UPPSALA
UNIVERSITET

Analys bakom delta-32 CCR5-mutationens effekter mot HIV

Anton Björninen

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Analys bakom delta-32 CCR5-mutationens effekter mot HIV

Anton Björninen

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

HIV är idag ett stort hot mot världshälsan och viruset har sedan sin upptäckt smittat miljontals människor världen över. I synnerhet Afrika har varit hårt drabbat av epidemin och idag bedrivs intensiv forskning för att finna botemedel och bromsmedel mot viruset. Den så kallade delta 32-CCR mutationen har i tidiga fynd visat sig ge varierande skydd mot HIV-infektion. Denna rapport fördjupar sig i betydelsen av denna mutation och hur den kan användas i forskning för att bota HIV. Delta 32-CCR mutationen verkar ge en individ mycket god resistans mot den vanligaste formen av HIV-1, den så kallade R5-typen. I nuläget visar studier på att ett homozygot anlag för mutationen ger ett anmärkningsvärt gott resultat mot HIV-R5, medan mer studier behövs för att försäkra att samma sak gäller för det heterozygota anlaget. En lyckad stamcellstransplantation har utförts på den så kallade Berlinpatienten där patienten fått sitt immunförsvar ersatt med celler som bär denna mutation. Detta sägs ha botat patienten från HIV-infektion, och skulle därmed möjligtvis kunna bli en metod för att hjälpa HIV-smittade. Negativa aspekter med mutationen finns, men de behöver undersökas mer. Det behövs avsevärt många fler studier på ett sådant ingrepps hållbarhet/säkerhet och ett större statistiskt underlag. Det finns en hel del frågetecken huruvida detta kommer att kunna gå att upprepa med säkra resultat. Allt igenom, så tyder majoriteten av studier på att mutationen visar upp mycket god resistens mot HIV av R5-typ. Däremot är det med dagens kunskap svårt att göra ett så stort ingrepp rättvist med tanke på att mutationen inte erbjuder fullgott skydd mot alla former av HIV.

Inledning

HIV – Human immunodeficiency virus, behöver idag ingen större förklaring. Viruset tros ha uppkommit någonstans i den centralafrikanska regionen med huvudsakligen primater som värdgrupp tills det att det kom i kontakt med människan – varefter vi har blivit virusets huvudsakliga vektor. HIV och AIDS, (Acquired immune deficiency syndrome) den sjukdom som viruset slutligen orsakar i sin värd, hamnade i internationellt fokus under 80-talet då viruset dök upp ifrån i stort sett ingenstans och orsakade stora problem på grund av sin höga dödlighet och avsaknad av botemedel. Idag finns viruset på samtliga befolkade kontinenter – enligt World Health Organization (WHO) har sammanlagt 78 miljoner människor blivit smittade och 39 miljoner människor avlidit till följd av HIV sedan dess upptäckt. Speciellt drabbad är den afrikanska kontinenten – i en del länder överstiger antalet smittade inom gruppen unga människor (18-40 år) 20 procent (WHO, 2015). HIV smittar främst genom blod och sexuell kontakt och angriper människans immunförsvar (Costello Daly *et al.* 1994) – viruset säkrar ingång till olika varianter av vita blodkroppar och förökar sig inom dem, vilket resulterar i att cellen i fråga efter en period dör och virusets mångfald i värden ökar. Detta har självklart en mycket negativ effekt på immunförsvaret – allt eftersom viruset förökar sig i värden så sänks även värdens kapacitet att försvara sig mot både viruset i fråga

och även andra patogener, parasiter och till och med tumörer. När värdens immunförsvar i princip är utslaget så benämns diagnosen som AIDS (CDC, 2015).

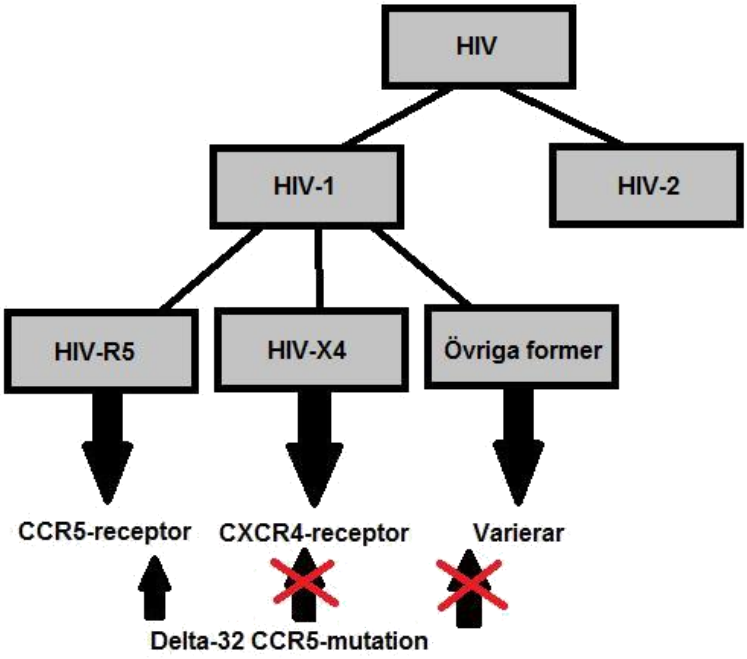
Som tidigare nämnts har HIV varit under ett stort fokus sedan dess upptäckt på 80-talet. Kampanjer för att hindra smittspridningen har använts flitigt med god effekt medan många läkemedelsföretag och organisationer världen över har gjort det till ett mål att finna ett botemedel mot HIV-smittan i människor. I nuläget finns det antivirala medel som bromsar HIV-virusets förmåga att föröka sig i människokroppen och därmed hindrar förloppet som leder till diagnosen AIDS, men de har inte kapaciteten att eliminera viruset och smittade personer är därför i många fall fortfarande vektorer för fortsatt smittspridning (CDC 2015). En upptäckt gjordes på 90-talet, nämnligen att en viss Stephen Crohn ”The man who can not catch AIDS”, uttryckte total resistans mot den form av HIV han bar på och därför inte utvecklade AIDS. Det visade sig att mannen bar på en sällsynt genetisk mutation som var relaterad till det så kallade CCR5–proteinet som går att finna på de flesta vita blodkropparna i immunförsvaret (Paxton *et al.* 1996). Det är idag känt att den vanligaste formen av HIV interagerar med CCR5-proteinet i människokroppen som en vital del av dess förökningsprocess (Nokta *et al.* 2001, Mummidi *et al.* 1997). Denna mutation, som även verkar rendera proteinet i fråga funktionslöst, leder därför till att personen i fråga uttrycker en stark resistens mot HIV. Det är uppskattat att mindre än en procent av populationen bär på denna resistens (Lucotte 2001).

Även om detta innebär att personen i fråga fortfarande är en vektor för smittspridning, så är det en intressant ny synvinkel på hela situationen med HIV. HIV leder nästan oundvikligen till en väldigt degenerativ sjukdom som kommer sätta den smittade ur spel utan medicinsk hjälp. Förutom aspekten av mänskligt lidande så orsakar sjukdomen enorma ekonomiska och sociala problem i främst sydliga afrikanska nationer, där epidemin har slagit till värst (CDC 2015). Jag finner detta ämne väldigt intressant och väljer därför att belysa det i mitt projektarbete – med fokus på vad CCR5-mutationen har för betydelse.

Min frågeställning är således denna: I vilken utsträckning denna mutation kan användas i kampen mot HIV?

HIV-infektionen

När en talar om HIV-viruset finns det i synnerhet två olika former att ta hänsyn till: HIV-1 samt HIV-2. Dessa två subtyper av samma virus delar en hel del kännetecken, men HIV-1 är ansvarigt för en klar majoritet av alla smittofall i världen och är därför den subtyp som kommer att talas om, om inte annat nämns (figur 1). HIV-2 kännetecknas av ett långsammare sjukdomsförlopp och smittspridning jämfört med HIV-1, och är primärt centrerat till delar av den centralafrikanska regionen (Gautheret-Dejean *et al.* 2015, Ferguson *et al.* 2002).



Figur 1. Figuren visar de olika relevanta subtyperna av HIV samt vilka receptorer de använder sig utav. Figuen visar även de receptorer (och således subtyper av HIV) som Delta-32 CCR5-mutationen har en effekt på. (Björninen, 2015, eget verk)

I texten kommer två olika begrepp att användas; HIV-smitta och HIV-infektion. Dessa är lätta att blanda ihop. En person med HIV-smitta bär på viruset och kan sprida det till andra, men en person med HIV-infektion bär på aktivt reproducerande HIV-virus. Eftersom virusets reproduktion är det som sätter individens immunförsvar ur spel och utvecklar AIDS, så ses detta som ett allvarligt tillstånd. De flesta läkemedel på marknaden idag är gjorda för att bromsa HIV-infektion. Även om viruset inte kan föröka sig i dess värd, kan det fortfarande leva under långa perioder och individen i fråga är därför fortfarande en vektor för smittspridning. Det finns ingen bot mot HIV-smitta, det vill säga att det finns inget sätt att eliminera viruset helt från värden (CDC 2015). Det finns inte heller någon bot mot HIV-infektion, men de antivirala medel som finns idag kan bromsa förloppet till den grad att AIDS inte utvecklas. Vad det innebär är att de medel som finns på marknaden idag är designade för att sakta ned virusets reproduktion till den grad att det inte hinner utarma individens immunförsvar innan nya immunceller bildas (Palella *et al.* 1998).

Det finns ett dokumenterat fall av en patient som anses blivit botad från HIV-infektion, som kommer tas upp i en senare del. Detta fall är omgivet av en hel del osäkerheter och behöver undersökas vidare innan metoden kan erkännas som en bot mot HIV-infektion.

HIV angriper immunförsvaret i dess värd. Viruset riktar främst in sig på immunoceller inom CD4+-kategorin. Dessa celler bär den så kallade CD4-molekylen på sina membran, och detta är HIV-virusets huvudsakliga receptor för att säkra inträde till cellen (Briand *et al.* 1997).
Detta är, som tidigare nämnt, en del av virusets förökningsprocess. En invasion av cellen följs

sedan utav integrering av virusets genetiska material till cellens cellkärna, varefter cellens egna organeller producerar nya virus. Detta skiljer sig inte nämnvärt från traditionell viral reproduktion. Vissa skillnader finns mellan olika former av HIV-viruset och hur de angriper immunförsvaret, men användandet av CD4 som receptor räknas som virusets generella tillvägagångssätt. Mätningar av antalet CD4+ - T-celler i blod och lymfa är ett etablerat sätt att fastställa diagonosen AIDS i smittade individer (Ferguson *et al.* 2002, Nokta *et al.* 2001). Det är dock fastställt att HIV även har andra sätt att invadera immunoceller, men attacken på CD4+-celler är det vanligaste. Det vitala sambandet att notera här är att medan HIV-viruset förlitar sig på CD4 som sin huvudsakliga receptor, så är den mest prevalenta typen av HIV-1-viruset (R5) även beroende utav co-receptorn CCR5 på cellens membran för att kunna invadera cellen. Virusets samspel mellan CD4-receptorn och CCR5-coreceptorn har därför fått stor uppmärksamhet i medicinsk forskning, och det finns flera antivirala medel som stör denna process (Nokta *et al.* 2001, Mummidi *et al.*1997).

Utöver detta finns andra typer av HIV-1 med andra tillvägagångssätt, men de är inte lika prevalenta. HIV-X4 är en typ av HIV som inte återfinns i naturen lika ofta som HIV-R5, men ändå är ansvarigt för en betydande del av alla HIV-infektioner. HIV-X4 använder sig av coreceptor CXCR4 istället för coreceptor CCR5 vid inträde i en CD4 T-cell, och har därför andra förutsättningar. HIV-R5 och HIV-X4 använder sig därmed av olika coreceptorer för att invadera en cell (figur 1) (Moonis *et al.* 2001). Utöver detta så finns variation inom båda typerna som kan förändra dessa förutsättningar, samt att det även finns andra typer av HIV som utnyttjar andra tillvägagångssätt också, men dessa är avsevärt mer ovanliga (Coakley *et al.* 2005).

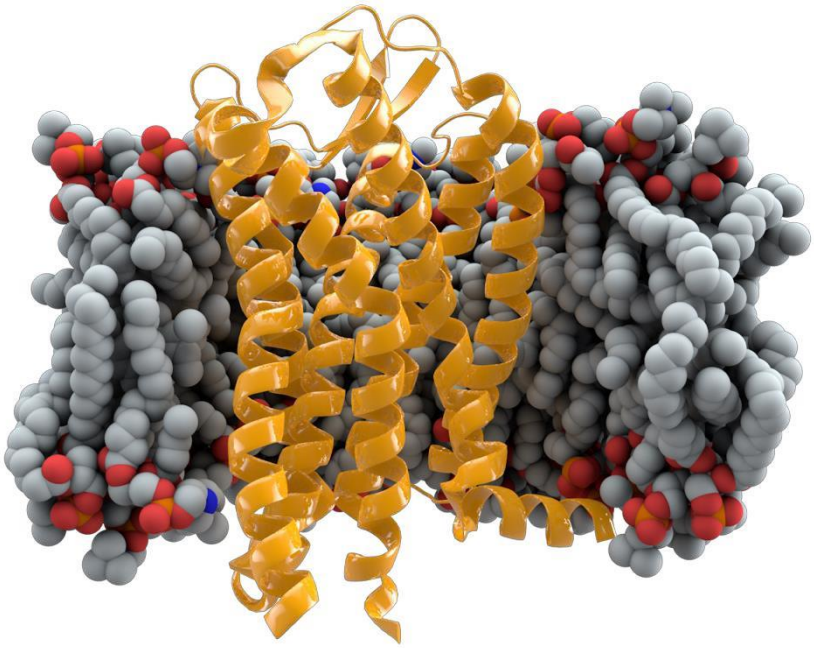
CCR5–mutationen och dess betydelse mot HIV

Delta-32 CCR-mutationen

Den så kallade delta-32-mutationen i den gen som kodar för CCR5-receptoren är av intresse här och är av hög betydelse för HIV R5. Mutationen utgörs av en deletion vid bp-32 i den sekvens som kodar för det färdiga CCR5-proteinet. Detta är en nonsense-mutation som leder till att transkriberingen avslutas tidigt och resulterar i att det färdiga proteinet är ofullständigt och inte fyller någon funktion. Denna mutation är som tidigare nämnts väldigt ovanlig i populationen, med en något högre frekvens hos kaukasiska folkgrupper och i synnerhet nordeuropeiska folkgrupper (Austerlitz *et al.* 2000). I samband med vad som noterades ovan förlitar sig HIV-R5 viruset sig på CCR5-proteinet som en co-receptor till sitt huvudsakliga tillvägagångssätt att invadera en cell (Nokta *et al.* 2001). Delta-32 CCR5-mutationen verkar göra detta omöjligt, eftersom proteinet är obrukbart både för cellen i fråga och för viruset (figur 1).

Det finns en hel del kliniska experiment som utförts med detta som fokus. Mutationen har ingen effekt på HIV av X4-typ, eller på någon annan form av HIV som inte använder CCR5-receptorn. Alla studier som undersökt delta-32 CCR5-mutationens potens mot HIV har därför

undersökt dess effekt mot HIV av R5-typ. Dock så är en HIV-smitta sällan homogen och det finns ofta situationer där flera olika subtyper av HIV återfinns i värden (Toma *et al.* 2010).



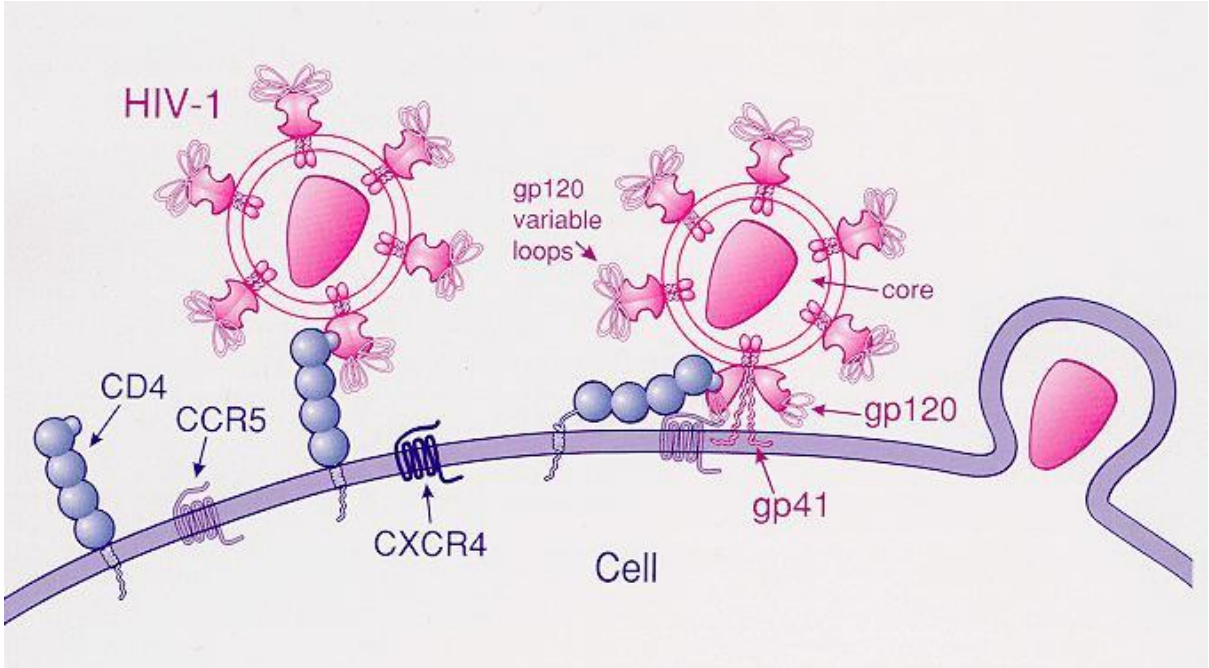
Figur 2: CCR5-receptoren i dess naturliga form, omgiven av lipider (cellmembranet). By Thomas Splettstoesser (www.scistyle.com) - Own work, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29444178

För att förstå vikten av delta-32 CCR5-mutationen är det nödvändigt att fördjupa sig en aning inom CCR5-proteinets funktion och virusets interaktioner med immuncellen.

CCR5-proteinet återfinns på cellens membran (figur 2) tillsammans med en mängd av andra membranöverskridande proteiner, inklusive CD4-proteinet (återfinns i alla CD4+T-celler) och även CXCR4-receptorn (figur 3), som används av HIV X4. CCR5-proteinets roll är som receptor; i normala fall svarar detta protein på signalmolekyler som återfinns i kroppen för att koordinera immunförsvaret mot potentiella hot, men denna funktion är fortfarande inte helt klarlagd (Doodes *et al.* 2009).

CD4 och CCR5-proteinen fungerar som receptorer på cellens membran, och det är denna process som viruset utnyttjar vid invasion. Det så kallade gp120-proteinet på virusets yta imiterar de signalmolekyler som CD4 och CCR5-proteinet vanligtvis använder, varpå viruset binder på CD4-proteinet, dess huvudsakliga receptor. För att garantera inträde till cellen behöver viruset även binda till en co-receptor, som i fallet med HIV-R5 är CCR-proteinet. Denna process leder till att viruset hakar fast i cellens membran med det så kallade gp41-proteinet, varefter virusets yttre skal faller av och cellen omgiver virusets kärna med sitt

membran genom naturliga processer (figur 3) (Scarlatti *et al.* 1997, Loftlin *et al.* 2010).



Figur 3: Figuren visar från vänster till höger processen i vilket ett HIV-R5 virus interagerar med CD4 och CCR5-receptorerna på en CD4+T-cell för att säkra inträde till cellen. By US National Institutes of Health - National Institute of Allergy and Infectious Diseases - US National Institutes of Health - National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Public Domain, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2330638

I en individ med delta-32 CCR5-mutation är CCR5-receptorn på cellmembranet ofullständigt och helt obrukbart för både cellen i fråga och för viruset. Detta omöjliggör virusets attack på cellen då den helt enkelt inte kan släppa in viruset utan en fungerande co-receptor. Detta fynd har visat på att människor med mutationen bär på stark resistens mot HIV-R5 (Nokta *et al.* 2001). CCR5-receptorns exakta funktioner är fortfarande inte helt klarlagda, då det finns få studier som behandlar hur individen påverkas av denna mutation utan HIV-smitta.
En studie visar på att CCR5-receptorer återfinns på så kallade astrocyter i nervsystemet. Dessa celler har en underhållsfunktion i nervsystemet, där de underhåller och reparerar andra nervceller. Studien visar att en brist på CCR5-receptorer stör signalvägarna i nervsystemet vilket orsakar inflammation och celldöd i neuronerna. Detta har kopplats till försämrad minnesfunktion och ökad prevalens av Alzheimers (Lee *et al.* 2009). Denna nackdel är något som kommer att belysas senare.

Tester på individer med homozygota anlag

Ett experiment har gjorts där två individer homozygota (mutationsanlag på båda alleler) för delta-32 CCR5-mutationen granskades. Båda personerna bar på sexuellt överförd samt obehandlad HIV-smitta, men hade under loppet av flera år hållit både en acceptabel halt av HIV samt en hög halt CD4+-celler i blodet. Detta är karaktäristiskt för en ej långt gången HIV-smitta, då en hög halt av CD4+-celler innebär att immunförsvaret inte blivit utsatt för större skada. Båda personerna sågs vara vid god vigör. Undersökningen visade att även ifall personerna för stunden inte verkar lida av en övergång till AIDS, så bar båda personerna

utöver den vanliga R5-typen även på HIV-typer som hade möjlighet att invadera celler genom användning av andra receptorer än genom coreceptor CCR5. Dessa var dock i klar minoritet. Dessa innefattade HIV X4; dessa använder som tidigare nämnt coreceptor CXCR4 istället för CCR5 och var därmed inte hindrade från att föröka sig. Proven visade däremot även att särskilda HIV R5-”mutanter” i patienten som lyckats kringgå det traditionella användandet av CCR5-receptorn och därmed kunde överkomma sitt reproduktiva hinder. Även om det redan tidigare antogs att delta-32 CCR-mutationen skulle ha lite eller ingen effekt på HIV av typ X4, så kunde även särskilda ”mutanter” av HIV R5- typ slutligen föröka sig i en smittad individ utan fungerande CCR5-protein. Detta visar att delta-32 CCR5– mutationen i detta fall inte verkar erbjuda någon permanent resistens mot HIV. Båda patienterna bar på en anmärkningsvärt låg halt HIV trots att de inte sökt vård för sin smitta på över flera år. Infektionen kunde dock fortfarande fortskrida om än med ett väldigt långsamt förlopp i de två individer som undersökningen utförts på. Däremot tyder detta på att mutationen har en god effekt i att stävja infektion av reguljära HIV R5, som är den vanligaste typen vid HIV-smitta (Henrich *et al.* 2015).

Detta stöds av en rad äldre experiment, exempelvis en undersökning som utfördes av ett forskarlag år 2001. Resultatet av deras arbete indikerade att i en patient smittad med vanlig HIV-R5 så skulle en homozygot delta 32-CCR5 mutation kunna stoppa en infektion på obestämd tid (Marmor *et al.* 1999). Vid ett annat arbete som utfördes år 1999 undersöktes blodvärden på 70 HIV-smittade individer och fann en klar korrelation hos de individer som bar på en låg halt av HIV och samtidigt bar på delta 32-CCR5- mutationen. Forskarna var inte så optimistiska och kunde inte säga att mutationen skulle kunna stävja en infektion på obestämd tid, men sambandet att mutationen verkade kunna bromsa HIV-infektion var tydligt (Walli *et al.* 1998).

En annan studie utförd av Thomas R O’Brien *et al*. (1999) tyder på liknade resultat. Studien gjordes på en HIV-smittad man som senare dog av sina åkommor. Mannen bar på homozygota anlag för delta-32 CCR5-mutationen, vilket fastställdes genom DNA-sekvensering av mannens immunceller. I detta fall utvecklade mannen AIDS efter en tidsperiod som ansågs normal, vilket tydde på att mutationen inte hade någon effekt på sjukdomsförloppet. En parallell undersökning gjordes samtidigt med fem andra HIV-smittade individer med homozygota anlag för mutationen, som inte utvecklade HIV-infektion. Detta, kombinerat med att den DNA-sekvensering av de HIV-virus mannen bar på sågs som avvikande, ledde forskarlaget till följande resultat. Mannen bar inte på en HIV-smitta av R5-typ, och det ses som anledningen till att mannen avled när de andra fem individerna uttryckte resistens mot HIV-infektion (O’Brien *et al.* 1997).

Dessa studier belyser den fördel mutationen har för individen mot HIV-R5 då den är homozygot, men dessa individer är oerhört sällsynta då genotypen är mycket ovanlig. Mutationen har bedömts att inte ha någon effekt på andra former utav HIV, helt enkelt på grund utav att de inte använder sig utav CCR5-receptorn vid reproduktion (Nokta *et al.* 2001).

Studier har även gjorts på mutationens aspekter då den uttrycks heterozygot.

Tester på individer med heterozygota anlag

Jämförelser har gjorts för att undersöka HIV-virusets förmåga att föröka sig i personer med heterozygota anlag för delta 32-CCR5-mutationen och i människor med två alleler av vildtyp för CCR5. 18 individer med delta 32/vildtyp och 54 individer med vildtyp/vildtyp deltog för detta ändamål, samtliga individer fick dock antiviral terapi under samma period. Detta bedömdes som en faktor som försvårade möjligheten att se ifall mutationen hade en faktisk effekt på viruset, eftersom terapin aktivt bekämpade viruset innan och under hela studien. Som förväntat uttryckte de 18 individer med homozygot anlag för delta 32-CCR5-mutation ett avsevärt mindre antal CCR5-receptorer på sina T-celler i jämförelse med vildtypen. Resultaten kunde dock inte fastställa ett samband mellan mutationen och resistens mot HIV. Detta berodde på att både grupperna bar på låga halter av HIV som lika gärna skulle kunna korreleras till individernas antivirala terapi istället för mutationen (Wang *et al.* 2014).

Liknande och mer omfattande studier har gjorts på området. I en studie undersöktes cirka 300 individer; 150 med vildtyp och 150 med heterozygota anlag för delta-32 CCR5-mutationen. Samtliga hade påbörjat antiviral terapi. Syftet med denna studie var att undersöka eventuella kopplingar eller skillnader i dessa individers HIV-infektion baserat på mutationen. Resultatet blev anmärkningsvärda och visade bland annat på en korrelation mellan hög mängd CCR5-receptorer i heterozygoter och låg halt av HIV, vilket motsäger tidigare studier inom området som generellt säger att det bör vara tvärt om, då en genomsnittlig HIV-R5-infektion brukar resultera i låga mängder CCR5-receptorer allt eftersom infektionen fortskider. Båda grupperna av genotyper uttryckte även ungefär samma mängd utav CCR5-receptorer, där tidigare studier föreslagit att mutationen bör sänka mängden av fungerande CCR5-receptorer. Heinrich beskriver samspelet mellan HIV, mutationen och CCR5-receptorerna som komplext, och föreslår att bland annat den antivirala terapin kan utgöra en faktor till resultaten (Henrich *et al.* 2016).

Slutsatserna man kan dra av detta är att det är betydligt svårare att fastställa ett samband mellan mutationen och lägre HIV-smitta när den är heterozygot. Värt att notera är att det rent generellt varit en mycket större deltagarbas i de studier som behandlat den heterozygota mutationen jämfört med den homozygota. Att båda studierna ovan pekar ut den antivirala terapin som deltagarna gått på som en faktor till resultaten beror helt enkelt på att det är svårt att peka ut mutationens resistenta effekter (som skall hindra reproduktion av HIV) när antivirala medel gör exakt samma sak (Wang *et al.* 2014, Henrich *et al* 2016).

Stamcellstransplantationer (Berlinpatienten)

T-celler bildas nästan konstant i benmärgen från specifika stamceller, som har kapaciteten att utvecklas till vilken form utav blodkropp som helst. Ett omfattande men tillika intressant ingrepp som har dokumenterats är stamcellstransplantation från en person som bär på delta-

32 CCR5-mutationen till en annan, och huruvida detta kan åstadkomma nya T-celler i patienten som bär på resistens mot HIV-infektion.

Stamcellstransplantation (och/eller) benmärgstransplantationer har använts vid forskning mot HIV och i försök att bota AIDS i över trettio år, men mycket få av dem har gett goda resultat. Kontroversiella försök som transplantationen av stamceller från babian till människa (Hužicka, 1999) och försök med stamcellstransplantation i möss som introducerats till HIV (Myburgh *et al.* 2015) är exempel på försök som gjorts genom åren. Sedan upptäckten av delta 32-CCR5-mutationen har det mest lyckade försöket varit med stamcellstransplantation från en individ som bär på mutationen till en HIV-smittad patient. Patienten i fråga beskrivs vara fri från HIV-infektion; den så kallade ”Berlinpatienten” (Hütter *et al.* 2009). Patienten i fråga led av långt gången HIV-infektion som behandlats genom antiviral terapi och personen hade även diagnosen akut myelonisk leukemi. Denna allvarliga sjukdom hindrar det naturliga förloppet i benmärgen där individens stamceller gradvis bildar nya immunceller och blodkroppar. Med detta i åtanke bedömdes patientens stamceller vara etiskt acceptabla att byta ut som ett kombinerat försök att både bota patientens leukemi och HIV-infektion. Halten av HIV i patienten var sedan innan låg som effekt av den antivirala terapin. Patienten undergick stamcellstransplantation från en donator med homozygota alleler för delta 32 CCR5-mutationen, varvid dennes immunsystem ersattes allt eftersom med genetiskt annorlunda CD4 T-celler som visade sig vara resistenta mot patientens HIV-smitta. I detta fall bedömdes den gradvisa ersättningen av mannens immunsystem vara tillräckligt för att stoppa HIV-infektion, och mannen avslutade sin antivirala terapi och bedömdes fortfarande vara fri från HIV-infektion 18 månader efter ingreppet (Hütter *et al.* 2009). En uppföljning 3,5år senare visade att patienten hade fått en helt ny uppsättning av immunceller, och att inga återfall av HIV-infektion hade kunnat noteras. En anmärkning var dock, så som även noterat ovan, att patientens T-celler fortfarande uttryckte CXCR4-receptorer på sina membraner och således skulle vara sårbara mot HIV X4-infektion. Prover visade nämligen att patienten bar på en mycket låg andel av HIV X4-virus, som skulle kunna skapa ett återfall. Patienten är dock i nuläget den enda person som ses som botad från HIV-infektion (Allers *et al.* 2011) och har därmed dragit på sig en del medial uppmärksamhet.

Denna form av ingrepp bär med sig en risk för patienten i och med en risk för infektioner, organskador samt att patientens egna immunförsvar inte accepterar den främmande vävnaden och angriper den. Dock så har denna medicinska behandling blivit avsevärt säkrare sedan det utvecklades för ungefär 40 år sedan (Gooley *et al.* 2010).

Berlinpatienten har granskats ytterligare efter behandlingen utav utomstående forskarlag, varpå fler prover togs fem år efter att patienten bedömts botad från HIV. Resultatet var det samma även efter den tidsperioden – patientens immunsystem var totalt ersatt och ingen mätbar HIV-infektion kunde läsas, trots mätbar men mycket låg HIV X4-mängd (Yukl *et al.* 2013).

Diskussion

Då frågeställningen i denna uppsats var ifall förekomsten utav delta 32-CCR5 mutationen skulle kunna ha en signifikant effekt i kampen mot HIV så finns det definitivt anledningar att vara optimistisk. Flera undersökningar med just detta i fokus visar nästan enhälligt att det finns en tydlig korrelation mellan att individer som är homozygota för mutationen också har en markant lägre halt av HIV-virus i sina kroppsvätskor (Henrich *et al.* 2015, Marmor *et al.* 1999). Detta blir mer tydligt eftersom att homozygota individer som bär på mutationen verkar ha ett nästan helt intakt immunförsvar även flera år efter smitta, medan en person med vildtyp-CCR5 nästan säkert skulle ha haft en allvarlig HIV-infektion (Henrich *et al.* 2015). Vad gäller heterozygota individer med mutationen så har resultaten varit betydligt mer diffusa, vilket troligen kan härledas till att samtliga individer som studerats samtidigt under flera år har gått på antiviral terapi och därmed redan har väldigt låga (onormala i sammanhanget) HIV-värden (Wang *et al.* 2014). De homozygota individer som behandlats i studier har ofta eller inte alls fått antiviral terapi mot HIV-smittan, då de helt enkelt ofta inte har märkt av några negativa symptom, eller kanske inte ems varit medveten om sjukdomen över huvud taget. Dock är de homozygota individerna (och samt även smittade med HIV) rent naturligt väldigt sällsynta i populationen och de flesta studier har därför enbart involverat ett par stycken (Heinrich *et al.* 2015) vilket kanske inte är ett tillräckligt statistiskt underlag. Den tidiga studien som utfördes 1997 på en HIV-smittad man homozygot för delta-32 CCR5-mutationen stärker hypotesen att mutationen ger riktig resistens mot HIV-R5, ifall man skall tro resultaten. Författaren fastställde där att anledningen till att mannen dog var för att han bar på en ovanlig smitta, mest troligt HIV-X4, eftersom att viruset ej angrep mannens CCR5-receptorer. Denna slutsats kunde dras eftersom fem andra individer med samma mutation inte utvecklade någon HIV-infektion alls (O'Brian *et al.* 1997). Det finns stort utrymme för osäkerhet och diskussion, samt fortsatta studier inom området. Värt att nämna är att samtliga av dessa studier har gjorts med bakgrundsinformationen att delta-32 CCR5-mutationen skall verka emot HIV (se exempelvis Berlinpatienten).

Under ett försök med en delta 32-CCR5-stamcellstransplantation i en person smittad med HIV kom det något kontroversiella men tillika anmärkningsvärda resultatet att patienten i fråga (Berlinpatienten) inte visar tecken på HIV-infektion 5 år efter ingreppet (Allers *et al.* 2011, Yukl *et al.* 2013). Mannen har varit under stor granskning för att försäkra att han är frisk, och ifall detta kan återupprepas ytterligare med samma framgång så är det onekligen en stor framgång i anti-HIV forskning. Säkerheten i detta framsteg ifrågasätts dock en aning utav det experiment som utförts av Henrich et al. 2015. Deras undersökning av två HIV-smittade individer som båda bar på homozygota alleler för delta-32 CCR5-mutation visade mycket riktigt en anmärkningsvärd resistens mot HIV av R5-typ, men fortsatta analyser av kompositionen av deras HIV-smitta visade på R5-"mutanter" som ändå nått reproduktiv framgång genom att de bedömts lyckats använda sig utav andra coreceptorer än just CCR5. Henrichs studie visar att individer som bär på ett homozygot anlag för mutationen inte kan ses som botade från HIV-infektion (Henrich *et al.* 2015), och därför kan det vara tveksamt att säga att Berlinpatienten kan ses som botad när han fick dessa anlag i en

stamcellstransplantation. Berlinpatienten bär dessutom fortfarande på HIV av X4-typ, som inte bör ha problem att föröka sig då den inte använder sig av CCR5-receptorer. Varför detta inte händer är en gåta. Vad man kan konstatera här när olika fakta ställs emot varandra är bristen på ett statistiskt underlag. Berlinpatienten kan ha varit anmärkningsvärt tursam. Ingen HIV-smitta är heller den andra lik, och de HIV-R5-”mutanter” som återfanns i patienterna i Heinrichs studie kan ha varit en händelse som aldrig sker igen. Effekten av delta-32 CCR5-mutationen måste undersökas i fler individer och situationer för att en säker slutsats ska kunna dras. En spekulation från min sida är att resistensen som erhålls från delta-32 CCR5-mutationen kan variera beroende på individens övriga genetiska faktorer, dess miljö, andra sjukdomar som påverkar immunförsvaret samt även virusets förmåga att anpassa sig. De fynd som finns idag tyder på att mutationen erbjuder en resistens mot HIV av R5-typ, men att denna resistens verkar variera till den grad att vissa studier bedömer den som ett skydd mot HIV medan andra anser att den har kapaciteten att bota HIV-infektion fullständigt. Däremot finns det en stor etisk problematik med transplantationer av muterade stamceller, eftersom brist på CCR5-receptorn i nervsystemet har länkats till sämre minnesfunktion och Alzheimers. Då denna mutation renderar proteinet obrukbart, så är frågan ifall mutationen kan orsaka mer skada än vad den ger. Däremot är det viktigt att poängtera att i fallet med Berlinpatienten så tillfördes mutationen endast till patientens benmärg – den modifierade inte hela patientens genom varvid personens nervceller hypotetiskt skulle kunna vara oskadda då astrocyter bildas i hjärnan. Vid framtida studier på området bör det dock vara av yttersta vikt att söka upp fler av dessa möjliga negativa aspekter av mutationen och väga dem mot dess fördelar, ifall det i framtiden skall kunna ses som säkert och rimligt att använda ingreppet på andra HIV-smittade individer.

Ett fortsatt fokus på medicinska genombrott angående CCR5-coreceptoren kommer i min mening förmodligen att leda till att dessa alternativa HIV R5-”mutanter” som nämnts tidigare och även HIV X4-virus blir mer och mer prevalenta, då de fyller upp ett tomrum som tidigare inte fanns. En parallell går att dra till det växande problemet med patogena bakterier som nu visar resistens för våra vanligaste antibiotika; ett allt för effektivt medel mot en patogen kommer att leda till ökad prevalens för patogener med alternativa genotyper som är bättre lämpade för att hantera den nya utmaningen. Det är i mina ögon troligt att i en värld där denna form av stamcellstransplantation skulle används regelbundet för att bota HIV R5-infektioner så kommer problemet endast att förskjutas då viruset med tiden anpassar sig för att kontra detta och motverka den nytta delta 32 CCR5-mutationen har. Det är dock viktigt att belysa att patienten i detta fall även led av akut myelonisk leukemi utöver HIV. Detta kan vara skälet till varför ett så stort ingrepp gjordes i första taget; det kanske inte är ett ingrepp som ses som rimligt för att behandla majoriteten av patienter.

Denna behandling bör som tidigare nämnt inte heller ha någon effekt på det mindre prevalenta HIV X4-viruset, som inte alls är lika vanligt vid HIV-smitta men fortfarande ansvarar för en betydande del av spridningen av HIV (Moonis *et al.* 2001*)*. Ett framsteg är dock fortfarande ett framsteg, även ifall det endast kan vara temporärt. Majoriteten av HIV-smittor idag består utav den dominerande HIV R5-typen och fortsatta studier kring CCR5-mutationen kombinerat med utveckling av antivirala medel borde kunna leda till en

betydelsefull positiv trend inom området. En ytterligare punkt att belysa inom just detta ämne är att alla HIV-smittor inte nödvändigtvis behöver vara homogena. I fallet med delta 32-CCR5-stamcellstransplantationen som verkar ha botat en HIV-infektion så bar patienten på en överväldigande hög HIV R5-uppsättning, men fortfarande även på en lägre mängd HIV X4 även efter att infektionen ansågs som botad. I en smitta där både HIV R5, HIV X4 och eventuellt även andra typer är närvarande hos en individ med delta 32-CCR5 mutation tyder en del rön på att infektion fortfarande kan utvecklas, om än i drastiskt långsammare takt (Henrich *et al.* 2015, Yukl *et al.* 2013).

Slutsatser

Slutsatsen som går att dra från studiernas resultat och personliga reflektioner är att det onekligen går att finna fördelar i delta-32 CCR5-mutationen mot utvecklingen av HIV. Mutationen ger individer varierande men stark resistens mot HIV av R5-typ. Detta har gått att applicera i ett enskilt lyckat försök med stamcellstransplantation (Berlinpatienten) där personen har förklarats botad från HIV-infektion. Däremot har bristen på normala CCR5-receptorer kopplats till försämrade kognitiva funktioner, och mer forskning på framförallt negativa aspekter måste utföras ifall mutationen skall kunna användas rent medicinskt för att bota fler människor. CCR5-mutationen har ingen effekt på andra typer av HIV, och HIV-smittor är sällan homogena och infektion kan därför i vissa fall fortfarande utvecklas. Det är även troligt att viruset har en förmåga att anpassa sig för att använda andra receptorer, och de subtyper av HIV (främst X4) som redan använder sig av andra receptorer kommer troligt att bli mer prevalenta vid fortsatt fokus på CCR5-receptorn. Det krävs avsevärt mer forskning på området för att bedöma om ett så invasivt och omfattande ingrepp som stamcellstransplantation är ett rimligt alternativ att använda mot HIV, när dagens rön tyder på att mutationen inte erbjuder ett garanterat skydd mot infektionen.

Tack

Stort tack går ut till Irene Söderhäll för handledning och återkoppling på projektet. Tack till Simon Selberg, Ida Brisvåg, Malin Jigrud, Marisol Avilés och Erik Widén för givande diskussion och återkoppling under arbetets gång. Tack går även ut till Katarina Andreasen, Lage Cerenius, Ingrid Ahnesjö, Lena Pavasson, Elisabeth Furberg och Elisabeth Långström som har lett undervisning under kursens gång.

Referenser

Allers K, Hütter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, Schneider T, 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5delta32/delta32 stem cell transplantation. Blood, **117:** 2791-2799

Austerlitz F, Heyer E, 2000. Allelic association is increased by correlation effective family size, European Journal of Human Genetics (2000) **8:** 980-985

Briand G, Barbeau B, Tremblay M, 1997. Binding of HIV-1 to its receptor induces tyrosine phosphorylation of several CD4-associated proteins, including the phosphatidylinositol 3-kinase. Virology **228:** 171-179

Centers for Disease Control and Prevention, 2015. “About HIV/AIDS”. Hämtat den 16-05-12. 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA

Coakley, Eoin, Christos J, Whitcomb, Jeannette M, 2005. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. Current Opinion in Infectious Diseases, **18:** 9-15.

Costello Daly C, Helling-Giese G E, Mati J K, Hunter D J, 1994. Contraceptive methods and the transmission of HIV: implications for family planning. Genitourin Med **1994:** 110-117

Doodes P D, Cao Y, Hamel K M, Wang Y, Rodeghero R L, Kobezda T, Finnegan A, 2009. CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthrisis. Arthrisis and rheumathism, **60**: 2945-2953

Gautheret-Dejean A, Bocobza J, Brunet S, Damond F, Plantier JC, Barin F, 2015. Performance of rapid tests for discrimination between HIV-1 and/or HIV-2 infections. Journal of medical virology **87:** 2061-2066

Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorror ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr KA, Appelbaum FR, Storb R, McDonald GB, 2010. Reduced Mortality after Allogeneic Hemotopoietic-Cell Transplantation, New England Journal of Medicine, **363:** 2191-2101

Henrich T J, Hanhauser E, Hu Z, Stellbrink H-J, Noah C, Martin J, Deeks S G, Kuritzkes D R, Pereyra F, 2015. Viremic control and viral coreceptor usage in two HIV-1-infected persons homozygous for CCR5 delta32. AIDS(London), **29:** 867-876

Henrich T J, Hanhauser E, Harrison L J, Palmer C D, Romero-Tejeda M, Jost S, Bosch R J, Kuritzkes D R, 2016. CCR5-delta32 Heterozygosity, HIV-1 Reservoir Size, and Lymphocyte Activation in Individuals Receiving Long-term Suppressive Antiretroviral Therapy, J Infect Dis. **213:** 766-770

Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O, Blau I W, Hofmann, WK, Thiel E, 2009. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. New England Journal of Medicine, **360:** 692-698

Hužicka I, 1999. Could bone marrow transplantation cure AIDS?, Medical Hypotheses, **52:** 247-257

Lee YK, Kwak DH, Oh KW, Nam SY, Lee BJ, Yun YW, Kim YB, Han SB, Hong JT, 2009. CCR5 deficiency induces astrocyte activation, A beta deposit and impaired memory function. Neurobiology of Learning and Memory, **92:** 356-363.

Loftlin L M, Kienzle M F, Yi Y, Lee B, Lee F H, Gray L, Gorry P R, Collman R G, 2010. Constrained use of CCR5 on CD4+ lymphocytes by R5X4 HIV-1: Efficiency of Env-CCR5 interactions and low CCR5 expression determine a range of restricted CCR5-mediated entry. Virology, **402:** 125-148.

Lucotte, 2001. Distribution of the CCR5 Gene 32-Basepair Deletion in West Europe. A Hypothesis About the Possible Dispersion of the Mutation by the Vikings in Historical Times Human Immunology **62:** 933-936

Marmor M, Sheppard H W, Donnel D, Bozeman Sam, Celum C, Buchbinder S, Koblin B, Seage III GR, 1999. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. Journal of acquired immune deficiency syndromes, **27:** 472-481

Moonis M, Lee B, Bailer RT, Luo Q, Montaner LJ, 2001. CCR5 and CXCR expression correlated with X4 and R5 HIV-infection yet not sustained replication in Th1 and Th2 cells, AIDS **15:** 1941-1949

Mummidi S, Ahuja S S, McDaniel B L, Ahuja S K, 1997. The Human CC Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene, The Journal of Biological Chemistry, **272:** 30662-30671

Myburgh R, Ivic S, Pepper M S, Gers-Huber G, Li D, Audigé A, Rochat M-A, Jaquet V, Regenass S, Manz M G, Salmon P, Krause K-H, Speck R-F, 2015. Lentivector Knockdown of CCR5 in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Confers Functional and Persistent HIV-1 Resistance in Humanized Mice. J. Virol. **89:** 6761-6772

Nokta MA, Li XD, Nichols J, Mallen M, Pou A, Asmuth D, Pollard RB, 2001. Chemokine/CD4 receptor density ratios correlate with HIV replication in lymph node and peripheral blood of HIV-infected individuals. AIDS **15:** 161-169

O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JAE, Carrington M, Michael NL, White II GC, 1997. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5-delta32, The Lancet **349:** 1219

Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. 1996. Relative resistance to HIV-1 infection
of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. Nature Medicine **2**:412-417

Pallella FJ, Kathleen M, Delaney MS, Anne C, Moorman BSN, Mark O, Loveless MD, Jack F, Glen A, Satten, Diane J, Aschman R, Scott MS, Holmberg MD, 1998. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. The New England Journal of Medicine, **338:** 853-860

Scarlatti G, Tresoldi E, Björndal Å, Fredriksson R, Colognesi C, Kui Deng H, Malnati M S, Plebani A, Siccardi A G, Littman D R, Fenyö E V, Lusso P. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. Nature medicine, **3:** 1259-1265.

Toma J, Whitcomb JM, Petropoulos CJ, Huang W, 2010. Dual-tropic HIV type 1 isolates vary dramatically in their utilization of CCR5 and CXCR4 coreceptors. AIDS, **24:** 2181-2186

Walli R, Reinhart B, Luckow B, Lederer E, Loch O, Malo A, Wank R, Schlöndorff D, Goebel F D, 1998. HIV-1-infected long-term slow progressors heterozygous for delta32-CCR5 show significantly lower plasma viral load than wild-type slow progressors. Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology. **18:** 229-233

Wang C, Abdel-Mohsen M, Strain M C, Lada S M, Yukl S, Cockerham L R, Pilcher C D, Hecht F M, Sinclair E, Liegler T, Richman D D, Deeks S G, Pillai S K, 2014. Decreased HIV Type 1 Transcription in CCR5-delta32 Heterozygotes During Suppressive Antiretroviral Therapy, J Infect Dis. **210**: 1838-1843

Yukl S A, Boritz E, Busch M, Bentsen C, Chun T-W, Douek D, Eisele E, Haase A, Ho Y-C, Hütter G, Justement J S, Keating S, Lee T-H, Li P, Murray D, Palmer S, Pilcher C, Pillai S, Price R W, Rotherberger M, Schecker T, Siliciano J, Siliciano R, Sinclair E, Strain M,

Wong J, Richman D, Deeks S G, 2013. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. PLoS pathogens, **9:**e1003347

World Health Organization, 2015. "Fact Sheet N360". Hämtat den 16-04-26. World Health Organization HIV/AIDS Department v20, Avenue Appia vCH-1211 Geneva

27 Switzerland

Analys bakom genetisk resistens mot HIV: etisk bilaga

Anton Björninen

Självständigt arbete i biologi 2015

Etiska problemställningar och överväganden

Inom alla vetenskapliga fält finns det självfallet etiska frågeställningar att ta hänsyn till. Inom biologin, och i synnerhet det ämne jag har valt att behandla, är detta särskilt framträdande. Här belyser jag etiska problemställningar och hur jag valt att ta ställning till dem i mitt projektarbete.

Etisk behandling av försökspersoner

Inom mitt projektarbete med HIV, ett virus som endast angriper människan, så har jag behandlat åtskilliga studier. I de allra flesta fall involverar de försök på människor, vilket länge har varit ett problematiskt område. Försök på människor har länge varit mycket hårdare reglerat än försök på andra levande varelser, per de generella överenskommelserna om forskningetik. Många av försöken som utförts har ofta varit omfattande, och det är frågan om aspekten av mänskligt lidande väger över framstegen som studierna har resulterat i. Det bör även vara av betydelse att komma ihåg att HIV är en allvarlig och ofta stigmatiserad sjukdom. Människor i många delar av världen kan tendera att känna sig utstötta. I en del fall skulle risken finnas att de inte ser någon annan utväg än att delta i en studie de annars inte skulle känna sig beväma med.

De flesta av dessa studier har varit i samarbete med myndigheter runt om i världen. I ett försök att undvika att referera arbeten där oetiska arbetsmetoder använts, så har jag kontrollerat att varje studie jag använt där intrusiva försök gjorts på människor först har blivit godkänd utav någon form av högre auktoritet. Det bör vara ett tecken på att studierna följer generella etiska överenskommelser.

Fabricering av data

Det är såvitt jag vet relativt ovanligt, men det förekommer fortfarande att data fabriceras i studier i hopp om att de ska bli mer attraktiva och generera mer pengar när de publiceras. Dessa fabriceringar brukar upptäckas relativt fort när andra forskare försöker replikera deras resultat, speciellt ifall det är inom något som bryter ny mark. För att undvika den smala risken att jag skulle citera fabricerad data (som jag ej kan testa) har jag förlitat mig på redan citerade artiklar och använt mitt sunda förnuft när jag gått igenom dem.

Objektiv framställning av slutpunkter

Jag behandlar ett område som det för stunden bedrivs mycket aktiv forskning på. Även om de studier som gjorts inom området inte är mina, så bör jag försöka att producera en så neutral helhet utav dessa som möjligt som både belyser positiva och negativa aspekter av de resultat jag har tagit del utav. Att välja att bara belysa positiva aspekter som rimmar in väl med min frågeställning är väldigt likt sensationalism, och jag anser inte att det har någon plats i en vetenskaplig uppsats.