A HIV sejtekbe való bejutásának kofaktora: egy hét transzmembrán szegmentumot tartalmazó fehérje klónozása

Cikk: Feng Y. és mtsai - Science 272, 872, 1996.

A HIV-1 primer receptora, a CD4 csak akkor teszi lehetővé a vírus bejutását, ha emberi sejtekben van jelen. A CD4-et expresszáló emberi és nem-emberi sejtekkel végzett összehasonlító vizsgálatok szerint ennek az az oka, hogy a nem-humán sejtekről hiányzik egy specifikus, a vírus és a sejt-membrán fúzióját lehetővé tevő kofaktor. Ugyanez a kofaktor szükséges a CD4-et hordozó sejtek és a HIV-1 burokfehérjéket expresszáló sejtek fúziójához is. Az eddig elvégzett funkcionális vizsgálatok szerint e kofaktor szükséges humán sejtben is jelen van, bár találtak olyan humán sejtvonalat is, amelyek ezt valószínűleg nem hordozzák. A korábbi intenzív kutatómunka ellenére nem sikerült mindmáig ezt a kofaktort identifikálni.

Szerzők egy általuk korábban kidolgozott kísérleti modell alkalmazttak a kofaktor azonosítását célzó kísérletekben. A modell lényege a következő: kétféle sejtet kevernek össze egymásnál és mérik ezek fúzióját. A fúzió bekövetkezését az egyik sejtbe beépített "jelző" génnek a másik sejt egy termike által történő aktivációjakor keletkező b -galactosidase megjelenése mutatja. Mindkét reagáltatott sejt a NIH3T3 jelű egér sejtvonalból származott. Az egyik sejtbe háromféle gént, ill. génkeveréket juttattak be: a "jelző" gént aktívális enzimet kódoló gént, a humán CD4 génjét, és a humán eredetű HeLa sejtekből származó cDNS keveréket. (A típusú sejt). A másik sejtet (B típusú sejt) olyan vaccinia vírusnal fertőzték, amelyhez előzetesen génetechnológiai úton hozzáadták a "jelző" (E. coliból származó lacZ) gént, továbbá a HIV-1 env génjét. Az A típusú sejt CD4-et, ill. az emberi cDNS génkönyvtár által kódolt fehérjéket expresszálta, a B típusú sejt pedig a HIV-1 env fehérjét. A cDNS-ből származó fehérjék közül a CD4-et, ill. a HIV env fehérjéket hordozó sejtek nem fúzionáltak. Ha viszont az A típusú sejtek humán, a cDNS keverék által kódolt fehérjéket is expresszálták, akkor effektív fúzió következett be a kétféle sejt között. Az összevonodást mikroszkopikus úton, ill. a már említett "jelző" gén segítségével detektálták: ha a fúzió bekövetkezett, akkor az A típusú sejt által termelt fehérje akadályoztalanul bejuthatott a B típusú sejtbe, és ott aktiválta a "jelző" lacZ gént, és ennek eredményeképpen a sejt b -galacto-sidaset kezdett termelni. Az enzim termelődését vagy egy kromogén szubsztrát hasításakor keletkező színreakció segítségével, vagy in situ festéssel mérték.

A szerzők igen egyszerű, de hatékony stratégiát alkalmaztak a kofaktor keresése során. Az A sejteket előzőleg a teljes emberi cDNS könyvtárt reprezentáló plasmidokkal fertőtték, majd a könyvtár 1000 különböző frakcióra szétosztták és ezeket különböző kombinációban vizsgálták. Amikor végül sikerült megtalálniuk azt az egyetlen frakciót, amely pozitív eredményt adott (tehát lehetővé tette az A és B típusú sejt fúzióját), akkor ezt tovább frakcionálták és vizsgálták. Ezt egészen addig végezték, amíg meg nem találták azt az egyetlen klónt, amelyet, ha az A típusú sejtet transzfektálták, akkor létrejött ennek fúziója a B típusú sejttel. Ennek a cDNS darabnak a molekulatömege kb. 1,7 MR, 1659 bázispárt tartalmaz. A DNS darabot szekvenálták, és a szekvenciát összehasonlították az ismert fehérje-szekvenciákkal. Ennek alapján bizonyították, hogy a fúziót lehetővé tevő fehérje a bét transzmembrán szegmentumot tartalmazó, G-proteinhez kötött receptorok szupercsaládjába tartozik. Utólag kiderült, hogy e fehérjét korábban már többen is megtalálták, de funkcióját még nem sikerült meghatározni. Mivel a HIV-infekcióban a fehérje fő funkciója az, hogy a HIV-1 fúziós kofaktorakéntműködik, elnevezésére szerzők a fusint javasolták.

A fusin cDNS-ét klónozták és plazmidba, ill. vaccinia vektorba építették be. Ennek segítségével transzfekció vagy infekció útján a fusint különböző sejtekbe tudták bejuttatni. Ezzel párhuzamosan a DNS szekvencia alapján meghatározták a fusin extracelluláris régiójának aminosav szerveződét, az ennek megfelelő peptidet szintetizálták, amellyel nyulakat immunizáltak. A fusin cDNS plasmiddal transzfektált sejtek egy olyan 46 kD molekulatömegű fehérjét szintetizáltak, amely immunobloton reagált a peptidtől immunizált nyulak szérumával, de nem adott reakciót az ugyanezekből az állatokból az immunizálás előtt levett szérummal.

A továbbiakban különböző módszerekkel bizonyították, hogy a fusin valóban elengedhetetlen a CD4-et expresszáló nem human sejtek és a HIV-1 env fehérjéket expresszáló sejtek fúziójához. A csak CD4-et, ill. csak fusint expresszáló sejtek nem fúzionáltak a HIV-1IIIB törzsének env fehérjéit expresszáló emberi HeLa sejtekkel. Ezzel szemben, ha az epérsejtek mind a CD4-et, mind pedig a fusint expresszálták, akkor létrejött a fúzió a HeLa sejtekkel: nagy syncitiumok képződtek és jelentős mértékű b-galactosidase termelés indult meg. Azt is bizonyították, hogy a fúzióhoz a HIV-1 env fehérjéknek is intaktnak kell lenniük.

A továbbiakban ugyanazt a rendszert használva több olyan emberi és állati eredetű sejtvonalat is megvizsgáltak, amelyekről ismeretes volt, hogy nem fúzionálnak a HIV-1 env fehérjéket hordozó sejtekkel, noha a CD4 jelen van rajtuk. Fusin nélküli egyik vizsgált sejt esetében sem következett be a fúzió. A fusinnal való transzfekció után azonban minden vizsgált sejtvonal esetében létrejött a fúzió, amelynek mértéke néhány esetben elérte a kontroll HeLa sejtet kapott értéket.

Ezután azt vizsgálták, hogy a fusin génnel való transzfekció alkalmassá teszi-e a nem-humán sejteket arra, hogy ezek produktívan fertőzhetők legyenek a HIV-1-el. A vizsgálatot egy olyan nyér: eredetű sejtvonallal végezték, amelyről ismeretes volt, hogy a HIV-1 ennekbe nem tud bejutni, de ha transzfekció útján a vírus génállományát bejuttatják, akkor a produktív infekció végbemegy. A fusin vektorral való transzfekció után a nyér: sejtek fertőzhetővé válnak a HIV-vel és a fertőzött sejtekben produktív infekció volt kimutatható: a kultúrákban AZT-vel gátolható p24 termelést észleltek. Más kísérletekkel is bizonyították, hogy a produktív infekcióhoz is mind a CD4-nek, mind a fusinnak expresszálódnia kell.

A transzfektált, nem emberi eredetű sejtekkel végzett kísérletek eredményei arra mutattak, hogy a fusin elengedhetetlen a HIV-1 és a fertőzött sejtek membránjának fúziójához, és így a vírus bejutásához. Mivel a jelenleg rendelkezésre álló antitesttel még nem voltak képesek a fusin jelenlétének kimutatására a különböző sejtek felszínén, közvetett módszerrel tanulmányozták a fusin szerepét a HIV-1 fertőzésben: megvizsgálták a különböző emberi sejtek fusin mRNS szintje és a HIV-1 fertőzés iránti érzékenysége közötti kereslatot. Fusin mRNS-t csak azokban a sejtekben tudtak kimutatni, amelyek HIV-1-el fertőztethetők voltak.

Végül azt vizsgálták, hogy a fusin valamennyi HIV-1 törzs sejtbe jutásának kofaktora, vagy csak bizonyos törzsek esetében elengedhetetlen a fúzióhoz és a HIV-1 fertőzéshez. Mivel a kiinduló cDNS könyvtár egy olyan sejtből (HeLa) származott, amely elsősorban a T sejtekhez adaptált HIV törzsek iránt érzékeny, feltételezték, hogy a fusin is elsősorban az ilyen törzsek esetében játszik esszenciális szerepet. A kísérletek eredményei igazolták a feltételezést: a fusinnal transzfektált sejtek kizárólag a T sejtekhez adaptált törzsek env fehérjéit expresszáló sejtekkel fúzionáltak, a macrophag tropikus törzsek burokfehérjéjét expresszáló sejtekkel azonban nem.

Hasonló eredményt hoztak azok a kísérletek is, amelyekben a perifériás vér mononuclearis sejtjei HIV-1 fertőzéseit fusin-ellenes antitestekkel igyekeztek gátolni. A T sejtekhez adaptált LAV törzs esetében igen erős, dózis-függő gátlást észleltek, míg a macrophag tropikus Ba-L törzssel való fertőzését a fusin antitestek egyáltalán nem gátolták.

Megbeszélés
A kapott eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a fusin esszenciális kofaktora a HIV-1 infekciónak, legalább is a T sejt tropikus törzsek esetében. A fehérje hatásmechanizmusa ma még nem ismert, kifejtheti hatását a HIV env fehérjével vagy a CD4-el való kölcsönhatás útján, de az sem kizárt, hogy a G-proteinneken keresztül történő jelátvitel segítségével, indirekt úton fejti ki a hatását. E folyamatok együttes szerepe is elképzelhető.

Igen valószínűnek látszik, hogy a macrophag tropikus törzsek esetében is létezik egy vagy több, a fusinhoz hasonló, de attól különböző kofaktor. Ennek, vagy ezeknek az identifikálása igen lényeges lesne. Szerzők igen valószínűnek tartják, hogy a HIV-2 és SIV fúziós kofaktorai jelentősen különböznek a fusintól és az egyéb HIV-1 törzsek fúziós kofaktoraitól. Hipotézisük szerint a fusin-szerű molekulának egész családja létezik, melyek esetleg valamennyien a bét transzmembrán szegmentummal rendelkező, G-proteinhez kapcsolt receptorok szuperfamíliájába tartoznak. Igen érdekes, hogy ugyanezibe a szuper-familiába tartoznak más emberi kórokozók, pl. a Plasmodium vivax, ill. a Staphylococcus pneumoniae egyes target sejtekbe való bejutásához szükségbetehetelen receptorai is.

Szerzők egyéb érdekes hipotetikus összefüggéseket is említenek cikkükben. Ezek közül kétségkívül a legérdekesebb az, hogy a fusin génje az ismert aktivitású emberi fehérjék génjei közül egy chemokin, az IL-8 receptorával mutat a legnagyobb (37% aminosav azonosság) homológiát. Ezért elképzelhető, hogy a fusin természetes liganduma egy chemokin. Ebből a szempontból érdekesnek látszik az a megfigyelés, hogy háromféle chemokin, a MIP-1a , a MIP-1b és a RANTES is hatékonyan gátolja a HIV-1 fertőzést in vivo (I. AH 101 szám). Feltételezhető, hogy ezek a chemokinek egy olyan receptorra keresztül hatnak, amely egyben fúziós kofaktor is. Feltehetően ez nem azonos a fusinnal, hanem inkább egy még nem azonosított fusin-szerű proteinről van szó, mivel a fenti chemokinek elsősorban a macrophag tropikus törzsekkel való fertőzést gátolják.

Szerzők felfedezésék közvetlen gyakorlati alkalmazhatóságára is rávilágítanak. A fusin segítségével egy olyan kísérleti állatmodell hozható létre, amelyen a HIV-1 fertőzés közvetlenül tanulmányozható. Erre a célra elsősorban egy olyan transzgenikus nyulat tartanak alkalmasnak, amelybe a fusin génjét bejuttatják, a nyúlsejtben ugyanis a HIV-1 képes produktívan szaporodni, ha a vírus bejutása már megtörtént.

A cikket a Science ugyanabban a számában kommentáló J. Cohen (272, 809, 1996) szokatlanul lelkes hangot üt meg. A T. Berger által vezetett munkacsoport felfedezése esetében alkalmazhatónak vélt az áttörés kifejezést. Cohen leírja, hogy a kérdés legjobb szakértői, pl. John Moore és James Hoxie is jelentős haladásnak ítélik a cikkben leírt eredményeket, amelyeket már eddig két másik laboratóriumban is sikerült reprodukálni. A fusin felfedezésének természetesen terápiás jelentősége is lehet a

jövőben: olyan gyógyszerek fejleszthetők ki, amelyek a fusin-HIV-1 kölcsönhatás blokkolása útján megakadályozhatják a HIV-1 fertőzést. Ehhez előbb természetesen el kell végezni azt - az eredeti cikk szerzői által is igen lényegesnek ítélt - munkát melynek során identifikálják a kofaktorait képző fusin-szerű molekulákat. E kísérletek már több laboratóriumban folyamatban vannak.