

Retrocyklin – ett nytt antibiotika med verkan mot HIV?

Katja Södergren

Exekutiv sammanfattning av Självständigt arbete i biologi 2012

Inledning

HIV är idag mycket utbredd och finns på så gott som alla bebodda kontinenter. Det kostar varje år många människors liv och är en förödande diagnos att få. Än så länge finns inget botemedel mot HIV eller AIDS. Jag anser att en fördjupning bör ske inom forskning kring förebyggande och behandlande medicin för HIV/AIDS och då också åt en riktning gällande en grupp antimikrobiella peptider vid namn defensiner. Kanske närmare bestämt gruppen av cirkulära defensiner som kallas θ -defensiner. Dessa defensiner har hittats i rhesusapan (*Macaca mulatta*) men finns ej i sin fungerade form i människan. θ -defensiner har förmågan att skydda apan från patogener så som gram-negativa och gram-positiva bakterier samt mot svamp. En pseudogen har hittats i människan som kodar för ett mänskligt θ -defensin, men den kodande delen har avbrutits av ett för tidigt stoppkodon så att inga funktionella θ -defensiner kan bildas. Hjälpningsväckande nog har forskare lyckats rekonstruerat detta mänskliga protein som nu kallas retrocyklin. Retrocyklin är det cirkulära defensin som skulle ha varit det mänskliga θ -defensin ifall genen var intakt. Retrocyklin har visats skydda våra egna immunceller mot infektion av HIV typ 1. Det är detta ämne jag ämnar förklara och undersöka vidare med denna rapport!

HIV - humana immunbristviruset

HIV är förkortningen för human immunodeficiency virus och är ett retrovirus som tillhör gruppen lentivirus. Viruset infekterar framförallt en viss typ av immunceller vid namn T-hjälparceller. Dessa celler har en receptor kallad CD4 som är avgörande för infektionen och används som huvudreceptor av viruset för antring. Andra celler som också har CD4-receptorn är till exempel makrofager, som också kan infekteras av viruset. CD4+ T-hjälparceller har en avgörande roll i immunförsvarets aktivering så fort en patogen kommer in i kroppen.

Så fort viruset har infekterat en cell transkriberas dess RNA och bildar de protein som behövs för att integrera sin arvs massa i cellens eget DNA. Därifrån kan viruset använda sig av värdens eget polymeras för att bygga nya virioner av det integrerade DNA:t, som innehåller alla beståndsdelar till nya viruspartiklar. HIV kodar för ett eget polymeras i sitt RNA och detta polymeras saknar förmågan för proof reading. Det ger en väldigt hög mutationshastighet som bland annat bidrar till att viruset genomgår ett selektionstryck för att undvika kroppen immunförsvaret.

Utvecklingen av HIV

HIV delas i dag in i två huvudgrupper, HIV-1 och HIV-2. HIV-1 är den vanligaste typen och den som är pandemiskt utbredd i världen idag. HIV-2 finns endast hos en minoritet av jordens befolkning. Man har idag kunnat bevisa genom bland annat taxonomiska studier att HIV härstammar ifrån ett immunbristvirus som infekterar apor. Samlingsnamnet för aplika immunbristvirus är SIV, som står för simian immunodeficiency virus. HIV-1 är genetiskt sett mycket lik en typ av SIV som infekterar en viss underart av schimpanser, nämligen Centralschimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*). HIV-2 tycks härstamma från det SIV (SIVmac) som hittats hos fångslade rhesusapor (*Macaca mulatta*).

Symptom

Har man smittats med HIV är det vanligast att man efter ca 14 dagar får influensaliknande symptom så som feber, trötthet, muskelvärk och viktnedgång. Man kallar detta stadium för akut infektion. Vid akut infektion kan man även se en kraftig spridning av virus till blodet, så kallad viremi. Ett annat typiskt men mindre vanligt symptom är utslag på bålen och armar. På grund av att symptomen är så pass diffusa så kan en tidig akut HIV-infektion ofta misstas för andra sjukdomar så som körtelfeber. Dock söker de flesta akut smittade läkarvård för sina symptom då de ändå är så pass påtagliga. För att fastställa en diagnos görs ofta en ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) där man tittar efter antikroppar mot viruset, men detta test är inte tillräckligt då antikroppar först bildas efter veckor till månader från smittotillfället. Därför görs även tester för antigen p24 (ett protein från den så kallade kapsiden, som inhyser virusets RNA) som går att påvisa mycket tidigt vid en infektion. I begynnelsestadiet kan man se en markant minskning av det totala antalet vita blodkroppar och att antalet cytotoxiska CD8+ T-celler ökar medan antalet CD4+ T-hjälparceller minskar, då främst genom cytolys av viruset. Normalt sett finns fler CD4+ T-celler än CD8+ T-celler men hos smittade kan man se det omvända. De cytotoxiska T-cellerna aktiveras och prolifererar till följd av en infektion och den stora ökningen signalerar immunförsvarets försök att kontrollera mikroben.

En stark korrelation mellan höga halter virus-RNA i blodet och ett snabbt sjukdomsförlopp finns. Man kan även titta på halten CD4+ celler för att avgöra sjukdomsförloppet. Höga halter virus-RNA står i förhållande till hastigheten på minskningen av CD4+ T-celler. Man bör alltså titta på både virushalten och CD4+ koncentrationen för att göra en så korrekt bedömning som möjligt.

En hög koncentration av virus-RNA i blodet leder till större risk att utveckla AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). AIDS är samlingsnamnet för de opportunistiska sjukdomar som drabbar en infekterad individ då dennes halt av CD4+ celler är så låg att den inte längre kan skydda sig mot sjukdomar som normalt sett kan tas omhand av kroppens immunförsvär. Det är när koncentrationen CD4+ lymfocyter sjunker under 200/ μ L blod som individen oftast utvecklar AIDS. Man anser att de celler som främst infekteras av HIV sitter i slemhinnan i mag- och tarmkanalen. Dessa infekteras först och i stor mängd, främst för att slemhinnan i magen är mycket stor till ytan och att de minnes-T-celler som är virusets främsta mål är mycket vanliga här. När en infektion sker aktiveras immunförsvaret bland annat genom att förstöra de infekterade cellerna. Viruset kommer även att tas omhand av fagocytiska celler och transporteras till lymfkörtlar. Lymfkörtlarna är en viktig plats där många T-lymfocyter finns. Flera T-celler kommer här att infekteras och sprida sig runt kroppen. Detta tillstånd ger en stadig minskning av kroppen CD4+ T-celler. På grund av att de mukosala minnes-T-cellerna försvinner snabbt mister slemhinnan tillslut sin funktion och immunförsvaret kommer kroniskt att aktiveras. Det som skiljer de naturliga värdarna för SIV som inte utvecklar AIDS från till exempel människan och rhesusapan är att de naturliga värdarna inte tycks få denna kroniska aktivering av immunförsvaret. En naturlig värd för SIV är *Cercocebus atys*. Denna apa har vid infektion en liknande minskning (i slemhinnan) av sina CD4+ T-celler. Skillnaden är att aktiveringen av immunförsvaret är begränsat och lokalt. De har sedan genom sin evolution kunnat leva med låga halter CD4+ minnes-T-celler, som bibehållit sin funktion trots sitt låga antal.

CCR5 och CXCR4 som coreceptorer vid infektion

HIV-1 klassificeras i två stammar, M-tropisk och T-tropisk. Från början utgick denna indelning ifrån vilka celler de olika stammarna infekterade. M-tropiska virus infekterar främst makrofager medan T-tropiska virus infekterar T-celler. På senare tid har man kunnat visa att de M-tropiska stammarna

använder sig, utöver CD4, av coreceptorn CCR5 vid infektion och kallas nu för R5-virus. De T-tropiska stammarna använder sig av coreceptorn CXCR4 vid infektion och kallas X4-virus. Genom att undersöka fenotypen på de celler som infekteras HIV har man kommit fram till att det främst är minnes-T-celler med receptorn CD4 och coreceptorn CCR5 som infekteras. De flesta CD4+ T-celler i slemhinnan har denna fenotyp och det är därför den märkbara minskningen av dessa celler sker just där. Man ser också då varför det främst är en sexuellt överförbar sjukdom och smittar genom slemhinnor.

Vissa individer är naturligt immuna mot HIV och har inte fått infektionen trots risk och upprepade smittotillfällen. Då man undersökt detta närmare har man funnit en defekt gen för coreceptorn CCR5. Detta stödjer påståendet om att just CCR5 är viktig i infektionsögonblicket.

Cirkulära θ -defensiner och Retrocyklin

Defensiner är en typ av peptider som är en del av det medfödda försvaret i vår kropp. De har en antimikrobiell verkan och skyddar kroppen mot många bakterier och svampar. Hos vertebrater har man funnit 3 olika sorters defensiner; α -defensiner, β -defensiner och θ -defensiner. Det var hos rhesusapan man först fann θ -defensinet. Det var det första cirkulära defensin man funnit och man kallade det för RTD-1 (rhesus theta defensin 1). Varje θ -defensin var uppbyggt av två nonapeptider och finns som tre homologer; en heterodimer och två homodimerer. RTD-1 är en heterodimer medan homodimererna kallas RTD-2 och RTD-3. Nonapeptiderna är sammanlänkade med tre cysteinbryggor till en ring och saknar således laddade terminus. Denna egenskap gör de cirkulära defensinerna oberoende av salthalt och bryts inte ner av exopeptidas.

I människan finns en pseudogen för ett mänskligt θ -defensin. Genen innehåller ett för tidigt stoppkodon som gör att det ej bildas något funktionellt protein. Denna mutation kan ha varit tyst, det kanske inte gjorde någon skillnad för människan att ha ett θ -defensin, eller att det helt enkelt kan ha funnits någon fördel att inte ha θ -defensin. Forskare har kunnat återställa detta mänskliga θ -defensin och kallar det för retrocyklin. Retrocyklin är mycket likt det θ -defensin som finns hos rhesusapan och man tror därför att mutationen som ledde till det tidiga stoppkodonet har skett ganska nyligen. Cole et al. lyfte 2001 också frågan ifall det var på grund av att vi förlorade detta defensin som vi blev mottagliga för HIV. Retrocyklin har bevisats vara mycket effektiv i att skydda våra CD4+ T-celler från infektion av både M-tropiska och T-tropiska HIV-stammar och är otroligt nog mer potent till detta än RTD-1, -2, eller -3.

Rekommendationer

Man har lyckats framställa retrocyklin i en ännu potentare form om man modifierar aminosyrorna något. Det antyder att formen på retrocyklin som den ser ut idag kanske inte än är helt optimerad. Forskningen kring detta bör fortsätta då denna antimikobocid uppvisar så stark verkan mot HIV-1 *in vitro*. Då retrocyklin härstammar från vårt eget medfödda försvar har det god förmåga att accepteras i den mänskliga kroppen. Man skulle kunna tänka sig att retrocyklin ändå uppfattas som främmande då det framställs atrificiellt, men pseudogenernas sekvenser utgör så stor del av proteinet att detta är försumbart.

Den vaginala slemhinnan är väldigt utsatt i den primära infektionen men det är även här en mycket stor del av det medfödda försvaret verkar. Här finns celler som producerar olika former av defensiner och har även förmågan att producera cirkulära retrocyklin. Om forskningen fortgår inom detta område kan man kanske till slut kunna framställa endogena mikrobicider eller ämnen som verkar lokalt i slemhinnan och motverkar virusets primära antring av celler.

Även fast ökningen av HIV-infekterade personer håller på att minska så är HIV-pandemin ett stort problem för världshälsan. I vissa delar av Afrika är var fjärde vuxen individ smittad (UNAIDS, 2010). Det är av stor vikt att hitta verksamma ämnen som stoppar infektionen och dessa ämnen bör vara lättanvända. Antimikrobiella peptider kan möjligen användas som lokala mikrobicider i den vaginala slemhinnan. Då det senaste antibiotikat upptäcktes i början på 1960-talet (Emmerson, Jones 2003), och då många mikrober uppvisar resistens mot konventionell antibiotika är det välkommet med en ny sorts antibiotika, som dessa antimikrobiella peptider kan komma att utgöra.

Referenser

- Emmerson AM, Jones AM. 2003. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 13-20.
- Södergren K. 2012. Den mystiska smittan från Afrikas djungel. HIV – biologin bakom ett komplext immunbristvirus. Självständigt arbete i biologi. Institutionen för biologisk grundutbildning. Uppsala universitet.
- UNAIDS. 2010. UNAIDS report on the global AIDS epidemic. WWW-dokument 2010-11-23: http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_Chap2_em.pdf. Hämtad 2012-05-04.