

Polimorfizam gena za interleukin 28B u osoba zaraženih virusom ljudske imunodeficijencije

Pehar, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:187929>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sanja Pehar

Polimorfizam gena za interleukin 28B u osoba zaraženih virusom
ljudske imunodeficijencije

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević“, Odsjek za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku, pod vodstvom dr. sc. Snježane Židovec Lepej, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

ZAHVALE

Srdačno zahvaljujem mentorici, znanstvenoj savjetnici dr. sc. Snježani Židovec-Lepej, Voditeljici Laboratorija za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu, što mi je omogućila izradu diplomskog rada u željenom laboratoriju. Također zahvaljujem dr.sc. Ivani Grgić na povjerenju, stručnim savjetima, velikoj pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i dipl. ing. Lani Gorenc na pomoći i susretljivosti prilikom izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Polimorfizam gena za interleukin 28B u osoba zaraženih virusom ljudske imunodeficijencije

Sanja Pehar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Zaraza virusom ljudske imunodeficijencije (HIV) povezuje se s progresivnom deficijencijom imunološkog sustava. CD4+ T-limfociti su osnovna subpopulacija stanica koju virus ljudske imunodeficijencije zaražava te tijekom infekcije dolazi do deplecije ovih stanica u krvi HIV-pozitivnih osoba što služi kao prognostički parametar za progresiju HIV-bolesti. Interferoni λ inhibiraju replikaciju različitih virusa. Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860 u promotoru gena za interleukin-28B (jedan od interferona λ) utječe na koncentraciju tog citokina u organizmu. Osobe koje su C homozigoti imaju veće koncentracije IL-28B te sporiju progresiju bolesti. Cilj ovog istraživanja je odrediti povezanost između polimorfizma gena za IL-28B i imunološkog statusa HIV-om zaraženih osoba. Ispitanike sam podijelila u tri skupine prema apsolutnom broju CD4+ T-limfocita te metodom PCR-a u stvarnom vremenu odredila polimorfizam gena za IL-28B. Prva skupina su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te minimalno godinu dana nakon toga imale > 500 CD4+ limfocita / μ l krvi. Druga skupina su osobe koje su u kliničku skrb ušle s < 200 CD4+ limfocita / μ l krvi, ali je broj CD4+ limfocita porastao do > 500 CD4+ limfocita / μ l krvi nakon početka terapije antiretrovirusnim lijekovima. Treća skupina su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te nakon minimalno godinu od započinjanja antiretroviralne terapije imale < 200 CD4+ limfocita / μ l krvi. C homozigoti su najčešća skupina u prvoj i trećoj skupini ali i u čitavoj populaciji (50,5 %). Heterozigoti su prisutni u populaciji sa 36,7 % i najčešći je genotip u drugoj skupini ispitanika. T homozigoti su prisutni u populaciji sa 12,8 %, i najrjeđi je genotip u sve tri skupine. Nema statistički značajnih razlika između pojedinih skupina ispitanika. Istraživanje je pokazalo da nema povezanosti između progresije bolesti i IL-28 genotipa u HIV zaraženih osoba.

(38 stranica, 8 slika, 3 tablice, 54 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik).

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: HIV, CD4+ T-limfociti, interferon, IL-28B

Voditelj: Dr.sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica

Suvoditelj: Doc. dr.sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji: Doc.dr.sc. Inga Marijanović, prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 17.04.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Polymorphism of interleukin 28B gene in human immunodeficiency virus infected individuals

Sanja Pehar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with progressive deficiency of the immune system. CD4⁺ T-lymphocytes are the primary targets of HIV which leads to depletion of this cell population in HIV-infected individuals which serves as a prognostic marker for HIV disease progression. Interferons λ inhibit the replication of different viruses. Single-nucleotide polymorphism (SNP) of interleukin 28B (IL-28B, one of λ interferons) affects the concentration of that interleukin in the organism. C homozygotes have higher concentrations of that interleukin and therefore slower disease progression. The aim of this study is to determine the correlation between IL-28B SNP and immunological status of HIV-infected individuals. I have divided the patients into three groups considering their CD4⁺ count and using a real-time PCR test determined their IL-28B genotype. First group consisted of patients who had > 500 CD4⁺ lymphocytes / μ l at entrance to care and at least for one year after. In the second group were patients who had < 200 CD4⁺ lymphocytes / μ l but then their CD4⁺ count rose to > 500 lymphocytes / μ l and stayed as high for at least a year. Third group had patients who entered clinical care with < 200 CD4⁺ lymphocytes / μ l at and remained so for at least a year. C homozygotes are most frequent in entire study group (50,5 %) as well as in the first and third group of patients. Heterozygotes were present in 36,7 % in the entire study group and were the most frequent in second group of patients. T homozygotes were the least frequent in an entire study population and all three groups. There were no statistically significant differences in genotype distribution between groups so this study showed that there is no correlation between disease progression and IL-28B genotype in HIV-infected individuals.

(38 pages, 8 figures, 3 tables, 54 references, original in: Croatian)

The thesis is deposited in the Central Biological Library.

Keywords: HIV, CD4⁺ T-cells, interferon, IL-28B

Supervisor: Dr.sc. Snježana Židovec-Lepej, Senior Research Associate

Cosupervisor: Dr. sc. Inga Marijanović, Asst. Prof

Reviewers: Doc.dr.sc. Inga Marijanović, prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Thesis accepted: 17.04.2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Imunološki sustav	1
1.1.1. Urođena i stečena imunost	1
1.1.2. Uloga antigen-prezentirajućih stanica	2
1.2. Interferoni	3
1.2.1. Interferon lambda	3
1.2.2. Interleukin-28B	5
1.3. Virus ljudske imunodeficijencije (HIV)	6
1.4. Morfološka struktura virusa i organizacija genoma	7
1.5. Replikacijski ciklus HIV-a	10
1.6. Imunopatogeneza HIV infekcije	11
1.7. Antiretrovirusna terapija	13
1.8. Protočna citometrija	14
1.9. Lančana reakcija polimerazom	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Ispitanici	19
3.2. Biološki uzorci	19
3.3. Reagensi i otopine	20
3.3.1. Reagensi i otopine za protočnu citometriju	20
3.3.2. Reagensi i otopine za izolaciju ljudske DNA	21
3.3.3. Reagensi i otopine za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu	22
3.4. Oprema, računalni programi i potrošni materijal	22
3.5. Metode	23
3.5.1. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi protočnom citometrijom	23
3.5.2. Izolacija ljudske DNA	24
3.5.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	24
3.5.4. Statistička analiza	26
4. REZULTATI	26
4.1. Podaci o ispitanicima	26
4.2. Rezultati genotipova	26
5. RASPRAVA	29

6. ZAKLJUČCI.....	31
7. LITERATURA.....	32
8. ŽIVOTOPIS	38

1. UVOD

1.1. Imunološki sustav

Imunologija je biomedicinska znanost koja proučava imunost tj. sposobnost organizma da se odupre djelovanju stranih tvari (antigena). Imunološki sustav čine stanice i molekule koje posreduju u imunosti, a njihovo zajedničko i precizno kontrolirano međudjelovanje nazivamo imunoreakcijom (Andreis i sur., 2010).

1.1.1. Urođena i stečena imunost

Postoje dvije temeljne vrste obrambenih mehanizama u organizmu; nespecifični (urođeni) i specifični (stečeni). Nespecifična otpornost sastoji se od čitavog niza nespecifičnih mehanizama zaštite od infekcije koji uključuju fizičke barijere, urođeno ubilačke stanice (eng. *natural killer cells*, NK), mononuklearne fagocite i polimorfonuklearne limfocite, enzime sustava komplementa, molekule koje prepoznaju obrasce strukture mikroba te solubilne medijatore tj. citokine koji koordiniraju sve aspekte imunosti. Djeluje i bez prethodnog dodira organizma s određenim antigenom, te je usmjerena protiv svih antigena koji ulaze u organizam. Efektorski mehanizmi nespecifične imunosti ne razlikuju pojedine vrste antigena i izostaje imunološka memorija, ali reakcija je vrlo brza (Andreis i sur., 2010).

Specifičnu imunost čine mehanizmi koji se induciraju ili stimuliraju nakon specifičnog prepoznavanja stranog antigena u organizmu. Posrednici specifične ili stečene imunosti su limfociti T, limfociti B, makrofagi te brojni citokini. Specifična imunost dijeli se na humoralnu i staničnu. Humoralna imunost posredovana je antitijelima (molekule imunoglobulina) koje specifično prepoznaju i eliminiraju strane antigene. Antitijela sintetiziraju aktivirani B-limfociti (plazma stanice), dok je stanična imunost posredovana T-limfocitima i makrofagima (Murphy, 2012).

Svi stanični elementi krvi, uključujući i stanice imunološkog sustava nastaju iz pluripotentne hematopoetske matične stanice u koštanoj srži te tako nastaju dva tipa matičnih stanica. Iz limfoidne prastanice nastaju bijele krvne stanice; B, T limfociti i NK stanice. Iz mijeloidne prastanice nastaju ostali leukociti, eritrociti (crvene krvne stanice) i megakariociti

(Murphy 2012). Limfociti, kao i drugi leukociti izražavaju različite molekule koje se nazivaju leukocitnim diferencijacijskim antigenima (LDA). To su membranske i citoplazmatske molekule koje imaju brojne biološke uloge. Diferencijacijski antigeni na površini limfocita označuju se kraticom CD (eng. *cluster of differentiation*) i pripadajućim brojem koji označava monoklonsko antitijelo specifično za određenu molekulu. Neke CD molekule nazivamo identifikacijskim biljezima (markerima) jer su konstitutivno eksprimirane na membranama određene stanične subpopulacije. Neke se CD molekule pojavljuju isključivo tijekom aktivacije pa se nazivaju aktivacijskim biljezima. Biljezi sazrijevanja su CD molekule koje pokazuju stadij diferencijacije pojedine stanice (Béné, 1997).

1.1.2. Uloga antigen-prezentirajućih stanica

Glavne antigen-prezentirajuće stanice u imunološkom sustavu su makrofagi, B stanice i dendritičke stanice koje su ujedno i najveći induktori imunološkog odgovora (Lu i sur., 2004). Ostale antigen-prezentirajuće stanice su fibroblasti, epitelne stanice prsne žlijezde, epitelne stanice štitnjače, glija stanice, beta-stanice gušterače, endotel krvnih žila. Preteče dendritičkih stanica migriraju iz koštane srži kroz primarne limfatičke organe sve do reproduktivnog trakta. Cirkuliraju krvlju te uzimaju topive antigene i migriraju do sekundarnih limfatičkih organa, gdje aktiviraju antigen-specifične T-stanice. Antigen-prezentirajuće stanice na membrani eksprimiraju molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. *major histocompatibility complex*, MHC). Cijepanjem antigena nastali peptidi se vežu na komponente MHC molekula te cijeli kompleks odlazi na površinu stanice (Abbas, 2005). Citotoksični limfociti T (eng. *cytotoxic T lymphocyte*, CTL) imaju mogućnost prepoznavanja i eliminiranja virusom inficiranih stanica, te su ključan faktor u kontroli replikacije HIV-a (Maranon i sur., 2004). CD8 T- limfociti zahtijevaju prezentiranje antigenih peptida sa HLA I molekulama (eng. *human leukocyte antigen*, HLA) a CD4 T-limfociti sa HLA II molekulama (Andreis i sur., 2010).

1.2. Interferoni

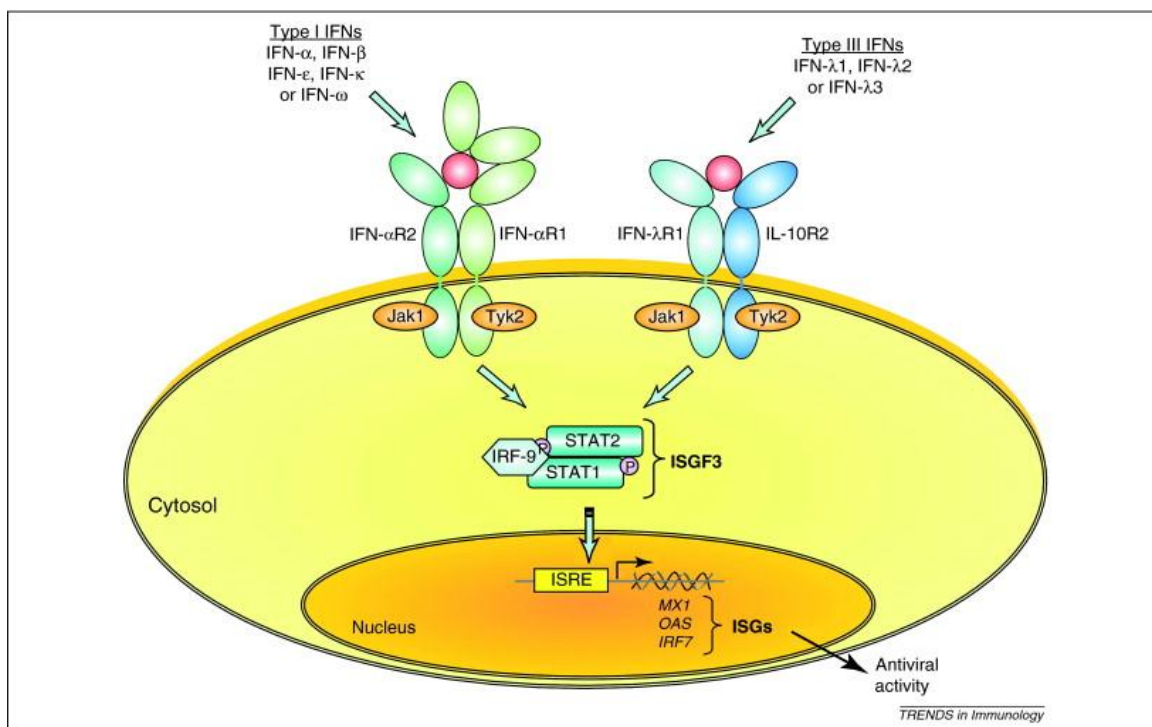
Citokini su glikoproteini niske molekularne mase koji posreduju u međustaničnoj komunikaciji. Potiču aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduju ili reguliraju imunoreakcije i upalne procese, a mogu djelovati i citotoksično. Prenose informacije među stanicama i važni su medijatori upalnih bolesti. Luče ih mnogobrojne stanice u organizmu, ali većinom imunološke i upalne stanice. Većina se citokina luči tek nakon podražaja (ozljeda tkiva, infekcije i dr.), a znatno manji dio konstitutivno. Podjela citokina je na interleukine, interferone i kemokine (Andreis i sur., 2010).

Interferoni su citokini koji sudjeluju u antivirusnom odgovoru. Razlikujemo tri tipa interferona (tip I, tip II i tip III) koji su podijeljeni na temelju upotrebe receptora, strukture i biološke aktivnosti (Lopušna i sur., 2013). Tip I djeluje preko heterodimernog receptorskog kompleksa (IFNAR1 i IFNAR2) (Donnelly i Kotenko, 2010) koji se nalazi na površini većine stanica u organizmu (Perry i sur., 2005). Aktivira signalni put vodeći do aktivacije gena koji su kontrolirani interferon stimulirajućim faktorom (eng. *interferon stimulated gene factor*, ISGF) i čiji produkti su uključeni u apoptozu i aktivaciju stečenog imunološkog sustava (Uze i Moneron 2007). Interferonu tipa II pripada IFN- γ , a njega luče T-limfociti, NK stanice, monociti, makrofagi i dendritičke stanice. Receptor za IFN- γ (eng. *interferon gamma receptor*, IFNGR) se sastoji od dva lanca koja vežu ligand, te dva koja provode signal (Schroder i sur., 2004).

1.2.1. Interferon lambda

Interferon-lambda (IFN- λ) je nedavno otkrivena grupa citokina koja je sposobna inducirati antivirusni odgovor. Sastoji se od tri strukturno povezanih subtipova nazvanih IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL28-A) i IFN- λ 3 (IL28-B) (Lopušna i sur., 2013).

Interferoni se vežu na različite komplekse receptora na staničnoj membrani. Receptor interferona tipa III je sastavljen od dva lanca: IFN- λ R1 i IL10R2. Oba receptorska lanca se sastoje od ekstracelularnog, transmembranskog i intracelularnog dijela. Vežanjem dolazi do aktivacije Janus kinaza Jak1 i Tyk2 koje fosforiliraju IFN- λ R1 ICD (eng. *intracytoplasmic domain*). Također dolazi do aktivacije transkripcijskih faktora STAT1 i STAT2 koji zajedno sa IRF-9 čine transkripcijski faktor ISGF3 (eng. *IFN-stimulated gene factor 3*) koji translocira iz citoplazme u jezgru stanice gdje se veže za ISRE (eng. *interferon stimulated response elements*). Aktiviraju se transkripcijski faktori te dolazi do transkripcije gena *OAS1*, *MX1* i *IRF7* (Donnelly i Kotenko, 2010) (Slika 1).



Slika 1. Vežanje receptora interferona (IFN) tipa I i III na membranu stanice uzrokuje kaskadu signalnih puteva dovodeći do transkripcije gena koji potiču antivirusni odgovor. Tip I i tip III IFN vežu se za različite receptore na staničnoj membrani, što dovodi do aktivacije Janus kinaza Jak 1 i Tyk2. Dolazi do aktivacije transkripcijskih faktora STAT1 i STAT2 koji s IRF-9 čine transkripcijski faktor poznat kao ISGF3 (eng. *IFN-stimulated gene factor 3*)

koji translocira iz citoplazme u jezgru stanice. ISGF3 regulira transkripciju gena vežući se za ISRE (eng. *interferon stimulated response elements*) te dolazi do transkripcije gena koji potiču antivirusni odgovor (Donnelly i sur., 2011).

1.2.2. Interleukin-28B

Polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) predstavlja najčešći oblik varijacije u odsječku DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*). Ustanovljeno je da SNP-ovi predstavljaju 90 % svih polimorfizama. Da bismo razliku u jednom nukleotidu nazvali SNP-om, najmanje zastupljen alel mora biti prisutan u najmanje 1 % ispitivane populacije. Najviše pažnje pobuđuju SNP-ovi koji mijenjaju funkciju ili izražaj gena. Pretpostavlja se da broj takvih SNP-ova iznosi 50000-250000. Taj broj predstavlja samo mali postotak od ukupnog broja SNP-ova od kojih većina ne mijenja fenotip. SNP-ovi predstavljaju potencijalno veliko područje u otkrivanju genskih razlika između pojedinaca koje bi mogle biti odgovorne za različit odgovor na lijekove (Jadan, 2004).

Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860 nalazi se 3kb uzvodno od gena za interleukin 28-B (IL28-B) (jedan od interferona λ) na kromosomu broj 19. Nekoliko studija je dokazalo antivirusnu aktivnost IFN- λ uključujući i virus ljudske imunodeficijencije. Osobe koje su C homozigoti imaju veće koncentracije IL-28B te sporiju progresiju bolesti (Machmach i sur., 2012).

SNP rs12979860 u genu koji kodira sintezu IL-28B povećava ekspresiju interferona λ te je jedan od čimbenika koji odlučuju o tijeku zaraze virusom hepatitisa C. U osoba koje su C homozigoti češće dolazi do izliječenja nego u osoba koje su heterozigoti ili T homozigoti (Parczewski i sur., 2012), dok je njegova uloga u kroničnom hepatitisu B još uvijek slabo poznata (Boglione i sur., 2014). Utjecaj polimorfizma primijećen je osobito kod oboljelih s HCV genotipom 1, dok je utjecaj polimorfizma u manjoj mjeri izražen kod oboljelih s genotipom 2 i 3 (Parczewski i sur., 2012).

1.3. Virus ljudske imunodeficijencije (HIV)

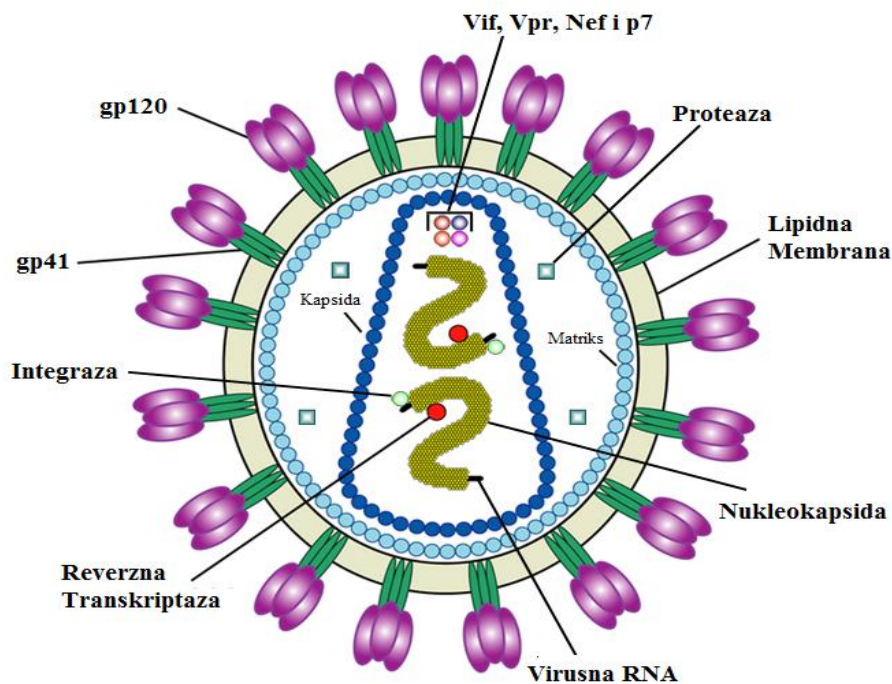
Virus ljudske imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*, HIV) je retrovirus koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (eng. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) (Gallo i sur., 1983). HIV je svrstan u porodicu ljudskih retrovirusa (*Retroviridae*), rod *Lentivirus* (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>).

1983. godine virus je izoliran iz punktata limfnog čvora homoseksualca oboljelog od kronične multiple limfadenopatije, a nazvan je virusom udruženim s limfadenopatijom (franc. *lymphadenopathie associe virus*, LAV) (Barre-Sinoussi i sur., 1983). Iz krvi bolesnika sa simptomima HIV-a iz Zapadne Afrike 1986. godine izoliran je virus sličan virusu ljudske imunodeficijencije i nazvan je virusom ljudske imunodeficijencije tipa 2 (HIV-2), a virus izoliran iz bolesnika 1983. godine u Parizu nazvan je virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) (Clavel i sur., 1986).

HIV-a zaražava CD4+ limfocite T, dendritičke stanice, makrofage. Nalazi se u tjelesnim tekućinama kao što su krv, sjemena tekućina, vaginalni sekreti, majčino mlijeko. Najčešći putevi prijenosa su nezaštićeni spolni odnos, u kojem dolazi do kontakta sjemene tekućine, sekreta rodnice ili krvi zaražene osobe sa sluznicom druge osobe, zatim izravnim unosom krvi zaražene osobe u organizam nezaražene osobe, i sa zaražene majke na dijete, tijekom trudnoće, poroda ili dojenja (Yu i Vajdy, 2010).

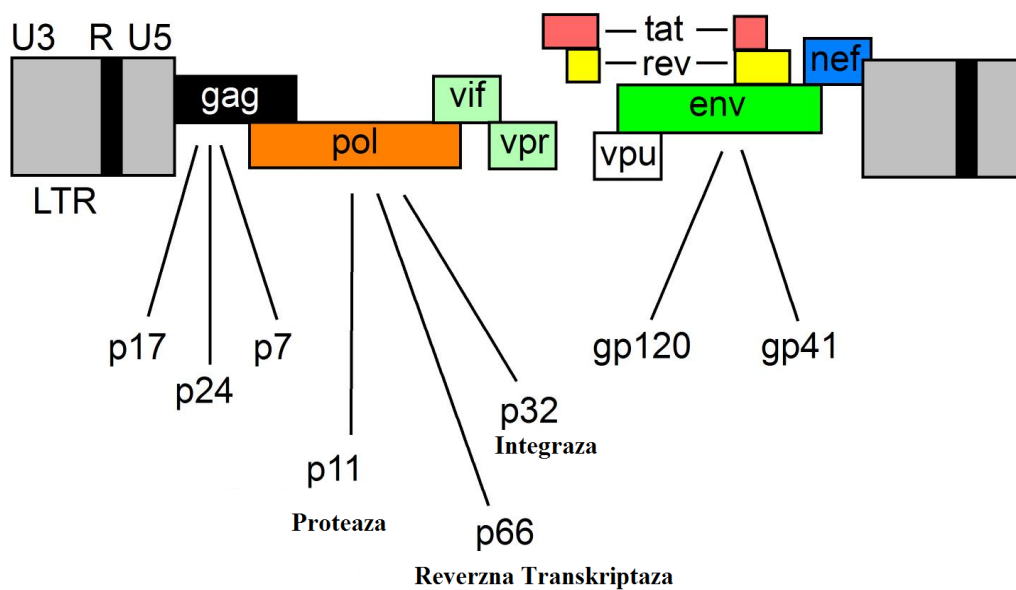
1.4. Morfološka struktura virusa i organizacija genoma

Virusna čestica promjera je 100 nm i obavijena lipidnim dvoslojem koji potječe od membrane stanice iz koje je virus izašao. Svaki virion sadrži 72 glikoproteinska kompleksa koji su integrirani u lipidnu membranu i koji se sastoje od glikoproteina (gp) 120 i transmembranskog gp41. U unutrašnjosti lipoproteinskog sloja se nalazi protein matriksa p17. Unutar kapside se nalaze 2 kopije RNA, te virusni enzimi: reverzna transkriptaza, integraza i proteaza (Briggs i Krausslich, 2011) (Slika 2).



Slika 2. Prikaz virusne čestice retrovirusa. Ovojnica virusa sastavljena je lipidnog dvosloja. Na ovojnici se nalaze glikoproteini koji se sastoje od dva dijela; glikoprotein 120 (gp) i transmembranski gp41. Unutar kapside se nalaze dvije kopije RNA, proteini, enzimi reverzna transkriptaza, integraza i proteaza koji su potrebni za replikaciju virusa (Preuzeto s: <http://bs.wikipedia.org/wiki/HIV>).

Tri gena, *gag*, *pol* i *env* kodiraju za više virusnih proteina, produkti ovih gena tvore virusnu česticu ili kodiraju za enzime virusa koji se nalaze u virusnoj čestici (Hill i sur., 2005). Gen *gag* kodira za proteine matriksa i kapside (Gherghe i sur., 2010). Gen *pol* kodira za proteazu, integrazu, reverznu transkriptazu (Sarafinos i sur., 2009). *Env* kodira za transmembranske glikoproteine gp120 i gp41 (Van Maele i sur., 2006). Osim tri glavna gena, HIV sadrži još šest gena (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* i *nef*) (Slika 3). Gen *vif* kodira protein VIF (eng. *viral infectivity factor*) koji suprimira rezistenciju domaćina na infekciju HIV-om. Gen *vpu* kodira za protein Vpu koji promovira unutarstaničnu degradaciju CD4+T-limfocita te pozitivno djeluje na otpuštanje virusa iz stanične membrane. Gen *vpr* kodira za protein VPR (eng. *viral protein R*) koji sudjeluje u transportu DNA u jezgru domaćina te dovodi do zastoja staničnog ciklusa (Malim i Emerman, 2008). Gen *tat* kodira za protein TAT (eng. *trans-activator of transcription*), pozitivni aktivator transkripcije, veže se na LTR (eng. *long terminal repeat*) promotor genoma virusa i potiče transkripciju (Hill i sur., 2005). Gen *rev* kodira za protein REV (eng. *regulator of virion protein expression*), veže se na mRNA i potiče ekspresiju strukturnih gena (Suhasini i Reddy, 2009). Gen *nef* kodira protein NEF (eng. *negative regulatory factor*) koji sprječava zarazu jednom zaražene stanice novim virionima kako ne bi došlo do superinfekcije i smrti stanice, a u HIV-om zaraženim makrofagima, kemokinima privlači CD4+T limfocite i omogućava da virus zarazi nove stanice (Arhel i Kirchhoff, 2009).



Slika 3. Prikaz genoma virusa HIV-1. LTR regija (eng. *long terminal repeat*) predstavlja dva kraja virusnog genoma te ne kodira za virusne proteine. Tri gena, *gag*, *pol* i *env* kodiraju za više virusnih proteina, produkti ovih gena tvore virusnu česticu ili kodiraju za enzime virusa koji se nalaze u virusnoj čestici. Gen *gag* kodira za proteine matriksa i kapside. Gen *pol* kodira za proteazu, integrazu, reverznu transkriptazu. *Env* kodira za transmembranske glikoproteine gp120 i gp41. Osim tri glavna gena, HIV sadrži još šest gena (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* i *nef*) (Preuzeto s: <http://hivbuch.files.wordpress.com/2012/01/3-abb-2.jpg>).

1.5. Replikacijski ciklus HIV-a

Za ulazak HIV-a u ciljanu stanicu potrebna je interakcija s primarnim receptorom i koreceptorom. Primarni receptor HIV-a je CD4 molekula najčešće eksprimirana na membrani CD4+ limfocita T i monocita. Gp120 se veže na površinsku molekulu CD4 i jedan od kemokinskih koreceptora; CXCR4 ili CCR5, a gp41 sudjeluje u fuziji virusne ovojnice i plazma membrane stanice domaćina te tako omogućuje ulazak virusnog genoma i njegovih proteina u citoplazmu (Klasse, 2012). Reverzna transkriptaza prepisuje virusnu RNA u komplementarnu DNA (cDNA). Virusna cDNA se integrira pomoću enzima integraze u genom stanice domaćina. Takva integrirana cDNA se naziva provirusna DNA. Transkripcija provirusne DNA stimulirana je transkripcijskim faktorima koji su prisutni u svim aktiviranim T stanicama. Aktivaciju CD4+ T- limfocita inducira transkripcijski faktor NFkB, koji se veže na promotore stanične DNA i virusne LTR sekvence. Geni *tat* i *rev* (rani proteini) koji kodiraju za virusne proteine Tat i Rev promoviraju virusnu replikaciju u aktiviranim T stanicama te izlazak virusne RNA iz jezgre u citoplazmu. Translatiraju se kasni proteini Gag, Pol i Env koji u potpunosti formiraju virus te pupanjem sa stanične membrane iz stanice izlaze nove virusne čestice (Karn i Stoltzfus, 2012).

1.6. Imunopatogeneza HIV infekcije

Nekoliko tjedana nakon ulaska virusa u organizam akutna faza nastupa 3-6 tjedana nakon zaraze virusom a obilježena je raznim simptomima kao vrućica, povećanje limfnih čvorova, grlobolja, osip te bolovi u mišićima i zglobovima. Viremija u akutnoj HIV-1 infekciji izuzetno je visoka te dostiže i do 10^6 kopija HIV-1 RNA/ml plazme. Dolazi do smanjenja postotka i apsolutnog broja subpopulacije CD4+ limfocita T (Arnott i sur., 2010). Nakon akutne nastupa kronična infekcija koja napreduje od asimptomatske faze do uznapredovale, simptomatske faze bolesti. U asimptomatskoj fazi bolesti koncentracija virusne RNA u plazmi bolesnika uglavnom ne prelazi 10000 kopija HIV-1 RNA/mL, dok je nešto veća u limfnim čvorovima. Međutim, iako zaražena osoba nema izraženijih simptoma virus se svakodnevno umnožava, razara napadnute stanice te se postupno smanjuje broj CD4+ T- limfocita (Ford i sur., 2009).

U simptomatskoj fazi HIV infekcije broj CD4+ T-limfocita vrlo je nizak, a viremija vrlo visoka. Javljaju se brojni simptomi; umjereno do jako povećanje limfnih čvorova na vratu, ispod pazuha i u preponama, učestala povišenja tjelesne temperature, crvenilo kože, infekcije u području oko noktiju, učestala pojava herpesa na usnama, češća je pojava infekcija dišnih puteva, gubitak tjelesne težine i umor. Postepeno, kako imunološki sustav slabi, dolazi do razvoja sve većeg broja oportunističkih infekcija: *Candida albicans*, HSV (Herpes simplex

virus), Herpes zoster virus, Citomegalovirus, *Pneumocystis carinii* i *Mycobacterium tuberculosis*. Pacijenti oboljevaju i od različitih oblika tumora (Kaposi sarkom, limfomi), imunološki sustav je posve oslabljen te na kraju dolazi do smrti zaraženog (Fevrier i sur., 2011) (Slika 4).

Uzimanjem odgovarajuće antiretrovirusne terapije znatno se produljuje životni vijek i povećava kvaliteta života oboljenih osoba (Carrington i O'Brien, 2003). Manja skupina oboljelih osoba tzv. spori progresori (eng. *long term non-progressors*, LTNP) imaju sposobnost održavati pod kontrolom infekciju bez antiretroviralne terapije. Oni se genetički, imunološki i virološki razlikuju od progresora. HLA B*5701 povezan je sa sporijom progresijom HIV infekcije iako točan mehanizam djelovanja ovog alela nije poznat. Suprotno sporim progresorima postoji i skupina HIV-om inficiranih osoba koje razviju AIDS u relativnom kratkom periodu od ulaska virusa u organizam. Takve se osobe nazivaju brzim progresorima (eng. *rapid progressors*, RP). Brza progresija HIV bolesti povezana je s B*35 alelom (Lackner i sur., 2012).



Slika 4. Prikaz bolesti koje nastaju u odnosu na broj CD4+T- limfocita kod oboljelih pacijenata. U simptomatskoj fazi HIV infekcije broj CD4+ T-limfocita vrlo je nizak, a viremija vrlo visoka. Postepeno, kako imunološki sustav slabi, dolazi do razvoja sve većeg broja oportunističkih bolesti. Sa otprilike 500 CD4+ T-limfocita / μ l krvi dolazi do raznih infekcija kao bakterijske i gljivične infekcije kože. Kako se broj CD4+T- limfocita smanjuje, tako pacijenti oboljevaju i od različitih oblika tumora (Kaposi sarkom, limfomi) (Preuzeto s: http://huhiv.hr/wp-content/uploads/2011/09/hiv_begovac2.jpg).

1.7. Antiretrovirusna terapija

HIV infekcija liječi se antiretrovirusna terapijom (eng. *highly active antiretroviral treatment*, HAART), kombinacijom nekoliko vrsta lijekova koji djeluju na različite faze u životnom ciklusu virusa (Cohen i sur., 1997). Antiretrovirusni lijekovi dijele se u nekoliko skupina; inhibitori reverzne transkriptaze, inhibitori proteaze, inhibitori integraze, inhibitori fuzije i inhibitori CCR5 koreceptora (Arts i Hazuda, 2012). Inhibitori reverzne transkriptaze onemogućavaju sintezu DNA HIV-a iz RNA, direktno djelujući na aktivno mjesto enzima ili mijenjajući njegovu strukturu vezanjem na neku drugu poziciju čime je onemogućena katalitička aktivnost enzima. To su nukleotidni, nukleozidni i nenukleozidni analozi. Inhibitori proteaze svojim djelovanjem onemogućuju cijepanje primarnih translacijskih produkata te ne dolazi do stvaranja novih viriona. Dijele se u dvije skupine: kompetitivni inhibitori i nekompetitivni inhibitori (Ghohs i Anderson, 2011). Integraza je enzim potreban za ugradnju DNA HIV-a u genom domaćina. Inhibitori integraze kompetitivno inhibiraju integrazu zbog čega virus ne može ući u fazu latencije, smanjena je sinteza novih virusnih čestica i inficiranje zdravih stanica (Powderly, 2010). Inhibitori fuzije vežu se na peptide na površini virusne čestice sprječavajući vezanje virusa na receptore na površini ciljane stanice (Yuxian i sur., 2008). Inhibitor CCR5 koreceptora djeluje na stanični virusni koreceptor blokirajući interakciju gp120 HIV-a s CCR5 koreceptorom što je ključan korak u ulasku HIV-a u neinficiranu stanicu (Wilkin i Gulick, 2012).

Početak primjene antiretrovirusne terapije ovisi o simptomima, broju CD4+ limfocita T i viremiji te raznim drugim čimbenicima kao što su trudnoća i koinfekcije. Simptomatski bolesnici, kao i oni s apsolutnim brojem CD4+ limfocita T manjim od 350 stanica po μL krvi, počinju s primjenom terapije odmah po ulasku u kliničku skrb iako novije studije pokazuju da započinjanje liječenja pri apsolutnom broju CD4+ limfocita T između 350 i 500 po μl krvi ili čak iznad 500 stanica po μl krvi značajno smanjuje stopa smrtnosti. Primjenom terapije ne dolazi do potpunog izlječenja te se terapija uzima do kraja života bolesnika (Arts i Hazuda 2012). Broj CD4+ limfocita T treba pratiti svakih tri mjeseca nakon početka terapije, osobito kod bolesnika sa brojem manjim od $200/\mu\text{L}$. Ukoliko broj CD4+ limfocita T tijekom godinu dana terapije bude stabilan ($> 350/\mu\text{L}$), broj CD4+ limfocita T može biti praćen u intervalu od šest mjeseci (Huldrych i sur., 2014).

1.8. Protočna citometrija

Protočna citometrija je grupa analitičkih metoda koje omogućavaju istovremenu analizu morfoloških, biokemijskih i funkcionalnih karakteristika stanica ili staničnih dijelova. Protočni citometar sastoji se od protočnog, optičkog i elektroničkog dijela. U protočnom dijelu nalazi se izotonična tekućina u kojoj je suspenzija stanica koje analiziramo. U optičkom dijelu nalazi se laser čija zraka pada na površinu stanica, dio zrake koji se ogiba pod malim kutem proporcionalan je granularnosti jezgre stanica (SS, side scatter parametar) a dio zrake pod kutem od 90° proporcionalan je veličini stanica (FS, forward scatter parametar). Pomoću ta dva parametra razlikujemo u punoj krvi tri stanične populacije; neutrofile, monocite te limfocite. Laserska zraka koja pada na površinu stanice u izotoničnoj tekućini ekscitira fluorescentnu boju kojom je obilježena određena stanična komponenta ili monoklonsko antitijelo specifično za neku staničnu molekulu. Ekscitacija fluorescentne boje potiče emisiju svjetlosti određene valne duljine koja je karakteristična za pojedine fluorescentne boje. U elektroničkom dijelu protočnog citometra prikupljaju se svi podaci i pomoću odgovarajućeg kompjuterskog programa omogućava se analiza čestica (Ormerod 2008).

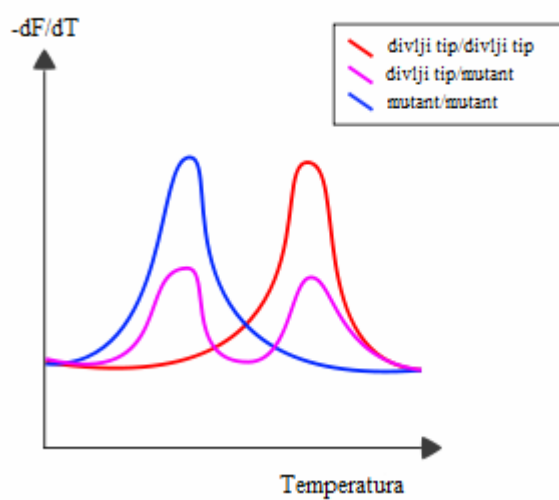
1.9. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda kojom se određeni dio DNA umnožava te nastaje veliki broj identičnih kopija. Godine 1983. Kary Mullis je otkrio i opisao metodu u kojoj se DNA umnožava bez kloniranja i to iz malih količina DNA. Na osnovama PCR metode je razvijeno niz novih postupaka koji su prilagođeni potrebama eksperimentalnih zahtjeva i razinama osjetljivosti i specifičnosti samog eksperimentalnog ili analitičkog modela. Metoda se sastoji od tri glavna koraka; denaturacija DNA kalupa, vezanje početnica na kalup te produljenje početnica polimerazom. Reakcijska smjesa priprema se od DNA, oligonukleotidnih početnica dugih 20-ak baznih parova, deoksinukleotid-fosfata (dNTP's), te Taq polimeraze (izolirana je iz bakterije *Thermophilus aquaticus*) u odgovarajućem puferu. Dvostruki lanac DNA molekule se zagrijavanjem na otprilike 94 °C razdvoji, slijedi vezanje početnica na komplementarne odjeljke DNA pri temperaturi od 50 – 60 °C. Zadnji korak je sinteza komplementarnog lanca pri temperaturi od 72 °C na kojoj je polimeraza aktivna (Grce, 2013).

PCR u stvarnom vremenu (Real-Time PCR) je osjetljiva i pouzdana metoda za detekciju nukleinskih kiselina. Umnožavanje sekvence DNA i detekcija produkata reakcije odvijaju se istovremeno. Za detekciju produkata reakcije mogu se koristiti boje koje se interkaliraju u DNA (etidijev bromid, SYBR Green). U vodenoj otopini njihova fluorescencija je utišana, a kad se prilikom amplifikacije ugrađuju u dsDNA fluoresciraju. Takva detekcija naziva se nespecifičnom jer se detektira se bilo koji fragment umnožen tijekom PCR-a. Specifični način detekcije uključuje detekciju pomoću specifičnih proba na koje su vezani fluorokromi. Postoje različite vrste proba. Hibridizacijska proba, detekcija po principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (eng. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET) se sastoji od dva dijela, jedan nosi donor boju, a drugi akceptor. Dizajnirane su tako da kad se obje vežu na DNA, donor i akceptor se nađu jedan kraj drugog dolazi do prijenosa energije i emitira se svjetlost određene valne duljine (Didenko, 2001).

Probe koje imaju formu ukosnice (eng. *molecular beacons*) na jednom kraju imaju signalnu molekulu (reporter), a na drugom utišavač fluorescencije (quencher). Kad se proba veže na DNA, signalna molekula i utišavač fluorescencije se nađu dovoljno daleko jedan od drugog da bi reporter mogao emitirati svjetlost određene valne duljine. TaqMan probe koriste egzonukleaznu aktivnost polimeraze da bi odvojili signalnu molekulu od utišavača fluorescencije razgrađujući pri tom probu. Kod škorpion (eng. *scorpion*) početnica na početnicu je vezana proba u formi ukosnice koja na dva različita kraja ima utišavač fluorescencije i signalnu molekulu. Tijekom vezanja, na jednoj strani početnice se ukosnica razdvaja i veže na komplementarnu DNA, a na drugoj polimeraza nastavlja lanac (Thelwell i sur., 2000).

Upotrebom hibridizacijskih proba mogu se otkriti mutacije gena pa i mutacija samo jedne baze, na temelju temperature taljenja (eng. *temperature melting*, T_m). T_m molekule DNA značajno ovisi o sastavu nukleotida. «Simple probe» su probe koje jače fluoresciraju kad su vezane na komplementarnu DNA nego kad su samostalno u otopini. Povećavanjem temperature prema T_m , probe se odvajaju od komplementarnog lanca te se fluorescencija smanjuje. Temperatura pri kojoj će se proba odvojiti od ciljnog fragmenta DNA ovisi o nukleotidu prisutnom u ciljnom fragmentu DNA (Jadan, 2004) (Slika 5).



Slika 5. Krivulja taljenja koja prikazuje promjenu fluorescencije s temperaturom. Divlji tip i mutant imaju jedan vrhunac fluorescencije, dok heterozigot ima dva vrhunca (Preuzeto s: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Melting_Curve_Analysis_Graphs.svg).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je istražiti povezanost polimorfizma jednog nukleotida rs12979860 u genu za IL-28B i imunološkog statusa u HIV-om zaraženih osoba. Ispitanike ću podijeliti u tri skupine prema apsolutnom broju CD4+ T-limfocita te metodom PCR-a u stvarnom vremenu odrediti polimorfizam gena za IL-28B. Zatim ću izračunati postoje li statistički značajne razlike među tri skupine ispitanika s različitom brzinom progresije bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje sam provela na 109 osoba zaraženih virusom ljudske imunodeficijencije (HIV). Ispitanike sam podijelila u tri skupine prema apsolutnom broju CD4+ limfocita T u krvi. Prva skupina su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te minimalno godinu dana nakon toga imale > 500 CD4+ limfocita T/ μl krvi. Druga skupina su osobe koje su u kliničku skrb ušle s < 200 CD4+ limfocita T/ μl krvi, ali je broj CD4+ limfocita T porastao do > 500 CD4+ limfocita T/ μl krvi nakon početka terapije antiretrovirusnim lijekovima. Treća skupina su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te nakon minimalno godinu od započinjanja antiretrovirusne terapije imale < 200 CD4+ limfocita T/ μl krvi.

3.2. Biološki uzorci

Biološki uzorci su uzimani venepunkcijom u dvije sterilne VACUTAINER epruvete s antikoagulansom K₃EDTA (etildiamintetraoctena kiselina). Krv za protočnu citometriju sam

pohranila na sobnoj temperaturi do analize. Punu krv za izolaciju DNA pohranila sam na -20 °C do izolacije.

3.3. Reagensi i otopine

3.3.1. Reagensi i otopine za protočnu citometriju

Reagens «CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 Monoclonal Antibody Reagents» u kojem je kombinacija monoklonskih antitijela specifična za molekule CD45, CD4, CD8 i CD3 za četverostruko bojanje (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Reagens »CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 Monoclonal Antibody Reagents» koji sadrži kombinaciju monoklonskih antitijela specifičnih za molekule CD45, CD56, CD19 i CD3 za četverostruko bojanje (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Monoklonsko antitijelo HLA-DR-PC-7 specifično za molekulu HLA-DR (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Monoklonsko antitijelo CD38-PC-7 specifično za molekulu CD38 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Reagens «ImmunoPrep Reagent System Whole blood lysing reagent» se sastoji od tri otopine (Immunoprep A, B i C) koje su prilagođene za pripremu uzoraka za protočnu citometriju pomoću aparata Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Otopina Immunoprep A sadrži formijatnu kiselinu (1,2 ml/l) i stabilizator. Immunoprep B je otopina Na₂CO₃ (6,0 g/l), NaCl (14,5 g/l), Na₂SO₄ (31,3 g/l) i stabilizatora. Otopina immunoprep C sastoji se od 10,0 g/l paraformaldehida i pufera.

Reagens «Flow-Count™ Flourospheres absolute count determination» koji sadrži fluorescentne mikrosfere poznate koncentracije (962-1023 flourosfere/μl, promjer 10 μm, emisijski spektar 525-700 nm) i omogućuje određivanje apsolutnog broja određene stanične subpopulacije direktno na protočnom citometru (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Reagens «Flow-Check™ Flourospheres» koji sadrži fluorescentne mikrosfere (promjer 10 μm, koncentracija 1*10⁶ flourosfera/μl, emisijski spektar 525-700 nm) i služi za provjeru i kalibraciju optičkog i protočnog dijela citometra (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Izotonična otopina «IsoFlow™ Sheath Fluid Azide free balanced electrolyte solution» koja se miješa s uzorkom tijekom mjerenja protočnim citometrom (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

3.3.2. Reagensi i otopine za izolaciju ljudske DNA

QIAamp DNA Mini Kit:

Pufer za lizu, sadrži gvanidin klorid, (Buffer AL)

Pufer za ispiranje, koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol, (Buffer AW1)

Pufer za ispiranje; koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol, a sadrži natrijev azid, (Buffer AW2)

Pufer za ispiranje koji sadrži 10 mM Tris-Cl i 0.5 mM EDTA, pH 9.0, (Buffer AE)

Proteinaza K, proteaza koja cijepa peptidnu vezu proteina na karboksilnom kraju hidrofobnih, alifatskih i aromatskih aminokiselina

3.3.3. Reagensi i otopine za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu

Redestilirana, deionizirana, autoklavirana voda PCR grade H₂O, (Roche Diagnostic, Germany)

Otopina magnezija Mg²⁺ (25 mM), (Roche Diagnostic, Germany)

Reakcijska smjesa koja sadrži početnice i probe (drži se na +4 °C) (TIB Molbiol, Germany)

Smjesa koja sadrži polimerazu i dNTP, Roche master, (Roche Diagnostic, Germany)

Kontrole; 10⁵ ciljnih molekula u 5 µL otopine (C homozigot, heterozigot, T homozigot), (TIB Molbiol, Germany)

3.4. Oprema, računalni programi i potrošni materijal

1. Aparat za pipetiranje uzoraka za protočnu citometriju Coulter PrepPlus 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)
2. Aparat za pripremu uzoraka za protočnu citometriju Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)
3. Protočni citometar CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) povezan s računalom Pentium (IBM, USA) i laserskim štampačem Business inkjet 2300 (Hewlett-Packard, USA)
4. Miješalica za epruvete, Vortex Vibromix (Tehtnica, Slovenija)
5. K₃EDTA VACUTAINER epruvete za uzimanje krvi (Becton Dickinson, USA)
6. Polistirenske epruvete 12*75 mm (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)
7. QIAamp Spin Column (Eppendorf); sadrže membranu od silikagela

8. Kolekcijske tubice (Eppendorf)
9. Automatske pipete (Thermo, Eppendorf)
10. Nastavci za automatske pipete (Eppendorf)
11. Ultracentrifuga K3K0 (Sigma)
12. Pasteur-pipete (Eppendorf)
13. Aparat za inkubaciju uzoraka Termomixer comfort (Eppendorf)
14. Termociklički amplifikator za PCR u stvarnom vremenu, LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostic, Germany)
15. Staklene kapilare za PCR u stvarnom vremenu, LightCycler Capillaries (20 μ l); (Roche Diagnostic, Germany)

3.5. Metode

3.5.1. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi protočnom citometrijom

Sustav za pripremu uzoraka za protočnu citometriju se sastoji od dva aparata; aparat za pipetiranje uzoraka PrepPlus 2 te aparat za inkubaciju uzoraka i lizu eritrocita Tq-Prep. Uzorke, reagensne i po dvije silikonizirane polistirenske epruvete stavila sam u PrepPlus 2 aparat. U prvom koraku se pipetira po 10 μ L smjese monoklonskih antitijela. U prvu epruvetu pipetira se kombinacija CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 i CD38-PC7 antitijela, dok se u drugu pipetira kombinacija CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 i HLA-DR PC7. Zatim se u svaku epruvetu pipetira po 100 μ L uzorka. Sljedeći korak je inkubacija uzoraka 10 minuta u aparatu Tq-Prep, a nakon inkubacije u uzorke se dodaje reagens koji se sastoji od tri otopine A, B i C. Pomoću reagensa liziramo eritrocite te fiksiramo membranu limfocita. U međuvremenu, u jednu silikoniziranu polistirensku epruvetu doda se 10-12 kapi reagensa koji služi za provjeru i kalibraciju optičkog i protočnog dijela citometra. U zadnjem koraku sam dodala 100 μ L reagensa koji sadrži fluorescentne mikrosfere poznate koncentracije, kako bi mogla odrediti apsolutni broj CD4⁺ limfocita T. Pripremljene uzorke analizirala sam na citometru CYTOMICS FC 500. Prikupljene podatke analizirala sam pomoću CXP softvera te dobila podatke o postotku limfocita B, limfocita T, NK stanica, CD4⁺ limfocita T, CD8⁺ limfocita T i aktiviranih limfocita T. Limfocite sam od ostalih stanica odvojila pomoću panleukocitnog biljega (CD45) i parametra SS «side scatter» koji

određuju granuliranost jezgre stanica te pomoću parametara SS i FS «forward scatter» koji govore o veličini stanice.

3.5.2. Izolacija ljudske DNA

Za izolaciju ljudske DNA koristila sam QIAamp DNA Mini Kit. U 20 μL QIAGEN proteaze dodala sam 200 μL uzorka i 200 μL pufera za lizu. To sam kratko vorteksirala te inkubirala 10 minuta na 56 °C. Zatim sam dodala 200 μL 98 % etanola, opet vorteksirala te prebacila cijeli volumen (620 μL) u QIAamp Mini Spin kolonu koja sadrži membranu od silikagela na koju se veže DNA te centrifugirala 1 minutu na 8000 okretaja u minuti (eng. *revolutions per minute*, rpm). Kolonu sam prebacila u novu kolekcijsku tubicu, dodala 500 μL pufera za ispiranje «Buffer AW1» te centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm-a. Nakon toga sam kolonu opet prebacila u čistu kolekcijsku tubicu i dodala pufer za ispiranje «Buffer AW2» te centrifugirala 3 minute na 14500 rpm-a. Kolonu sam zatim opet prebacila u novu kolekcijsku tubicu i centrifugirala na 14500 rpm 1 minutu bez dodavanja ičega. Ovaj korak služi da bi se s kolone maknuli svi ostaci pufera za ispiranje jer puferi sadrže etanol koji inhibira djelovanje polimeraze i onemogućava PCR. Kolonu sam zatim prebacila u čistu Eppendorf tubicu te dodala 200 μL pufera za ispiranje «Buffer AE» pomoću kojeg se DNA otpusti s kolone, inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi te centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm-a. QIAamp Spin kolonu sam bacila a izolat sam spremila na -20 °C.

3.5.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Pripremila sam reakcijsku smjesu za određen broj uzoraka. Volumeni pojedinih sastojaka za jedan uzorak su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz komponenti koje čine reakcijsku smjesu za jedan uzorak (15 μL), potrebne za detekciju polimorfizma gena za IL-28B metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Redestilirana voda za PCR	9.4 μL	
---------------------------	-------------------	--

Otopina Mg ²⁺ (25 mM)	1.6 µL	Ukupno 15 µL
Smjesa koja sadrži početnice i probe (TIB Molbiol)	2.0 µL	
Smjesa koja sadrži polimerazu i dNTP (Roche master, mješavina LightCycler® FastStart Enzyme LightCycler® i FastStart Reaction MixHybProbe)	2.0 µL	

U detekciju ulazi izolirana ljudska DNA i kontrole (C homozigot, T homozigot i heterozigot). Optimalna koncentracija izolirane ljudske DNA za izvođenje ovog testa je 2-5 ng / µL (test može detektirati >1 ng / µL genomske DNA, prema uputama proizvođača za LightMix®Kit IL-28B). U metalni blok sam složila staklene kapilare, po jednu za svaki uzorak i kontrole. U svaku kapilaru sam dodala 15 µL reakcijske smjese i 5 µL izolirane ljudske DNA ili pripremljene kontrole. Kapilare sam zatim oprezno stresla kako bi se tekućina spustila u uži dio kapilare, te ih zatim stavila u okretnu napravu, pa u uređaj LightCycler. Odabrala sam test IL28, i upisala nazive uzorka i kontrola. U tablici 2. su prikazane reakcije koje se odvijaju u instrumentu. Za detekciju polimorfizma jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koristila sam «Simple Probe». «SimpleProbe» jače fluoresciraju vezane na komplementarnu DNA nego samostalno u otopini. Povećavanjem temperature prema temperaturi mekšanja (T_m), probe se odvajaju od komplementarnog lanca te se fluorescencija smanjuje.

Tablica 2. Prikaz uvjeta lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu koji se odvijaju u uređaju LigtCycler

Progr. korak	Denaturacija	Ciklusi	Otapanje	Hlađenje
Analiza:		Umnažanje	Krivulja topivosti	
Ciklusi:	1	45	1	1

Temperatura[°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Trajanje[mm:ss]	10:00	00:05	00:10	00:15	00:20	00:20	00:00	00:30

3.5.4. Statistička analiza

U analizi sam koristila programe Microsoft Excell (Microsoft) i Statistica (Microsoft). Vrijednosti kontinuiranih varijabli pokazala sam aritmetičkom sredinom i medijanom. U programu Statistica koristila sam Fischerov program.

4. REZULTATI

4.1. Podaci o ispitanicima

Ispitanike sam podijelila u tri skupine prema apsolutnom broju CD4+ limfocita T u krvi. Od 109 ispitanika, 97 je muških, a 12 ženskih.

Prva skupina su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te minimalno godinu dana nakon toga imale > 500 CD4+ limfocita T/ μl krvi. Druga skupina su osobe koje su u kliničku skrb ušle s < 200 CD4+ limfocita T/ μl krvi, ali je broj CD4+ limfocita T porastao do > 500 CD4+ limfocita T/ μl krvi. Treća skupina su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te nakon minimalno godinu imale < 200 CD4+ limfocita T/ μl krvi.

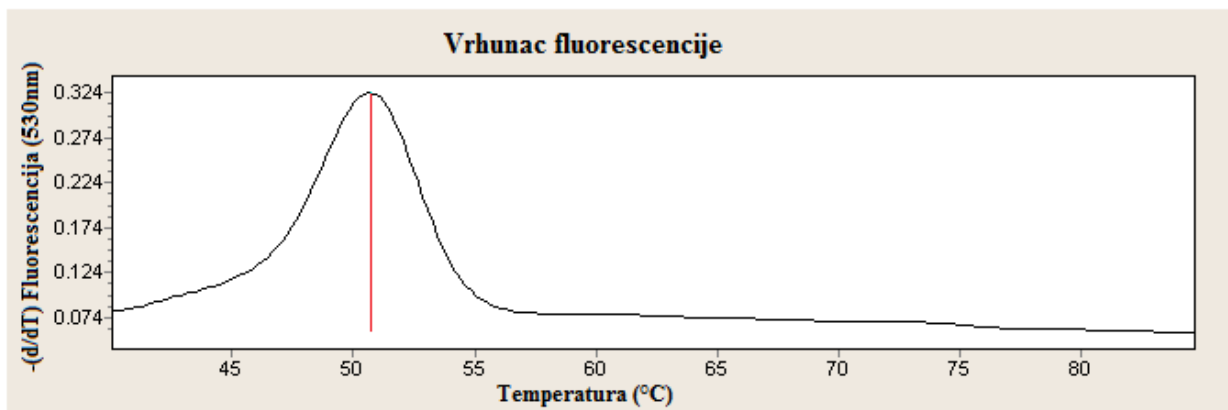
4.2. Rezultati genotipova

Na temelju grafičkog prikaza krivulje taljenja, koja prikazuje promjenu fluorescencije s temperaturom ($-dF/dT$), odredila sam genotip IL28B. T homozigot ima vrhunac fluorescencije na otprilike $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Slika 6), C homozigot na otprilike $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Slika 7), heterozigoti imaju dva vrhunca na otprilike $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Slika 8).

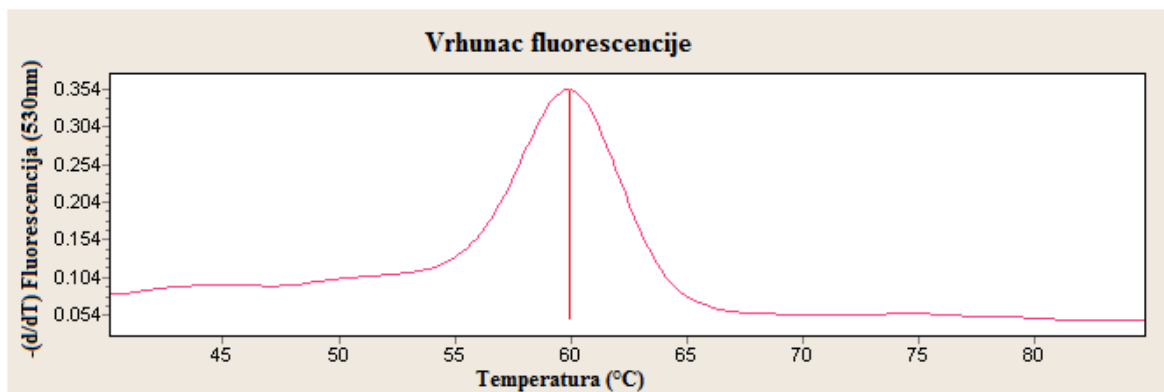
U čitavoj skupini ispitanika 55 ispitanika su C homozigoti (50.5 %), 40 ispitanika su heterozigoti (35.7 %), a T homozigota je 14 (12.8 %). Fischerovim testom uspoređene su po

dvije skupine ispitanika, grupirani su T homozigoti i heterozigoti. Test nije pokazao statistički značajne razlike, OR 1.38 $p = 0.623$ za prvu i drugu skupinu, OR 0.97, $p = 1$ za prvu i treću i OR 0.70, $p = 0.605$ za drugu i treću skupinu.

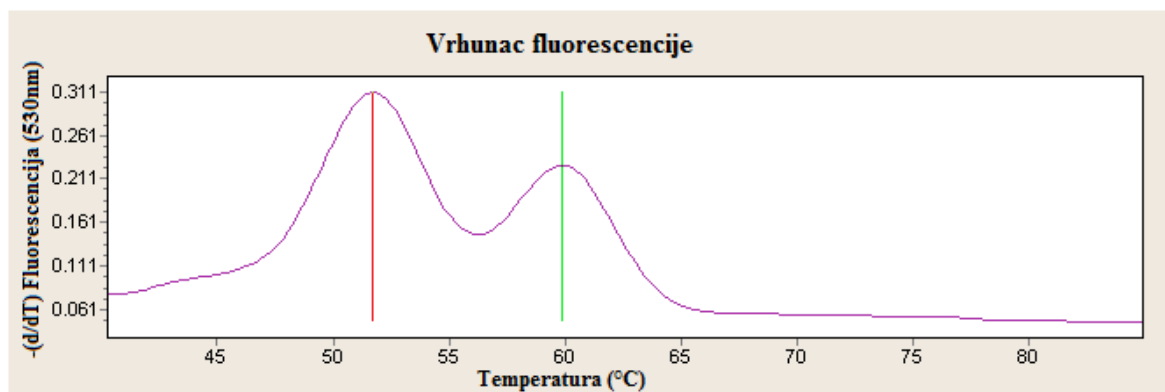
U prvoj grupi od 48 ispitanika, najčešći genotip je C homozigot sa 52.1 %. Slijedi heterozigot sa 37.5 % i T homozigot sa 10.41 %. U drugoj grupi od 25 ispitanika, C homozigota ima najviše (48 %), zatim C homozigot (44 %), dok T homozigota ima najmanje (8 %). Treća skupina ima 36 ispitanika, najčešći genotip je C homozigot (52.7 %), zatim heterozigot sa 27.7 %, i T homozigot sa 19.4 % (Tablica 3).



Slika 6. Grafički prikaz krivulje taljenja koja prikazuje promjenu intenziteta fluorescencije s temperaturom ($-dF/dT$). Ispitanik, čiji je genotip IL28 TT, ima vrhunac fluorescencije na 50.72 °C.



Slika 7. Grafički prikaz krivulje taljenja, koja prikazuje promjenu fluorescencije s temperaturom ($-dF/dT$). Ispitanik, čiji je genotip IL28 CC, ima vrhunac fluorescencije na 59.93 °C.



Slika 8. Grafički prikaz krivulje taljenja, koja prikazuje promjenu fluorescencije s temperaturom ($-dF/dT$). Ispitanik, čiji je genotip IL28 CT, ima dva vrhunca fluorescencije na 51.70 °C i 59.86 °C.

Tablica 3. Broj i postotak HIV-pozitivnih ispitanika s pojedinim genotipom interleukina 28B. Ispitanici su podijeljeni u tri skupine prema apsolutnom broju CD4+ T-limfocita, te su prikazani brojevi i postotci C homozigota, heterozigota i T homozigota za pojedinu skupinu ispitanika

Genotip IL-28B	>500 CD4+ limfocita T/ μl krvi	<200-500 CD4+ limfocita T/μl krvi	<200 CD4+ limfocita T/ μl krvi
CC	25 (52.1 %)	11 (44 %)	19 (52.7 %)
CT	18 (37.5 %)	12 (48 %)	10 (27.7 %)
TT	5 (10.41 %)	2 (8 %)	7 (19.4 %)
Ukupno:	48	25	36

5. RASPRAVA

Od 109 ispitanika ovog rada njih 55 su C homozigoti (50.5 %), 40 ispitanika su heterozigoti (35.7 %), a T homozigota je 14 (12.8 %). U prvoj grupi od 48 ispitanika, najčešći genotip je C homozigot sa 52.1 %. Slijedi heterozigot sa 37.5 % i T homozigot sa 10.41 %. U drugoj grupi od 25 ispitanika, C homozigota ima najviše (48 %), zatim C homozigot (44 %), dok T homozigota ima najmanje (8 %). Treća skupina ima 36 ispitanika, najčešći genotip je C homozigot (52.7 %), zatim heterozigot sa 27.7 %, i T homozigot sa 19.4 %. Parczewski i sur. (2012) su proveli istraživanje na 484 HIV-om inficiranim pacijentima (406 pacijenata su na antiretroviralnoj terapiji). 202 pacijenata su C homozigoti (41.7 %), heterozigota je 225 (46.5 %), a 57 pacijenata su T homozigot (11.7 %). IL28B CC genotip je povezana sa povećanim rizikom smrtnosti u liječenih, HIV-om zaraženih osoba (22.8 %), u usporedbi sa heterozigotom (13.8 %) i T homozigotom (12.3 %). Machmach i sur. (2013) su ispitanike podijelili na HIV kontrolore (ispitanici koji su sposobni održati jako malu količinu virusa u odsutnosti antiretroviralne terapije) i HIV-om inficirane nekontrolore. U tom istraživanju je nekoliko faktora imalo bitnu ulogu, npr. prisutnost alela kao HLA-B57 ili

HLA-B27, dob, spol i sl. Rezultati su pokazali da kod 53 kontrolora naučestaliji genotip je C homozigot (62.3 %), zatim heterozigot sa 34 %, i T homozigot sa 3,8 %. Kod 389 nekontrolora naučestaliji genotip je heterozigot sa 46,3 %, zatim C homozigot sa 45 % i T homozigot sa 8.7 %. Rezultati su ukazali na činjenicu da je IL28B CC genotip nezavisno povezan sa spontanom kontrolom HIV-a u pripadnika bijele populacije.

Interferoni λ inhibiraju replikaciju različitih virusa. Polimorfizam jednog nukleotida rs12979860 u promotoru gena za interleukin-28B (jedan od interferona λ) utječe na koncentraciju tog citokina u organizmu. Osobe koje su C homozigoti imaju veće koncentracije IL-28B što može utjecati na brzinu progresije različitih infekcija (Machmach i sur., 2013).

Tijekom 2009. i 2010. g. objavljeni su i rezultati četiri GWAS istraživanja (*genome-wide association studies*, GWAS) koja su pokazala značajnu povezanost između prisutnosti SNP-a rs12979860 i rs809917 koji se nalaze u blizini gena za IL-28B i učestalosti spontane eliminacije virusa te ishoda liječenja kroničnog hepatitisa C s peginterferon- α 2a i ribavirinom (Vince i sur., 2013). Čimbenici o kojima ovisi ishod liječenja su HCV-genotip, bazalna viremija, indeks tjelesne mase, dob, spol, rasa i koinfekcija HIV-om. Trajni virološki odgovor (eng. *sustained virologic response*, SVR) kod oboljelih koje su C homozigoti dostiže visokih 70 % u usporedbi s 25-30 % u oboljelih koji su heterozigoti ili T homozigoti (Nucara i sur., 2012). Thomas i sur. (2009) su ispitali utjecaj genotipa na infekciju hepatitisa C. Pokazalo se da pacijenti koji su C homozigoti imaju sporiju progresiju bolesti, za razliku od heterozigota i T homozigota (Thomas i sur., 2009). Uloga SNP rs12979860 u kroničnom hepatitisu B još uvijek slabo poznata (Boglione i sur., 2014).

U ovom istraživanju najviše ispitanika je C homozigot, što je netipično obzirom na činjenicu da u većini radova najčešći genotip je heterozigot. Lindh i sur. (2011) su proveli istraživanje na 134 pacijenata inficiranih HCV-om, i rezultati su pokazali da C homozigota ima 35 %, heterozigota 47 % i T homozigota 15 %. Parczewski i sur. (2012) su proveli istraživanje na 484 HIV-om inficiranim pacijentima, 202 pacijenata su C homozigoti (41.7 %), heterozigota je 225 (46.5 %), a 57 pacijenata su T homozigot (11.7 %). Frekvencije genotipa za rs12979860 razlikuju se među različitim etničkim skupinama. Melis i sur. (2011) su proveli istraživanje frekvencije genotipa za T homozigote i heterozigote na bijelcima, Azijatima, populaciji Bliskog istoka, Latinoamerikancima te Afroamerikancima. Istraživanja su pokazala da je heterozigota najviše među populacijom Azijata (89 %), T homozigota među Afroamerikancima (57 %).

HLA genotip, osim što utječe na brzinu i tijek HIV infekcije, utječe i na odgovor bolesnika na terapiju. Studije su pokazale da HLA genotip može biti odgovoran za benigni tijek bolesti kod otprilike 40 % pacijenata sa dugoročnim neprogresivnim tijekom bolesti. Pacijenti koji su heterozigoti za HLA klasu I pokazuju slabiju progresiju imunodeficijencije za razliku od homozigota. *HLA-B*14*, *HLA-B*27*, *HLA-B*51*, *HLA-B*57* i *HLA-C*8* geni su povezani sa slabijom progresijom bolesti, dok je prisutnost *HLA-A*23*, *HLA-B*37* i *HLA-B*49* gena povezana sa brzim razvojem imunodeficijencije (Carrington i O'Brien, 2003). HLA B*5701 povezan je sa sporijom progresijom HIV infekcije iako točan mehanizam djelovanja ovog alela nije poznat (Lackner i sur., 2012). Munderi i sur. (2011) odredili su učestalost HLA-B*5701 alela u 247 HIV pozitivnih osoba koja su primale lijek abakavir uključujući šest pacijenata s postavljenom dijagnozom reakcije preosjetljivosti. Unatoč tome testom HLA genotipizacije utvrđeno je da ni jedna osoba nema HLA-B*5701 alel, odnosno da je njegova učestalost 0 %. Arrizabalaga i sur. (2009) proveli su epidemiološku studiju u koju su uključili 1198 pacijenata iz 74 centra za liječenje HIV-a u Španjolskoj i dobili rezultate da je učestalost HLA-B*5701 alela u populaciji bijelaca 6.5 % (92.2 % ispitanika).

6. ZAKLJUČCI

1. U ukupnoj istraživanoj populaciji, od 109 HIV pozitivnih ispitanika, najčešći genotip je C homozigot (50,5 %), zatim slijedi heterozigot (36,7 %) i T homozigot (12,8 %).
2. U prvoj skupini, u kojoj su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb te minimalno godinu dana nakon toga imale > 500 CD4+ limfocita T/ μ l krvi, C homozigot je najzastupljeniji genotip (52,1 %), a T homozigot najrjeđi genotip (10,41 %).
3. U drugoj skupini u kojoj su osobe koje su u kliničku skrb ušle s < 200 CD4+ limfocita T/ μ l krvi, ali je broj CD4+ limfocita T porastao do > 500 CD4+ limfocita T/ μ l krvi nakon početka terapije antiretrovirusnim lijekovima, heterozigot je najzastupljeniji genotip (48 %), dok je T homozigot najrjeđi genotip (8 %).
4. U trećoj skupini u kojoj su osobe koje su pri ulasku u kliničku skrb, te nakon minimalno godinu od započinjanja antiretrovirusne terapije imale < 200 CD4+ limfocita T / μ l krvi, C homozigot je najzastupljeniji genotip (52,7 %), dok je T homozigot najrjeđi genotip (19,4 %).

5. Uspoređujući po dvije skupine ispitanika, grupiranjem T homozigota i heterozigota, koristeći Fisherov program u programu Statistica ustanovila sam da nema statistički značajnih razlike među skupinama ispitanika.

Istraživanje je pokazalo da nema povezanosti između progresije bolesti i genotipa IL-28B u HIV zaraženih osoba.

7. LITERATURA

Abbas A. K., Lichtman A. H. 2005. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia.

Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinivić-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. 2010. Imunologija. Medicinska naklada Zagreb.

Arhel N. J., Kirchhoff F. 2009. Implications of Nef: host cell interactions in viral persistence and progression to AIDS. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **339**:147-175.

Arnott A., Jardine D., Wilson K., Gorry P. R., Merlin K., Grey P., Law M. G., Dax E. M., Kelleher A. D., Smith D. E. 2010. High viral fitness during acute HIV-1 infection. *PLoS One* **9(5)**: e12631.

Arrizabalaga J., Rodriguez-Alcántara F., Castañer J.L., Ocampo A., Podzamczer D., Pulido F., Riera M., Sanz J., Pascual-Bernaldez M. 2009. Prevalence of HLA-B*5701 in HIV-infected patients in Spain (results of the EPI Study). *HIV Clinical Trials* **10**: 48-51.

Arts E. J., Hazuda D. J. 2012. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Harbor Perspective in Medicine **2(4)**: a007161.

Barré-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Brun-Vezinet F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science **220**: 868–871.

Béné M. C., Martini É. 1997. Immunophenotyping of blood and bone marrow leukocytes. Harwood academic publishers, London

Boglione L., Cusato J., Allegra S., Esposito I., Patti F., Cariti G., Di Perri G., D'Avolio A. 2014. Role of IL28-B polymorphisms in the treatment of chronic hepatitis B HBeAg-negative patients with peginterferon. Antiviral Research **102**: 35-43.

Briggs J. A. G., Krausslich H. G. 2011. The molecular architecture of HIV. Journal of Molecular Biology **410**: 491-500.

Carrington M., O'Brien S. J. 2003. The influence of HLA genotype on AIDS. Annual Review of Medicine **54**: 535–551.

Clavel S., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M. A., Santos-Ferreira M. O, Laurent A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science **233**: 343-346.

Cohen O. J., Kinter A., Fauci A. S. 1997. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. Immunology Review **159**: 31-48.

Didenko V. 2001. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. Biotechniques **31**: 1106–1121.

Donnelly R. P., Dickensheets H., O'Brien T. R. 2011. Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. Trends Immunology **32**: 443-450.

- Donnelly R. P., Kontenko S. V. 2010. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **30**: 555-564.
- Février M., Dorgham K., Rebollo A. 2011. CD4+ T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection: Role of Apoptosis. *Viruses* **5**: 586-612.
- Ford S. E., Puronen C. E., Sereti I. 2009. Immunopathogenesis of Asymptomatic Chronic HIV Infection: The Calm before the Storm. *Current Opinion in HIV and AIDS* **4**: 206–214.
- Gallo R. C., Sarin P. S., Gelmann E. P., Robert-Guroff M., Richardson E., Kalyanaraman V. S., Mann D., Sidhu G. D., Stahl G. D., Zolla-Pazner S., Liebovitch J., Popovic M. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 865–867.
- Gherghe C., Lombo T., Leonard C. W., Datta S. A., Bess J. W. Jr., Gorelick R. J. 2010. Definition of high-affinity Gag recognition structure mediating packaging of a retroviral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Science* **107**:19248-19253.
- Ghosh A. K., Anderson D. D. 2011. Tetrahydrofuran, tetrahydropyran, triazoles and related heterocyclic derivatives as HIV protease inhibitors. *Future Medicinal Chemistry* **3**: 1181–1197.
- Grce M. 2013. Molekularna dijagnostika oralnih infekcija. *Acta Medica Croatica* **67**: 425-432.
- Hill M., Tachedjian G., Mak J. 2005. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Current HIV Research* **3**: 73-85.
- Günthard F. H., Aberg A. J., Eron J. J., Hoy F. J., Amalio Telenti A., Benson A C., Burger M. D., Cahn P., Gallant E. J., Glesby J. M., Reiss P., Saag S. M., Thomas L. T., Jacobsen M. D., Volberding A. P. 2014. Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. *The Journal of the American Medical Association* **312**: 410-425.
- Jadan M. 2004. Otkrivanje i analiza polimorfizma jednog nukleotida tehnologijom *LightCycler*. *Biochemia Medica* **14**: 3-4.

- Karn J., Stoltzfus C. M. 2012. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspectives in Medicine* **2(2)**: a006916.
- Klasse P. J. 2012. The molecular basis of HIV entry. *Cellular Microbiology* **14**: 1183-1192.
- Lackner A. A., Lederman M., Rodriguez B. 2012. HIV Pathogenesis: The Host. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine* **2**: a007005.
- Lindh M., Lagging M., Färkkilä M., Langeland N., Mørch K., Nilsson S., Norkrans G., Pedersen C., Buhl M. R., Westin J., Hellstrand K. 2011. Interleukin 28B gene variation at rs12979860 determines early viral kinetics during treatment in patients carrying genotypes 2 or 3 of hepatitis C virus. *Journal of Infectious Disease* **203**: 1748-1752.
- Lopušna K., Režuchova I., Betakova T., Škorvanova L., Tomaškova J., Lukačikova L., Kabat P. 2013. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta virologica* **57**: 171-179.
- Lu W., Arraes L. C., Ferreira W. T., Andrieu J. M. 2004. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nature Medicine* **10**: 1359-1365.
- Machmach K., Abad-Molina C., Romero-Sanchez M., Abad M., Ferrando-Martinez S., Genebat M., Pulido I., Viciano P., Gonzales-Escribano M., Leal M., Ruiz-Mateos E. 2013. IL28B Single-Nucleotide Polymorphism rs1299860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. *The Journal of Infectious Diseases* **207**: 651-5.
- Malim M. H., Emerman M. 2008. HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* **3**: 388-398.
- Maranon C., Desoutter J. F., Hoeffel G., Cohen W., Hanau D., Hosmalin A. 2004. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Science* **101**: 6092-6097.
- Melis M., Fauron C., McMillin G., Lyon E., Shirts B., Hubley M. L., Slev R. P. 2011. Simultaneous Genotyping of *rs12979860* and *rs8099917* Variants Near the *IL28B* Locus Associated with HCV Clearance and Treatment Response. *Journal of Molecular Diagnostics* **4**: 446-451.

Munderi P., Snowden W. B., Walker A. S., Kityo C., Mosteller M., Kabuye G., Thoofer N. K., Ssali F., Gilks C. F., Hughes A. R. 2011. Distribution of HLA-B alleles in a Ugandan HIV-infected adult population: NORA pharmacogenetic substudy of DART. *Tropical Medicine and International Health* **16**: 200-204.

Murphy K. (2012): *The Janeway's Immunobiology*. Washington University School of Medicine, St. Louis.

Nucara S., Caroleo B., Guadagnino V., Perrotti N., Trapasso F. 2012. Natural history and clinical response: «It's the virus, stupid, stupid, or is it the host?» *BioMed Central Infectious Diseases* **12(2)**: S6. doi:10.1186/1471-2334-12-S2-S6.

Ormerod M. (2008): *Flow Cytometry-A Basic Introduction*. Privately published.

Parczewski M., Leszczyszyn-Pynka M., Wnuk A., Urbańska A., Fuksińska K., Bander D., Boroń-Kaczmarek A. 2010. Introduction of pharmacogenetic screening for the human leucocyte antigen (HLA) B*5701 variant in Polish HIV-infected patients. *HIV Medicine* **11**: 345-348.

Parczewski M., Bander D., Leszczyszyn-Pynka M., Urbanska A., Socha L., Boron-Kaczmarek A. 2012. IL28B CC Genotype Is Associated with Higher All-Cause Mortality in Antiretroviral-Treated HIV-Infected Patients. *Aids Research and Human Retroviruses* **28**: 1640-1646.

Powderly G. W. 2010. Integrase inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**: 2485–2488.

Perry A. K., Chen G., Zheng D., Tang H., Cheng G. 2005. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research* **15**: 407-422.

Sarafianos S. G, Marchand B., Das K., Himmel D. M., Parniak M. A., Hughes S. H., Arnold E. 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerisation and inhibition. *Journal of Molecular Biology* **385**: 693-713.

- Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* **75**: 163-89.
- Suhasini M., Reddy T. R. 2009. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Current HIV Research* **7**: 91-100.
- Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research* **28**: 3752–3761.
- Thomas D., Thio C., Martin M., Ying Q., Ge D. O’huigin C., Kidd J., Kidd K., Khakoo S., Alexander G., Goedert J., Kirk G., Donfield S., Rosen H., Tobler L., Busch M., McHutchison J., Goldstein D., Carrington M. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**: 798–801.
- Uze G., Monneron D. 2007. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* **89**: 729-734.
- Van Maele B., Busschots K., Vandekerckhove L., Christ F., Debyser Z. 2006. Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends in Biochemical Science* **31**: 98-105.
- Vince A., Hrštic I., Begovac J., Bradarić N., Čolić-Cvrlje V., Duvnjak M., Đaković Rode O., Filipić Kanižaj T., Grgurević I., Jaklin Kekez A., Kaić B., Kes P., Kurelac I., Milić S., Morović M., Mrzljak A., Ostojić R., Poljak M., Slaviček J., Smolić M., Štimac D., Včev A., Vucelić B., Židovec Lepej S. 2013. Virusni hepatitis Hrvatska konsenzus konferencija. *Acta Medica Croatica* **67**: 263-272.
- Wilkin T. J., Gulick M. R. CCR5 2012. Antagonism in HIV Infection: Current Concepts and Future Opportunities. *Annual Review of Medicine* **63**: 81–93.
- Yu M. i Vajdy M. 2010. Mucosal transmission and vaccination strategies through oral compared to vaginal and rectal routes. *Expert Opinion of Biological Therapy* **10**: 1181–1195.
- Yuxian H., Cheng J., Lu H., Jingjing L., Hu J., Qi Z., Zhonghua L.†, Shibo J., Dai Q. 2008. Potent HIV fusion inhibitors against Enfuvirtide-resistant HIV-1 strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 16332–16337.

<http://bs.wikipedia.org/wiki/HIV>

<http://hivbuch.files.wordpress.com/2012/01/3-abb-2.jpg>

http://huhiv.hr/wp-content/uploads/2011/09/hiv_begovac2.jpg

<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Melting_Curve_Analysis_Graphs.svg

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16.04.1991. u Zagrebu, gdje sam pohađala i završila osnovnu školu „Malešnicu” i „Gimnaziju Lucijana Vranjanina” kao odlična učenica. U rujnu 2009. sam upisala preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i završila ga u rujnu 2012., čime sam stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.). U rujnu 2012. sam upisala diplomski studij molekularne biologije u trajanju od četiri semestra. Iskoristila sam brojne prilike koje nudi studiranje na Biološkom odsjeku, poput iskustva terenske nastave. Tijekom studiranja volontirala sam i aktivno sudjelovala u promicanju znanosti, poput Noći biologije. Aktivno poznajem engleski jezik, pasivno španjolski i njemački.