja R5 tüvede eristamiseks sisestatakse programmi viiruse V3 piirkonna DNA järjestused. Geno2pheno klassifikaatorisse on võimalik sisestada veel lisaks patsiendi kliinilisi näitajaid nagu viiruskoormus, CD4+ ning CD8+ rakkude arv ja CCR5 genotüüp, mis võimaldavad täpsemat troopsuse hindamist (Lengauer *et al.*, 2007).

1.7.3 Genotüübiliste testidega troopsuse määramine HIV rekombinantsetel tüvedel

Kõigi eelpoolnimetatud ning hetkel olemasolevate klassifikaatorite väljatöötamisel on kasutatud vaid C ja B alatüüpi viiruste järjestusi, ning selle tõttu ei ole teada, kas need klassifikaatorid on rakendatavad ka näiteks rekombinantsete CRF06_cpx tüüpi viiruste troopsuse hindamiseks.

Viiruse troopsuse määramise meetodite võrdlus on näidanud, et B alatüüpi viiruste troopsust on võimalik määrata genotüübiliste testidega sama efektiivselt kui fenotüübilistega ning seega oleks neid võimalik rakendada ka kliinilises paraktikas (Chueca *et al.*, 2009).

Genotüübiliste testide võrdlused B alatüüpi viirusjärjestustega on näidanud, et PSSM klassifikaatorid on kõrge täpsusega, kuid nende tundlikkus on madal. Samas Geno2pheno klassifikaatori tulemused on olnud madalama täpsusega, kuid kõrgema tundlikkusega võrreldes kõigi teiste klassifikaatorite tulemustega (Mendoza *et al.*, 2008; Chueca *et al.*, 2009; Low *et al.*, 2007).

Mitte B ja C alatüüpi kuuluvate viiruste troopsuse hindamise tulemused on näidanud, et klassifikaatorite troopsuse määramise efektiivsus sõltub viiruse tüvest, millel troopsust määrata soovitakse, kuid kõikide klassifikaatorite troopsuse määramise tundlikkus ning täpsus on madalamad võrreldes B alatüübi viirustega (Raymond et al., 2009; Garrido et al., 2008; Esbjörnssen et al., 2010; Seclen et al., 2010).

Troopsuse määramise klassifikaatorite võrdlustes on saadud mitte B alatüüpi kuuluvate viiruste puhul paremaid tulemusi Geno2pheno klassifikaatori puhul (Garrido et al., 2008). Samas sageli on fenotüübilise testi tulemustega kõige paremini

korreleerunud nn „lihtsate reeglite“ ehk üldise laengu reegli ja 11/25 reegli järgi hinnatud troopsuse tulemused (Raymond et al., 2009).

Seega tuleb Eestis peamiselt levinud rekombinantse CRF06_cpx tüve troopsuse hindamiseks valideerida troopsuse määramise test. Selleks tuleb võrrelda olemasolevaid klassifikaatoreid ning kontrollida saadud tulemusi fenotüübilis(te) testi(de)ga.

2 Eksperimentaalne osa

2.1 Uurimustöö eesmärgid

- Hinnata uuringusse kaasatud viiruste V3 järjestuste varieeruvust lähtudes HIV troopsuse määramise meetoditest
- Võrrelda erinevaid genotüübilisi troopsuse hindamise meetodeid
- Määrata CCR5 ja CCL5 haplotüüpide jaotuvus uuritavas süstivate narkomaanide populatsioonis
- Uurida viiruse troopsuse ja geneetiliste markerite, HIV koretseptori CCR5 ja tema ligandi CCL5 kodeerivate geenide haplotüüpide ning CCL3L1 geeni koopiaarvu, vahelisi seoseid

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Uuritavad patsiendid ja proovid

Antud uurimustöö läbiviimiseks on andnud loa Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee.

Uurimustöö läbiviimiseks koguti vere proovid teavitatud kirjaliku nõusoleku alusel kokku 173 HIV-positiivselt süstivalt narkomaanilt, kes osalesid uuringus vabatahtlikult. Info intravenoosete narkootikumide kasutamise kohta saadi uuringus osalenud isikute poolt täidetud ankeetidest. Uuringusse kaasati isikud kolmest Eesti vanglast, kahest süstlavahetuspunktist ja Ida-Viru Keskhaiglast vahemikus aastatel 2006 kuni 2007. 173-st isikust 82% olid mehed ja 18% naised, keskmise vanusega 26 aastat. Kõikide uuringus osalenute HIV kandlus on kinnitatud HIV Referentlaboratooriumi poolt.

Peale proovide kogumist teostati HIV Referentlaboratooriumis kõikidest proovidest HBV ja HCV analüüsid. Koos HIV nakkusega esines 86,3%-l HCV nakkus ning 23% HBV nakkus.

Igalt uuringus osalejalt Na-tsitraat antikoagulanti sisaldavasse katsutisse (Vacutainer Cell Preparation tube; CPT; *Beckton Dickinson*, Ameerika Ühendriigid, Franklin Lakes) 8 ml verd, mis säilitati jääl kuni edasise töötlemiseni maksimaalselt nelja tunni vältel. Perifeerse vere mononukleaarsed rakud ning vereplasma eraldati 20 minutilise tsentrifuugimise teel ~ 3500 p/min Ficoll'i tihedusgradiendis. Tsentrifugimine viidi läbi tsentrifuugi OC-6M *swing-out* tüüpi rootoriga. Peale tsentrifuugimist jäid perifeerse vere mononukleaarsed rakud katsutis oleva polümeeri ning vereplasma vahelisse kihti ning koguti sealt Pasteur'i pipeti abil. Vereplasma ja mononukleaarsed rakud jaotati 500 µl kaupa võrdseteks osadeks (aliquootideks) ning säilitati -80 °C juures edasisteks uuringuteks.

2.2.2 Nukleiinhapete eraldamine

Inimese geneetiliste markerite ning HIV V3 piirkonna uurimiseks eraldati uuringus osalejatelt kogutud vereproovidest vastavalt DNA ning RNA.

DNA eraldamiseks sulatati külmutatud rakud (500 µl) jääl ning seejärel eraldati genoomne DNA kasutades Qiamp DNA Mini Kiti (*Qiagen*, Saksamaa, Hilden) tootjapoolset protokollit. Eraldatud DNA säilitati -80°C juures.

DNA kontsentratsiooni ja kvaliteeti hinnati spektrofotomeetril Nanodrop 1000 mõttes valguse neelduvust 260 ja 280 nm juures (*Thermo Scientific*, Ameerika Ühendriigid, Wilmington).

Viiruse RNA eraldamiseks sulatati külmutatud plasma alikvoodid (500 µl) jääl ning eraldati RNA kasutades Qiamp RNA Mini Kiti (*Qiagen*, Saksamaa, Hilden) vastavalt tootja protokollile. Eraldatud RNA säilitati -80°C juures jagatuna 11µl alikvootideks.

2.2.3 Viiruse V3 piirkonna amplifikatsioon ja sekveneerimine

Viiruse RNA-lt cDNA sünteesimiseks ning cDNA amplifikatsiooniks *nested PCR* meetodil kasutati Nijhuis *et al.*, 1998 poolt väljatöötatud praimereid (tabel 1).

Tabel 1. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni ja nested-PCR praimerite järjestused (Nijhuis *et al.*, 1998)

Reaktsioon	Praimeri nimetus	Seondumiskoht viiruse genoomil	Järjestus
Pöördtranskriptsioon	JA170	7388–7364	5'GTG ATG TAT T(A/G)C A(A/G)TAGA AAA ATT C3'
Nested PCR I reaktsioon	JA170	7388–7364	5'GTG ATG TAT T(A/G)C A(A/G)TAGA AAA ATT C3'
	JA168	6958–6982	5'ACA ATG (C/T)AC ACA TGG AAT TA(A/G) GCC A3'
Nested PCR II reaktsioon	JA169	7373–7349	5'AGA AAA ATT C(C/T)C CTC (C/T)AC AAT TAA A3'
	JA168	6958–6982	5'ACA ATG (C/T)AC ACA TGG AAT TA(A/G) GCC A3'

2.2.3.1 Pöördtranskriptsioon

Eelnevalt eraldatud viiruse RNAlt sünteesiti MuLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*)(*Fermentas International Inc*; Kanada, Burlington) pöördtranskriptaasi abil viiruse cDNA kasutades HIV spetsiifilist praimerit JA170 (tabel 2). Igasse pöördtranskriptsiooni reaktsiooni lisati 9,6 µl eelnevalt eraldatud RNA-d. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni komponendid on toodud tabelis 2.

Pöördtranskriptsioon viidi läbi termotsükleril Eppendorf Mastercycler (*Eppendorf International*; Saksamaa, Hamburg) inkubeerides reaktsioonisegu esmalt 1 tund ja 30 minutit 37°C juures ning seejärel 5 minutit 95°C juures. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni produktid säilitati 4°C juures mitte kauem kui 24h.

Tabel 2: Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni segu komponendid

Komponendid	Lõppkontsentratsioon
MuLV RT-PCR puhver	1x
dNTP	1mM
praimer JA170	400 nM
Rnaasi inhibiitor	0,8 U
MuLV pöördtranskriptaas	0,8 U
DEPC H2O	

2.2.3.2 Nested PCR

HIV V3 piirkonna amplifikatsioon viidi läbi semi-nested (edaspidi nested-PCR) PCR meetodil, mille puhul PCR toimub kahes teineteisele järgnevas reaktsiooni, kus teises reaktsioonis kasutatakse ühe praimerina uut ning teise praimerina ühte esimeses reaktsioonis kasutatud praimeritest.

Nested PCR esimene etapp viidi läbi 50µl reaktsioonimahus, millesse lisati 3µl pöördtranskriptsioonireaktsiooni produkti. DNA amplifikatsioonil kasutati Pfu (*Pyrococcus furiosus*) (*Fermentas International Inc*; Kanada, Burlington) ning HotStart Taq (*Thermus aquaticus*) (*Fermentas International Inc*; Kanada, Burlington) polümeraasi segu 1:6. Pfu DNA polümeraas omab 3'->5' eksonukleasset *proofreading* aktiivsust ning seeläbi võimaldab täpsemat DNA amplifikatsiooni.

Esimese ja teise amplifikatsiooni etapi PCR segu erines MgCl₂ kontsentratsiooni poolest (tabelis 3).

Tabel 3. Nested-PCR reaktsiooni segu komponendid

Komponendid	Lõppkontsentratsioon
PCR puhver 10x	1x
dNTP 2,5mM	200µM
praimer JA170 20µM	300nM
praimer JA168 20µM	300nM
MgCl ₂ 25mM	1,5mM (1. etapis); 2,5mM (2. etapis)
HotStart/Pfu DNA polümeraaside segu 6:1	1U
MQ H2O	

Nested PCR viidi läbi kasutades termotsüklerit Eppendorf Mastercycler (*Eppendorf International*; Saksamaa, Hamburg) ning nii esimese kui ka teise reaktsiooni puhul kasutati sama amplifikatsiooni programmi, mis on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Termotsükleri programmi parameetrid amplifikatsiooni läbiviimiseks

HotStart polümeraasi aktivatsioon	Amplifikatsiooni tsüklid		
	29 kordust		
	Denaturatsioon	Praimerite seondumine	Praimeri ekstensioon
4 min 95°C	30 sekundit 95°C	30 sekundit 40°C	30 sekundit 72°C

PCR produktide olemasolu tehti kindlaks visuaalselt, analüüsid PCR produkte UV valguses 1,0% TE agarosgeelil. Vastavalt Nijhuis *et al.*, 1998 oli oodatava PCR produkti pikkus 360 aluspaari.

2.2.3.3 Sekveneerimine

V3 piirkonna sekveneerimine viidi läbi BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-iga (*Applied Biosystems; Life Technologies Corporation*, Ameerika Ühendriigid, Carlsbad). Sekveneerimisprodukti elektroforees viidi läbi Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer kapillaarelektroforeesi masinaga kasutades 50 cm kapillaare ning POP7 polümeeri.

2.2.4 HIV V3 järjestuste analüüs

Sekveneeritud V3 piirkonna järjestuste kontrollimiseks ja kontiigide (sekveneerimisel saadud järjestuslõigud) assambleerimiseks kasutati VectorNTI (*Invitrogen Corporation*, Ameerika Ühendriigid, Carlsbad) tarkvarapaketi olevat ContigExpress programmi.

Täispikad järjestused joondati programmiga MEGA4.1. Sama programmi abil koostati ka DNA järjestuste järgi V3 piirkonna aminohappejärjestused.

V3 piirkonna fülogeneesipuu koostati kasutades MEGA tarkvarapaketi olevat Kimura 2-parameetrilist mudelit. Programmi sisestati referentjärjestused ja uuritavad järjestused, mille alatüüp määrati fülogeneetilises puus klasterdumise järgi.

2.2.5 Viiruse troopsuse hindamine genotüübiliste meetoditega

2.2.5.1 V3 piirkonna troopsuse hindamine „lihtsate reeglite“ abil

Viiruse troopsuse määramiseks kasutati reegleid, mis ei põhine matemaatilistel algoritmidel („lihtsateks reeglid“) ning ei ole rangelt HIV alatüübi põhised. Sellised on 11/25 , 11/24/25 ja üldise laengu reegel.

Uuringus osalenud isikutelt isoleeritud viiruste V3 aminohappejärjestusi analüüsiti lähtuvalt 11/25 ning 11/24/25 reeglitest arvestades vastavates positsioonides paiknevate aminohapete laenguid. Positiivse laenguga aminohape (R või K) positsioonides 11, 24 või 25 ennustab viiruse X4 troopsust (Sander *et al.*, 2007; Cardozo *et al.*, 2007).

Lisaks hinnati viiruste troopsust arvestades V3 piirkonna kogulaengut. V3 piirkonna kogulaeng arvutati positiivse laenguga aminohapete arvu (R – arginiin, H – histidiin, K – lüsiin) liitmisel ning sellest negatiivse laenguga aminohapete arvu lahutamisel (D - asparagiinhape, E – glutamiinhape)

V3 piirkonna üldlaengu reegli alusel defineeritakse viirus X4 troopseks kahel tingimusel: a) kui V3 piirkonna aminohappejärjestuse kogulaeng on suurem kui +5; b) kui V3 piirkonna aminohappejärjestuse kogulaeng on +5 ja positsioonides 11 või 25 esineb positiivse laenguga aminohape (Lwembe *et al.*, 2009).

2.2.5.2 Troopsuse hindamine klassifikaatoritega

Viiruse troopsuse hindamine viidi läbi kõikide internetis kättesaadaval olevate klassifikaatoritega. Seejuures kasutati nii HIV B-alatüübi kui ka C-alatüübi järjestuste järgi väljatöötatud klassifikaatoreid, kuna klassifikaatorite võimet hinnata CRF06_cpx tüvede troopsust pole varem uuritud.

2.2.5.2.1 Wet Cat algoritmid

Ennustamiseks Wet Cat algoritmidega viiruste troopsust, viidi V3 aminohapete järjestused MEGA 4.1 programmi abil vastavusse ettenähtud konsensusjärjestusega CTRPNNNT-RK*I*I—GPG*AFY*-TG*I-IGDIRQAHC, milles tärn tähistab suvalist aminohapet ning sidekriips lünka, ehk gap-i. Troopsuse ennustamine viidi läbi

kõikidel Wet Cat klassifikaatoritel (C4.5, C4.5 positsioonid 8 ja 12, PART, SVM ja *Charge rule* (Wetcat Laengu reegel)).

2.2.5.2.2 WebPSSM

WebPSSM klassifikaatorisse sisestati samaaegselt kõik V3 piirkonna aminohapete järjestused. Sisestatud järjestuste pikkus oli 35 aminohapet.

Viiruse troopsust hinnati kõikide klassifikaatoritega (webPSSM_{SINSI} (B alatüüp), webPSSMR_{R5X4} (B alatüüp) ja webPSSM_{SINSI} (C alatüüp)).

2.2.5.2.3 Fortinbras PSSM

Klassifikaatorisse sisestati V3 piirkonna aminohapete järjestused korraka. Troopsuse hindamine viidi läbi nii alatüüp B kui alatüüp C järjestuste järgi väljatöötatud klassifikaatoritega (PSSM_{R5X4} (B alatüüp); PSSM_{SINSI} (B-alatüüp); PSSM_{R5X4} (Poveda) (B alatüüp); PSSM_{SINSI} (Poveda); PSSM_{SINSI} (C-alatüüp)).

2.2.5.2.4 Geno2pheno

Viiruse troopsuse ennustamiseks Geno2pheno klassifikaatori puhul sisestati programmi ükshaaval iga viiruse sekveneerimisel saadud täispikk DNA järjestus.

Geno2pheno klassifikaatoril on võimalik määrata, kui rangelt toimub X4 tüvede hindamine. Uuritava järjestuse sisestamisel klassifikaatorisse on võimalik valida troopsuse hindamise olulisuse aste (*significance level*), mis määrab, millisel hulgal loetakse X4 troopseteks tõenäoliselt valepositiivseid tüvesid.

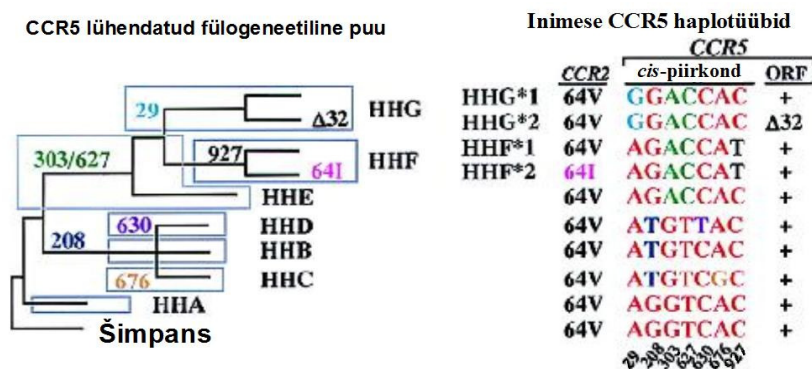
Antud uuringus kasutati kahte taset, konservatiivset ja liberaalset. Rangema taseme hindamine viidi läbi kasutades Maraviroci kliiniliste katsete MOTIVATE grupi järgi optimeeritud tingimusi, mille puhul valepositiivsete hulk on 2%. Liberaalse hindamise puhul oli valepositiivsete hulga tasemeks määratud 20%.

Viiruse troopsuse hindamisel Geno2pheno klassifikaatoril peale V3 järjestuse, patsiendi kohta, teisi andmeid klassifikaatorisse ei sisestatud.

2.2.6 Geneetiliste markerite määramine

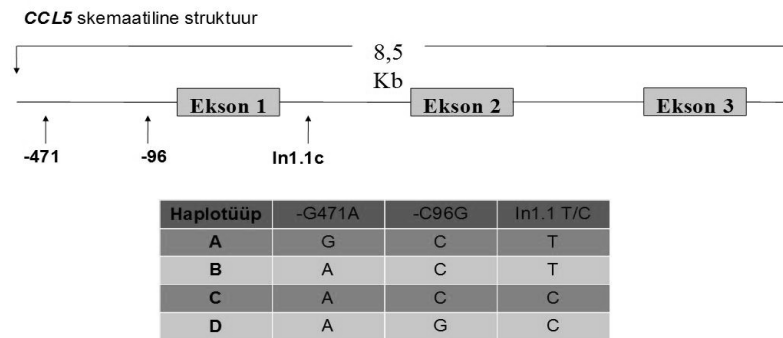
Uuringus osalenud isikute geneetilised markerid on määratud eelnevalt Kristi Huiki, Maarja Sadama ja Radko Avi poolt teiste uurimustööde käigus (Huik *et al.*, 2010; Avi *et al.*, avaldamata andmed).

Uuringus osalenud isikute CCR5 ja CCL5 polümorfismid määrati restriksioonifragmetide polümorfismi analüüsi meetodil (Gonzalez *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2005). CCR5 haplotüüpid määrati CCR5 cis-piirkonnas esinevate järgnevate SNP-de alusel: A29G, G208T, G303A, T627C, C630T, A676G, C927T ning CCR5 Δ 32 ja CCR2-V64I mutatsiooni olemasolul. Haplotüübi paaride defineerimisel kasutati CCR5-CCR2 polümorfismide evolutsioonilist klassifikatsiooni (Mangano *et al.*, 2001)(joonis 10).



Joonis 10. CCR5 haplotüübid. CCR5 haplogrupp moodustub paljudest haplotüüpidest, mis erinevad teineteisest fülogeneesipuul märgitud SNP-de poolt (värvilised numbrid puu harude juures). Inimese CCR5 haplotüüpide loendis on märgitud HHF*2 ning HHG*2, mis on HHF ja HHG haplotüüpide alatüübid, mis on vastavalt LD-s 64I või Δ 32 mutatsiooniga (Gonzalez *et al.*, 1999 järgi).

CCL5 haplotüübid määrati vastavalt eelnevalt kirjeldatud CCL5 promooteralas ning esimeses intronis paiknevatel SNP-del -G471A, -C96G ja In1.1 T/C (Gonzalez *et al.*, 2001; An *et al.*, 2002)(joonis 11).



Joonis 11. CCL5 skemaatiline struktuur ja haplotüübid. CCL5 haploblokke määravad SNP-d -G471A ja -C96G paiknevad CCL5 geeni promoteralas. In1.1C/T paineb CCL5 geeni esimeses intronis. Tabelis on toodud CCL5 haplotüüpe määravad SNP-d.

Samuti oli teostatud kõikidele uuringu proovidele kvantitatiivse reaalka PCR meetodil CCL3L1 geenikoopiate määramine, mille puhul referentgeeni, milleks oli β -globiini geen, ning CCL3L1 amplifikatsioonikurvi võrdluse järgi arvutati välja iga uuringus osalenud isiku CCL3L1 geenikoopiate hulk (Gonzalez *et al.*, 2005).

Enne assotsiatsioonianalüüsi defineeriti CCL3L1 koopiaarv mediaani alusel kaheks: i) CCL3L1 koopiaarv ≤ 2 (madal koopiaarv); ii) CCL3L1 koopiaarv > 2 (kõrge koopiaarv). Analüüsidesse kaasati CCR5 ja CCL5 haplotüübid ja haplotüüpide paarid, mis esinesid rohkem kui 5%-l uuritavatest (Huik *et al.*, 2010).

2.2.7 Statistiline analüüs

Statistiline analüüs viidi läbi programmil R 10.0. Statistiliselt oluliseks loeti p väärtust $< 0,1$. X4 või R5 troopsusega viirustüvede esinemissageduse erinevust CCR5 ja CCL5 haplotüüpide puhul hinnati sõltuvalt olukorrast χ^2 või Fisher-i täpse testiga.

Geneetiliste markerite ja viiruse troopsuse vaheliste seoste hindamiseks kasutati ühemõõtmelist logistilise regressiooni mudelit.

2.3 Tulemused

2.3.1 HIV V3 järjestuse sekveneerimine

V3 piirkonna järjestus sekveneeriti 161-lt isikult isoleeritud viirusel. Viiruste tüpiseerimiseks viidi läbi fülogeneetiline analüüs. Isoleeritud viiruste järjestustest koostatud fülogeneetiline puu on toodud joonisel 12. Analüüsi tulemuste järgi kuulus 96% viirustest CRF06_cpx klastrisse. Järjestused A47, A48, E59 ja E77 klasterdusid A-alatüüpi ning A1 sarnanes enim B-alatüüpi kuuluvate viirustega ja A27 AB rekombinantse tüvega CRF03.

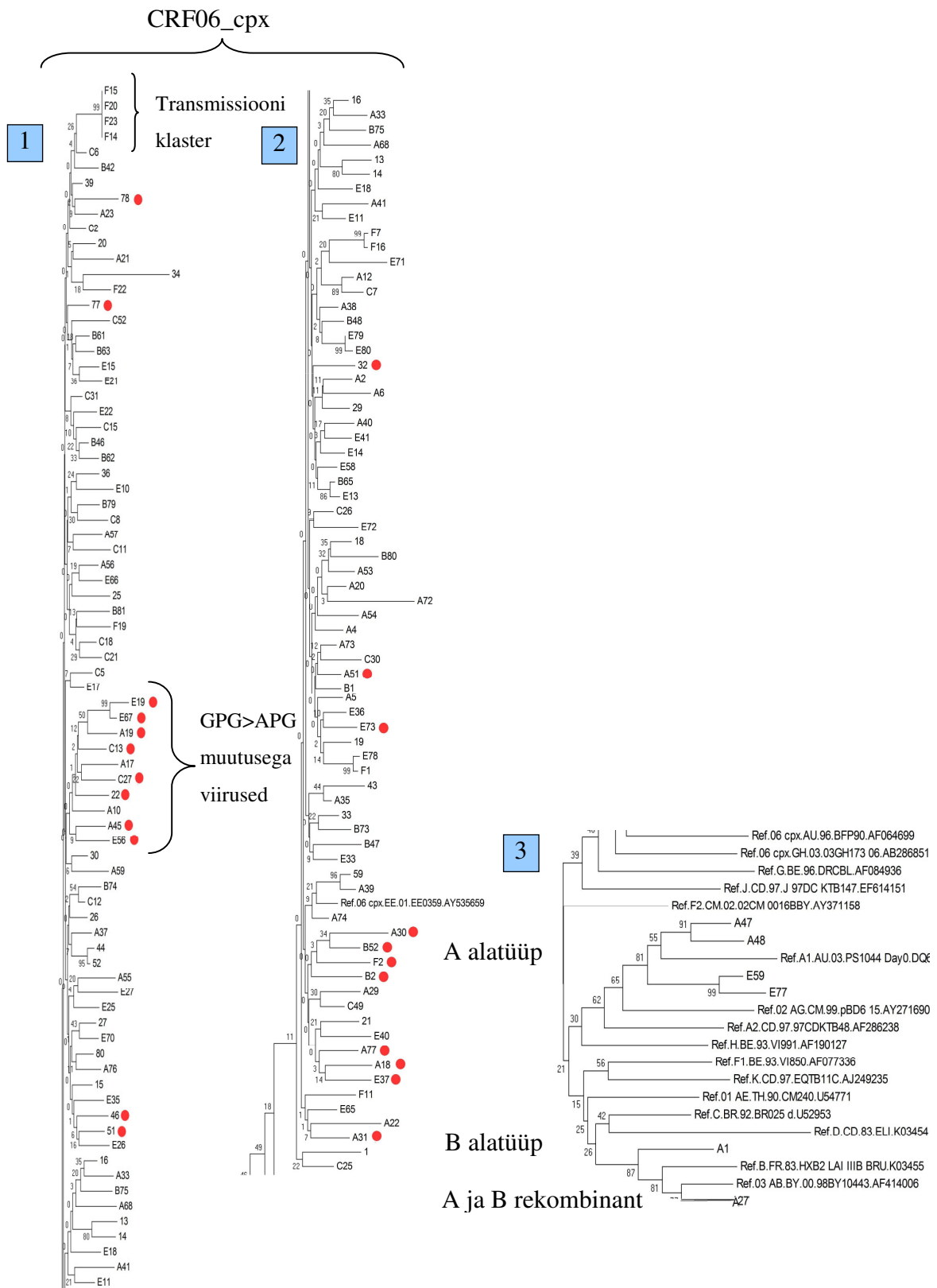
Fülogeneesipuul on näha neljalt patsiendilt isoleeritud CRF06_cpx tüüpi viirusest (F14, F15, F20, F23) koosnev transmissiooniklaster, mille puhul on viirusjärjestuste sarnasus 99%.

2.3.1.1 Mutatsioonid V3 konserveerunud järjestuses

Viiruse aminohappejärjestuse analüüsil selgus, et 15%-l (n = 24) uuritavatest järjestustest on V3 konserveerunud GPG järjestuses aminohappe muutus – esimeses positsioonis on glütsiin asendunudalaniiniga (GPG > APG) (tabel 6). Nimetatud muutusega järjestused eristuvad fülogeneetilisel analüüsil eraldi klastritena (joonis 12). V3 aminohappejärjestuse tuuma osas ei leitud uuritavatel proovidel ühtegi muutust (tabel 5).

Selgitamaks välja, kas tegu võib olla CRF06_cpx viirustüvedele omase muutusega, järjestati ning võrreldi Los Alamos andmebaasis olevaid CRF06_cpx tüüpi viiruste V3 aminohappejärjestusi (www.hiv.lanl.gov). 4% analüüsitud järjestustest (11/277) esines GPG muutus APG-ks (4%), kusjuures ükski muutusega järjestustest ei olnud Eesti päritolu.

Kuna V3 GPG piirkonna muutusi ei ole varem seostatud viiruse troopsusega, siis GPG muutust APG-ks ei käsitletud uuringus kui troopsust määravat faktorit.



Joonis 12. V3 järjestuste fülogeneesipuu kolmes osas. 1 ja 2 kõik CRF06_cpx rühma klasterdunud järjestused. 3. A47, A48, E59 ja E77 järjestuste klasterdumine A – alatiüpi ning A1 ja A27 järjestuste klasterdumine B-alatiüpi. Punasega on märgistatud GPG>APG muutusega viirused.

Tabel 5. V3 järjestused, milles on toimunud GPG piirkonna esimeses positsioonis glütsiini asenduminealaniiniga. Tumehalliga on märgitud V3 järjestuse tuuma ja tipu struktuuris konserveerunud aminohapped. Helehalliga on märgitud varieeruv esimene positsioon GPG piirkonnas.

Proovi kood	Aminohapete positsioonid V3 piirkonnas																																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
22	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	D	I	I	G	N	I	R	E	A	H	C
32	C	T	R	P	N	N	N	T	R	R	S	I	H	I	A	P	G	Q	T	F	F	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
46	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	A	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
51	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	A	I	I	G	N	I	R	Q	A	H	C
77	C	T	R	P	Y	N	N	T	R	R	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
78	C	T	R	P	Y	N	N	T	R	R	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
A18	C	A	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	D	A	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
A19	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	I	F	A	T	G	A	I	I	G	N	I	R	E	A	H	C
A30	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C
A31	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
A45	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	E	I	I	G	N	I	R	Q	A	H	C
A51	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C
A77	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	D	A	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
B52	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C
C13	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	F	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C
C27	C	T	R	P	N	N	N	T	R	R	S	I	Q	F	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
E19	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	A	I	I	G	D	I	R	E	A	Y	C
E20	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	L	A	P	G	Q	V	F	F	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
E37	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	Q	F	A	P	G	Q	A	L	Y	A	T	G	A	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
E56	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	H	F	A	P	G	Q	V	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
E67	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	A	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C
E73	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	G	Q	V	F	Y	A	T	G	K	I	I	G	N	I	R	Q	A	H	C
F2	C	T	R	P	Y	N	N	T	R	R	S	I	T	F	A	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	V	G	D	I	R	Q	A	H	C
F9	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	I	A	P	R	Q	A	F	F	A	T	G	E	V	I	G	D	T	R	Q	A	H	C

2.3.2 Viiruse troopsuse hindamine

Viiruse troopsus määrati V3 piirkonna aminohappejärjestuste alusel troopsuse hindamise „lihtsate reeglite“ (11/25, 11/24/25 ja üldise laengu reegli) ning troopsuse hindamise klassifikaatoritega kõigil 161-l sekveneritud viirusel.

2.3.2.1 Viiruste troopsused vastavalt 11/25 ja 11/24/25 reeglitele

V3 piirkonna aminohapete analüüsil ei esinenud ühelgi proovil positiivse laenguga aminohapet (R või K) positsioonis 11, küll aga esines R ja K kahel proovil positsioonis 25. Samuti ei täheldatud positiivse laenguga aminohappe paiknemist 24. positsioonis. Seega vastavalt 11/25 ja 11/24/25 reegli järgi oli analüüsitud viirustest X4 troopsed 1,24% (n=2) (joonis 13).

2.3.2.2 Üldise laengu reegel

Üldise laengu reegli esimese tingimuse (üldine laeng on suurem kui +5) alusel esines uuritavas populatsioonis 12 X4 troopset viirust. Samas ei leidunud ühtegi järjestust, mis oleks olnud vastavuses teise tingimusega (üldine laeng +5 ja positiivse laenguga aminhappe esinemine positsioonides 11 või 25). Seega üldise laengu reegli järgi oli kogu uuritava populatsiooni X4 viiruste hulk 7,45 % (n=12) (joonis x).

2.3.2.3 Viiruse troopsuse hindamine klassifikaatoritega

Viiruse troopsuse hindamine viidi läbi 16 erineva nii B kui ka C alatüüpi viiruste järjestuste järgi väljatöötatud klassifikaatoriga. Erinevate klassifikaatorite puhul varieerusid X4 troopsete viiruste esinemissagedused 0-st kuni 64,6%-ni.

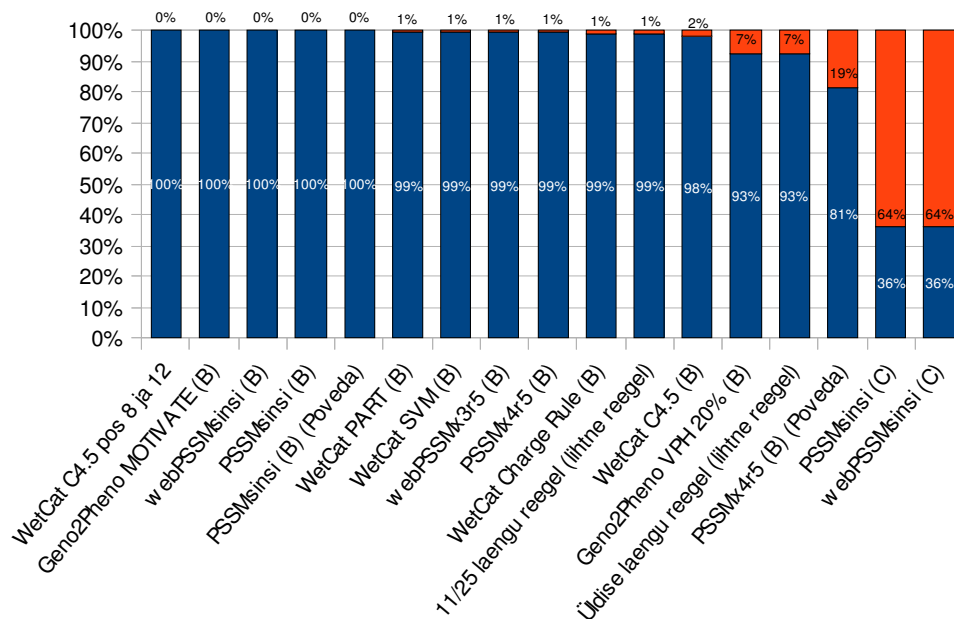
Viis klassifikaatorit ei määranud ühtegi viiruse järjestust X4 troopseks (WetCat C4.5 pos8 ja 12; Geno2Pheno MOTIVATE järgi valideeritud klassifikaator; webPSSM_{SINSI} ja PSSM_{SINSI}) (joonis 13), mis võib viidata madalale tundlikkusele uuritavate järjestuste analüüsimisel ning seega on need klassifikaatorid sobimatud CRF06_cpx troopsuse hindamiseks.

Mõlemad C alatüübi meetodid hindasid X4 troopsete viiruste osakaaluks uuritavas populatsioonis 64% (n=103). HIV-1 C alatüüpi kuuluvate viirusjärjestuste järgi väljatöötatud klassifikaatorite tulemused olid samad, kuna mõlemad klassifikaatorid põhinevad PSSM algoritmil ja on seega sisuliselt identsed (Jensen *et al.*, 2003). Edaspidi on C-alatüübi klassifikaatorid webPSSM_{SINSI} (C alatüüp) ja PSSM_{SINSI} (C alatüüp) tähistatud koondnimetusega PSSM_{SINSI} (C).

C alatüüpi viiruste järgi väljatöötatud klassifikaatorite tulemuste ülimalt kõrge X4 troopsete viiruste protsent võib viidata meetodite madalale spetsiifilisusele ja kõrgele valepositiivsete tulemuste osale.

Kuus klassifikaatorit määrasid vaid 1-2 viirustest X4 troopseteks (<1%) (joonis 13).

Vaid kaks B-alatüüpi viiruste järgi väljatöötatud klassifikaatorit hindasid X4 troopseteks 7-19% viirustest, mis on sarnane varasemates uurignutes näidatud X4 troopsete viiruste osakaalule (Mendoza *et al.*, 2008).



Joonis 13. Erinevate klassifikaatorite ja järjestuste analüüsi meetodite troopsuse hindamise tulemused ja X4 ning R5 troopsusega viiruspopulatsioonide hulk. Sinisega on tähistatud R5 troopsusega tüvede protsent, oranžiga X4 troopsusega tüvede protsent. Sulgudesse on märgitud, millisesse alatüüpi kuuluvate viiruste järjestuste järgi on meetod välja töötatud.

2.3.2.4 Troopsuse määramise meetodite võrdlus

Erinevaid troopsuse määramise meetodeid võrreldi tulemuste kattuvusprotsendi alusel. Võrdluse kaasati vaid sellised troopsuse hindamise meetodid, mis määrasid X4 troopsuse enam kui 5% viirusjärjestustest ning üldise laengu reegel (joonis 14). Ülejäänud klassifikaatoritel ei määratud kas ühtegi või vaid 1-2 viirusjärjestust X4 troopseks ning seetõttu ei olnud neid mõtet võrdluse kaasata.

Kõik võrdluse kaasatud klassifikaatorid ja üldise laengu reegel hindasid üheselt 19 viiruse järjestust R5 troopseteks, kuid X4 troopsuse hindamisel esines 100%-line kattuvus erinevate meetodite vahel vaid ühe viiruse järjestuse puhul.

Seega võib oletada, et ka uuritavate järjestuste puhul esineb erinevate klassifikaatorite suurem tulemuste kattuvus R5 troopsusega tüvede ennustamisel võrreldes X4 tüvedega, mis on vastavuses eelnevate uurimustöödega (Low *et al.*, 2007).

Klassifikaatorite tulemuste võrdlusel korreleerusid omavahel sama HIV alatüüpi kuuluvate viiruste aminohappejärjestuste järgi väljatöötatud klassifikaatorid. Erinevate alatüüpide järgi väljatöötatud klassifikaatorite tulemused erinesid üksteisest enam kui 50% (joonis 14).

Kõige enam kattusid omavahel Geno2pheno 20% VPH (B alatüüp) ja üldise laengu reegli tulemused (kokkulangevaid tulemusi 89,5%; n=145).

Palju kokkulangevaid tulemusi oli ka PSSM_{R5X4} (Poveda) (B alatüüp) ja Geno2pheno 20% VPH (B alatüüp) klassifikaatorite vahel (kokkulangevaid tulemusi 80,9%; n=131).

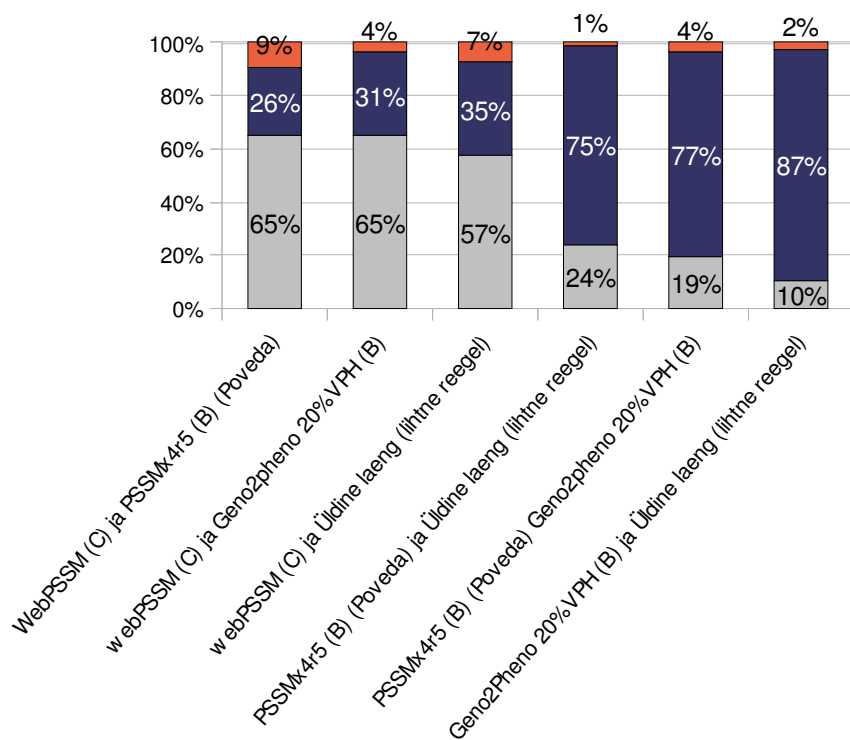
Tulemuste kokkulangevus oli samuti suur PSSM_{R5X4} (Poveda) (B alatüüp) ja üldise laengu reegli (lihtne reegel) vahel (kokkulangevaid tulemusi 75,9%; n=123).

Kogu kokkulangevusest oli X4 tüvede puhul kokkulangevate tulemuste protsent erinevate klassifikaatorite vahel alla 5%.

Geno2pheno ja PSSM_{R5X4} (B alatüüp) klassifikaatorid on mõlemad töötatud välja B alatüüpi kuuluvate viiruste järgi, kuid erinevad teineteisest matemaatilise algoritmi poolest, mille abil troopsust hinnatakse. Üldise laengu reegel põhineb lihtsal aminohapete kogulaengu arvutusel ning ei ole otseselt aluseks PSSM või Geno2pheno klassifikaatori algoritmile.

Viiruse troopsuse sõltuvus V3 piirkonna üldisest laengust ei ole B alatüübi spetsiifiline omadus ning seetõttu on üldise laengu reegel rakendatav erinevate viirustüvede, nagu rekombinantsete vormide, puhul (Raymond *et al.*, 2010).

C alatüübi ning B alatüübi viiruste järgi väljatöötatud algoritmide suurem X4 troopsuse tulemuste kattuvusprotsent on tingitud C alatüüpi viiruste järgi väljatöötatud klassifikaatoritel määratud suuremast X4 troopsete tüvede osakaalust (64%, joonis 13), mis ilmselt hõlmab nii oletatavaid tõelisi X4 troopseid viiruseid, kuid ka valepositiivseid X4 troopseid viirustüvesid.

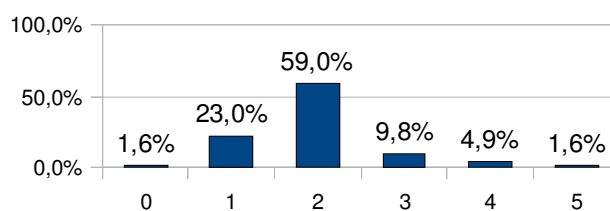


Joonis 14. Troopsuse hindamise meetodite tulemuste kattuvusprotsendid (*concordance*). Tulpades on toodud kõikide troopsuse hindamise meetodite, mille puhul X4 troopseks määrati enam kui 5% järjestustest, tulemuste võrdlused paarikaupa. Halliga on märgitud tulemused, mis ei langenud kokku. Sinisega on märgitud R5 troopsusega viiruste kokkulangevad tulemused. Oranžiga on tähistatud X4 troopsusega viiruste kokkulangevad tulemused.

2.3.3 Geneetiliste markerite määramine

Kõigil isikutel (n=161), kellelt isoleeritud viirustel suudeti hinnata HIV troopsust, olid genotüpeeritud CCL5 polümorfismid ja 160-1 CCR5-CCR2 polümorfismid. CCL3L1 geeni koopiaarvu andmed olid olemas 122 patsiendi kohta.

CCL3L1 geeni koopiaarv uuritavas populatsioonis varieerus 0-st kuni 5-ni (mediaan=2) (joonis 13).

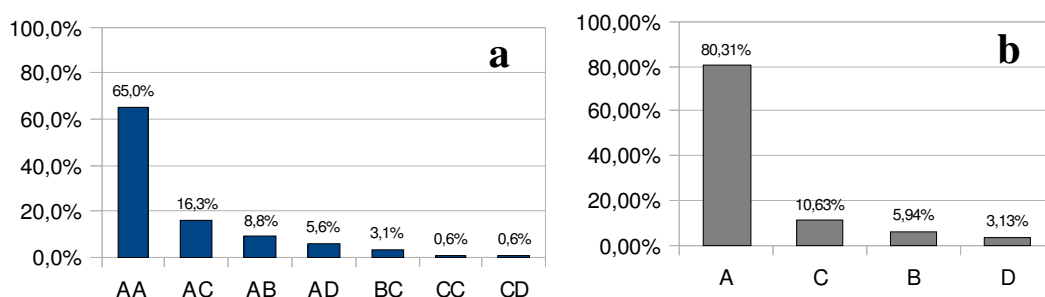


Joonis 15. CCL3L1 geenikoopiate esinemissagedus uuringus osalenud isikutel.

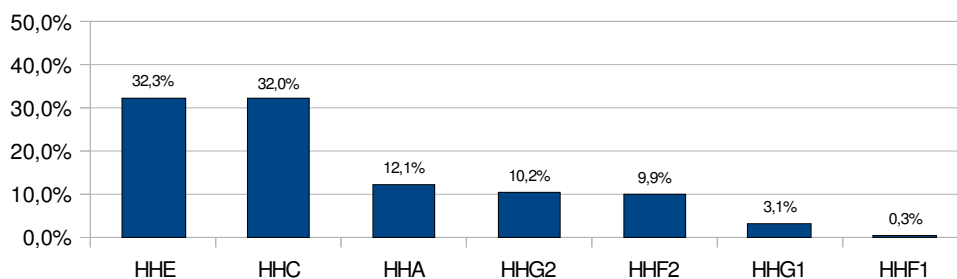
CCL5 haplotüüpidest oli kõige sagedam A haplotüüp (79,8%) ja haplotüübi paarist AA (65%) (joonis 16).

CCR5 haplotüüpidest olid kõige sagedasemad HHE (32,3%), HHC (32,0%) ja HHA (12,1%; joonis 17) ning haplotüübi paaridest HHC/HHE (18,75%), HHE/HHE (11,88%) ja HHC/HHC (11,25%; joonis 18).

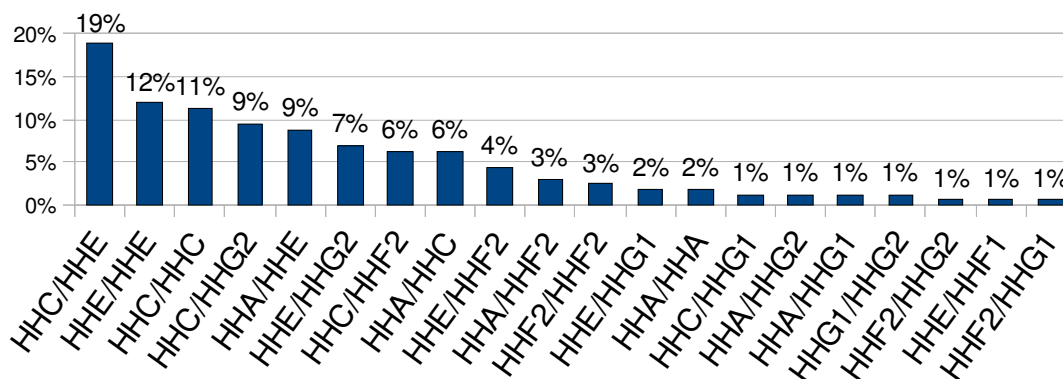
Ühelgi uuritava ei esinenud CCR5 haplotüüpe HHB ja HHD (joonis 157).



Joonis 16. a) CCL5 haplotüüpide paaride esinemissagedused ja b) CCL5 haplotüübid uuringusse kaasatud isikutel.



Tabel 15. CCR5 haplotüüpide esinemissagedused uuringusse kaasatud isikutel



Joonis 17. CCR5 haplotüüpide paaride esinemissagedused.

2.3.4 Assotsiatsioonianalüüs

Seoseid uuriti peremeesorganismipoolsete geneetiliste markerite (CCR5 ning CCL5 haplotüüpide ja CCL3L1 geeni koopiaarvu) ja HIV-1 V3 piirkonna alusel määratud troopsuse vahel. Analüüsis kasutati kõikide troopsuse määramiseks kasutatud meetodite tulemusi.

CCR5 haplotüübi HHE jaotuvus erines Geno2pheno klassifikaatoriga määratud R5 ja X4 troopsete tüvede hulgas – vastavalt 49% ja 91,7% ($p=0,0454$).

Univariantse logistilise regressiooni tulemus näitas, et isikutel, kellel esineb CCR5 haplotüüp HHE, on enam kui 8,53 korda suuremad šansid ($95\%CI=1,05-69,56$) omada X4 troopset viirust kui mõnda teist CCR5 haplotüüpi omaval isikul.

Lisaks võis näha trendi CCR5 HHG haplotüübi ja WetCat C4.5 klassifikaatoriga määratud viiruse troopsuse vahel ($p=0,092$). HHG2 haplotüübiga isikutel on 8,17 ($OR=8,17$; $95\% CI=0,71-94,10$) korda suurem šans omada X4 troopsusega viirust võrreldes isikutega, kes ei oma HHG2 haplotüüpi

Ükski teine uuritavate geneetiliste markerite jaotuvus ei erinenud ülejäänud klassifikaatorite alusel ennustatud R5 ja X4 troopsete viiruste vahel.

Arutelu

Antud töös hinnati nii CCR5 kui ka tema ligandi CCL5 polümorfismide ning CCL3L1 geenikoopiate arvu mõju viiruse troopsusele. Kuigi tugevaid seoseid nimetatud geneetiliste markerite ja troopsuse vahel ei esinenud, leiti statistiliselt oluline seos CCR5 haplotüübi HHE ja Geno2pheno klassifikaatoril hinnatud X4 troopsuse vahel. Vaatamata statistilise mudeli väga laiale usaldusvahemikule võib järeldada, et isikud, kes omavad HHE haplotüüpi, omavad ka suurema tõenäosusega X4 troopset viirust. Kuna HHE haplotüüp on seotud CCR5 madalamat ekspressiooni põhjustava cis-piirkonnas G303A mutatsiooniga (viide), võib tekkinud olukord olla soodne X4 troopsete viiruste levikuks. Varasemalt on näidatud HHE haplotüübi kõrgemat sagedust kiiretel progresseerujatel, mis võib viidata X4 troopsete viiruste esinemisele (Li et al., 2005).

Lisaks täheldati seost ka WetCat C4.5 algoritmi ning CCR5 HHG2 haplotüübi vahel, mille puhul HHG haplotüübi esinemine tõstab tõenäosust omada X4 troopsusega viirust. HHG2 haplotüüp on seotud CCR5 Δ 32 mutatsiooniga. CCR5 Δ 32 homosügootidel ei sünteesita CCR5 retseptorit rakupinnale ja seetõttu ei nakatu nad ka R5 troopsete HIVi tüvedega (viide). Heterosügootidel aga on vähenenud CCR5 ekspressioon, mis omakorda võib soodustada X4 troopsete tüvede replikatsiooni. Kuna seosed kahe CCR5 haplotüübi ja X4 troopsuse vahel on nõrgad, siis leitud seoseid tuleks vaadata suuremas populatsioonis.

Antud uuringusse kaasatud Eesti süstivate narkomaanide populatsioon on homogeenne - peamiselt noored mehed, ravinaiivsed ning HIV-iga nakatumine on toimunud oletatavalt samal moel, on tegu sobiva inimgrupiga geneetiliste mõjude hindamiseks.

Isoleeritud viiruste fülogeneetilisel analüüsil oli näha nende monofüleetilisus (vt joonis 12). Enamus viirustest on CRF06_cpx rekombinantset tüüpi ning järjestuselt suhteliselt sarnased, mida on näidatud ka varem (Adojaan et al., 2005, Avi). Tulemus ei ole üllatav, sest Eesti HIV epideemia on suhteliselt noor ning uuritav populatsioon on peamiselt antiretroviirusliku ravinaiivne ja nakatumine on toimunud süstitavate narkootikumide kasutamise kaudu (viited).

Võrreldes seksuaalsel teel leviva nakkusega, ei toimu süstimise käigus viiruse organismi sisenemisel sarnast selektsiooni ja nakatumine võib toimuda ligi 100% homoloogsete viirustega (viide). Selline viiruse levik on näha fülogeneesipuul nelja

erineva inimese verest eraldatud viiruste järgi, mis kuuluvad kõik ühte homoloogsesse transmissiooniklastriisse (vt. Joonis 12). Samasugust väga sarnaste viiruste levikut on täheldatud süstivate narkomaanide puhul varemgi (Adojaan *et al.*, 2005; Avi veel avaldamata andmed), kuid selle täpseid põhjuseid ei ole uuritud.

Antud uuringus kasutatud klassifikaatoritel saadi CRF06_cpx viiruse V3 piirkonna järgi troopsuse hindamisel varieeruvaid tulemusi (joonis 14). Erinevate klassifikaatoritega määrati X4 troopseteks 0-64% kõikidest viirustest. Klassifikaatorite tulemuste lahknevus on põhjustatud tõenäoliselt sellest, et kõigi olemasolevate klassifikaatorite väljatöötamisel on kasutatud B ja C alatüüpi kuuluvate viiruste järjestusi (Poveda *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003 jt) ja mitte harvemini esinevaid alatüüpide omasid, nagu CRF06_cpx. Kuigi CRF06_cpx *env* järjestus on tõenäoliselt pärit G-alatüüpi kuuluvalt viiruselt, ei ole ka selle alatüübile väljatöötatud troopsuse määramise algoritmi. Seetõttu pole võimalik kindlalt väita, et olemasolevad klassifikaatorid oleksid suutelised ennustama mitte B või C alatüüpi kuuluvate viiruste troopsust usaldusväärset (Raymond *et al.*, 2009).

Kuna R5 troopsete viiruste V3 aminohappejärjestused on oluliselt vähem varieeruvad võrreldes X4 troopsete viiruste järjestustega, suudavad enamus klassifikaatoritest oluliselt paremini määrata R5 troopsust võrreldes X4 troopsusega (Bozek *et al.*, 2009).

Kuna Eestis enimlevinud CRF06_cpx rekombinantse viiruse järjestus on erinev B ning C alatüüpi viiruste järjestustest, siis võib arvata, et meetod, mille tundlikkus on kõrgem ning mis suudab määrata paremini varieeruvate järjestustega X4 troopseid tüvesid, suudab paremini määrata troopsust ka CRF06_cpx tüüpi viiruste puhul.

Klassifikaatorite võrdlusel esines korrelatsioon üldise laengu reegli ja B, aga mitte C alatüüpi, kuuluvate viiruste troopsuse hindamise klassifikaatorite vahel.

Kuna korrelatsioon esines Geno2pheno (20% VPH), PSSM_{R5X4} (Poveda *et al.*, 2009) ja üldise laengu reegli tulemuste vahel, võib järeldada, et kõik nimetatud meetodid võivad olla sobilikud CRF06_cpx troopsuse hindamiseks.

Varasemalt on näidatud Geno2pheno klassifikaatori kõrgemat tundlikkust võrreldes teiste klassifikaatoriga nii B kui ka mitte B-alatüüpi kuuluvate viiruste troopsuse hindamisel (Mendoza *et al.*, 2008; Chueca *et al.*, 2009; Low *et al.* 2007; Garrido *et al.*,

2008). Selle põhjuseks võib olla Geno2pheno klassifikaatori väljatöötamisel kasutatud suurem hulk viiruste järjestusi võrreldes teiste klassifikaatoritega ja see tõstab meetodi tundlikkust (Seclen *et al.*, 2010).

Arvestades C alatüüpi viiruste järgi väljatöötatud klassifikaatoritel määratud X4 troopsete viiruste hulka (64%) ning tulemuste erinevust statistiliselt olulisel määral B alatüüpi viiruste järgi väljatöötatud klassifikaatorite tulemustest ja ka üldise laengu reegli tulemustest, võib järeldada, et C alatüübi järgi väljatöötatud klassifikaatorid ei oma piisavat täpsust CRF06_cpx tüüpi viiruste troopsuse määramiseks.

Enamus troopsuse hindamiseks kasutatud meetodeid ei suutnud määrata mitte ühtegi või suutis tunda ära vaid üksikud X4 troopset tüved (<1%). Varem on näidatud, et ravinaivsetes populatsioonides esineb X4 troopsusega viiruseid 15-20% nakatunutest (Mendoza *et al.*, 2008; Poveda *et al.*, 2007).

Antud uuringus enamuse klassifikaatoritega määratud madal X4 troopsete viiruste hulk võib olla põhjustatud klassifikaatorite madalast tundlikkusest, kuid võib olla seotud hoopis uuritava populatsiooniga eripäradega.

On näidatud, et opiaadid, mille alla kuulub ka Eestis süstivate narkomaanide seas enamasti leviv heroiin, omavavad mõju CCR5 retseptoritele ning nende ligandidele, vähendades CCR5 retseptori ligandide ekspressiooni ning tõstes veel ka CCR5 retseptorite ekspressiooni (Mahajan *et al.*, 2005). See aga loob soodsad tingimused R5 troopsete viiruste levikuks, mis selgitaks X4 troopsete viiruste väikest osahulka.

Kui opiaatide kasutamise tõttu uuritavas populatsioonis on HIV X4 troopsete viiruste protsent väga madal, ei pruugi klassifikaatorid üksikuid X4 tüvesid ära tunda. Enamus troopsuse hindamise klassifikaatoreid on töötatud välja pikaajaliselt ravi saanud isikutelt isoleeritud viiruste järjestuste järgi. Lisaks on X4 troopsete viiruste sagedus üldiselt suurem populatsioonis, mis ei koosne süstivatest narkomaanidest. Seega ei pruugi sellistes tingimustes väljatöötatud meetodite täpsused ning tundlikkused olla piisavad CRF06_cpx troopsuse hindamiseks Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis.

Antud töö peamiseks puuduseks on, et uuritavate viiruste troopsust ei ole kinnitatud fenotüübilise testiga, mis võimaldaks hinnata klassifikaatorite tundlikkust ja täpsust. Fenotüübiliste andmete põhjal saaksime väita, kas praegu üheks parimaks mitte B alatüüpi kuuluvate viiruste troopsuse hindamise klassifikaatoriks peetakse Geno2pheno,

on sobiv ka CRF06_cpx tüvede troopsuse hindmiseks ja kas seda võiks rakendada ka kliinilises praktikas.

Viiruste V3 piirkonna analüüsil avastati paljude viiruste puhul aminohappelise järjestuse ülimalt konserveerunud GPG piirkonnas glütsiini asendusalaniiniga esimeses positsioonis (15% viirustest). Nimetatud asendus ei ole CRF06_cpx viirustel sagedasti esinev, kuna HIV järjestuste andmebaasis olevatel CRF06_cpx järjestustel esines APG vaid 4% juhtudest. Varasemalt on avaldatud töid, mis kirjeldavad inimeselt isoleeritud viiruse GPG järjestuse teise aminohappe muutusi, kuid mitte esimese (Hu *et al.*, 2000). *In vitro* katsed on näidanud, et nii APG esinemine kui nende kolme aminohappe deletsioon kaotavad viiruse nakatumisvõime olenemata viiruse troopsusest (Grimaila *et al.*, 1992; Su *et al.*, 2000).

Kuna avastatud muutus on niivõrd sage, saab välistada võimaluse, et tegu võiks olla sekveneerimisel tekkinud veaga. Samuti võib kindlat väita, et selline muutus ei muuda viirust nakatumisvõimetuks.

Kuigi et antud aminohappe asendus ei seostunud teiste troopsuse klassifikaatoritega ega peremeesorganismi geneetiliste markeritega, võib see omada rolli viiruse koretseptori kasutuses ja selle läbi ka haiguse progressioonis.

Antud uurimustöö eesmärgiks olnud seost inimese geneetiliste markerite ning viiruse troopsuse vahel ei leitud, kuid viiruste troopsuse täpsemal või suuremas hulgas määramisel, võivad sellised assotsiatsioonid avalduda.

Selleks, et hinnata, milline genotüübiline test on sobivaim CRF06_cpx tüüpi viiruste troopsuse määramiseks on plaanis võrrelda fenotüübilise ning genotüübiliste testide tulemusi. Fenotüübilise testi tulemuste järgi oleks võimalik kombineerida erinevatest genotüübilistest testidest täpsem meetod CRF06_cpx tüüpi viiruste troopsuse hindamiseks.

Antud töös kasutatud sekveneerimismeetodil on võimalik sekveneerida vaid domineeriv viiruspopulatsioon. Kuna X4 troopsusega tüved võivad olla siiski organismis olemas, aga väiksemas osahulgas, siis on plaanis kõikide X4 troopse viirusega nakatunute väljaselgitamiseks sekveneerida erinevatelt indiviididelt isoleeritud viirused erinevate viirustüvede kaupa järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodil.

Süvasekveneerimine tooks rohkem selgust ka GPG muutusega viiruste esinemise ning leviku kohta ja täpsemad troopsuse hindamise meetodid aitaksid selgitada välja, kas antud muutus on oluline viiruse seondumisel rakulise koretseptoriga, või mitte.

Järeldused

- Peamiseks viirustüveks on Eestis CRF06_cpx ja samasugused tulemused saadi ka antud uuringus. Järjestuste varieeruvuse analüüsil leiti 15% V3 järjestustest konserveerunud GPG piirkonnas esimeses positsioonis haruldane muutus, kus glütsiin oli asendunudalaniiniga.
- Praeguseks välja töötatud troopsuse hindamise meetoditel määratud X4 troopsete viiruste hulk varieerus uuritavas populatsioonis märgatavalt. Troopsue hindamise klassifikaatorite omavaheline kattuvus oli suurim meetoditel, mille väljatöötamiseks on kasutatud B-alatüübi järjestusi.
- Uuritavas süstivate narkomaanide populatsioonis esines CCL5 haplotüüpidest teistest oluliselt rohkem A haplotüüp ning AA haplotüübipaar. CCR5 haplotüüpidest esines enim HHE ning HHC haplotüübid. Haplotüübipaaridest olid kõige sagedasemad HHE/HHC ja HHE/HHE haplotüübipaarid.
- Geneetiliste markerite ning viiruse troopsuse vaheliste seoste uurimisel leiti CCR5 haplotüüp HHE ja Geno2pheno meetodil ennustatud X4 troopsete viiruste vahel nõrk seos ja haplotüüp HHG2 ning WetCat C4.5 klassifikaatori tulemuse vahel oli näha trendi, mis võib viidata HHG2 haplotüübi ning X4 troopse viiruse esinemise seosele.

Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti Eesti süstivate narkomaanide populatsioonis HIV nakkust mõjutavate geneetiliste markerite ning viiruse troopsuse vahelisi seoseid.

Uuritavas populatsioonis olid määratud geneetilisest markeritest HIV peamise koretseptori CCR5 haplotüübid ning tema peamiste ligandide CCL5 haplotüübid ning CCL3L1 koopiaarv.

HIV troopsuse määramiseks isoleeriti uuringus osalenud isikute verest viirused, millega viidi läbi viiruste järjestuste analüüs.

Järjestuste analüüsil leiti 15% järjestustest haruldane muutus viiruse retseptori stuktuuris.

Viiruste troopsuse hindamine viidi läbi kõiki hetkel olemasolevate genotüübiliste troopsuse hindamise meetoditega. Seejärel viidi läbi troopsuse hindamise meetodite omavaheline võrdlus, mis näitas, et uuritavas populatsioonis on sobivaimad B alatüüpi viiruste järgi väljatöötatud troopsuse hindamise meetodid.

Viiruste troopsuse ning geneetiliste markerite seoste uurimisel leiti nõrk seos HIV koretseptori CCR5 HHE haplotüübi ning viiruse troopsuse vahel, samuti täheldati trendi CCR5 HHG2 haplotüübi ning viiruse troopsuse vahel.

Töö tulemusena selgus, et viiruse troopsuse ning inimese geneetiliste markerite vahel võib esineda seoseid, kuid nende kinnitamiseks on vajalik viia läbi suurema hulga ning täpsemate meetoditega uuringud.

Tänuavaldused

Olen väga tänulik Irja Lutsarile mulle antud võimaluse eest.

Lisaks soovin tänada eelkõige Kristi Huiki ja Radko Avi, aga ka Merit Pauskarit tarkade nõuannete, abivalmiduse, tähelepanelikkuse, mõistmise ja kannatlikkuse eest.

Instituudi hea ja sõbraliku töökeskkonna eest soovin tänada kõiki laborikaaslasi.

Summary

Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) is the main etiologic agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS).

HIV viruses are divided into groups - M (major), N (non-M), O (outlier) and P (not named). M group is further divided into subtypes A-D, F-H and J-K. When person is infected with several different viruses from different subtypes the circulating recombinant forms (CRF) can spring up.

It is also possible to divide viruses according to their ability to infect different cells ie tropism.

In the viral transmission HIV uses CD4 receptor as the main receptor and CCR5 and/or CXCR4 as a coreceptor. CCR5 receptors are mainly expressed on macrophages and monocytes and CXCR4 on T-lymphocytes. It has been shown that the prevalence of the viruses that are able to use different coreceptors change in the course of the infection. Just after getting infected mostly CCR5 using viruses are prevalent, but in later phases of the disease CXCR4 using viruses emerge. Due to this phenomena, viruses using CXCR4 are associated with worse outcome

The length of HIV latent phase is affected by the genetic background. It has been shown that a number of genes like CCR5, coding HIV coreceptor and also CCL3L1 and CCL5, coding ligands of the CCR5 receptor, have an influence on the disease.

The aim of this study was to find out if there is an association between genetic markers and the tropism of the virus.

Viruses were isolated from the samples collected from the Estonian intravenous drug users. 96% of the viruses belonged to the monophyletic recombinant CRF06_cpx group of viruses as shown also previously.

The tropism of the viruses were determined with all genotypic classifiers available.

The classifiers were compared according to their ability to predict tropism in CRF06_cpx viruses. The results varied significantly. Better results were obtained with classifiers, based on the sequences of subtype B viruses.

The association study were carried out. No significant association was found between tropism and genetic markers, but a trend between viral tropism and CCR5 HHE haplotype and CCR5 HHG2 were discovered.

When viral sequences were analysed, rare mutation in the viral V3 region, was found.

Kasutatud kirjandus

- Adojaan, M., T. Kivisild, et al. (2005). Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**(5): 598-605.
- Adojaan, M., T. Molder, et al. (2007). High prevalence of the CCR5Delta32 HIV-resistance mutation among Estonian HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**(2): 193-7.
- Alexaki, A., Y. Liu, et al. (2008). Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res* **6**(5): 388-400.
- Alkhatib, G., C. C. Broder, et al. (1996). Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol* **70**(8): 5487-94.
- Anderson, J. P., A. G. Rodrigo, et al. (2000). Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E. *J Virol* **74**(22): 10752-65.
- Ansari, A. W., H. Heiken, et al. (2007). Dichotomous effects of C-C chemokines in HIV-1 pathogenesis. *Immunol Lett* **110**(1): 1-5.
- Ansari, A. W., R. E. Schmidt, et al. (2007). Prednisolone mediated suppression of HIV-1 viral load strongly correlates with C-C chemokine CCL2: In vivo and in vitro findings. *Clin Immunol* **125**(1): 1-4.
- Aquaro, S., P. Menten, et al. (2001). 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* **75**(9): 4402-6.
- Arien, K. K., Y. Gali, et al. (2006). Replicative fitness of CCR5-using and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 biological clones. *Virology* **347**(1): 65-74.
- Atchison, R. E., J. Gosling, et al. (1996). Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science* **274**(5294): 1924-6.
- Avi, R., K. Huik, et al. (2009). Absence of genotypic drug resistance and presence of several naturally occurring polymorphisms of human immunodeficiency virus-1 CRF06_cpx in treatment-naïve patients in Estonia. *J Med Virol* **81**(6): 953-8.
- Balter, M. (1996). A second coreceptor for HIV in early stages of infection. *Science* **272**(5269): 1740.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599): 868-71.
- Berger, E. A., P. M. Murphy, et al. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**: 657-700.
- Blanpain, C., B. Lee, et al. (2000). Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. *Blood* **96**(5): 1638-45.

- Blanpain, C., I. Migeotte, et al. (1999). CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* **94**(6): 1899-905.
- Bobkov, A. F., E. V. Kazennova, et al. (2004). Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J Med Virol* **74**(2): 191-6.
- Boyd, M. T., G. R. Simpson, et al. (1993). A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* **67**(6): 3649-52.
- Chabot, D. J., H. Chen, et al. (2000). N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **74**(9): 4404-13.
- Chalmet, K., F. Van Wanzele, et al. (2008). Impact of Delta 32-CCR5 heterozygosity on HIV-1 genetic evolution and variability--a study of 4 individuals infected with closely related HIV-1 strains. *Virology* **379**(2): 213-22.
- Clavel, F., F. Brun-Vezinet, et al. (1986). [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *C R Acad Sci III* **302**(13): 485-8.
- Davis, C. B., I. Dikic, et al. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* **186**(10): 1793-8.
- de Jong, J. J., J. Goudsmit, et al. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* **66**(2): 757-65.
- De Mendoza, C., C. Garrido, et al. (2009). Changes in drug resistance patterns following the introduction of HIV type 1 non-B subtypes in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**(10): 967-72.
- Fatkenheuer, G., A. L. Pozniak, et al. (2005). Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med* **11**(11): 1170-2.
- Feng, L. (2000). Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol Res* **21**(2-3): 203-10.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**(5263): 872-7.
- Fouchier, R. A., M. Groenink, et al. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* **66**(5): 3183-7.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-72.
- Galimand, J., P. Frange, et al. Short communication: evidence of HIV type 1 complex and second generation recombinant strains among patients infected in 1997-2007 in France: ANRS CO06 PRIMO Cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**(6): 645-51.
- Gao, F., D. L. Robertson, et al. (1998). An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic

- comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* **72**(12): 10234-41.
- Gaschen, B., J. Taylor, et al. (2002). Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* **296**(5577): 2354-60.
- Gilbert, P. B., I. W. McKeague, et al. (2003). Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* **22**(4): 573-93.
- Gonzalez, E., M. Bamshad, et al. (1999). Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 12004-9.
- Gorry, P. R., C. Zhang, et al. (2002). Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5 Delta 32 allele. *Lancet* **359**(9320): 1832-4.
- Hemelaar, J., E. Gouws, et al. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids* **20**(16): W13-23.
- Herbein, G., U. Mählke, et al. (1998). Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* **395**(6698): 189-94.
- Hirashima, M., T. Ono, et al. (1992). Nucleotide sequence of the third cytokine LD78 gene and mapping of all three LD78 gene loci to human chromosome 17. *DNA Seq* **3**(4): 203-12.
- Huang, C. C., M. Tang, et al. (2005). Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**(5750): 1025-8.
- Huik, K., M. Sadam, et al. CCL3L1 copy number is a strong genetic determinant of HIV seropositivity in Caucasian intravenous drug users. *J Infect Dis* **201**(5): 730-9.
- Kahle, K. M., H. K. Steger, et al. (2009). Asymmetric deactivation of HIV-1 gp41 following fusion inhibitor binding. *PLoS Pathog* **5**(11): e1000674.
- Kalev, I., K. Oselin, et al. (2003). CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes. *J Diabetes Complications* **17**(6): 387-91.
- Kroeze, W. K., D. J. Sheffler, et al. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci* **116**(Pt 24): 4867-9.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**(6686): 648-59.
- Lee, B., M. Sharron, et al. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5215-20.
- Leitner, T., A. Alaeus, et al. (1995). Yet another subtype of HIV type 1? *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(8): 995-7.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**(3): 367-77.

- Lwembe, R., R. W. Lihana, et al. (2009). Changes in the HIV type 1 envelope gene from non-subtype B HIV type 1-infected children in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**(2): 141-7.
- Martinson, J. J., N. H. Chapman, et al. (1997). Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* **16**(1): 100-3.
- McNicholl, J. M., D. K. Smith, et al. (1997). Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* **3**(3): 261-71.
- Menten, P., A. Wuyts, et al. (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(6): 455-81.
- Meyer, L., M. Magierowska, et al. (1997). Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. The SEROCO Study Group. *Aids* **11**(11): F73-8.
- Mitchell, R. S., B. F. Beitzel, et al. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* **2**(8): E234.
- Modi, W. S. (2004). CCL3L1 and CCL4L1 chemokine genes are located in a segmental duplication at chromosome 17q12. *Genomics* **83**(4): 735-8.
- Mueller, A., N. G. Mahmoud, et al. (2006). Diverse signalling by different chemokines through the chemokine receptor CCR5. *Biochem Pharmacol* **72**(6): 739-48.
- Mummidi, S., M. Bamshad, et al. (2000). Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides in the pathogenesis of HIV-1 and simian immunodeficiency virus. *J Biol Chem* **275**(25): 18946-61.
- Nibbs, R. J., J. Yang, et al. (1999). LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1alpha (LD78alpha), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J Biol Chem* **274**(25): 17478-83.
- Plantier, J. C., M. Leoz, et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**(8): 871-2.
- Proudfoot, A. E., R. Buser, et al. (1999). Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. *J Biol Chem* **274**(45): 32478-85.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**(6593): 722-5.
- Schuitmaker, H., N. A. Kootstra, et al. (1992). Differential tropism of clinical HIV-1 isolates for primary monocytes and promonocytic cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**(9): 1679-82.
- Shrestha, S., M. Nyaku, et al. Variations in CCL3L gene cluster sequence and non-specific gene copy numbers. *BMC Res Notes* **3**: 74.
- Zetterberg, V., V. Ustina, et al. (2004). Two viral strains and a possible novel recombinant are responsible for the explosive injecting drug use-associated HIV type 1 epidemic in Estonia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(11): 1148-56.

- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**(6685): 595-9.
- Takeda, S., S. Kadowaki, et al. (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* **520**(1-3): 97-101.
- Ustina, V., K. Zilmer, et al. (2001). Epidemiology of HIV in Estonia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**(1): 81-5.
- Uuskula, A., A. Kalikova, et al. (2002). The role of injection drug use in the emergence of Human Immunodeficiency Virus infection in Estonia. *Int J Infect Dis* **6**(1): 23-7.
- van de Laar, M. J. and G. Likatavicius (2009). HIV and AIDS in the European Union, 2008. *Euro Surveill* **14**(47).
- Whitcomb, J. M., W. Huang, et al. (2007). Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 566-75.
- Wood, G. S., N. L. Warner, et al. (1983). Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol* **131**(1): 212-6.
- Wyatt, R. and J. Sodroski (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**(5371): 1884-8.
- An, P., G. W. Nelson, et al. (2002). Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 10002-7.
- Brumme, Z. L., J. Goodrich, et al. (2005). Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis* **192**(3): 466-74.
- de Jong, J. J., J. Goudsmit, et al. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* **66**(2): 757-65.
- de Mendoza, C., K. Van Baelen, et al. (2008). Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr* **48**(3): 241-4.
- Degenhardt, J. D., P. de Candia, et al. (2009). Copy number variation of CCL3-like genes affects rate of progression to simian-AIDS in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *PLoS Genet* **5**(1): e1000346.

- Gonzalez, E., R. Dhanda, et al. (2001). Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5199-204.
- Gonzalez, E., H. Kulkarni, et al. (2005). The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* **307**(5714): 1434-40.
- Gornalusse, G., S. Mummidi, et al. (2009). CCL3L Copy number variation and the co-evolution of primate and viral genomes. *PLoS Genet* **5**(1): e1000359.
- Huik, K., M. Sadam, et al. CCL3L1 copy number is a strong genetic determinant of HIV seropositivity in Caucasian intravenous drug users. *J Infect Dis* **201**(5): 730-9.
- Jensen, M. A. and A. B. van 't Wout (2003). Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev* **5**(2): 104-12.
- Lengauer, T., O. Sander, et al. (2007). Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol* **25**(12): 1407-10.
- Mack, M., B. Luckow, et al. (1998). Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* **187**(8): 1215-24.
- McDermott, D. H., M. J. Beecroft, et al. (2000). Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Aids* **14**(17): 2671-8.
- Meddows-Taylor, S., S. L. Donniger, et al. (2006). Reduced ability of newborns to produce CCL3 is associated with increased susceptibility to perinatal human immunodeficiency virus 1 transmission. *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 2055-65.
- Paxton, W. A., R. Liu, et al. (1998). Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* **244**(1): 66-73.
- Poveda, E., E. Seclen, et al. (2009). Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother* **63**(5): 1006-10.
- Raymond, S., P. Delobel, et al. (2008). Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *Aids* **22**(14): F11-6.
- Raymond, S., P. Delobel, et al. Prediction of HIV type 1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr* **53**(2): 167-75.
- Saha, K., G. Bentsman, et al. (1998). Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. *J Virol* **72**(1): 876-81.
- Sander, O., T. Sing, et al. (2007). Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol* **3**(3): e58.

- Swenson, L. C., A. Moores, et al. Improved Detection of CXCR4-Using HIV by V3 Genotyping: Application of Population-Based and "Deep" Sequencing to Plasma RNA and Proviral DNA. *J Acquir Immune Defic Syndr*.
- Tersmette, M., R. E. de Goede, et al. (1988). Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* **62**(6): 2026-32.
- Whitcomb, J. M., W. Huang, et al. (2007). Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 566-75.