

Latence HIV a perspektivy vyléčení

Velmi rafinovaná strategie HIV vzdoruje jednoduchým léčebným zásahům. Zásadní překážkou vyléčení je zabudování genetické informace HIV do genomu hostitelské buňky, v níž se tento provirus může kdykoli probudit.

text **KATEŘINA TREJBALOVÁ, IVAN HIRSCH**

RETROVIRUS HIV je původcem infekce, která před zavedením léčby téměř bez výjimky vedla k onemocnění zvanému AIDS (syndrom získané imunitní nedostatečnosti). Současná antiretroviróvá terapie (ART) umožňuje nakaženým pacientům, aby dlouhodobě vedli kvalitní život. ART radikálně snižuje množství viru v organismu, nedokáže ale infekci odstranit a pacienta viru zbavit. Přerušení i velmi účinné léčby vede k rychlé obnově množení viru, a terapii proto nelze nikdy trvale vysadit. Dříve fatální onemocnění se v posledních dvou desetiletích stalo chronickým.

HIV infikuje T-lymfocyty a některé další buňky nesoucí na povrchu molekulu CD4. Tyto buňky jsou zásadní pro komunikaci mezi jednotlivými hráči imunitního systému. V T-lymfocytech CD4⁺ se virus HIV intenzivně množí a přitom tyto buňky zabíjí. Jejich počet tak během měsíců a let klesá, a tím klesá i schopnost imunitního systému vypořádat se s jakoukoliv infekcí. Zatímco zdravý člověk má v krvi 0,5 až 1,6 milionu T-lymfocytů CD4⁺ na mililitr krve, člověk se syndromem AIDS jich má 2krát až 10krát méně. Výsledkem je výrazně poškozená imunita a mizivá schopnost bránit se nejrůznějším infekčním nebo i nádorovým onemocněním.

Brzy po identifikaci HIV jakožto původce pandemie AIDS se výzkum soustředil na vývoj terapie. Jakým mechanismem tedy ART účinkuje? Od počátku bylo zřejmé, že terapie musí působit pouze na virus a nesmí ovlivňovat zásadní funkce lidských buněk. Vývoj se proto zaměřil na virové proteiny účastníce se množení HIV, které jsou naštěstí výrazně odlišné od proteinů lidských. Účinnou antiretroviróvou terapii tvoří kombinace alespoň tří léčiv, která blokují různé virové proteiny a různé fáze virového replikačního

cyklu (viz **obr. 2** na s. 396). Kombinace léčiv brání vzniku virových populací rezistentních na terapii. Obrovský přínos dnešní antiretroviróvé terapie spočívá v tom, že brání infekci nových buněk a dokáže dlouhodobě potlačovat virovou replikaci a její nežádoucí dopady na organismus; brání tedy i úbytku T-buněk CD4⁺ (viz též příspěvek na s. 400).

Důvod, proč antiretroviróvá terapie nedokáže odstranit virus z organismu, spočívá z velké části v zásadním a z hlediska množení viru nutném kroku, při kterém je kompletní genetická informace HIV vložena (integrována) do genomu hostitelské buňky (**obr. 2** na s. 396). Genom HIV, který se takto stává trvale součástí genomu infikované T-buňky CD4⁺, se označuje jako provirus. Teprve po integraci se na základě genetické informace proviru HIV vytváří virová RNA a virové proteiny a mohou vznikat tisíce nových virionů HIV, které zase mohou infikovat další T-lymfocyty CD4⁺. Teorii „proviru“, který dokáže okamžitě nebo i po dlouhé době vést k tvorbě viru, razil spolu s ostatními velikány retrovirologie v šedesátých letech minulého století Jan Svoboda – a další vývoj mu dal plně za pravdu.

I u úspěšně léčených pacientů, u kterých nebyly dlouhodobě detekovány virové partikule v krvi, se tvorba viru po zastavení terapie rychle obnovila. Pacienti tedy byli úspěšně léčeni, ale nebyli vyléčení. To vedlo k definici rezervoáru HIV jako populace T-buněk CD4⁺, jež ve svém genomu obsahují integrovaný provirus HIV. Rezervoár HIV infekce tak slouží jako zásobárna genetické informace pro tvorbu nových HIV virionů, které infikují další buňky.

Velká část rezervoáru HIV je tvořena populací klidových paměťových T-lymfocytů CD4⁺, které přežily infekci virem a mají HIV integrovaný ve svém genomu. Tyto

buňky mají dlouhý poločas života, protože musejí zajistit dlouhodobou, často celoživotní imunitu vůči různým onemocněním, jež jsme prodělali nebo proti kterým jsme byli očkováni v dětství. Tím je ale nechtěně zajištěna dlouhodobá perzistence HIV rezervoáru. V klidových paměťových T-lymfocytech CD4⁺ je v klidovém (latentním) stavu i provirus; znamená to, že se nepěpisuje, nevytváří virové bílkoviny ani infekční částice. A právě fenomén latence je zásadní překážkou ve vyléčení infekce HIV. Antiretroviróvá terapie nemá v případě latentního proviru proti čemu účinkovat a ani imunitní systém nedokáže nijak rozpoznat, že daná buňka je infikovaná. Populace T-lymfocytů CD4⁺, které obsahují latentní HIV, se označuje jako latentní rezervoár HIV. Pozoruhodné je, že frekvence latentně infikovaných T-lymfocytů CD4⁺ je velmi nízká. Odhaduje se, že v celém organismu obsahujícím asi 200 miliard T-lymfocytů CD4⁺ je pouze přibližně 200 tisíc latentně infikovaných buněk, z nich přibližně 4000 cirkulují v krvi.

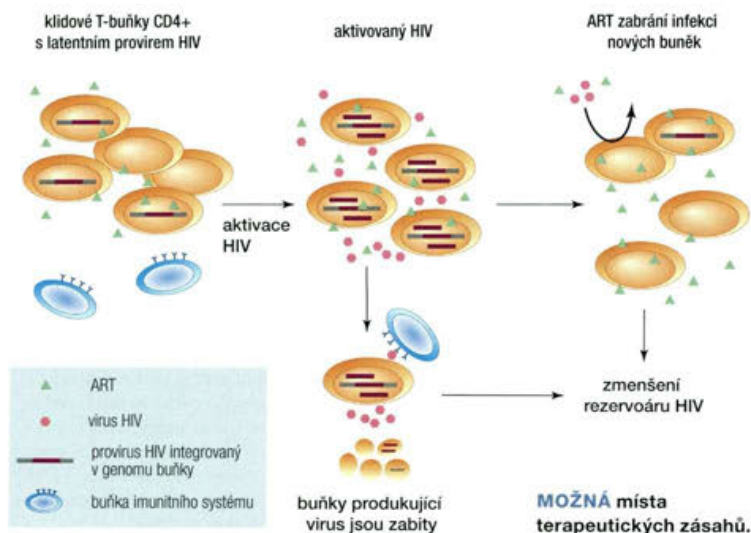
Latentní proviry HIV jsou sice umlčené, neznamená to ale, že nejsou funkční. Stačí, když se paměťové buňky stimulují vnějšími podněty, např. infekcí pacienta jinými mikroorganismy, a spolu s nimi se aktivuje i provirus HIV, který začne vytvářet virovou RNA, virové proteiny a nové infekční viriony. Pokud pacient v tomto okamžiku není léčen, dochází k infekci dalších T-buněk CD4⁺ a k zvětšování rezervoáru. Nemožnost vyléčit infekci HIV pomocí antiretroviróvé terapie je tedy dána existencí proviru, který je navíc latentní a aktivovatelný. Aby pacienti předešli

IVAN HIRSCH, Ph.D., vystudoval PFF UK. Na fakultu se vrátil po pětadvacetileté kariéře výzkumného ředitele v Insermu ve Francii. Na PFF UK, v Biocevu, v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. a v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. studuje mechanismy chronické a latentní infekce viry HIV a hepatitidy B a C.



KATEŘINA TREJBALOVÁ, Ph.D., vystudovala PFF UK. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., studuje epigenetiku a transkripční regulaci retrovirů. Zaměřuje se na virus HIV a na lidské endogenní retroviry. Na Přírodovědecké fakultě UK přednáší spolu s Ivanem Hirschem lékařskou virologii a virovou patogenezi.





opakováním cyklům masivního virového množení a rychlému úbytku T-lymfocytů CD4⁺, musí užívat antiretrovirovou terapii neustále.

Příčiny toho, že provirus HIV přestane vytvářet virové proteiny, je umlčen a latentní, jsou intenzivně studovány již dlouho. Zásluhou toho se postupně objevují další a další faktory přispívající k latenci HIV. Jde např. o nepřítomnost transkripčních faktorů, jejich inaktivní stav a také o epigenetický stav proviru a strukturu lidského genomu v místě, do kterého se provirus HIV vložil. Pokud je provirus vložen v oblasti DNA se složitou, „zapletenou“ strukturou, která je kompaktně zabalená, pak tyto špatně přístupné oblasti nemohou dobře posloužit pro složité a objemné „továrny“ na výrobu virových produktů (viz též úvodní článek na s. 394).

Přístup, který by měl za cíl zcela odstranit infekci z organismu, by musel rozpoznat a odstranit latentní rezervoár. Jelikož ten je ale již ze své podstaty neviditelný, je to těžký oříšek. Nejslibnější je přístup nazývaný „vzbudit a zabít“ („kick and kill“ nebo „shock and kill“). Ten má za cíl aktivovat HIV, tedy zviditelnit, latentní proviry, a následně využít toho, že intenzivní virová replikace spolu s imunitním systémem zabijí infikované T-buňky CD4⁺, zatímco přetrvávající antiretrovirová terapie zabrání infekcím nových buněk (obr. nahoře). Při tomto přístupu je nejtěžší „vzbudit“ latentní provirus natolik, aby se dostatečně aktivoval ve všech nakažených buňkách. Současně nesmí dojít k masivní polyklonální aktivaci imunitních buněk, která by byla životu nebezpečná.

V současnosti jsou testována léčiva, zejména inhibitory histonových deacetyláz a DNA metyltransferáz, která pomáhají rozvolnit strukturu latentní provirové DNA a umožnit „probuzení“ proviru a tvorbu virových proteinů. Výsledky testů však ukazují, že „probuzení“ stále není dostačující

a dochází k aktivaci jen přibližně 10 % latentních provirů. Počet buněk infikovaných HIV se daří tímto způsobem deseti- až stonásobně snížit, ale ne vymýtit.

Problematika rezervoáru infekce HIV je nadále komplikována tím, že HIV infikuje vedle T-lymfocytů CD4⁺ v krvi též makrofágy CD4⁺ a dendritické buňky ve střevě a v plicích a gliové buňky v mozku. Rezervoárůk tak vzniká několik: v dlouhodobě přežívajících klidových T-buňkách CD4⁺ v krvi, ve kterých ART množení HIV účinně inhibuje, a v krátkodoběji přežívajících makrofázích a dendritických buňkách v tkáních, do kterých ART proniká méně účinně a HIV se v nich sice pomalu, ale jistě množí. Konečným cílem je vymýcení všech typů rezervoárů.

Kromě přístupu „vzbudit a zabít“, do kterého řada vědců vkládá velké naděje, lze zmínit ještě úvahy o zcela opačné strategii „utišit a uspat“, která se snaží naopak prohloubit latenci provirů natolik, aby již nemohly být reaktivovány. Epigenetické stavy jsou ale vždy do jisté míry reverzibilní a lidskému naturelu je bližší „konečné řešení“ v podobě eliminační léčby, proto je tento přístup zastoupen při klinickém testování mnohem méně. Z hlediska odstranění HIV z organismu by bylo velmi lákavé využít buněčných systémů, které umějí cíleně rozpoznat určitou sekvenci DNA a tu „vystříhnout“. Cílem výzkumu je dosáhnout vysoké účinnosti a co nejnižší chybovosti těchto CRISPR/Cas systémů při vystříhávání sekvencí HIV.

Navzdory veškerému pokroku v poznání latentního rezervoáru i klinickým zkouškám máme na kontě jediného úspěšně vyléčeného pacienta, který kromě infekce HIV trpěl také leukémií. Lékaři mu během léčby leukémie v berlínské nemocnici Charité odstranili kombinaci chemoterapie a ozařování jeho imunitní a krvetvorné buňky v kostní dřeni včetně T-lymfocytů CD4⁺ nakažených HIV

a poté mu kostní dřeň nahradili transplantací. Transplantované buňky pocházely od dárce přirozeně rezistentního k HIV díky vzácné mutaci. Po transplantaci v letech 2007-2008 pak lékaři antiretrovirovou terapii vysadili. U tohoto pacienta se virus HIV v krvi zatím znovu neobjevil. U několika dalších pacientů však tento přístup úspěšný nebyl. Naposledy se na veřejnost dostaly optimistické zprávy z Bostonu (Brigham and Women's Hospital), kde dva pacienti po transplantaci kostní dřeni, jejíž buňky však neobsahovaly mutaci rezistentní k infekci HIV, žili řadu měsíců bez ART a bez zjištěného viru v periferní krvi. Nakonec se však virus znovu objevil a rychle se dostal na úroveň typickou pro neléčené pacienty. Zřejmým zdrojem viru jsou buňky, které před transplantací nebyly zničeny. Poznamenejme, že alotransplantace kostní dřeni je zatím stále nebezpečným zákrokem, který lékaři ve všech případech použili primárně pro léčbu zhoubné leukémie nebo lymfomu. Bez ohledu na konečný výsledek přinesly transplantace a jejich účinek na infekci HIV mimořádné znalosti o rezervoáru infekce HIV.

Latentní rezervoár se ustavuje velmi brzy po infekci a začátku množení viru v krvi. Proto má cenu zahájit terapii co nejdříve po záchytu infekce, aby byl rezervoár co možná nejmenší. Na to poukazuje případ „dítěte z Mississippi“, léčeného v Univerzitní nemocnici v Jacksonu, a dalšího dětského pacienta z francouzské studie nazvané Visconti. V obou případech se děti nakazily od svých HIV pozitivních matek při porodu. U dítěte z Mississippi byla antiretrovirová terapie zahájena okamžitě, po nějaké době však matka přestala s dítětem docházet na pravidelné testování a na půl roku vysadila léky. K překvapení lékařů po této době nedošlo k rychlému znovuobjevení viru a dítě zůstalo bez terapie negativní po další téměř dva roky. Detekce viru po této době byla pro odbornou komunitu velkým zklamáním. V druhém, optimističtějších případě byla léčba dítěte přerušena ve třech letech a dítě zůstává zdravé bez antiretrovirové terapie již jedenáct let.

Je evidentní, že latence HIV je klíčovým problémem při léčbě infekce HIV. Zdá se, že dosáhnout vyléčení infekce HIV způsobem, který by spočíval v odstranění všech virem HIV infikovaných buněk latentního rezervoáru a který dosud nebyl bohužel nalezen, bude možné jen kombinací antiretrovirové terapie, aktivací buněk latentního rezervoáru a imunologických přístupů. Řada mechanismů latence dodnes není objasněna. Odhalování záhad tohoto procesu je úkolem základního výzkumu. Teprve soubor poznatků, které vyplynou ze základního výzkumu, bude moci aplikovanému a farmaceutickému výzkumu ukázat správnou cestu při hledání způsobu účinného odstranění infekce HIV z organismu. ●