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 lehetõvé a vírus bejutását, ha emberi sejteken van jelen. A CD4-et expresszáló emberi és nem-emberi sejtekkel végzett összehasonlító vizsgálatok szerint ennek az az oka, hogy a nem-humán sejtekrõl hiányzik egy specifikus, a vírus és a sejt-membrán fúzióját lehetõvé tevõ 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 sokféle humán sejten is jelen van, bár találtak olyan humán sejttípusokat is, amelyek ezt valószínûleg nem hordozzák. A korábbi intenzív kutatómunka ellenére sem sikerült mindmáig ezt a kofaktort identifikálni.

Szerzõk egy általuk korábban kidolgozott kísérleti modellt alkalmaztak a kofaktor azonosítását célzó kísérleteikben. A modell lényege a következõ: kétféle sejtet kevernek össze egymással és mérik ezek fúzióját. A fúzió bekövetkezését az egyik sejtbe beépített "jelzõ" génnek a másik sejt egy terméke által történõ aktivációjakor keletkezõ b -galactosidase megjelenése mutatja. Mindkét reagáltatott sejt a NIH3TC jelzésû egér sejtvonalból származott. Az egyik sejtbe háromféle gént, ill. génkeveréket juttattak be: a "jelzõ" gént aktiváló enzimet kódoló gént, a humán CD4 génjét, és a humán eredetû HeLa sejtekbõl származó cDNS keveréket. (A típusú sejt). A másik sejtet (B típusú sejt) olyan vaccinia vírussal fertõzték, amelyhez elõzetesen géntechnológiai úton hozzákötötték a "jelzõ" (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 fehérjéit. A cDNS-bõl származó fehérjék nélkül a CD4-et, ill. a HIV env fehérjéket hordozó sejtek nem fuzionáltak. Ha viszont az A típusú sejtek humán, a cDNS keverék által kódolt fehérjéket is expresszáltak, akkor effektív fúzió következett be a kétféle sejt között. Az összeolvadást mikroszkopikus úton, ill. a már említett "jelzõ" gén segítségével detektálták: ha a fúzió bekövetkezett, akkor az A típusú sejt által termelt fehérje akadálytalanul bejuthatott a B típusú sejtbe, és ott aktiválta a "jelzõ" lacZ gént, és ennek eredményeképpen a sejt b -galacto-sidaset kezdett termelni. Az enzim termelõdését vagy egy kromogén szubsztrát hasításakor keletkezõ színreakció segítségével, vagy in situ festéssel mérték.

A szerzõk igen egyszerû, de hatékony stratégiát alkalmaztak a kofaktor keresése során. Az A sejteket elõször a teljes emberi cDNS könyvtárt reprezentáló plazmidokkal fertõzték, majd a könyvtárt 1000 különbözõ frakcióra osztották és ezeket különbözõ kombinációban vizsgálták. Amikor végül sikerült megtalálniuk azt az egyetlen frakciót, amely pozitív eredményt adott (tehát lehetõvé 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 klont, amellyel, ha az A típusú sejtet transzfektálták, akkor létrejött ennek fúziója a B típusú sejttel. Ennek a cDNS darabnak a molekulatömege kb. 1,7 kB, 1659 bázispárt tartalmaz. A DNS darabot szekvenálták, és a szekvenciát összehasonlították az ismert fehérje-szekvenciákkal. Ennek alapján bizonyították, hogy a fúziót lehetõvé tevõ fehérje a hét 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 fõ funkciója az, hogy a HIV-1 fúziós kofaktoraként mûködik, elnevezésére szerzõk a fusint javasolták.

A fusin cDNS-ét klonozták és plazmidba, ill. vaccinia vektorba építették be. Ennek segítségével transzfekció vagy infekció útján a fusint különbözõ sejtekbe tudták bejuttatni. Ezzel párhuzamosan a DNS szekvencia alapján meghatározták a fusin extracelluláris régiójának aminosav sorrendjét, az ennek megfelelõ peptidet szintetizálták, amellyel nyulakat immunizáltak. A fusin cDNS plasmiddal transzfektált sejtek egy olyan 46 kD molekulatömegû fehérjét szintetizáltak, amely immunobloton reagált a peptiddel immunizált nyulak szérumával, de nem adott reakciót az ugyanezektõl az állatoktól az immunizálás elõtt levett szérummal.

A továbbiakban különbözõ módszerekkel bizonyították, hogy a fusin valóban elengedhetetlen a CD4-et expresszáló nem humán sejtek és a HIV-1 env fehérjéket expresszáló sejtek fúziójához. A csak CD4-et, ill. csak fusint expresszáló sejtek nem fuzionáltak a HIV-1IIIB törzsének env fehérjéit expresszáló emberi HeLa sejtekkel. Ezzel szemben, ha az egérsejtek mind a CD4-et, mind pedig a fusint expresszálták, akkor létrejött a fúzió a HeLa sejtekkel: nagy syncitiumok képzõdtek és jelentõs mértékû 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 eredetû sejtvonalat is megvizsgáltak, amelyekrõl ismeretes volt, hogy nem fuzionálnak a HIV-1 env fehérjéket hordozó sejtekkel, noha a CD4 jelen van rajtuk. Fusin nélkül 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 sejttel kapott értéket.

Ezután azt vizsgálták, hogy a fusin génnel való transzfekció alkalmassá teszi-e a nem-humán sejteket arra, hogy ezek produktívan fertõzhetõk legyenek a HIV-1-el. A vizsgálatot egy olyan nyérc eredetû sejtvonallal végezték, amelyrõl ismeretes volt, hogy a HIV-1 ezekbe nem tud bejutni, de ha transzfekció útján a vírus génállományát bejuttatják, akkor a produktív infekció végbemegy. A fusin vektorral való transzfekció után a nyérc sejtek fertõzhetõvé váltak a HIV-vel és a fertõzött 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 eredetû sejtekkel végzett kísérletek eredményei arra mutattak, hogy a fusin elengedhetetlen a HIV-1 és a fertõzött sejtek membránjának fúziójához, és így a vírus bejutásához. Mivel a jelenleg rendelkezésre álló antitesttel még nem voltak képesek a fusin jelenlétének kimutatására a különbözõ sejtek felszínén, közvetett módszerrel tanulmányozták a fusin szerepét a HIV-1 fertõzésben: megvizsgálták a különbözõ emberi sejtek fusin mRNS szintje és a HIV-1 fertõzés iránti érzékenysége közötti korrelációt. Fusin mRNS-t csak azokban a sejtekben tudtak kimutatni, amelyek HIV-1-el fertõzhetõk 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 fertõzéshez. Mivel a kiinduló cDNS könyvtár egy olyan sejtbõl (HeLa) származott, amely elsõsorban a T sejtekhez adaptált HIV törzsek iránt érzékeny, feltételezték, hogy a fusin is elsõsorban 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 fuzionáltak, a macrophag tropikus törzsek burokfehérjéit expresszáló sejtekkel azonban nem.

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

Megbeszélés
A kapott eredmények egyértelmûen 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-proteineken keresztül történõ jelátvitel segítségével, indirekt úton fejti ki a hatását. E folyamatok együttes szerepe is elképzelhetõ.

Igen valószínûnek látszik, hogy a macrophag tropikus törzsek esetében is létezik egy vagy több, a fusinhoz hasonló, de ettõl különbözõ kofaktor. Ennek, vagy ezeknek az identifikálása igen lényeges lenne. Szerzõk igen valószínûnek tartják, hogy a HIV-2 és SIV fúziós kofaktorai jelentõsen különböznek a fusintól és az egyéb HIV-1 törzsek fúziós kofaktoraitól. Hipotézisük szerint a fusin-szerû molekuláknak egész családja létezik, melyek esetleg valamennyien a hét transzmembrán szegmentummal rendelkezõ, G-proteinhez kapcsolt receptorok szuperfamíliájába tartoznak. Igen érdekes, hogy ugyanebbe a szuper-famíliába tartoznak más emberi kórokozók, pl. a Plasmodium vivax, ill. a Staphylococcus pneumoniae egyes target sejtekbe való bejutásához nélkülözhetetlen receptorai is.

Szerzõk 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 elképzelhetõ, hogy a fusin természetes liganduma egy chemokin. Ebbõl 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 fertõzést in vivo (l. AH 10/1 szám). Feltételezhetõ, hogy ezek a chemokinek egy olyan receptoron keresztül hatnak, amely egyben fúziós kofaktor is. Feltehetõen ez nem azonos a fusinnal, hanem inkább egy még nem azonosított fusin-szerû proteinrõl van szó, mivel a fenti chemokinek elsõsorban a macrophag tropikus törzsekkel való fertõzést gátolják.

Szerzõk felfedezésük közvetlen gyakorlati alkalmazhatóságára is rávilágítanak. A fusin segítségével egy olyan kísérleti állatmodell hozható létre, amelyen a HIV-1 fertõzés közvetlenül tanulmányozható. Erre a célra elsõsorban 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 véli az áttörés kifejezést. Cohen leírja, hogy a kérdés legjobb szakértõi, pl. John Moore és James Hoxie is jelentõs haladásnak ítélik a cikkben leírt eredményeket, amelyeket már eddig két másik laboratóriumban is sikerült reprodukálni. A fusin felfedezésének természetesen terápiás jelentõsége is lehet a

jövõben: olyan gyógyszerek fejleszthetõk ki, amelyek a fusin-HIV-1 kölcsönhatás blokkolása utján megakadályozhatják a HIV-1 fertõzést. Ehhez elõbb természetesen el kell végezni azt - az eredeti cikk szerzõi által is igen lényegesnek ítélt - munkát melynek során identifikálják a különbözõ HIV-1 típusok kofaktorait képzõ fusin-szerû molekulákat. E kísérletek már több laboratóriumban folyamatban vannak.