

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Návrh a produkce tagovaných rekombinantních  
proteinů pro orientovanou vazbu na  
proteanoliposomy**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Tereza Filipi</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.</b>
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Tímto bych chtěla velmi poděkovat prof. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, Ph.D. za veškerou pomoc a cenné rady, které byly velkým přínosem. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům Ústavu Imunologie LF UPOL za vstřícný přístup, neuvěřitelnou trpělivost a ochotu při řešení problémů, po celou dobu vzniku této práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Filipi
Název práce	Návrh a produkce tagovaných rekombinantních proteinů pro orientovanou vazbu na proteonanoliposomy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie
Vedoucí práce	prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
Rok obhajoby	2018

### Abstrakt

HIV neboli virus lidské imunodeficiency je retrovirus, který u nakažených způsobuje terminální syndrom získané imunodeficiency – AIDS. Toto onemocnění a jiné problémy spojené s nákazou virem HIV stojí každoročně životy mnoho pacientů. Předložená práce se soustředí v teoretické části na shrnutí dosavadních poznatků v oblasti vývoje vakcíny proti HIV, představení rekombinantních proteinů jako klíčové komponenty vakcín a přibližuje jejich přípravu, včetně metod purifikace. Dále je zde popsána gp140 SOSIP varianta rekombinantního glykoproteinu Env identifikovaného u pacienta WEAU v chronické fázi HIV-1 infekce (označeného P4W) a liposomální nanočástice, použitelné jako nosič pro přípravu proteinových vakcín.

V experimentální části byl připraven plasmid kódující glykoprotein gp140 SOSIP P4W s připojenou peptidovou coiled-coil kotvou a peptidovými značkami potřebnými pro purifikaci a identifikaci rekombinantního proteinu. Aby mohly být tyto značky později odstraněny, byla mezi gp140 SOSIP + coiled coil sekvenci a pomocné značky přidána aminokyselinová sekvence rozpoznávaná endoproteasou – enterokinasou (EC 3.4.21.9). Fúzní protein byl exprimován v HEK 293F linii savčích buněk, a následně purifikován pomocí afinitní chromatografie. Po zakoncentrování byl protein štěpen enterokinasou za optimalizovaných podmínek. Výsledný glykoprotein gp140 SOSIP P4W s coiled coil kotvou byl charakterizován základními fyzikálně chemickými postupy.

Klíčová slova	Rekombinantní protein, HIV, liposomy, Env, gp140 P4W SOSIP, coiled-coil, enterokinasa
Počet stran	71
Počet příloh	1
Jazyk	Čeština

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Tereza Filipi
Title	Design and production of tagged recombinant proteins for oriented binding onto proteonanoliposomes
Type of thesis	Master
Department	Department of immunology
Supervisor	prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
The year of presentation	2018

### Abstract

HIV, a human immunodeficiency virus, is a retrovirus that causes development of acquired immunodeficiency syndrome – AIDS. This disease and other HIV-related complications cost many people's lives each year. The Master thesis summarizes the development of HIV-1-preventing vaccine, followed by brief overview about recombinant proteins design, production, and purification. Next part describes the properties of HIV-1 envelope protein gp140 in soluble and structurally stabilized variant „SOSIP“ from a patient „WEAU“ in chronic stage of HIV-1 infection (designed as P4W). Last part of the introduction summarizes preparation and properties of liposome particles, which could be used as a carrier nanoparticles for recombinant proteins vaccines formulation.

The experimental part describes the design of a plasmid coding for gp140 SOSIP P4W glycoprotein fused with a sequence for coiled-coil anchor and tags needed for purification and identification separated by sequence recognized by endoprotease – enterokinase (EC 3.4.21.9). Next part describes expression of the recombinant protein in a mammalian cells line HEK 293F followed by purification using affinity chromatography. The purified protein was enzymatically cleaved under optimized conditions. The resulting gp 140 SOSIP P4W glycoprotein with coiled-coil motif was then characterized using physical-chemical methods.

Keywords	Recombinant protein, HIV, liposomes, Env, gp140 P4W SOSIP, coiled-coil, enterokinase
Number of pages	71
Number of appendices	1
Language	Czech

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Současný stav řešené problematiky .....	12
2.1	Rekombinantní proteiny .....	12
2.1.1	Využití rekombinantních proteinů .....	12
2.1.2	Výhody rekombinantních proteinů .....	13
2.1.3	Produkce rekombinantních proteinů .....	13
2.1.4	Expresní systémy .....	14
2.2	Purifikace rekombinantních proteinů .....	16
2.2.1	Inkluzní tělíska .....	16
2.2.2	Afinitní chromatografie.....	16
2.2.3	Gelová filtrace .....	18
2.2.4	Dialýza .....	19
2.2.5	Ultrafiltrace .....	19
2.3	Vakcína proti HIV .....	20
2.3.1	Virus HIV .....	20
2.3.2	Vývoj vakcíny .....	23
2.3.3	Obtíže při vývoji vakcíny .....	26
2.4	Glykoprotein gp140 SOSIP .....	27
2.4.1	Coiled-coil motiv .....	28
2.5	Liposomy .....	28
2.5.1	Klasifikace liposomů.....	28
2.5.2	Příprava liposomů .....	30
2.5.3	Liposomální nosiče .....	32
3	Experimentální část.....	33
3.1	Materiál .....	33
3.1.1	Biologický materiál.....	33
3.1.2	Chemikálie .....	33
3.1.3	Roztoky .....	35
3.1.4	Komerční soupravy .....	36
3.2	Přístrojové vybavení.....	36
3.2.1	Softwarové vybavení.....	37
3.3	Metody.....	38



3.3.1	Příprava insertu .....	38
3.3.2	Restrikční štěpení v plazmidu .....	38
3.3.3	Klonování plazmidu .....	39
3.3.4	Transformace plazmidové DNA, nízkoobjemová produkce.....	41
3.3.5	Restrikční analýza, sekvenování DNA .....	42
3.3.6	Transformace plazmidové DNA, velkoobjemová produkce.....	42
3.3.7	Transfekce buněk .....	43
3.3.8	Purifikace proteinu .....	44
3.3.9	Štěpení enterokinasou .....	45
3.3.10	SDS-PAGE.....	45
3.3.11	Western-blot.....	46
4	Výsledky .....	48
4.1	Návrh plasmidu .....	48
4.2	Restrikční štěpení vektoru .....	48
4.3	Klonování a amplifikace plasmidu.....	49
4.4	Biosyntéza proteinu a purifikace .....	51
4.5	Kvantifikace proteinu .....	53
4.6	Štěpení enterokinasou – optimalizace podmínek .....	54
5	Diskuze.....	60
6	Závěr .....	62
7	Literatura .....	63
8	Seznam použitých symbolů a zkratk .....	68
9	Přílohy.....	69

## CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části předložené diplomové práce je shrnout poznatky v oblastech úzce souvisejících s tématem této práce, tedy Návrh a příprava rekombinantních proteinů pro orientovanou vazbu na proteanoliposomy. V rešerši jsou shrnuty znalosti v odvětví rekombinantních proteinů, jejich výhody a využití zejména v oblasti rekombinantních vakcín, kterým se diplomová práce hlouběji věnuje. Jsou zmíněny i metody purifikace rekombinantních proteinů. Krátce jsou shrnuty poznatky o viru HIV a problémy, kterým věda při vývoji vakcíny čelí. Poslední část teoretického úvodu je věnována tematice liposomů, zejména jejich úloze coby nosičů. Pro komplexitu je však zmíněna i jejich klasifikace a metody přípravy.

Cílem experimentální části diplomové práce bylo navrhnout a připravit rekombinantní solubilní a trimerizující protein HIV-1 gp140 odvozený od Env se stabilizačními mutacemi – SOSIP odpovídající chronické fázi HIV-1 infekce P4W varianta. K gp140 SOSIP P4W byla připojena coiled-coil kotva. K návrhu rekombinantního proteinu byly použity nástroje bioinformatiky a k tvorbě kódujícího plasmidu byla využita metoda molekulárního klonování. Při návrhu proteinu byla zvažena i metoda purifikace a analýzy připraveného proteinu, a proto byl protein navržen ve fúzi s pomocnými značkami umožňujícími afinitní purifikaci proteinu a jeho identifikaci monoklonální protilátkou. Sekvence byla optimalizována pro expresi v savčí buněčné línii HEK 293F. Produkovaný rekombinantní protein byl následně afinitně purifikován a pomocné značky byly odštěpeny enterokinasou. Protein byl připraven v čistotě a dávkou potřebné pro pokročilé fyzikálně chemické strukturní analýzy, které budou provedeny v rámci společných projektů s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně.

# 1 ÚVOD

Očkování, vakcinace, imunizace. Synonyma a v současnosti mnohými velmi diskutované téma. Mezi jednu z moderních cest vakcinace patří využití rekombinantních proteinů produkovaných podle templátu rekombinantní plasmidové DNA připravené metodami molekulárního klonování. Rekombinantní proteiny mohou poskytnout bezpečnější a výhodnější variantu k běžnému očkování. Rekombinantní proteiny jsou již dnes součástí např. vakcíny proti hepatitidě B (HBV) nebo vakcíny proti infekci lidským papilomavirem.

V současné době existuje očkování proti velké řadě onemocnění, resp. původcům těchto onemocnění. Jedním z původců, na který se dosud nedaří připravit spolehlivě účinná vakcína je i virus lidské imunodeficiency neboli HIV. Ten v terminálním stádiu infekce u nakaženého způsobuje rozvoj syndromu získané imunodeficiency, známý pod zkratkou AIDS. V roce 2016 (dle WHO) zemřelo přes milion lidí na následky HIV infekce. Ke konci roku 2016 žilo přes 36,5 milionu lidí infikovaných virem HIV. Ačkoliv v současnosti existuje možnost antiretrovirální terapie, ne všem je přístupná, a ne vždy je účinná.

Jako u spousty jiných infekcí, i u HIV započala snaha o vývoj ochranné vakcíny brzy po objevení HIV viru. Pokusy o vývoj úspěšné vakcíny však narážely a naráží na neuvěřitelnou genetickou variabilitu viru, která mu umožňuje měnit sekvence povrchových antigenů. Tato vlastnost je pro virus klíčovou výhodou a pro vědu zatím velký oříšek, protože zejména kvůli této variabilitě zatím nebyla připravena vakcína schopná navodit protektivní protilátky chránící před spektrem HIV-1 variant, které bylo u nakažených identifikováno.

Nadějí jsou tzv. široce neutralizující protilátky (*broadly neutralizing antibodies*, bnAbs) resp. protilátky neutralizující široké spektrum variant HIV. Ty jsou popisovány u pacientů, kteří dokáží z části kontrolovat šíření viru HIV ve svém organismu a oddalovat tak konečné stádium AIDS i bez antiretrovirální terapie. Snaha navodit tvorbu podobných protilátek se tak stala jedním z cílů při vývoji vakcíny. Jako vhodný antigen se využívá Env obalový protein HIV-1 viru, který umožňuje vstup do hostitelské buňky. Zde je však problém navrhnout modifikace antigenu tak, aby jako rekombinantní protein použitý pro

imunizace dostatečně věrohodně mimikoval konformaci obalového proteinu přirozeně se vyskytujícího na povrchu virionu.

Glykoprotein gp140 ve verzi SOSIP se zdá být velmi podobný konformaci nativního obalového glykoproteinu. Ve verzi SOSIP je protein stabilizován pomocí disulfidických můstků a záměny aminokyselin. Díky úpravám představuje ve výzkumu pokrok z hlediska napodobení Env oproti gp120. I přesto však nebyla učiněna konečná volba antigenu, který by tvorbu bnAbs navodil a učinil tak významný krok vpřed v moderní imunologii.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Rekombinantní proteiny**

Rekombinantní protein se obecně definuje jako protein kódovaný rekombinantní DNA nebo tvořen na základě rekombinantního genu. Tyto proteiny jsou produkovány proteosyntetickým aparátem vybraného hostitelského organismu, který slouží jako expresní systém. Expresními systémy mohou být buňky bakteriální, savčí nebo třeba kvasinkové. Izolování takto produkováných proteinů může být, na rozdíl od izolace proteinů z přírodních zdrojů snazší, a to kvůli cíleně vneseným peptidovým úsekům (značkám, tagům), které mohou být použity pro afinitní chromatografické purifikační postupy. Díky snazší izolaci a rovněž eliminaci infekčních rizik, která mohou vyvstat v souvislosti s izolací proteinů např. z lidských zdrojů, nacházejí rekombinantní proteiny široké využití.

#### **2.1.1 Využití rekombinantních proteinů**

Proteiny vytvořené pomocí rekombinantní technologie lze využít v základním výzkumu, v průmyslu, diagnostice, terapii a v neposlední řadě rovněž ve vakcinologii. V základním výzkumu jsou využívány např. k identifikaci, mapování a sekvenování genů. Široké uplatnění nacházejí rekombinantní proteiny rovněž v medicíně. (Andersen and Krummen, 2002; Applications of recombinant proteins, 2017)

Očkování je jedním z nejúspěšnějších způsobů eradikace některých infekčních onemocnění z populace. Materiálem, který je tradičně pro vakcinaci používán jsou atenuované nebo inaktivní patogeny. Tento přístup může být někdy limitován nedostatečnou účinností nebo vedlejšími účinky. Možnou alternativou je vakcinace založená na aplikaci antigenů identifikovaných u daného patogena jako protektivní a produkováných rekombinantní technologií. Nutností je tedy identifikovat proteiny s dostatečnou protektivní kapacitou a produkovat je v dostatečném množství za poměrně nízkou cenu. Mikroorganismy, živočišné buňky stejně jako transgenní rostliny a živočichové mohou být zdrojem rekombinantních antigenů pro vakcinační účely. Každý z expresních systémů má své výhody a limity. Použití rekombinantních proteinů pro účely konstrukce vakcín vyžaduje doplnění vakcinační formulace o vhodné adjuvans, které zajistí dostatečnou imunogenicitu vakcín, a to vzhledem k tomu, že izolované

proteiny mají menší schopnost vyvolat imunitní reakci než celý patogen. (Soler and Houdebine, 2007; Greenwood, 2014)

Vzhledem k současné znalosti genomů patogenů se nabízí více možností, jak identifikovat protein, a dokonce i epitopy, které budou schopny vyvolat ochranou imunitní reakci. Dnes je již možné testovat jednotlivé antigeny patogenu jeden po druhém. Tento postup zahrnuje systematické klonování genů pro předpokládané proteiny vhodné k vakcinaci, přípravu korespondujících proteinů a zhodnocení jejich vakcinační kapacity. (Nascimento and Leite, 2012)

### **2.1.2 Výhody rekombinantních proteinů**

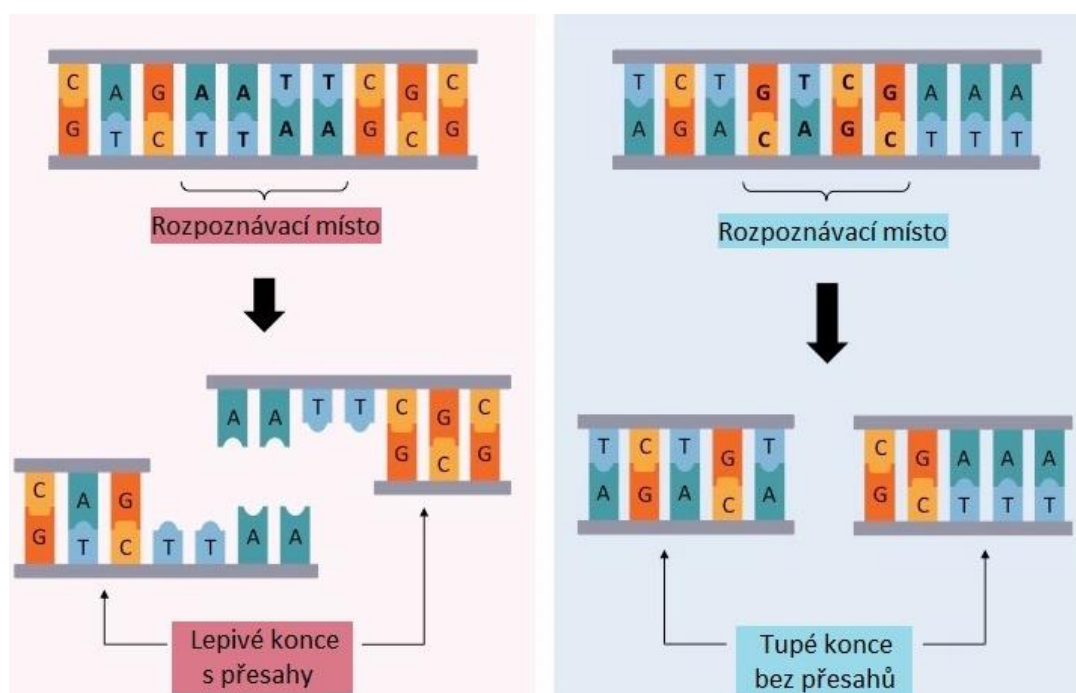
Většina současných vakcín vděčí za svůj úspěch schopnosti zacílit patogeny, které mají nízkou antigenní variabilitu. To je případ např. tetanu, záškrtu, spalniček nebo hepatitidy B. Úspěšnými vakcínami jsou ty, které dokáží vytvořit efektivní neutralizující nebo opsonizující protilátky. Na druhou stranu, buněčně zprostředkovanou imunitu efektivně kontrolující intracelulární patoge, které ve většině případů způsobují chronické infekce, je mnohem obtížnější navodit za použití současných vakcín. Vakcíny s použitím živých, oslabených patogenů, které jsou schopny vyvolat tento typ odpovědi, mohou být zdrojem potenciálního rizika. (Nascimento and Leite, 2012)

Vakcíny s rekombinantními proteiny naopak umožňují vyhnout se potenciálním rizikům spojeným s vpravením patogenů do organismu. Příkladem takovýchto rizik může být např. zvrát toxoidů zpět na jejich toxigenní formu u vakcín proti tetanu nebo záškrtu, nebo všeobecně reverze virulence původně oslabeného patogenu. Bezpečnost rekombinantních proteinů je tedy jednou z hlavních výhod, oproti vakcínám klasickým. V současnosti můžeme pro formulaci vakcíny založené na rekombinantních proteinech použít poměrně velkou škálu dostupných korpuskulárních nosičů, které mohou významně zvýšit imunogenicitu vakcíny. (Nascimento and Leite, 2012)

### **2.1.3 Produkce rekombinantních proteinů**

Produkcí rekombinantních proteinů předchází příprava DNA templátu kódujícího rekombinantní protein a nezbytné přidané peptidy včetně fúzních partnerů. Templáty, které mají nejčastěji podobu plasmidu jsou připravovány pomocí technologie molekulárního klonování

Restrikční enzymy s exo (štěpí na koncích DNA) nebo endonukleázovou (štěpí uvnitř DNA) aktivitou slouží k získání požadovaného DNA fragmentu. Po štěpení mohou vznikat tupé konce (v angl. jazyce blunt ends) nebo konce lepivé, „kohezivní“ kdy vznikají přesahy (viz Obr. 1) Příkladem enzymů, které tvoří přesahy jsou *EcoRI* *XhoI* nebo *NheI*. Mezi enzymy, které tvoří tupé konce patří např. *EcoRV* nebo *SmaI*.



**Obrázek 1** Grafické porovnání konců dvoušroubovice DNA vzniklých po restrikčním štěpení enzymy tvořícími lepivé nebo tupé konce. (Převzato a upraveno dle *Gene Transfer / BioNinja*)

Po získání cílového úseku DNA je nutné tento kus vložit do příslušného vektoru. Tento proces využívá enzymu DNA-ligasa, který má schopnost katalyzovat tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5' fosfátem a 3' hydroxylovou skupinou v DNA nebo RNA řetězci. Vektor, do kterého je daný úsek vkládán musí být v případě lepivých konců ošetřen stejnými endonukleázami, aby byly tyto přesahy vzájemně kompatibilní. Výsledkem je vznik plasmidu nesoucího žádoucí gen, resp. geny. Takto připravený plasmid může být vnesen do expresního systému. V případě této práce bude využita metoda transfekce. (Alberts *et al.*, 2014)

### 2.1.4 Expresní systémy

Jako expresní systém označujeme hostitelské buňky, které využíváme k expresi rekombinantních proteinů. V současnosti existuje poměrně velké množství expresních

systemů a je tedy nutné při výběru zohlednit původ (eukaryotický, prokaryotický) našeho proteinu, finanční možnosti, ale také časovou náročnost.

Co s týče prokaryotních expresních systémů, tak mezi pravděpodobně nejvyužívanější patří bakterie. Nejčastější z nich je *E.coli*, která je dobře geneticky prozkoumaným organismem. Má vysokou výtěžnost a její kultivace není nepřiměřeně finančně náročná. Mezi nevýhody patří omezení v oblasti posttranslačních modifikací a zároveň hromadění lipopolysacharidů, obecně známých jako endotoxiny s pyrogenními účinky v lidských a jiných savčích organismech. Proteiny používané pro terapeutické účinky musí proto být dvoukrokově purifikovány. (Petsch and Anspach, 2000; Terpe, 2003; Mergulhão *et al.*, 2005)

Mezi eukaryotické expresní systémy řadíme mimo jiné kvasinky, hmyzí expresní systémy, transgenní rostliny a živočichy a savčí tkáňové systémy. Kvasinkové systémy vynikají nad bakteriálními, co se schopnosti posttranslačních modifikací týče. Příprava systému je však náročnější a intenzita syntézy není u různých klonů konstantní. Hmyzí systémy částečně kombinují výhody jak prokaryotních, tak eukaryotních systémů. Vnesení DNA do buněk hostitele zde probíhá pomocí bakuloviru, což je velký hmyzí dvouvláknový virus. Nevýhodou je příprava a udržování dostatečného množství virových částic. Naopak výhodou tohoto systému je vysoká výtěžnost, posttranslační modifikace a nepřítomnost endotoxinů. (Verma, Boleti and George, 1998; Yin *et al.*, 2007)

Expresním systémem, který byl použit v této diplomové práci jsou savčí tkáňové linie, a to hlavně z důvod přípravy savčího proteinu. Tyto systémy převažují při produkci rekombinantních proteinů v klinické sféře. Jedním z důvodů, proč tomu tak je, je zajištění posttranslačních modifikací. Nevýhodou těchto systémů je velká finanční náročnost a poměrně nízký výtěžek. (Yin *et al.*, 2007) V této práci byly použity linie lidských embryonálních ledvinných buněk HEK (293F). U tkáňových kultur je kladen velký důraz na aseptičnost. Existuje možnost přidání antibiotika, tento přídatek ovšem může snižovat efektivitu některých kroků, jako je např. transfekce (Raška *et al.*, 2010), a proto byly kultury v této práci pěstovány bez přídavku antibiotik.

Při expresi proteinů je možné pomocí sekrečního signálu umožnit sekreci hotového proteinu do média. Z hlediska metodologického je purifikace takto sekretovaných proteinů snazší. Z média lze izolovat produkt např. pomocí precipitačních nebo chromatografických metod. Pokud není protein sekretován do média, je proces jeho



purifikace složitější. Buňky musí být lyzovány za pomoci metod jako je např. sonikace ultrazvukem, nebo pomocí chemikálií či enzymů. Při lýze dojde k rozpadu buněk a uvolnění jejich obsahu. Současně s proteiny se však z buňky uvolní i proteolytické enzymy, jejichž účinkům lze zabránit přidáním inhibitorů proteáz do lyzačního pufru.

## **2.2 Purifikace rekombinantních proteinů**

Po získání proteinu z expresního systému je nutné ho purifikovat. Stejně jako existuje množství expresních systémů, tak existuje i poměrně mnoho purifikačních technik. Před zvolením vhodné techniky je rovněž nutné objektivně vyhodnotit např. rozpustnost, stabilitu nebo i purifikační výtěžky.

### **2.2.1 Inkluzní tělíska**

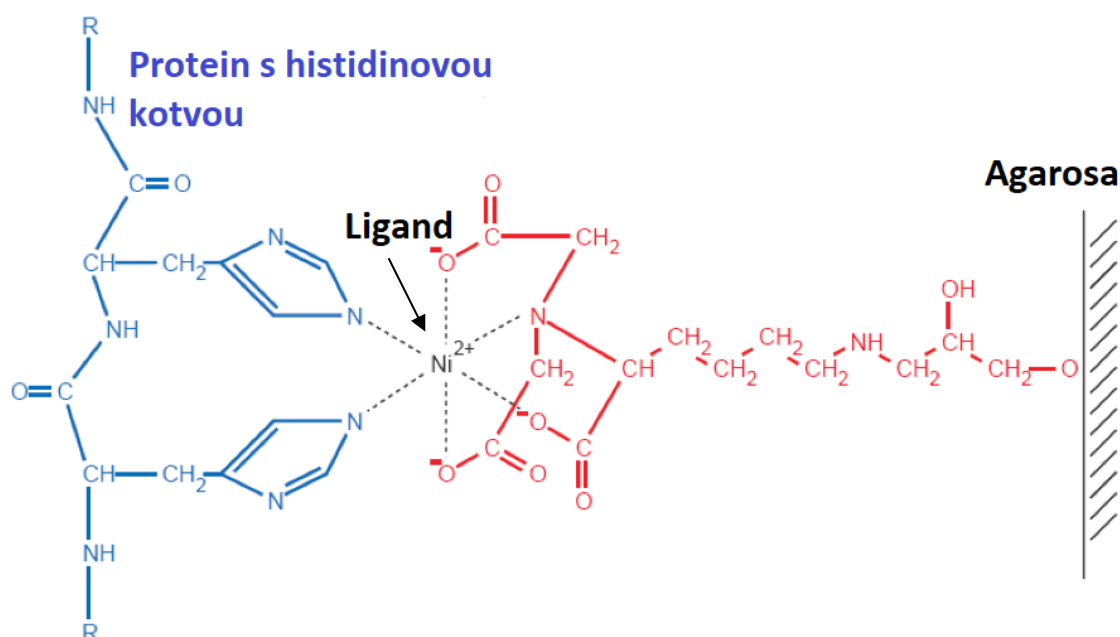
Při použití *E.coli* coby expresního systému může v některých případech dojít k agregaci exprimovaných proteinů do tzv. inkluzních tělísek. Proteiny, které se takto agregují bývají v mnoha případech ve špatné konformaci. Je tedy nutné tyto tělíska rozpustit a proteiny renaturovat, abychom získali jejich funkční formu. Inkluzní tělíska jsou uvolněna lýzí buněk a následně denaturována a rozpuštěna. Denaturované proteiny jsou poté převáděny do nativních podmínek, aby byly tzv. renaturovány. Jednou z metod renaturace je např. dialýza. Ve formě inkluzních tělísek se exprimují hlavně eukaryotické proteiny v systémech *E.coli*. Tomuto jevu lze předcházet buď expresí při nižší teplotě anebo užitím vhodnějších expresních systémů, např. savčích či hmyzích. (Palmer and Wingfield, 2004; Singh *et al.*, 2015)

### **2.2.2 Afinitní chromatografie**

Jedná se o nejefektivnější chromatografickou metodu, která bývá používána i jako samostatný purifikační krok. Funguje na principu biochemické specifity dvojice látek, jako je např. antigen-protilátka, koenzym-enzym, enzym-substrát, nebo protein-specifický ligand. (Zouhar, 1999) Při chromatografii se často užívá specifických značek, tzv. tagů, které slouží k usnadnění purifikace. Příkladem takovéto značky je i oligohistidinová kotva neboli HIS-tag.

Nejčastěji používané uspořádání oligohistidinové kotvy je šestinásobné opakování, tedy šest histidinů za sebou. Toto uskupení poskytuje velmi silnou vazbu na nikl a vzhledem ke své malé velikosti představuje pro buňku při expresi téměř zanedbatelnou

metabolickou zátěž. Výhodou této afinitní značky je to, že může být umístěna jak na C, tak na N konec proteinu, případně i mezi dva funkční bloky, za předpokladu že zůstane na povrchu složeného proteinu. Interakce proteinu a matrice je zprostředkována pomocí d-orbitalů iontů přechodných kovů, které jsou neobsazené a vážou tak volné elektronové páry zejména z atomu dusíků imidazolových skupin histidinů v proteinu. (Arnau *et al.*, 2006; Knecht *et al.*, 2009)



**Obrázek 2** Znázornění vazby oligohistidinové kotvy na matrici. Ligandem je v tomto případě Ni<sup>2+</sup>. (Převzato a upraveno dle manuálu k Ni-NTA Agarose, Quiagen)

Náplň v koloně při separaci nejčastěji bývá agaróza s navázanou polyadenátní skupinou vázající ion těžkého kovu. Jednou z dostupných a často využívaných náplní je ta s kyselinou nitril-trioctovou (Ni-NTA), ale lze užít i kyselinu imindioctovou. (Zouhar, 1999) Samotná jednoduchá afinitní chromatografie většinou neposkytuje tak čistý protein jako při použití jiných značek, což je způsobeno navázáním dalších proteinů v lyzátu na náplň v koloně. K eluci proteinu z kolony můžeme využít např. roztoku imidazolu, který protein vytěsňuje. Dále snížení pH, což způsobí protonizaci histidinu a přerušuje se spojení s kovem, nebo je možné použít chelataci kovu pomocí EDTA. (Bolanos-Garcia and Davies, 2006)

Odstranění afinitní značky, resp. his-tagu, závisí na tom, kde se tato kotva nachází. V případě, že je na C-konci proteinu, lze použít specifických endoproteáz, tedy enzymů, které štěpí určitou sekvenci aminokyselin. Tyto enzymy navíc snižují výskyt

nespecifického štěpení, ke kterému dochází při štěpení proteinů chemickými látkami. Příkladem takovéto specifické endoproteasy je např. enterokinasa, která rozpoznává aminokyselinovou sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓X-, nebo např. trombin identifikující sekvenci Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser. (Arnau *et al.*, 2006)

Výše zmíněná metalochelatační afinitní chromatografie může být použita k purifikaci za tzv. nativních nebo denaturačních podmínek. Při mírných pufovacích podmínkách a imidazolu jako součást eluentu jsou často výsledkem biologicky aktivní purifikační produkty. Proteiny, které zůstávají rozpustné v cytoplazmě nebo jsou sekretovány mohou být obvykle purifikovány za nativních podmínek, avšak v případě, že je protein nerozpustný, agregovaný v inkluzních těliscích (viz 2.2.1) nebo má terciární strukturu ve které je zakryta oligohistidinová kotva, nelze purifikaci při nativních podmínkách užít. (Bornhorst and Falke, 2000; Spriestersbach *et al.*, 2015)

V takovýchto případech je možno využít k purifikaci denaturační podmínky. Ty lze navodit za použití např. 6M guanidinu nebo 8M močoviny, tzv. chaotropních činidel. Interakce matrice s oligohistidinovou značkou (viz Obr. 2) nevyžaduje specifickou konformaci peptidové značky, což umožňuje efektivní purifikaci i za denaturačních podmínek. Denaturační podmínky však mohou snižovat aktivitu fosfatáz a proteolytických enzymů. Použití močoviny coby denaturačního činidla je často výhodnější vzhledem k tomu, že guanidin se přítomností SDS sráží a interferuje tak s následnou SDS-PAGE analýzou. Proteiny purifikované za denaturačních podmínek mohou být následně tzv. refoldingem navraceny do aktivní formy. (Bornhorst and Falke, 2000; Spriestersbach *et al.*, 2015)

### 2.2.3 Gelová filtrace

Při gelové filtraci dochází k separaci látek na základě odlišné molekulové hmotnosti. Tato metoda je založena na principu buď definovaných nebo různě velkých pórů v gelu, kdy malé molekuly vstupují do pórů difuzí a velké naopak pokračují v průchodu kolonou. Vstup proteinů do pórů způsobí zdržení, a proto se pro tuto metodu používá např. označení zadržovací. Používá se zvláště pro oddělení nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek, např. odsolení.

Stacionární fází je kapalina nacházející se v pórech gelu. Nosičem bývá ideálně hydrofilní polymer s nulovým nábojem, který je pevný a inertní. V praxi to jsou zejména

přírodní polymery na základě agarosy. Rozsah velikosti částic, které lze na daném gelu rozdělit je určena velikostí pórů. Mobilní fáze bývá isokratická, jelikož nedochází ke specifickým interakcím a viskozita mobilní fáze nesmí být výrazně vyšší než mobilita vzorku. Této metody se např. využívá i při určení molekulové hmotnosti proteinů v nativním stavu. (Hagel, 2001)

#### **2.2.4 Dialýza**

Při této metodě se pracuje s dialyzačním střívkem, které se naplní dialyzovaným roztokem a následně se vloží do kádinky s dialyzačním roztokem. Díky difuzi následně dochází k přesunutí nízkomolekulárních komponent do tohoto roztoku. Dialyzační střívko je nutné plnit jenom částečně, protože do něj může vstupovat rozpouštědlo a tím zvýšit objem střívka. Dialyzační roztok většinou obsahuje pufr, který slouží ke stabilizaci pH na žádoucí hodnotě. Rychlost difuze můžeme určit Fickovým zákonem, podle kterého záleží na difuzní konstantě, koncentračním gradientu a rovněž na velikosti plochy, skrz kterou difuze probíhá.

Dialýza je poměrně pomalá metoda, trvající až 24 hodin. Lze ji urychlit, pokud vyměníme dialyzační roztok za nový. Ukončení dialýzy pak lze stanovit měřením vodivosti dialyzačního roztoku. Materiálem pro výrobu střívek bývá většinou celulóza a velikost částic, které propustí se pohybuje mezi 1-50 kDa. Dialýzy se dá využít i v případě zakoncentrování makromolekulárního roztoku, a to díky polyethylenglykolu v dialyzačním pufru. Dochází k postupnému nasávání vody a zvětšování jeho objemu. (Raška *et al.*, 2010)

#### **2.2.5 Ultrafiltrace**

Při ultrafiltraci se používá membrán skládajících se ze dvou vrstev. První vrstva je obrácená směrem k ultrafiltrovanému roztoku. Tato vrstva je tenká a pórovitá, přičemž póry mají přesně určenou velikost. Druhá vrstva je silnější, rovněž pórovitá, přičemž póry jsou větší než u vrstvy první a jejich velikost nemusí být přesně definována. Při sestavování ultrafiltračního aparátu je proto důležitá správná orientace. Komerčně dostupné membrány se v současnosti liší jak hodnotou propustnosti (od 0,5 do 1000 kDa) tak rovněž i výrobním materiálem. Tím může být celulóza nebo různé druhy polymerů. (Dhawan, 2015)

Při samotném procesu ultrafiltrace může někdy dojít k ucpání pórů v membráně, a to z toho důvodu, že i molekuly větší než membrána propustí, jsou do těchto pórů vtlačovány. Tomuto jevu lze zabránit použitím elektromagnetického míchadla. Pro urychlení celého děje se využívá tlaku, který tlačí rozpouštědlo přes membránu. Ten se vytvoří např. přetlakem inertního plynu (dusíku) nebo centrifugací.

## 2.3 Vakcína proti HIV

Od objevu AIDS dosáhlo šíření HIV rozměrů pandemie, což představuje ohrožení globálního vývoje i veřejného zdraví. Vývoj bezpečné, dostupné, a hlavně účinné vakcíny představuje největší naději pro budoucí kontrolu. Ačkoliv byl v posledních letech učiněn velký pokrok v oblastech virologie, imunologie i patogeneze HIV/AIDS a vývoji antiretrovirálních léčiv všeobecně, vývoj vakcíny proti HIV stále čelí překážkám a výzvám (šířeji popsáno v kapitole 2.3.3). (Girard *et al*, 2006)

Poprvé byla první fáze klinické studie vedena v USA v roce 1987. Od té doby bylo testováno přes pětatřicet potenciálních vakcín ve více než 65 prvních a druhých fázích klinických studií. Ty zahrnovaly více než 10 000 dobrovolníků ve více než 10 zemích. Celkem třikrát byla dokončena třetí fáze klinické studie. (Cohen, 2003; Shin, 2016) Ke konci roku 2016 byl celkový počet lidí (dospělých i dětí) žijících s HIV odhadnut WHO na 36,7 milionů. Nejvíce zasaženou oblastí je stále subsaharská Afrika. Země východní Evropy pak zažívají zvýšení zejména kvůli uživatelům injekčně podávaných drog. (Girard *et al*, 2006)

### 2.3.1 Virus HIV

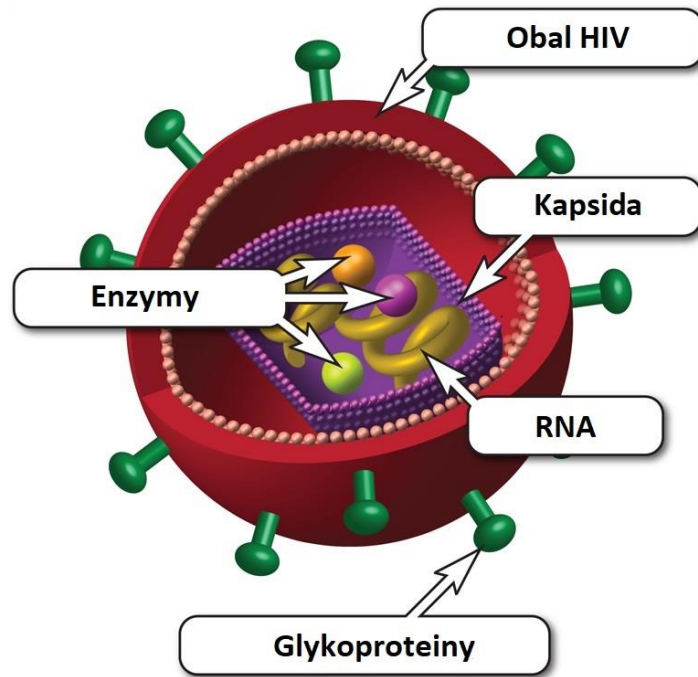
Virus lidské imunodeficience neboli HIV (z anglického *human immunodeficiency virus*) byl objeven v roce 1983 a je původcem syndromu získané imunodeficience AIDS (z anglického *acquired immunodeficiency syndrome*). Jedná se o retrovirus vyznačující se vysokou variabilitou. Ta vzniká v důsledku nepřesnosti reverzní transkriptázy a rovněž k tomu přispívá imunitní systém hostitele, který svým jedinečným chováním podmiňuje vznik nových variant HIV-1. (Michael, 1999)

Jednotlivé viriony HIV můžeme na základě klasifikačního systému rozdělit do typů a subtypů. V základě se HIV dělí na typ jedna (HIV-1), který se šíří v populacích šimpanze učenlivého a gorily obecné a je celosvětově rozšířenou variantou, a typ dvě (HIV-2), který se šíří v populaci mangabeje kouřového a výskyt tohoto typu mimo

západní Afriku je výjimečný (Lemey *et al.*, 2003). V rámci HIV-1 existují čtyři skupiny: M (z anglického *major*) hlavní skupina, O (z anglického *outlier*) vedlejší skupina a skupiny N a P, které jsou vzácné. Ve skupině M následně rozlišujeme ještě subtypy a následně i sub-sub typy. (GAC Blood, 2016)

Zralé infekční HIV-1 je sférická částice, o průměru okolo 120 nm, která se skládá ze dvou částí. Vnější částí je tzv. obal (viz Obr. 3) a uvnitř se nachází jádro charakteristického kónického tvaru. To obaluje virovou RNA, replikační proteiny a ve virionu se jich může nacházet více. Vytvoření takovéto zralé infekční částice je dvoukrokový proces, kdy vypučí nezralá, neinfekční částice, která následně dospívá do infekčního virionu. Tvorba částice vyžaduje transport polyproteinů do plasmatické membrány, kde dochází k asociaci s dalšími virovými a buněčnými komponentami a vzniká pučící struktura. Viriony jsou uvolňovány jako neinfekční, obsahující sférickou vrstvu Gag polyproteinů pod virovou membránou. Následně, činností virové proteázy dochází k dospívání. Proteolytické štěpení na definovaných místech v určitém pořadí vede k vytvoření proteinů matrix (p17), kapsidových (p24), nukleokapsidových proteinů (p7), dvou menších peptidů a spojovacího proteinu p6, který zajišťuje spojení kapsidy a matricového obalu. (Turner and Summers, 1999; Briggs *et al.*, 2003)

Z hlediska problematiky řešené v této diplomové práci, jsou důležité tzv. obalové proteiny, jejichž struktura je kódována v genomu viru. Virion získává obal po odtrhnutí z hostitelské buňky a část hostitelské buněčné membrány na sebe váže. Proto se na povrchu kromě vlastních obalových proteinů vyskytují také proteiny hostitele, např. ubikvitin nebo aktin (Arthur *et al.*, 1992). Samotný obalový protein Env se skládá ze šesti podjednotek, resp. tří dvoupodjednotkových komponent gp120 a gp41. Gp41 je transmembránová část, ke které je gp120 nekovalentně připojena. Env je kódován jako jeden dlouhý protein gp160 a v tomto stavu je transportován na povrch infikované buňky. Následně je gp160 štěpen pomocí furinu a dalších proteas. Env je vysoce glykosylovaný, obsahuje okolo jedenaosmdesáti glykosylačních míst na každém trimery. Obalový glykoprotein je klíčový pro vazbu a vstup virionu do buňky hostitele, kdy gp120 je zodpovědná za vazbu na receptor (s přihlédnutím ke konformaci) a gp41 se podílí na fúzi. (Merk and Subramaniam, 2013)



**Obrázek 3** Grafické zobrazení struktury virové částice (Převzato z (U.S. Department of Health and Human Services))

Dalším typem proteinů, které virus imunodeficiency tvoří jsou tzv. proteiny pomocné:

- *Nef* – negativní faktor, N-terminální membránový fosfoprotein, pravděpodobně hraje roli při buněčné apoptóze a zvyšuje infekčnost viru
- *Vif* – vysoce konzervovaný fosfoprotein, umožňuje proteasomem zprostředkovanou destrukci lidského antivirálního proteinu (Stanley *et al.*, 2008)
- *Vpr* – pravděpodobně hraje velkou roli při replikaci viru a zdá se, že umožňuje integraci virální DNA pozastavením G2 fáze
- *Rev* – váže se k virovému genomu, je důležitý pro syntézu hlavních virových proteinů a nezbytný pro virovou replikaci
- *Tat* – má důležitou roli při regulaci reverzní transkripce, zejména při účinné syntéze virové mRNA a rovněž reguluje uvolnění virionu z infikované buňky
- *Vpu* – je zapojen do CD4 degradace, zahrnující ubikvitinační cestu a rovněž se podílí na uvolnění virionu z infikované buňky

Shrnutí dle: (Nath, 2002; GAC, 2016)

Uvnitř kapsidy se nachází tři virové enzymy, katalyzující jednotlivé procesy probíhající v průběhu replikačního cyklu viru. Reverzní transkriptáza (p66/p51, RT) je enzym umožňující reverzní transkripci virové RNA do provirové DNA. Dalším enzymem je integráza (p38, IN), která zajišťuje správnou integraci provirové DNA do hostitelského genomu. Poslední je již výše zmíněná proteáza (p9, PR), která posttranslačně štěpí nově syntetizované řetězce za vzniku funkčních virových proteinů.

Kromě enzymů se v jádře nachází rovněž virová RNA, respektive dvě totožné jednovláknové molekuly. V buňce hostitelské má genom formu dvouvláknové DNA molekuly. HIV má tři základní geny od 5' konce směrem ke 3' konci. Jsou to *gag*, *pol* a *env*, které kódují hlavní strukturální proteiny a rovněž esenciální enzymy. Ty jsou syntetizovány jako polyproteiny, které tvoří proteiny Gag. (Epstein and Greene, 1991)

### 2.3.2 Vývoj vakcíny

Existuje několik přístupů, kterých lze užít při přípravě vakcíny proti HIV. Dle Ahna a Sunga (2009), je možné využít kompletně inaktivovanou, oslabenou aktivní, rekombinantní podjednotkovou, vektorem zprostředkovanou nebo DNA vakcínu. Žádná z nich ovšem v organismu imunizovaného jedince nevedla ke tvorbě bnAbs, které jsou v současnosti považovány za nejlepší strategii při konstrukci vakcíny proti HIV-1. Pokud jde o imunogen, který by měl být použit pro funkční vakcínu, odpověď je nasnadě. Jelikož jsou bnAbs cíleny pouze proti antigenním epitopům na výběžku HIV Env proteinu, který je tvořen glykoproteiny gp120 a gp41, pak funkční rekombinantní vakcína bude muset být založena na glykoproteinové podjednotce.

Za použití stejného paradigmatu, na základě kterého došlo k vývoji úspěšné vakcíny proti hepatitidě B, byly počáteční pokusy při tvorbě podjednotkové vakcíny proti HIV cíleny na vyvolání Env-specifické humorální imunitní odpovědi za použití rekombinantně připravené podjednotky obalového proteinu Env, která vyčnívá z povrchu virionu a označuje se gp120. Bohužel výsledky klinických studií prokázaly, že protilátky vyvolané monomerními gp120 byly málo efektivní při pokusech o neutralizaci primárních izolátů HIV, předcházení virové infekci i oddálení progresu onemocnění (Flynn *et al.*, 2005). V současnosti je proto vyvíjena snaha o tvorbu rozpustných rekombinantních trimerů coby imunogenů, které by lépe simulovaly nativní strukturu výběžku na Env. Dodnes bylo připraveno již velké množství takovýchto molekul, avšak



žádná z nich prozatím nebyla schopna vyvolat tvorbu bnAbs (Grundner *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Kong a Sattentau, 2012).

Mimo protilátek, které by bránily přímé interakci Env s CD4, CCR5 nebo CXCR4 je nezbytné vzít v potaz i neutralizační protilátky namířené na N-glykany. N-glykany jsou vzdáleny od CD4 vazebného místa a jsou součástí glykosylačního štítu HIV Env. Podílí se na správném složení podjednotky gp120, na navázání virionu k povrchu hostitelské buňky a nepřímo ovlivňují buněčný příjem HIV-1. Některé glykany by mohly HIV-1 chránit před hostitelskými neutralizujícími protilátkami, zatímco některé představují pro neutralizující protilátky cíl. Při navázání protilátky na takovýto glykan dojde ke změně konformace celého Env a tím rovněž k nepřímému zablokování interakce s receptory CD4, CCR5 nebo CXCR4. (Raska a Novak, 2010)

Kromě přípravy imunogenů schopných navození tvorby bnAbs existují i další cíle, které by měly být při snaze o vývoj úspěšné vakcíny proti HIV stanoveny. Dle (Burton *et al.*, 2012) je lze shrnout následovně.

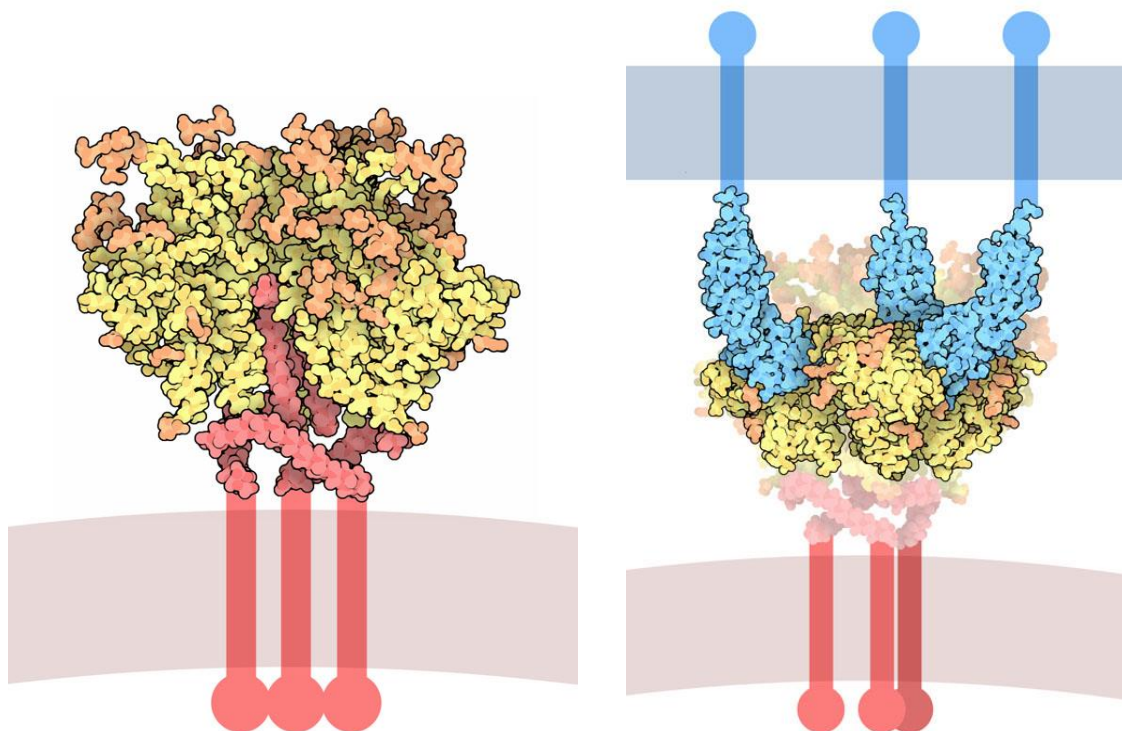
Vzhledem k hlavnímu cíli, kterým je vyvolání tvorby protilátek, nejlépe těch, co neutralizují široké spektrum variant HIV, je zapotřebí plně definovat protilátky a epitopy asociované s bnAbs. V ideálním případě by bylo vygenerováno a charakterizováno dostatečné množství bnAbs, které mají dostačující redundanci pro rozpoznání epitopu, abychom si mohli být jistí, že celý HIV Env byl pokryt. Z velkého množství definovaných bnAbs pak lze vybrat ty, které poskytují nejlepší ochranu.

Dalším, už dříve zmíněným cílem je návrh, příprava a purifikace proteinové vakcinační podjednotky, která by byla stabilní a co nejvěrohodněji imitovala přirozenou formu výběžku na Env. Současně je rovněž za potřebí definovat glykosylaci Env heterotrimeru. Ačkoliv byl glykosylační profil rekombinantního a nativního Env analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie, úplné definování místně specifické glykosylace prozatím nebylo možné (Bonomelli *et al.*, 2011; Go *et al.*, 2011). Takováto analýza by poskytla vhled do role specifických glykanů při tvorbě protilátkových epitopů v kontextu gp120 monomerů a nativních HIV Env trimerů, což může přispět ke snahám o zlepšení designu imunogenu. Dalším důvodem, proč je třeba definovat glykosylaci nativního Env je zjištění, že stejné rekombinantní gp120 proteiny, které byly exprimovány v různých, běžně používaných buněčných liniích, byly glykosylovány různě (Raska *et al.*, 2010).

V procesu vývoje vakcíny je rovněž důležité stanovit v jakém vztahu jsou antigenové epitopy s B-lymfocyty, protože porozumět tomu, jak imunitní systém rozpoznává a zpracovává virové antigeny pro trvalou humorální imunitu má podle Cyster, 2010 zásadní význam při návrhu vakcíny. Nyní je zřejmé, že B-lymfocyty se mohou s antigeny potkat a reagovat na ně pomocí mechanismů, které závisí na povaze a velikosti samotného antigenu, ale rovněž např. v rámci buňky na místě, kde se antigen nachází. U lymfatických uzlin například, vstupují malé rozpustné antigeny do folikulů B-lymfocytů, primárního místa kde probíhá aktivace B-lymfocytů, a to pomocí systému folikulárních kanálků (Rozenendaal *et al.*, 2009), zatímco částicové antigeny jako jsou např. viry a velké imunokomplexy musí být zachyceny subkapsulárními makrofágy, aby byly do folikulů přeneseny (Gonzalez *et al.*, 2011). V případě HIV Env, zvláště po zvažování velké nestability výběžku na Env proteinu, je nejasné, které Env antigeny jsou prezentovány B-lymfocytům a jak a kde k těmto událostem po infekci dochází. (Burton *et al.*, 2012)

Přes mnohé komplikace a výzvy, kterým musíme při snaze o vývoj anti-HIV-1 vakcíny čelit, nelze říct, že všechny pokusy končí neúspěchem. Dle Rerks-Ngarm *et al.*, 2009, už došlo k navození částečného protektivního účinku po podání vakcíny. Klinická studie, při které toho bylo dosaženo probíhala v Thajsku a účastnilo se jí 16 402 osob z nichž 12 542 osobám byla podána vakcína. Vakcinační protokol zahrnoval čtyři dávky rekombinantního kanarypox viru ALVAC-HIV a následovaly dvě dávky rekombinantního proteinu gp120. Protektivní účinek byl pozorován ve 26 % případů. (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009; Shin, 2016)

Podle posledních publikací se zdá být slibným tzv. „germline cílení“, které by mohlo být úspěšné při snaze o vyvolání bnAbs. Kritickým krokem je aktivace bnAbs prekurzorů B-lymfocytů, které mají potenciál, vyvinout se v B-lymfocyty schopné produkovat bnAbs. (Medina-Ramírez *et al.*, 2017) Bylo zjištěno, že odstranění dvou glykosylačních míst umožní navázání Env glykoproteinu a aktivaci B-lymfocytů. (McGuire *et al.*, 2013) což posloužilo jako první krok. Správně navržený protein se pak dokáže navázat na bnAbs prekurzory B-lymfocytů, a to i v kompetitivním prostředí dalších buněk imunitního systému. (Jardine *et al.*, 2016)



**Obrázek 4** Schéma struktury Env výběžku. Vlevo je vyobrazena nativní struktura Env výběžku ukotvená ve virové fosfolipidové membráně. Tento výběžek je tvořen trimerním povrchovým glykoproteinem Gp120, který je ve struktuře zabarven žlutě a trimerním transmembránovým glykoproteinem gp41 červená a sacharidy jsou vyznačeny oranžově. Část gp120 tzv. CD4 binding site se selektivně váže na protein CD4, který je vyznačen vpravo modrou barvou. Dojde ke změně tvaru gp120 což umožní jeho navázání na druhý buněčný koreceptor, zesílení připojení a vede k fúzi. (Převzato z PDB databáze)

### 2.3.3 Obtíže při vývoji vakcíny

Proč je tak těžké vyvinout vakcínu proti HIV? Přírozená infekce HIV virem nevyústí ve vymýcení viru imunitním systémem hostitele a vývojem přirozené imunity vůči reinfekci. Navzdory intenzivní a konstantní imunitní odpovědi jak humorální, tak rovněž i buněčné, je virus schopen odolat eradikaci a pokračuje v redukci CD 4+ lymfocytů, což vede k rozvinutí AIDS. Příležitost pro vakcínu je tedy velmi úzce limitována na počáteční stádium infekce. (Gallo, 2005) HIV si rozvinulo několik mechanismů k obcházení hostitelské imunitní odpovědi včetně schopnosti regulovat molekuly histokompatibilního komplexu MHC I a tím minimalizovat jeho rozpoznání cytotoxickými T lymfocyty (CTL). (Goulder and Watkins, 2004; Feeney *et al.*, 2005)

Dalším otázkou při vývoji efektivní vakcíny je správná konformace a stabilita antigenu. Problém pramení z faktu, že obalový glykoprotein viru zakrývá konzervovaný receptor a koreceptor vázající místa ve skulinách. Ta jsou maskována hypervariabilními

smyčkami molekuly a glykanovými rezidui.(Wyatt and Sodroski, 1998; Kwong *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003) Neutralizační protilátky indukované v odpovědi na gp120 jsou primárně cíleny proti těmto hypervariabilním smyčkám molekuly a pouze zřídka rozpoznají vazebné místo receptoru, což ztěžuje snahu o vytvoření bnAbs (protilátky neutralizující široké spektrum variant HIV) proti primárním izolátům viru od pacientů. (Parren *et al.*, 1999; Calarota and Weiner, 2003; Burton *et al.*, 2004; Garber, Silvestri and Feinberg, 2004)

Signifikantní překážkou ve výzkumu vakcíny proti HIV je také složitost vývoje vhodného zvířecího modelu. Jediná zvířata náchylná k experimentální infekci HIV jsou šimpanzi a makakové vepří. Další zvířecí model využívaný ve výzkumu HIV vakcín je založen na použití SIV/HIV hybridních virech, které byly vytvořeny, aby nesly *env* gen z HIV-1 izolátu.(Girard, Osmanov and Kieny, 2006)

Opičím modelům dále škodí fakt, že experimenty na jejichž základu lze zhodnotit účinnost vakcín vyžaduje vakcinaci zvířat velmi vysokými dávkami viru. Takto vysoké dávky jsou nutné pro dosažení stoprocentní infekce kontrolních zvířat ve skupině s placebem po jedné dávce. Avšak vysoké dávky rovněž nekorrespondují s přirozeným vystavením HIV u lidí. Také viry používané při experimentech se zvířecími modely jsou téměř vždy homologní k vakcíně, což sice poskytuje dobrou šanci na úspěch, ale u lidí je takováto situace nerealistická. (Girard, Osmanov and Kieny, 2006)

## **2.4 Glykoprotein gp140 SOSIP**

Tento rekombinantní konstrukt je určený k co nejpřesnějšímu napodobení přirozeně se vyskytující formy obalového glykoproteinu Env. Tento protein je tvořen sekvencí gp120 a sekvencí gp41 (viz Obr. 8). Ta je ale v tomto případně zkrácená o hydrofobní část aminokyselinové sekvence, která za nativních podmínek zajišťuje ukotvení glykoproteinu ve fosfolipidové membráně čímž z něj činí transmembránový protein. Zkrácením vzniká sekvence gp20.

Díky odstranění hydrofobní části ze sekvence a zároveň připojení sekrečního signálu k N-konci se rekombinantní protein uvolňuje do média exprimujících buněk (viz Obr. 8). Tato modifikace však ovlivňuje stabilitu konstruktů gp140, což vede k rozpadu na individuální podjednotky, které nejsou imunologicky velmi významné. Varianta SOSIP

zachovává štěpné místo mezi sekvencemi gp120 a gp20 a vazba je navíc stabilizována přidáním aminokyselin tvořících disulfidové můstky.

#### 2.4.1 Coiled-coil motiv

Coiled-coil je superhelikální proteinový strukturální motiv skládající se ze dvou nebo více peptidů s konformací  $\alpha$ -helixu, které jsou okolo sebe vzájemně obtočené a vytváří superhelikální strukturu. Každý helix je složen z opakující se heptády aminokyselin, které jsou obvykle značené  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ , přičemž  $n$  značí počet opakování. Na pozicích  $a$  a  $d$  se obvykle nachází hydrofobní aminokyseliny tvořící střed. Pozice  $e$  a  $g$  bývají obsazeny polárními aminokyselinami, které mohou vzájemně mezi řetězcí vytvářet elektrostatické interakce. (Mason and Arndt, 2004; Apostolovic, Danial and Klok, 2010)

### 2.5 Liposomy

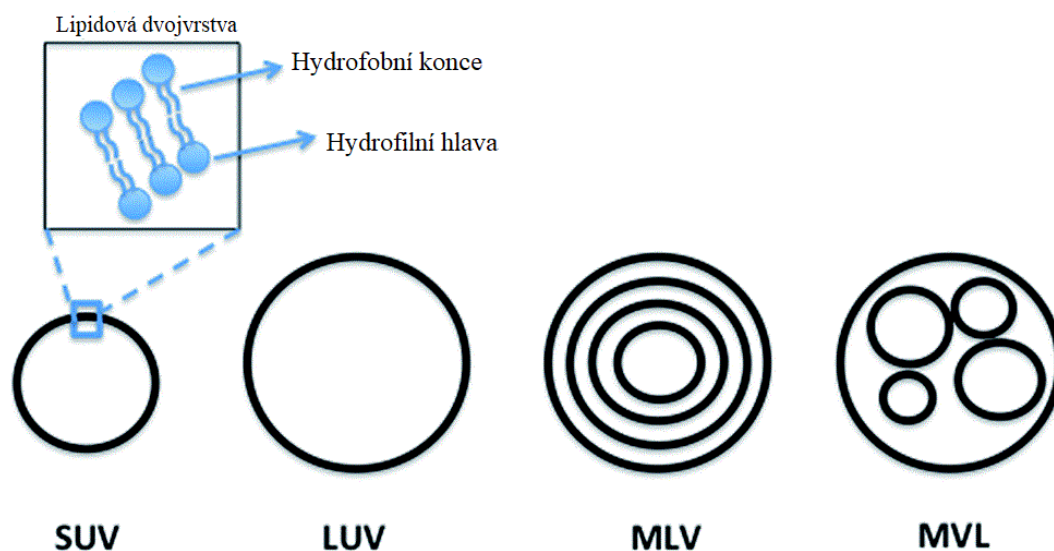
Liposomy, kulovité částice skládající se z jedné nebo více fosfolipidových dvojvrstev (viz Obr 6.) byly poprvé popsány v polovině šedesátých let. V současnosti jsou užitečným nástrojem v mnoha odvětvích včetně biofyziky, chemie, biochemie, biologie nebo např. teoretické fyziky. Od dob svého objevení se liposomy dostaly i na trh, a to díky pokročilým technologiím, kdy se částice užívají jako nosiče aktivních látek do místa určení nebo nosiče látek adjuvantních. Důvody k jejich používání jsou kromě biokompatibility rovněž jejich hydrofobní a zároveň hydrofilní povaha a velikost. Vlastnosti liposomů se liší na základě jejich složení, povrchového náboje, velikosti i metody jejich přípravy. Volba komponent dvojvrstvy určuje i rigiditu, resp. fluiditu membrány a její náboj. (Akbarzadeh *et al.*, 2013)

#### 2.5.1 Klasifikace liposomů

Všeobecně liposomy dosahují velikosti od 20 nm do 100  $\mu$ m s lipidovou dvojvrstvou silnou přibližně 4 nm. Nejběžnějším parametrem pro klasifikaci liposomů je jejich velikost a počet lamel. Rozlišujeme:

1. Malé unilamelární vesikuly (*small unilamellar vesicles*) – liposomy s velikostí 10-100 nm. Velikost se může mírně lišit podle lipidového složení membrány a také dle iontové síly vodního média.
2. Velké unilamelární vesikuly (*large unilamellar vesicles*) – částice jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 100 do 1000 nm.

3. Velké multilamelární vesikuly (*multilamellar vesicles*) – na rozdíl od dvou výše zmíněných částic tyto obsahují větší množství lipidových dvojvrstev (lamel), které bývají koncentricky uspořádány.
4. Velké multivesikulární vesikuly (*multivesicular vesicles*) – tyto částice mají rovněž větší množství lamel, ovšem uspořádaných nekonzentricky. (Sharma and Sharma, 1997; Shaheen *et al.*, 2006)



**Obrázek 5** Grafické znázornění vesikulí v závislosti na velikosti a počtu lamel, včetně zobrazení detailu lipidové dvojvrstvy. Převzato a upraveno dle (Salim *et al.*, 2014)

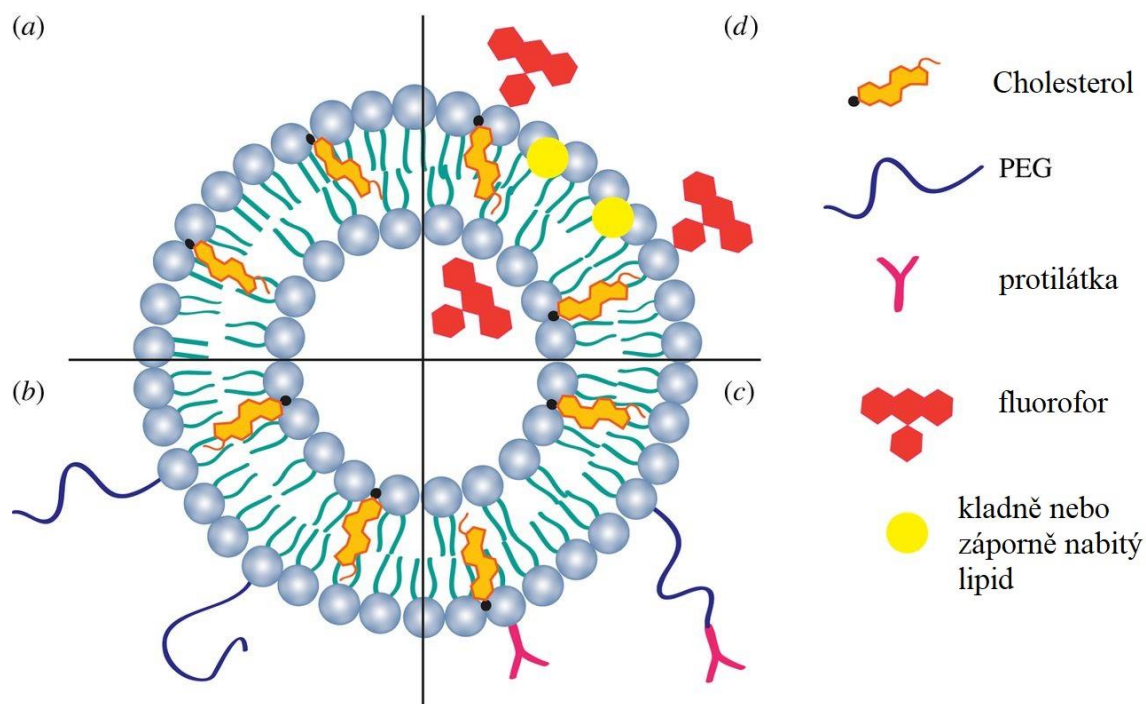
Dále můžeme liposomy rozdělit podle membránové struktury příp. povrchových modifikací. Tyto úpravy pak umožňují částice různě využít při navrhování systémů k cílenému transportu látek k buňkám. Membrána může být modifikována takovým způsobem, že při změně teploty nebo pH změní svou strukturu, což může být výhodou např. při cílení nádorů, kde jsou podmínky odlišné z důvodu omezeného prokrvení.

Rozlišujeme:

1. Konvenční liposomy (*conventional liposomes*) – liposomy tohoto druhu vykazují nescifické interakce a bývají labilní v séru.
2. Stéricky chráněné liposomy (*stealth liposomes*) – kvůli navázaným ligandům (např. polyethylenglykol, PEG, viz Obr. 6) na povrchu jsou v krvi stabilnější a mohou proto cirkulovat řečištěm déle.
3. Cílené liposomy (*targeted liposomes*) – díky ligandům navázaným na povrchu, vykazujícím specifickou interakci s povrchovými strukturami buněk lze

dosáhnout cíleného přenosu látek. Příkladem takovýchto interakcí je ligand-receptor nebo protilátka-epitop.

4. Kationické liposomy (*cationic liposomes*) – tyto liposomy jsou schopny interagovat se záporně nabitou DNA. Při elektrostatických interakcích se tvoří komplexy, tzv. lipoplexy. (Immordino, Dosio and Cattel, 2006)



**Obrázek 6** Částice liposomu. V pravém horním kvadrantu A je zobrazen konvenční liposom. V kvadrantu B je znázorěn stéricky chráněný liposom. Kvadrant C znázorňuje liposom cílený a v posledním kvadrantu D je demonstrována možnost jak nabitého, tak fluorescenčního liposomu. Převzato a upraveno dle (Monteiro *et al.*, 2014)

## 2.5.2 Příprava liposomů

Příprava liposomálních částic je založena na vlastnosti fosfolipidů přirozeně ve vodném prostředí agregovat a tvořit lipidovou dvojvrstvou. Při reakci vody s fosfolipidovým filmem dochází nejprve k formování primárních útvarů, které se nazývají fragmenty fosfolipidové dvojvrstvy. Ty se následně přeměňují ve vezikulární útvary s různou stabilitou. To je zapříčiněno vzájemným působením zbytků mastných kyselin a minimalizací interakce mezi těmito hydrofobními částmi fosfolipidů a molekulami vody. V případě multilamelárních vesikulí je vzdálenost jednotlivých lamel důsledkem působení přitažlivých Van der Waalsových a stérických sil. (Turánek, 2016) Před přípravou je nutné zvážit požadovanou strukturu liposomů a rovněž jejich cílovou

velikost. Na základě požadovaných parametrů je pak třeba zvolit vhodné stavební jednotky, které zajistí jak funkčnost, tak stabilitu vzniklých liposomů.

Obecný postup přípravy liposomů zahrnuje několik základních kroků, které Akbarzadeh *et al.*, 2013 shrnuje takto:

1. Vytvoření lipidového filmu odpařením organického rozpouštědla.
2. Příprava vodné fáze a hydratace (disperze) lipidů ve vodném médiu.
3. Purifikace vzniklých liposomálních částic a analýza výsledného produktu.

Metody přípravy lze na základě způsobu přípravy do třech základních kategorií.

- Mechanické disperzní metody – mezi tyto metody řadíme sonikace, třepání na vortexu a vysokotlaká homogenizace
- Detergentové dispersní metody – např. disperze rozpuštěného fosfatidylcholinu
- Metody založené na odstranění detergentu – reverzně-fázová evaporace nebo injektáž

Téměř nejběžněji využívanou v laboratořích, je metoda hydratace lipidového filmu, patřící do první skupiny. Principem je prvotní rozpuštění lipidů v org. rozpouštědle, kterým může být chloroform nebo chloroform-methanol. Organické rozpouštědlo je odpařeno např. lyofilizací nebo vakuovým sušením a vzniklý suchý lipidový film je následně hydratován. Disperzí dochází ke vzniku směsi různě velkých multilamelárních nosičů, které se dále upravují dle požadované velikosti.

Mezi další metody přípravy liposomů patří:

- Sonikace – využívá se nejčastěji pro přípravu SUV částic. Hlavní nevýhodou je velmi nízký vnitřní objem neboli enkapsulační účinnost, možná degradace fosfolipidů a přítomnost MLV současně s SUV. (Sahil *et al.*, 2011)
- French-press – extruze MLV částic skrz otvory French-press extrudéru. Oproti sonikaci má několik výhod a výsledné liposomy jsou spíše větší než SUV připravené sonikací. Nevýhodou je např. těžko dosažitelná vysoká teplota.
- Metoda zmrazení a rozmrazení – SUV jsou rychle zmrazeny a velmi zvolna rozmrazovány. Vznik unilamelárních liposomů je důsledek fúze SUV během procesu zmrazení a opětovného rozmrazení. Nevýhodou je silná inhibice metody



zvýšeným obsahem fosfolipidů a zvýšenou iontovou silou média. Enkapsulační účinnost je 20-30 %.

- Etherová injektáž – roztok lipidů v diethyletheru nebo směsi ether-metanolu je postupně vsřikován do vodného roztoku který má být enkapsulován při vyšších teplotách nebo sníženém tlaku. Následné odstranění etheru pomocí vakua vede ke vzniku liposomů.(Patil and Jadhav, 2014)

### **2.5.3 Liposomální nosiče**

Výhodou liposomů je mimo jiné i to, že enkapsulované látky mohou být jak lipofilní, tak hydrofilní. V prvním případě se látky inkorporují do lipidové dvojvrstvy a v případě druhém se nacházejí ve vnitřním vodném prostředí. V závislosti na možnostech přípravy (viz 2.5.2) vznikají liposomy s odlišnými vlastnostmi, které mohou ovlivnit množství látky, kterou částice může obalit. Další vlastnosti předurčující liposomy k využití v oblastech medicíny a farmacie je jejich jednoduchá biodegradabilita a nízká toxicita. Vzhledem k širokému spektru možností přípravy existuje velká variabilita liposomů, které můžeme získat a které následně umožní cílený transport léčiva do tkáně či organismu. Mezi další výhody patří i snižování nežádoucích účinků léčiv nebo schopnost postupného uvolňování aktivní látky v organismu nebo tkáni. (Eloy *et al.*, 2014)

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Biologický materiál**

- HEK-293F Cells – eukaryotický expresní systém (SIGMA ALDRICH, USA)
- One-Shot TOP10 Cells – bakteriální klonovací systém (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- Pacientské sérum – od pacientů nakažených virem HIV-1 subtypem A/C, kteří v oblasti Mbeya (Jihozápadní Tanzánie)

#### **3.1.2 Chemikálie**

- 293Fectin reagent (INVITROGEN, USA)
- 2-Log DNA Ladder 0,1–10 kb (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- 2-merkptoethanol (LACH-NER, Česká republika)
- agarosa (SERVA, Německo)
- alkalická fosfatasa – CIP (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- ampicilin (SERVA, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (LACH-NER, Česká republika)
- dodecylsírán sodný – SDS (MERCK, Německo)
- ethanol 96% (VWR, USA)
- enterokinasa (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- furin (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- fektin (INVITROGEN, USA)
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (BIOTIUM, USA)
- glycin (LACH-NER, Česká republika)
- HEK293F FreeStyle Expression Medium GIBCO (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- hovězí sérový albumin – BSA (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (LACH-NER, Česká republika)
- chlorid draselný (LACH-NER, Česká republika)

- chlorid sodný (LACH-NER, Česká republika)
- chlorid vápenatý (LACH-NER, Česká republika)
- imidazol (SIGMA ALDRICH, USA)
- izopropanol (LACH-NER, Česká republika)
- kvasniční extrakt (DUCHEFA, Nizozemí)
- kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (SIGMA ALDRICH, USA)
- liguční pufr T4 DNA (INVITROGEN, USA)
- ledová kyselina octová 99,8% (LACH-NER, Česká republika)
- methanol (SIGMA ALDRICH, USA)
- N', N', N', N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (SERVA, Německo)
- n-butanol (LACH-NER, Česká republika)
- optiMEM Reduced Serum Medium GIBCO (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- pepton (DUCHEFA, Nizozemí)
- peroxidisíran amonný – OMNIPUR (MERC, Německo)
- Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (BIO-RAD, USA)
- Precision Plus Protein™ Standards, unstained (BIO-RAD, USA)
- protilátka anti HIV-1 gp120 konjugovaná s HRP, produkovaná v kozách (BIODESIGN INTERNATIONAL, USA)
- protilátka monoklonální anti-V5 konjugovaná s HRP, produkovaná v myších (SIGMA ALDRICH, USA)
- protilátka anti-Human IgG  $\gamma$ -chain konjugovaná s HRP, produkovaná v kozách (SIGMA ALDRICH, USA)
- pufr č. 4 (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- restrikční endonukleáza *EcoRI* (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- restrikční endonukleáza *XhoI* (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- restrikční enzym *SacII* (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- restrikční enzym *HindIII* (NEW ENGLAND BIOLABS, USA)
- SOC médium (INVITROGEN, USA)
- T4 DNA ligáza (INVITROGEN, USA)
- Tris base (OMNIPUR (MERC, Německo)
- Triton X-100 (SIGMA ALDRICH, USA)

- Tween-20 (CALBIOCHEM, USA)
- ustalovač Manual Fixing Bath G354 (AGFA, Belgie)
- vývojka – Developer G150 (AGFA, Belgie)

### 3.1.3 Roztoky

- 10% roztok peroxodisíranu amonného – APS (1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  + 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ )
- 30% roztok akrylamid/bisakrylamid (SERVA) – 300 g akrylamid, 8 g bisakrylamid v 1 l  $\text{ddH}_2\text{O}$ )
- 2× SDS nanášecí pufr redukující (125mM Tris + 15,9% glycerol + 160mM SDS + 10% merkaptoethanol + 0,01% bromfenolová modř, pH 6,8)
- 2× SDS nanášecí pufr neredukující (125mM Tris + 15,9% glycerol + 160mM SDS + 0,01% bromfenolová modř, pH 6,8)
- 4× Tris pufr pH 6,8 (0,5M Tris, 12mM SDS)
- 4× Tris pufr pH 8,8 (1,5M Tris, 12mM SDS)
- barvicí roztok – 10% k. octová, 70mM Commassie Brilliant Blue R-250
- blokovací pufr SUPERBLOK (1% BSA a 0,05% Tween v 1× PBS)
- Fixační roztok – (25% isopropanol, 10% k. octová)
- GelRed – pracovní roztok: 300 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  + 17,6 g NaCl + 60  $\mu\text{l}$  GelRed Nucleic Acid Gel Stain)
- LB médium – 1% pepton, 1% NaCl, 0,5% kvasiční extrakt
- Odbarvovací roztok – 5% methanol, 7% k. octová
- PBS (137mM NaCl + 2,7mM KCl + 3,7mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  + 1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4)
- PBST – 0,05% Tween v 1xPBS
- pufr adaptační (500mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 1,5M NaCl + 100mM imidazol + 0,5% Tween 20, pH 8)
- pufr „binding“ (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 300mM NaCl + 10mM imidazol + 0,05% Tween 20, pH 8)
- pufr eluční (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 300mM NaCl + 200mM imidazol + 0,05% Tween 20, pH 8)
- pufr „harsh“ (20 ml SDS 10%, 12,5 ml Tris HCl, 0,8 ml 2-merkaptoethanol v celkovém objemu 100 ml)
- pufr hybridizační (30mM hepes + 100mM octan draselný, pH 7,5)

- pufr „mild“ (15 g glycinu, 1 g SDS, 10 ml Tweenu v celkovém objemu 1 l, pH=2,2)
- pufr – nanášecí pro DNA (30% glycerol + 0,05% bromfenolová modř, vodný roztok)
- pufr pro EK (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8.0)
- SDS elektrodový pufr (25mM Tris + 190mM glycin + 3mM SDS)
- TAE pufr 50× (1,5M Tris, 1mM k. octová, 0,1M EDTA, pH 8,5)
- Tobwinův pufr (75mM Tris + 0,58mM glycin + 60% methanol)

### 3.1.4 Komerční soupravy

- NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (MACHEREY-NAGEL, Německo)
- QIAgen EndoFree Plasmid Maxi Kit (QUIAGEN, USA)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN, USA)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)

### 3.2 Přístrojové vybavení

- automatické mikropipety (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- automatické pipety 1–5 ml (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- blotovací jednotka TRANS-6 SEMIDRY TRANSFER CELL (BIO-RAD, USA)
- centrifuga CR 312 JOUAN (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- centrifuga MIKRO 22R (HETTICH ZENTRIFUGEN, Německo)
- centrifuga UNIVERSAL 32R (HETTICH ZENTRIFUGEN, Německo)
- centrifugační zkumavka pro zakoncentrování – Amicon Ultra-4, 50K (MERCK, Německo)
- elektrický zdroj pro blotovací zařízení 2197 POWER SUPPLY (LKB BROMMA, Švédsko)
- elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic (BIO-RAD, Německo)
- elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPac Universal (BIO-RAD, Německo)
- elektroforetická komora a příslušející víko s elektrodami (BIO-RAD, Německo)
- elektroforetická komora Owl Easycast B1 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)

- elektroforetická komora Owl Easycast B2 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- inkubátor s aktivním chlazením MIR-153 (SANYO, Japonsko)
- inkubátor s CO<sub>2</sub> MCO-15AC – SANYO CO<sub>2</sub> INCUBATOR (SANYO, Japonsko)
- inkubátor termostat BT 120 M (LABO MS, Česká republika)
- kazeta pro expozici chemiluminiscenčního signálu na film (EASTMAN KODAK, USA)
- lázeň vodní s lineárním mícháním (GFL, Indie)
- laboratorní váhy 440-33N (KERN, Německo)
- laminární box aura-VF48 (BIO AIR, USA)
- laminární box IC 212 JOUAN (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- mikrocentrifuga E-Centrifuge (WEALTEK, USA)
- mikrovlnná trouba (SHARP, Japonsko)
- mikroskop Opton Standard 20 (ZEISS-OPTON, Německo)
- míchadlo magnetické – IKA big squid (IKA, Německo)
- pipetor FASTPETTE (LABNET, USA)
- sérologické pipety (SARSTEDT, Německo)
- termoblok - block heater SBH130D STUART (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- třepačka KS 130 basic (IKA, Německo)
- třepačka rolovací rollermixer STR6D STUART (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)
- UV transiluminátor GelLogic 212PRO (CARESTREAM HEALTH, USA)
- vortex MS2 Minishaker (IKA, Německo)
- PVDF membrána (BIO-RAD, USA)
- fotografický papír CL-XPosure Film (THERMO FISHER, USA)

### **3.2.1 Softwarové vybavení**

- SnapGene<sup>®</sup> viewer
- Molbio
- ImageJ
- Carestream MI Standard Edition<sup>™</sup>

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Příprava insertu

Návrh oligonukleotidů byl proveden v programu SnapGene viewer tak, aby výsledný plasmid obsahoval všechny cílové sekvence (viz Obr. 8). Po vytvoření výsledné sekvence byla syntéza oligonukleotidových vláken zadána firmě GeneriBiotech. Oligonukleotidy o dané sekvenci (viz přílohy) fosforylované na 5' koncích byly zpracovány následovně. Po krátkém stočení obou oligonukleotidových pelet byl do mikrozkmavek přidán „Duplex“ hybridizační pufr, který poskytl vhodné pufrční prostředí a obsažená sůl byla nutná k hybridizaci. Oba oligonukleotidy byly naředěny na stejnou koncentraci. Obsah obou mikrozkmavek byl následně smíchán v poměru 1:1. Tento poměr je nutný abychom zabránili přítomnosti reziduálních jednovláknových úseků DNA. Směs oligonukleotidů byla v dalším kroku zahřívána po dobu 2 minut při 94 °C a postupně ochlazována. Výsledným produktem byla stabilní, dvouvláknová DNA, která byla následně zamrazena a uchována pro další použití.

### 3.3.2 Restrikční štěpení v plazmidu

Pro restrikční štěpení bylo třeba připravit ředění reakce. Vzorky byly připraveny za sterilních podmínek, a to v laminárním boxu. Celkový objem restrikční reakce byl 50  $\mu$ l a jednotlivá reagentia jsou uvedena v tabulce č. 1. Restrikční reakce probíhala po dobu dvou hodin při 37 °C v inkubátoru. V dalším kroku byla ke směsi přidána fosfatasa (CIP) na dobu 2 hodin, aby došlo k defosforylaci vektoru. Objem přidaného enzymu byl nižší než 10 % celkového objemu reakce, aby nedocházelo k nespecifickému štěpení.

**Tabulka 1** Objemy reagentií v restrikční reakci vektoru

Reagentia	Objem ( $\mu$ l)
DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	3
pufr č. 4	5
EcoRI	1
XhoI	1
dd voda	40

Pro nanášení vzorků byl připraven 1% agarosový gel. Na předvážkách bylo naváženo 0,7 g agarosového prášku. Toto množství bylo rozpuštěno v 70 ml dH<sub>2</sub>O a rovněž bylo

přidáno 1,4 ml TAE pufru. Tento roztok byl v mikrovlnné troubě přiveden k varu. Následovala kontrola úplného rozpuštění agarosového prášku a případně opětovné vaření až do kompletního rozpuštění. Roztok byl přelit do předpřipravené elektroforetické komory s nachystaným hřebínkem, pro vytvoření nanášecích jamek. Gel tuhl při laboratorní teplotě cca. 50 minut.

Restrikční směsi byly po skončení inkubace smíchány v poměru 5:1 s nanášecím pufrům (10  $\mu$ l reakce a 2  $\mu$ l pufru). Do jedné z jamek byl vždy nanesen standard (5  $\mu$ l) o molekulové hmotnosti 0,1 – 10 kb (2-Log DNA Ladder) a do dalších jamek bylo nanášeno 12  $\mu$ l směsi vzorku a pufru. Vzorky byly děleny 50 minut při pracovním napětí 130 V. Po ukončení elektroforézy byly DNA fragmenty obarveny pomocí fluorescenčního interkalačního barviva GelRed, třepáním gelu na laboratorní třepače po dobu min. 30 minut. Po barvení byl gel umístěn do UV-transiluminátoru, kde byl za pomoci laboratorního softwaru Carestream MI Standard Edition<sup>TM</sup> pořízen snímek, resp. elektroforetogram, který zobrazuje jednotlivé rozštěpené fragmenty DNA.

### **3.3.3 Klonování plazmidu**

Pro získání plazmidu z agarosového gelu, byl předchozí experiment zopakován. Před obarvením byl však z gelu vyříznut pruh obsahující jak marker molekulové hmotnosti, tak také rozštěpenou DNA. Tento pruh byl obarven v GelRed barvivo a následně byla pomocí UV-transiluminátoru provedena kontrola správnosti rozštěpení DNA, tedy na fragment linearizovaného plazmidu a na vyštěpený fragment. Na základě UV záření byl na onom pruhu vyznačena výška pruhu nesoucího linearizovanou DNA. Přiložením tohoto k pruhu ke zbytku gelu, který rovněž obsahoval rozdělenou DNA bylo možné detekovat a vyříznout tuto DNA, aniž by došlo k vystavení barvivo nebo UV záření.

V dalším kroku byla DNA purifikována z gelového fragmentu, a to za pomoci QIAquick® Gel Extraction Kit dle protokolu. Termoblok byl nastaven na 50 °C. Vyříznutý agarosový gel byl zvážen, přičemž váha nepřesahovala 400 mg. Ke gelu byl přidán pufr o objemu trojnásobku hmotnosti gelu s přepočtem dle vztahu 100  $\mu$ l = 100 mg. Pro 400mg gel by to tedy bylo 1,2 ml komerčního pufru QG. Mikrozkuhavka s gelem a pufrům byla inkubována v termobloku při teplotě 50 °C a každé 2 minuty byl obsah zkuhavky vortexován pro lepší rozpuštění gelu a uvolnění DNA. Následně byl k rozpuštěnému gelu přidán isopropanol o objemu jednonásobku hmotnosti gelu. Pro 400mg gel by to tedy bylo 400  $\mu$ l isopropanolu. Na kolonku



QIAquick spin column, která byla umístěna do sběrné mikrozkušavky byla nanášena směs (max. 750  $\mu$ l) a kolonky byly centrifugovány (1 min; 13000 RPM). Flow-through bylo odstrááno. Na membráně kolonky zůstal precipitát DNA, který byl promyt 500  $\mu$ l QG pufru při opakované centrifugaci (1 min; 13000 RPM) a následně promývacím pufrém PE s ethanolem (750  $\mu$ l). Flow-through byl rovněž odstráan a byla provedena ještě jedna centrifugace pro úplné odstráení promývacího pufru. Pro úplné odpaření ethanolu byla kolonka ponechána při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Kolonka byla přenesena do 1,5ml mikrozkušavky a na membránu bylo nanášeno 30  $\mu$ l sterilní H<sub>2</sub>O, ve které se po centrifugaci (1 min; 13000 RPM) nacházela purifikovaná DNA. U purifikované DNA byla změřena koncentrace. Získaný vektor byl následně použit pro zaligování inzertu.

Po získání vektoru i inzertu byla provedena ligace a to za pomoci T4 DNA ligasy. Celkový objem ligační reakce byl 20  $\mu$ l. K výpočtu objemů byl použit poměr 1:12 vektoru k inzertu. Výsledná koncentrace inzertu v reakci byla 18,54 ng/ml. Objemy všech reagensů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

**Tabulka 2** Použité objemy všech reagensů pro ligační reakci

Reagencie	Objem ( $\mu$ l)
inzert	2,47
vektor	3,33
ligační pufr	4
ligasa	1
dd voda	9,2

Z 20  $\mu$ l ligační reakce byly přeneseny 2  $\mu$ l do připravených 50  $\mu$ l DH5 $\alpha$  kompetentních buněk a zbytek ligační reakce byl zamražen. Směs byla následně inkubována na ledě po dobu 30 minut. Kompetentní buňky byly poté přeneseny na 30 s do termobloku, který byl předehřátý na přesně 42  $^{\circ}$ C. Po rychlém zahřátí byly přeneseny zpět na led a do směsi v mikrozkušavce bylo přidáno 250  $\mu$ l SOC média a směs byla ponechána na třepačce v inkubátoru po dobu 60 minut při 37  $^{\circ}$ C.

### 3.3.4 Transformace plazmidové DNA, nízkoobjemová produkce

Do velké nádoby byl připraven 1 l roztoku růstového LB média. Nádoba s médiem byla poté sterilizována v autoklávu a přenesena do laminárního boxu, kde byl k obsahu přidán 1 ml ampicilinu. Petriho misky byly naplněny médiem zhruba do poloviny a ponechány ztuhnout. Na takto připravené misky s médiem byla nanášena ligační reakce. Misky byly použity dvě, přičemž na jednu bylo nanášeno 150  $\mu$ l a na druhou 50  $\mu$ l ligační reakce. Ta byla rovnoměrně rozprostřena po celé ploše kultivačního média. Bakterie byly kultivovány přes noc při teplotě 37 °C.

Pro přípravu bakteriální suspenze bylo předem připraveno 11 sterilních zkumavek, přičemž každá z nich obsahovala cca. 7 ml kultivačního LB média. 10 zkumavek bylo pomocí sterilních špiček inokulováno 10 transformovanými koloniemi (5 z jedné a 5 ze druhé Petriho misky). 11. zkumavka nebyla inokulována a posloužila jako případná kontrola kontaminace. Celá tato práce byla provedena v laminárním boxu. Všech 11 zkumavek bylo poté přeneseno do inkubátoru, kde probíhala kultivace přes noc, při 37 °C.

4 ml z celkového obsahu všech 10 zkumavek byly po kultivaci centrifugovány při 10 000 RPM po dobu 8 minut. Využitím takového množství byla získána dostatečně velká bakteriální peleta na dně mikrozkušavky. Z bakterií byla DNA izolována pomocí protokolu NucleoSpin® Plasmid.

Pro získání DNA z buněk byla nejprve provedena buněčná lýze a to přidáním 250  $\mu$ l A1 pufru k peletě, která byla důkladně rozsuspendována. Následně bylo k obsahu mikrozkušavky přidáno 250  $\mu$ l pufru A2 a obsah byl promíchán pouze několikerým otočením zkumavky. Směs nebyla promíchána na vortexu, aby nedocházelo k poškození genomické DNA. Celá směs byla následně inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 300  $\mu$ l pufru A3 a směs byla důkladně promíchána, převrácením mikrozkušavky. Obsah byl centrifugován při 13 000 rpm po dobu 5 minut, aby došlo k vyčištění lyzátu (odstranění precipitátu obsahujícího genomickou DNA a proteinové složky). Po stočení byl supernatant nanášen pipetou na kolonku, která byla součástí NucleoSpin® Plasmid kitu a opět centrifugován při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Silikonová membrána byla následně promyta 600  $\mu$ l A4 pufru a stočena při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Po odstranění roztoku, který protekl, byla mikrozkušavka opět centrifugována a to při 13 000 rpm/2 minuty. Pro eluci DNA byla použita sterilní dd

H<sub>2</sub>O. 30 µl dd H<sub>2</sub>O bylo nanášeno na membránu, necháno odstát po dobu 3 minut při RT a následně stočeno 1 minutu/13000 rpm.

### 3.3.5 Restrikční analýza, sekvenování DNA

DNA, která byla z bakterií izolována, resp. výsledný plazmid byl ověřen pomocí restrikční reakce s využitím endonukleas *EcoRI* a *XhoI*. Postup byl stejný jako v případě restrikčního štěpení vektoru (podkapitola 3.1.2.) a objemy pro reakci jsou uvedeny v tabulce č. 3. Celkový objem reakce byl však na rozdíl od předchozího postupu 10 µl. Výsledkem byl elektroforetogram, který potvrdil správnost plasmidu.

**Tabulka 3** Objemy a reagentia v restrikční reakci pro kontrolu správnosti plasmidu

Reagentia	Objem (µl)
DNA (1 µg/µl)	1
pufř č. 4	1
EcoRI	0,1
XhoI	0,1
dd voda	7,8

Po ověření správnosti plasmidu pomocí restrikčního štěpení byla následně ověřena správnost sekvence pomocí sekvenování. Pro sekvenování byl připraven vzorek s koncentrací 500 ng DNA v 5 µl (0,1 µg/µl). Primery byly přidány společností SeqMe. Jednalo se o primer CMV-F a BGH-R.

### 3.3.6 Transformace plazmidové DNA, velkoobjemová produkce

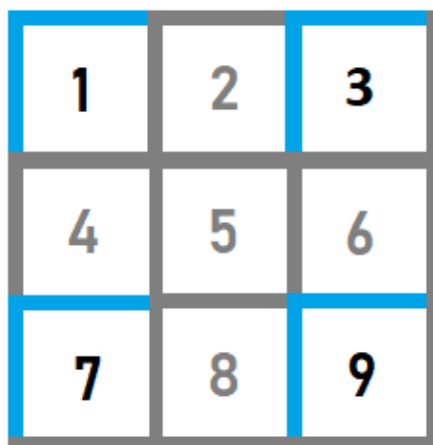
Poté co byla ověřena správnost sekvence byla provedena velkoobjemová produkce DNA, abychom získali co největší množství plasmidu. Z tohoto důvodu byl nasazen 1 l buněčné kultury, jejíž kultivace probíhala přes noc při 37 °C. Získání DNA z bakterií bylo provedeno pomocí QIAgen EndoFree Plasmid Maxi Kit.

Bakteriální kultura byla stočena při 10 000 rpm po dobu 10 minut. Vzniklý pelet byla následně rozsuspendován v 10 ml pufřu P1. Následně bylo přidáno 10 ml pufřu P2 a směs byla promíchána otočením (4 - 6x). Dále bylo přidáno 10 ml vychlazeného pufřu P3 a opět promícháno několikerým otočením. Bakteriální lyzát byl 10 minut inkubován při

laboratorní teplotě a následně filtrován. Ke zfiltrovanému roztoku bylo přidáno 2,5 ml ER pufru, směs byla řádně promíchána a 30 minut inkubována na ledu. Na QIAGEN-tip 500 membránu byl nanesen buněčný lyzát. Membrána byla dvakrát promyta 30 ml QC pufru a DNA byla vyeluována 15 ml pufru QF. U Získané DNA byla následně měřena jak koncentrace, tak čistota.

### 3.3.7 Transfekce buněk

Pro transfekci byla založena nová buněčná kultura a byla kultivována při teplotě 37 °C v termostatovaném inkubátoru. Pravidelně byla prováděna kontrola růstu pomocí počítání živých buněk. Po několika dnech bylo z buněčné kultury do zkumavky odebráno 10 µl, které byly smíchány s 10 µl trypanové modři. 10 µl z této směsi bylo následně naneseno do Bürkerovy komůrky. Výpočet buněk probíhal ve čtvercích 1,3,7,9 viz Obr. 7. Buňky, které byly na hranách byly počítány pouze v případě, že se nacházely na horní nebo levé hraně čtverců.



**Obrázek 7 Schéma Bürkerovy komůrky.** Buňky byly počítány ve čtvercích číslo 1,3,7 a 9 a také na hranách čtverců vyznačených modře. *Ilustrace:* autor práce

Výsledné množství buněk bylo spočítáno na základě obecného vzorce:

$$\frac{\text{počet buněk na } \mu\text{l}}{\text{plocha čtverce (mm}^2\text{)} \cdot \text{počet užitých čtverců} \cdot \text{hloubka čtverce (mm)} \cdot \text{faktor ředění}}$$

Z této rovnice stanovíme počet živých buněk na µl. V případě této práce byl výpočet následovný:

$$\frac{\text{počet buněk na } \mu\text{l}}{1 \cdot 4 \cdot 0,1 \cdot 0,5} = \text{počet vitálních buněk} / \mu\text{l}$$

Pomocí těchto výpočtů by počet buněk v médi stanoven na 2 milionu buněk v 1 ml. Optimální počet buněk na mililitr pro transfekci je 1 milion. Buněčná kultura byla tedy naředěna na toto množství do celkového objemu 100 ml v poměru 1:1.

Pro kotransfekci byla do jedné zkumavky připravena směs 1 ml OPTIMEMu a 62,5  $\mu\text{l}$  fektinu. Ve druhé mikrozkušavce bylo smíseno 1 ml OPTIMEMu se 4,5  $\mu\text{l}$  furinu a 14,2  $\mu\text{l}$  DNA gp140 SOSIP P4W CC\_EK. Výsledná koncentrace tedy byla 13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  furinu a 35,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  plasmidu gp140. Obě směsi byly inkubovány 5 minut, následně smíseny a inkubovány po dobu 30 minut společně. Obě inkubace probíhaly při RT v laminárním boxu. Po uplynutí příslušné doby byla výsledná směs přidána k naředěné buněčné kultuře a inkubována po dobu 3 dní při 37 °C.

### 3.3.8 Purifikace proteinu

Protein byl purifikován ze supernatantu (díky sekrečnímu signálu) pomocí Ni-NTA. 100 ml buněčné kultury bylo přeneseno do dvou 50ml centrifugačních zkumavek a centrifugováno 5 minut při 1500 RPM. Supernatant byl následně odpipetován a přenesen do čistých zkumavek. K supernatantu byl přidán adaptační pufr v poměru 1:10 k supernatantu, tedy 4,5 ml a 100  $\mu\text{l}$  Ni-NTA agarosy. Supernatant byl umístěn na rotátor a při nejnižší rychlosti, při teplotě 4 °C byl ponechán přes noc. Protein byl purifikován za pomoci metalochelatační chromatografie s použitím kolon. Zkumavka se supernatantem byla postavena do svislé polohy na 30-60 minut, aby došlo k usazení Ni-NTA agarosy. Supernatant neobsahující agarosu byl přenesen do čisté zkumavky a supernatant s usazenou agarosou byl nanesen na kolonu. Sesbíraná frakce byla značena jako „flow-through“. Na kolonu bylo dále nanášeno celkem 15 ml „binding“ pufru, přičemž proteklá frakce byla značena jako „wash“. Pro eluci proteinu byl použit eluční pufr. Objem každé z elucí byl 400  $\mu\text{l}$ . Proces purifikace probíhal v chlazeném prostředí, při teplotě 5 °C.

Jednotlivé eluce byly následně zakoncentrovány. K zakoncentrování byly použity speciální centrifugační zkumavky pro zakoncentrování (*centrifugal filter units*  $\leq$  50 kDa) do kterých byly jednotlivé eluční frakce přesunuty. Po centrifugaci byla kolona promyta 3x 2 ml pufru pro enterokinasu a zakoncentrovaný protein byl přenesen do čisté mikrozkušavky. Celkový objem zakoncentrovaného proteinu byl 200  $\mu\text{l}$ .

### 3.3.9 Štěpení enterokinasou

K roztoku zakoncentrovaného proteinu bylo přidáno adekvátní množství enzymu enterokinasou v závislosti na koncentraci vzorku. Inkubace proteinu s enzymem probíhala při 4 °C. Po uplynutí inkubační doby byla směs přenesena na centrifugační zkumavky pro zakoncentrování (*centrifugal filter units*  $\leq$  50 kDa) a centrifugována, aby došlo k odstranění odštěpené části proteinu (V5 značka a oligohistidinová značka). Po centrifugování bylo na kolonu nanášeno celkem 9 ml 1x PBS a protein zakoncentrován do celkového objemu 150  $\mu$ l.

### 3.3.10 SDS-PAGE

Podložní (spacery 0,75 mm) i krycí skla pro SDS-PAGE byla důkladně odmaštěna ethanolem, očištěna destilovanou vodou a osušena buničinou. Skla byla umístěna do držáku, který byl upevněn do stojanu. Pod skla byla vložena guma, která bránila protékání gelu. Utěsnění skel bylo otestováno deionizovanou vodou, která byla následně odsáta filtračním papírem.

Do plastových zkumavek byly připraveny roztoky potřebné pro přípravu dělicího a zaostřovacího polyakrylamidového gelu. Poměr všech reagensů pro 12% gel je uveden v tabulce 4 pro dělicí a v tabulce 5 pro zaostřovací gel.

**Tabulka 4** Objemy reagensů pro přípravu dělicího polyakrylamidového gelu

Reagencia	Objem (ml)
30% A/B	5
Tris pufr pH 8,8	3,75
dd voda	6,25
APS	0,75
TEMED	0,15

**Tabulka 5** Objemy reagensů pro přípravu zaostřovacího polyakrylamidového gelu

Reagencia	Objem (ml)
30% A/B	1,3
Tris pufr pH 6,8	2,5
dd voda	6,2
APS	0,5
TEMED	0,1

Persíran amonný a TEMED, která fungují jako polymerizační činidla byla přidána do směsi jako poslední, resp. těsně před nalitím gelu mezi skla, aby bylo zabráněno předčasné polymerizaci. Směs byla promíchána a pipetována mezi připravená skla, do výše dvou třetin. Na směs gelu byla nanese tenká vrstva *n*-butanolu, aby byly odstraněny případné bubliny a nerovnosti. Gel byl ponechán při pokojové teplotě cca. 30 minut. Vrstva *n*-butanolu byla odstraněna filtračním papírem a mezi skla byla pipetována vrstva gelu zaostřovacího. Do gelu byly umístěny 15-, nebo 10jamkové hřebínky s tloušťkou 0,75 mm. Zaostřovací gel byl ponechán při pokojové teplotě zhruba 30 minut.

Polyakrylamidové gely byly ve sklech umístěny do držáku v elektroforetické vaně tak, aby byly hřebínky směrem nahoru. Gely byly upevněny fixačními panty a zality elektrodoým pufrém. Po vytažení hřebínků byly do vytvořených jamek nanášeny vzorky a do jedné jamky byl rovněž nanesen marker molekulové hmotnosti. Elektroforetická komora byla uzavřena víkem s elektrodami připojenými ke zdroji stejnosměrného proudu. Pracovní napětí bylo nastaveno na 150 V.

Bromfenolová modř, kterou obsahovaly vzorky byla indikátorem separace. Při následném použití gelů pro metodu western-blotu byla modř vyplavena z gelu a separace ukončena (70-75 min) odpojením od zdroje. Elektrodoý pufr byl z komory vylit a po vyjmutí skla s gely byly pomocí špachtle skla odděleny. Špachtlí byl rovněž odstraněn zaostřovací gel a dělicí gel byl umístěn do Towbinova roztoku.

### **3.3.11 Western-blot**

Blotovací papíry byly namočeny do Towbinova roztoku cca. 30 min před začátkem blotování. PVDF membrána byla hydratována methanolem asi minutu a poté stejnou dobu oplachována v deionizované vodě. Takto hydratovaná membrána byla položena do Towbinova roztoku. Do blotovací jednotky byl připraven „sendvič“ z jednotlivých komponentů v pořadí blotovací papír, membrána, gel a blotovací papír. Pravý roh membrány byl označen tužkou a celý sendvič byl poskládán tak, aby mezi gelem a membránou nebyly vzduchové bubliny. Na přístroj byla umístěna katoda zakrytá víkem. Pracovní napětí bylo nastaveno na 20 V a proud na 250 mA s časem transportu 90 minut. Po skončení přenosu byla membrána připravována k imunochemické detekci.

Membrána, na které se nachází přenesené proteiny byla umístěna do roztoku 1% BSA/PBS, aby došlo k tzv. zablokování membrány, tedy snížení nespecifické vazby

protilátky. Membrána byla v tomto roztoku uložena na 1,5 hodiny na třepačku. Po zablokování membrány na ni byly pipetovány protilátky v odpovídajícím ředění vůči BSA/PBST (Anti-V5-HRP 1:10000; antigp120 1:5000). Inkubace s protilátkou probíhala 1,5 hodiny při pokojové teplotě, anebo přes noc při 4 °C. Po odstranění protilátek byla membrána promývána v roztoku PBST po dobu 30 min. Takto byla membrána promyta 3x. Po tomto promývání byla membrána dvakrát promyta i v PBS a to rovněž 30 min. Na promytou membránu byla pipetována směs chemiluminiscenčních substrátů SuperSignal West Pico v poměru 1:1. V této směsi byla membrána inkubována 5 minut. Po inkubaci byla membrána vložena do plastové fólie ve fotografické kazetě a přenesena do temné komory. Na membránu byl položen fotografický papír a kazeta byla uzavřena. Expoziční časy byly individuální dle síly signálu a budou upřesněny ve výsledcích. Fotografický papír byl po expozici vyjmut a přenesen do vývojky. Následně byl opláchnut v deionizované vodě s kyselinou octovou a přenesen do ustalovače minimálně na 5 min. Po ustálení byl film přenesen do destilované vody, ještě jednou opláchnut a následně usušen.

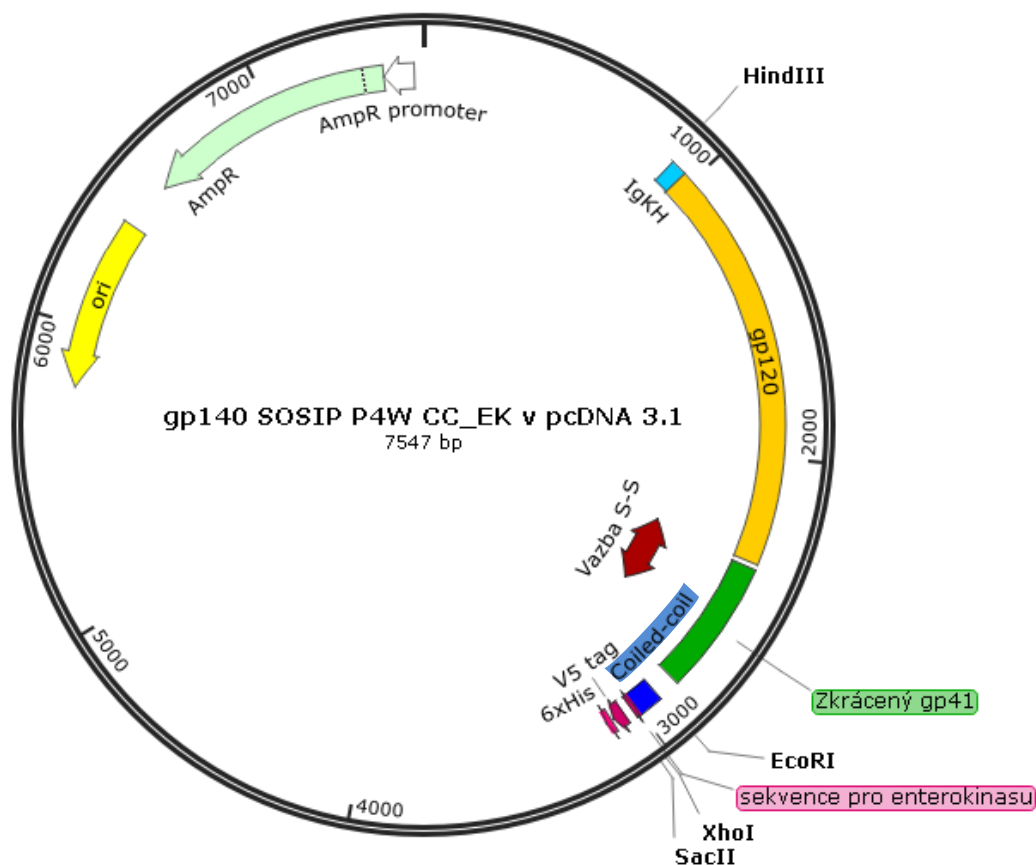
V některých případech byla membrána po vyvolání tzv. stripována, resp. byly z PVDF membrány staženy dříve navázané protilátky. Při stripování membrány pomocí „mild“ pufru, byla membrána v tomto pufru inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byl pufr odstraněn a nalit čerstvý, ve kterém byla membrána opět po dobu 10 minut. Následně byla membrána promývaná roztokem 1x PBS s 0,05% Tweenu a to dvakrát po dobu 10 minut a poté rovněž dvakrát po dobu 10 minut v 1xPBS. Takto připravená membrána byla dále inkubována s blokovacím pufrům a následně příslušnou protilátkou.

Rovněž bylo použito stripování za pomoci „Harsh“ pufru, kdy byl tento pufr zahříván do dosažení teploty 50 °C a vlit do pevně uzavíratelné nádoby. Do pufru byla vložena membrána a při 50 °C probíhala inkubace na třepačce po dobu 45 minut. Membrána byla po inkubaci promývána vodou a následně důkladně promyta v 1xPBS s 0,05 % Tweenem. Takto připravená membrána byla vložena do blokovacího pufru a následně inkubována s patientským sérem.



## 4 VÝSLEDKY

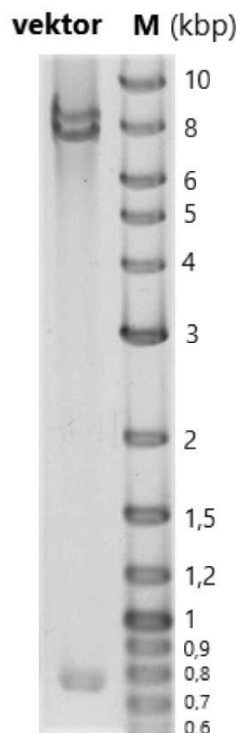
### 4.1 Návrh plasmidu



**Obrázek 8 Mapa plasmidu kódujícího protein gp 140 P4W SOSIP:** V mapě plasmidu je světle modře vyznačen úsek kódující IgKH (sekreční signál) a následně sekvence kódující cílový protein gp140, skládající se z glykoproteinu 120 (žlutě) a zkrácené části gp41 (zeleně). Růžově je vyznačen úsek kódující sekvenci následně rozpoznávanou enterokinasou. Protein a sekvence pro enterokinasu tvoří insert, který byl zaklonován do pcDNA 3.1 vektoru a celkově má plasmid 7547 bp. Za ním se nachází sekvence pro V5 značka a oligohistidinová značka (růžově). Na mapě jsou rovněž vyznačena místa pro restrikční endonukleázy (*EcoRI* a *XhoI*), kterých bylo v této práci využito. Žlutě je vyznačen počátek bakteriální replikace ori a zeleně je vyznačena oblast genu ampicilinové rezistence AmpR

### 4.2 Restrikční štěpení vektoru

Byla provedena restrikce plasmidu gp140 SOSIP P4W SPM pomocí enzymů *EcoRI* a *XhoI* za účelem vyštěpení SPM modulu z původního plasmidu a získání linearizovaného vektoru vhodného k budoucí ligaci cílového inzertu obsahujícího sekvenci pro enterokinasu a coiled coil.



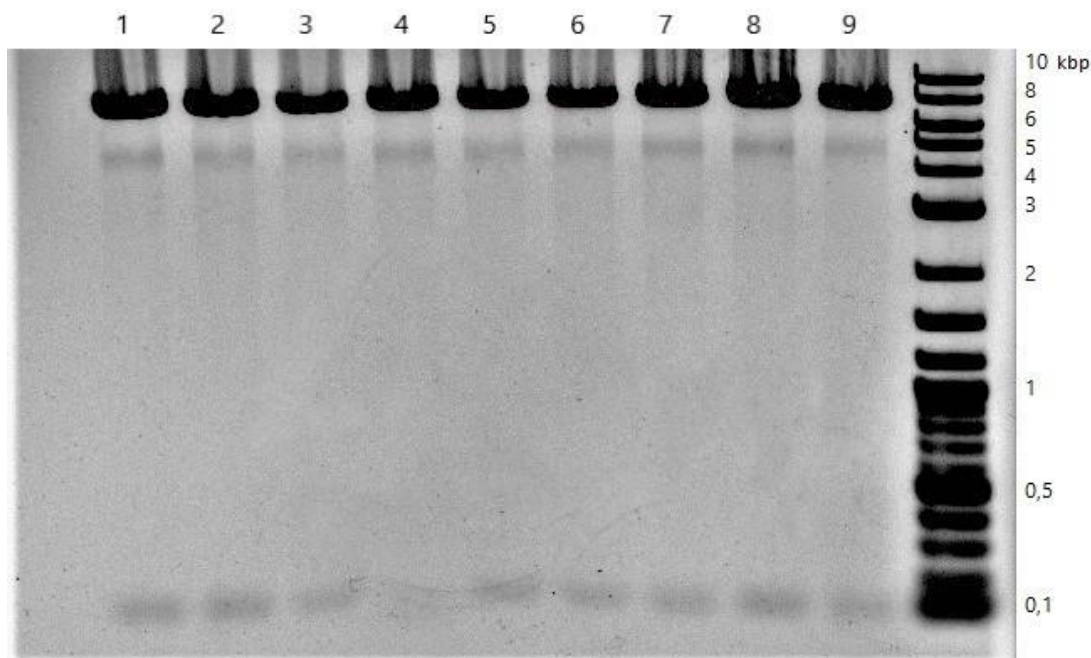
**Obrázek 9 Linearizace plasmidu gp 140 P4W SOSIP s SPM modulem pomocí restričních endokuleas *EcoRI* a *XhoI*.** Do první jamky, která na obrázku není znázorněna, jelikož byla vyříznuta, aby nedošlo k vystavení DNA UV záření, bylo nanášeno 50  $\mu$ l směsi barviva a plasmidu. Do další jamky bylo nanášeno 7  $\mu$ l DNA markeru pro rozlišení bandů viz pravý sloupeček obrázku. Do jamky poslední (viz jamka na obrázku vlevo) bylo nanášeno 10  $\mu$ l směsi DNA a markeru. Na elektroforetogramu jsou patrné tři bandy. Nejvrchnější o velikosti cca. 8,3 kbp značí nedostatečně naštěpený plasmid. Band pod ním, odpovídá velikosti okolo 7,4 a značí tedy rozštěpený vektor (tento band byl také vyříznut). Band nacházející se ve spodní části elektroforetogramu představuje oblast mezi restričními místy *EcoRI* a *XhoI*, která byla vyštěpená a obsahovala sekvenci pro SPM modul, o velikosti cca 750 bp.

Z elektroforetogramu je patrné, že se úspěšně podařilo daný plasmid linearizovat pomocí restričních endonukleas. Díky enzymům *EcoRI* a *XhoI* byl získán vektor s tupými konci. Dle postupu viz kapitola 3.3.3, byla z agarosového gelu DNA získána pomocí extrakce. U takto získané DNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop koncentrace a čistota. Výsledkem byl linearizovaný plasmid o koncentraci 21 ng/ $\mu$ l a čistotě  $O.D.260/280 = 2,18$ .

### 4.3 Klonování a amplifikace plasmidu

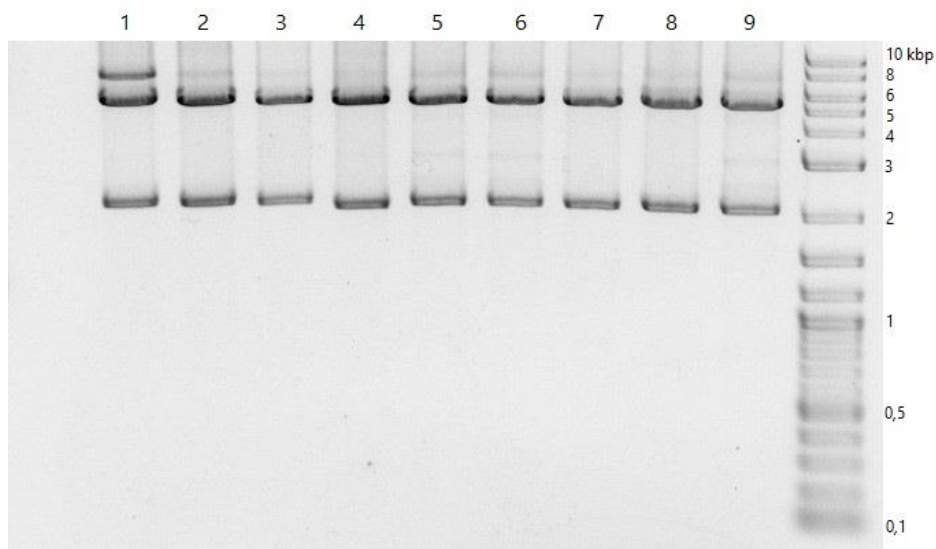
Po zaklonování insertu do pcDNA 3.1 vektoru a přípravě plasmidu obsahujícího sekvenci gp140 SOSIP P4W následovanou sekvencí pro coiled-coil kotvu a enterokinasu byla provedena transformace plasmidu do bakterií. Po nasazení bakterií do média a inkubaci bylo získáno 9 zkumavek s DNA (viz 3.3.4.)

Následně byla provedena kontrola získané DNA z bakterií, a to pomocí restrikčních reakcí. Nejdříve pomocí endonukleas *EcoRI* a *XhoI* a poté ještě pomocí enzymů *SacII* a *HindIII*.



**Obrázek 10** Restrikční štěpení výsledného plasmidu **gp 140 P4W SOSIP CC\_EK** pomocí endonukleas ***EcoRI*** a ***XhoI***. Do prvních deseti jamek bylo naneseno po 12  $\mu$ l směsi (10  $\mu$ l restrikční reakce a 2  $\mu$ l barviva) na jamku. Do poslední jamky byl nanesen 10 kbp marker (5  $\mu$ l) pro určení velikosti bandů. Na elektroforetogramu se objevují 3 bandy. První band je ve výšce cca. 7,4 kbp a odpovídá tedy větší části linearizovaného plasmidu. Slabý band v oblasti okolo 5 kbp značí cirkulární DNA. Band nacházející se ve spodní části elektroforetogramu pak odpovídá inzertu s velikostí 105 bází.

Z výsledků je patrné, že ve všech zkumavkách byla DNA s cílovým plasmidem gp 140 P4W SOSIP CC\_EK, resp. že ve všech bakteriích, které byly transformovány a následně vybrány k vysazení buněčné kultury, došlo k produkci právě tohoto plasmidu. Pro opakovanou kontrolu byla provedena restrikce s enzymy *SacII* a *HindIII*. Sekvence pro rozpoznání těmito enzymy je rovněž obsažena ve vektoru pcDNA 3.1 a tyto enzymy byly vybrány proto, že restrikční místa pro každý z enzymů jsou v plasmidu obsažena pouze jednou, navíc fragmenty vzniklé po štěpení jsou dostatečně velké a vzhledem ke své velikosti zároveň na elektroforetogramu dobře odlišitelné.



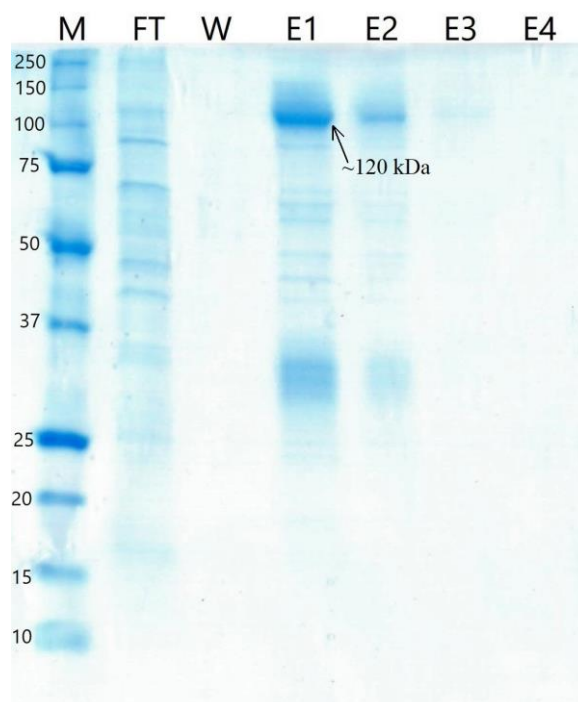
**Obrázek 11 Restrikční štěpení výsledného plasmidu gp 140 P4W SOSIP CC\_EK pomocí restrikčních enzymů *SacII* a *HindIII*.** Do prvních 9 jamek bylo nanášeno 12  $\mu$ l směsi restrikční reakce a barviva na jamku. Do poslední jamky byl nanášen 10 kbp marker (5  $\mu$ l) pro následné porovnání velikosti bandů. Vyšší band odpovídá velikosti cca. 5413 bp, tedy velikosti predikované pro těžší fragment a ten nižší velikosti cca. 2134 bp, tudíž fragmentu lehčímu.

Ve výsledcích elektroforetogramu byly očekávány dva bandy, a to ve velikosti 5413 bp a 2134 bp vzniklé rozštěpení plasmidu enzymy *SacII* a *HindIII*. Proužky, které jsou na elektroforetogramu patrné, odpovídají těmto předpokládaným teoretickým velikostem z čehož usuzujeme na správnost připraveného plasmidu gp 140 P4W SOSIP EK\_CC.

Po dvojnásobném ověření štěpení plasmidu byla DNA poslána na osekvenování, tedy přesné ověření správnosti obsažených sekvencí, nikoliv pouze velikostí. Po ověření správnosti sekvence byla provedena opětovná transformace bakterií, následována velkoobjemovou produkcí plasmidu (viz 3.3.6) při které byla snaha o získání co nejčistší DNA v co nejvyšší koncentraci. Při následném měření byla stanovena koncentrace DNA s výslednými hodnotami 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l a čistotou 1,92.

#### 4.4 Biosyntéza proteinu a purifikace

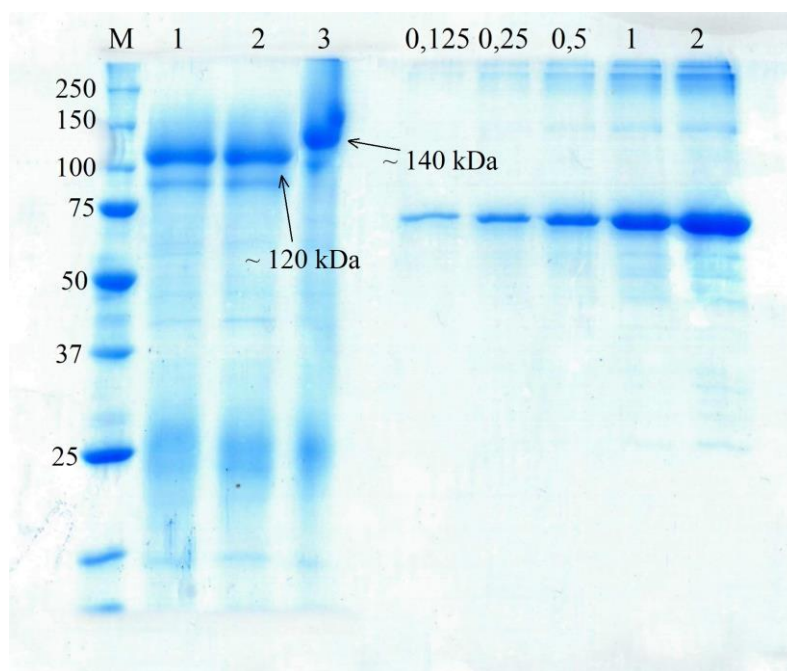
Protein byl exprimován v buňkách HEK 293 FreeStyle. Při dostatečném množství buněk v kultuře (1 milion/ml), byly tyto buňky transfekovány připraveným plazmidem gp140 SOSIP P4W CC\_EK (viz 3.3.7.). Syntetizované proteiny byly sklizeny a následně purifikovány ve dvou sériích. Po 3 a 6 dnech dle postupu viz podkapitola 3.3.8. Po purifikaci byly eluce společně s flow-through a frakcí wash analyzovány na akrylamidovém gelu za pomoci barvení Coomassie Brilliant Blue.



**Obrázek 12 Purifikace proteinu gp140 SOSIP P4W.** Do první jamky byly naneseny 4  $\mu$ l standardu molekulové hmotnosti (M). Do následujících jamek bylo vždy naneseno 8  $\mu$ l směsi vzorku a 2x nanášecího pufru (loading dye) v poměru 1:1. Ve druhé jamce je flow-through (FT), dále WASH (W) a následují eluce (E1-E4). Barveno CBB.

Exprimovaný protein gp140 SOSIP P4W s velikostí okolo 140 kDa je charakterizován bandem ve výšce cca. 120 kDa. To je způsobeno redukčními podmínkami, které štěpí disulfidovou vazbu a vzniká tak podjednotka gp120 a podjednotka gp20 společně s coiled-coil kotvou, V5 značkou a oligohistidinovou značkou, jejíž velikost odpovídá cca. 35 kDa. Z obrázku č. 12 je rovněž patrné, že nejvýnosnější byly první tři eluce. U zbylých dvou je výtěžek minimální. Veškeré eluce získané z purifikací byly následně zakoncentrovány do celkového objemu 200  $\mu$ l. Zakoncentrovaný protein byl analyzován pomocí metody western-blot a kvantifikován společně s dalšími vzorky získanými v průběhu následující manipulace s proteinem.

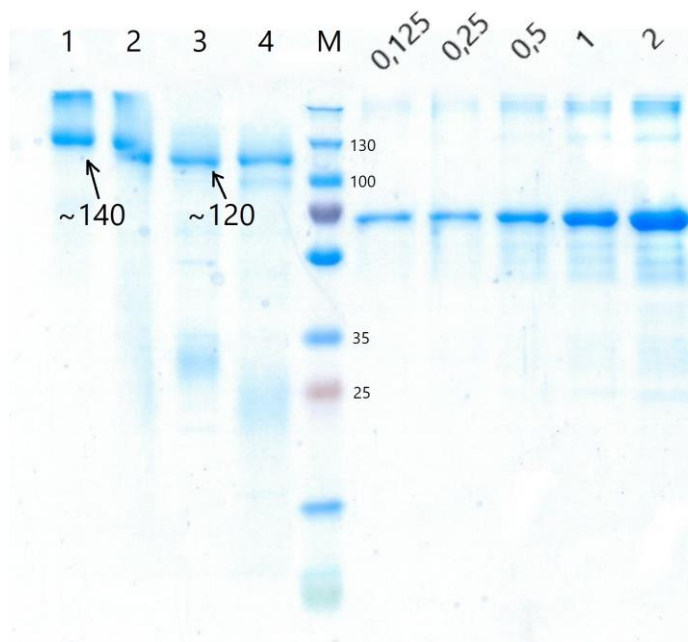
## 4.5 Kvantifikace proteinu



**Obrázek 13** Analýza gp140 SOSIP P4W pomocí SDS-PAGE s koncentrační řadou BSA. Do první jamky byly naneseny 4 μl standardu molekulové hmotnosti (M). Do následujících jamek bylo vždy naneseno 4 μl směsi vzorku a barviva v poměru 1:1. 1-protein po štěpení EK v redukčním prostředí, 2-protein po štěpení EK, zakoncentrovaný v redukčním prostředí, 3-protein po štěpení EK, zakoncentrovaný v neredučním prostředí. Barveno CBB.

Po zakoncentrování proteinu bylo třeba odštěpit V5 značku a polyhistidinovou značku, které byly přítomny pouze z důvodu usnadnění purifikace a identifikace. K odstranění byla využita aminokyselinová sekvence pro enzym enterokinasu. Díky enzymovému štěpení touto proteasou bylo možné získat protein gp140 SOSIP P4W pouze coiled-coil kotvou.

Pro stanovení koncentrace výsledného proteinu získaného po štěpení enterokinasou (obrázek 13, dráhy 2 a 3) bylo použito denzitometrické stanovení s kalibrační řadou BSA. Akrylamidový gel nabarvený CBB byl nafocen a obraz následně zpracován pomocí programu Image J. Výstupní hodnoty plochy pod křivkou byly následně zpracovány v programu MS Excel. Dle kalibrační křivky a následně rovnice lineární regrese byla koncentrace výsledného proteinu stanovena na 0,75 μg/μl. Na obrázku č. 13 je také u proteinů ošetřených enterokinasou patrný proužek o velikosti okolo 90 kDa, což značí, že u těchto proteinů dochází k částečné deglykosylaci, či neúplné glykosylaci nebo štěpení proteinu. Na obr. č. 14, ve dráze číslo 1 a 2 u proteinů, které enzymem ošetřeny nebyly se však tento band neobjevuje. K deglykosylaci dochází tedy nejpravděpodobněji v důsledku opakované manipulace s proteinem (zakoncentrování, změna pufrů apod.).



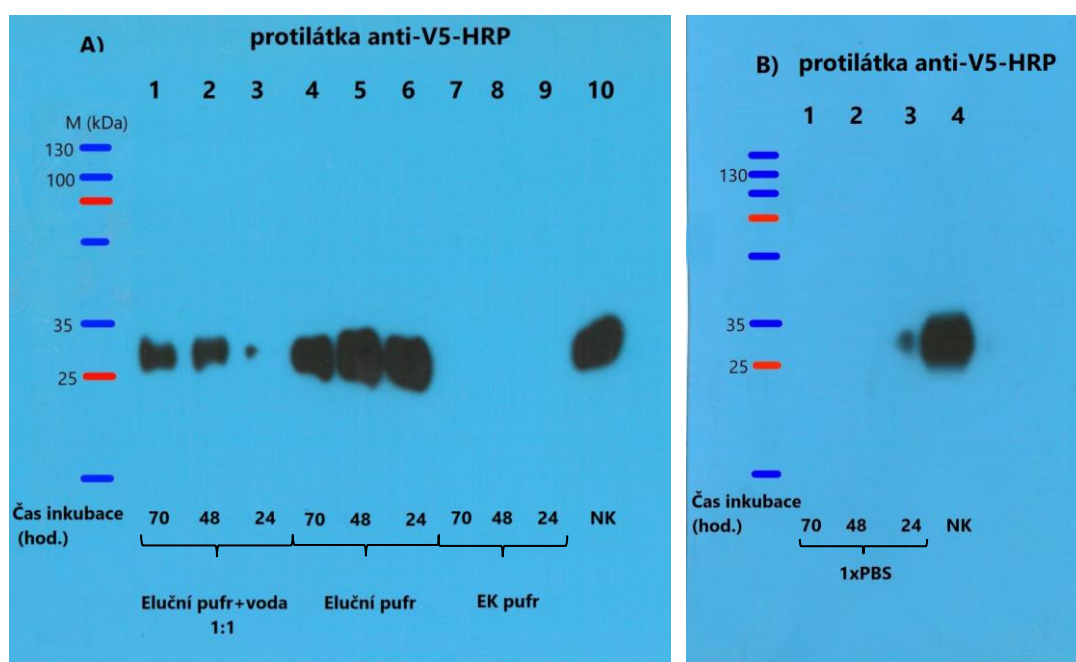
**Obrázek 14** Analýza gp140 SOSIP P4W před a po ošetření enzymem enterokinasou s koncentrační řadou BSA. Protein byl dávkován tak, aby byla výsledná koncentrace 0,5 $\mu$ g na jamku a tato koncentrace byla ověřena koncentrační řadou BSA. 1-protein neošetřený EK v neredukčním prostředí, 2-protein ošetřený EK v neredukčním prostředí, 3-protein neošetřený EK v redukčním prostředí, 4-protein ošetřený EK v redukčním prostředí. Barveno CBB.

Pro kontrolu štěpení při dané koncentraci proteinu byly srovnány ošetřené a neošetřené protein v redukčním o neredukčním prostředí. V drahách 3 a 4 lze vidět posun bandů z oblasti 35 kDa do oblasti 25 kDa. K úbytku molekulové váhy dochází vlivem odštěpení V5 a oligohistidinové značky a částečné deglykosylace zkrácené části glykoproteinu gp20. V dráze 4 je deglykosylace patrná z viditelného bandu ve výšce 90-100 kDa.

#### 4.6 Štěpení enterokinasou – optimalizace podmínek

Pro dosažení maximální efektivity štěpení enterokinasou byly štěpené vzorky vyhodnoceny western blot technikou s pomocí protilátky proti odštěpené V5 značce. Tento přístup umožnil kvantitativně vyhodnotit efektivitu štěpení a nastavit optimální podmínky. Vzorky proteinu gp140 SOSIP P4W CC\_EK byly inkubovány s enterokinasou při 4 °C po dobu 70 hodin, přičemž po 24 a 48 hodinách byly odebrány alikvoty pro analýzu. Ty byly následně smíchány s 2xSDS v poměru 1:1 a zamraženy v -20°C. Po štěpení byly vzorky analyzovány pomocí metody western-blot s protilátkou anti-V5-HRP. Jako negativní kontrola byl použit protein gp140 SOSIP P4W CC\_EK neošetřený

enzymem. Protilátka anti-V5-HRP se váže na V5 značku a v případě, že je tato sekvence ve vzorku přítomná, je patrný signál. V případě, že došlo k odštěpení a odstranění sekvence, proužek proteinu bez V5 značky nebude detekován. Enzymatické štěpení bylo testováno v různých prostředích. Pokud by byly eliminovány kroky zahrnující převádění proteinu do dalších pufrů po purifikaci, ztráty by byly nižší. Jak je však patrné z výsledků (viz Obr. 15) v prostředí imidazolu, který je obsažen v elučním pufru vykazuje enzym enterokinasa velmi nízkou aktivitu. Štěpení bylo proto testováno i v prostředí 1x PBS s přidavkem vápníku, který je nutný pro správnou funkci enzymu a pro porovnání i v prostředí pufru připraveného speciálně pro štěpení enterokinasou.



**Obrázek 15 Optimalizace štěpení enterokinasou.** A) 1-EK + gp140 po 70 hod., 2-EK + gp140 po 48 hod., 3-EK + gp140 po 24 hod., 4-EK + gp140 po 70 hod., 5-EK + gp140 po 48 hod., 6-EK + gp140 po 24 hod., 7-EK + gp140 po 70 hod., 8-EK + gp140 po 48 hod., 9-EK + gp140 po 24 hod., 10-negativní kontrola. B) 1-EK + gp140 po 70 hod., 2-EK + gp140 po 48 hod., 3-EK + gp140 po 24 hod., 4-negativní kontrola. Ředění protilátky (1:100000), expoziční čas 5s. Pacientské sérum pochází od pacientů nakažených virem HIV-1 subtypem A/C, kteří v oblasti Mbeya (Jihozápadní Tanzánie) nedostávají antiretrovirální terapii. (Raska *et al.*, 2014) Na membránu bylo konkrétně užito pacientské sérum s označením P15 společně s IgG  $\gamma$ -chain-HRP coby sekundární protilátkou.

Na obrázku 15 A v drahách 7-9 byly vzorky štěpeny v optimálním pufru a došlo k úplnému odštěpení V5 a oligohistidinové značky u každého alikvotu. Eluční pufr (+2mM CaCl<sub>2</sub>), ve kterém byl protein rovněž štěpen a který se užívá při purifikaci proteinů obsahuje imidazol. Ten, jak je vidět v drahách 4-6 brání aktivitě enzymu. U



dalších reakcí byl pak eluční pufr naředěn s dd H<sub>2</sub>O v poměru 1:1. Jak je vidět, u vzorků je signál slabší a došlo tedy k částečnému odštěpení sekvence. Štěpení v prostředí PBS (obrázek 15 B) je dle signálu časově závislé a 24 hodin není dostačující čas pro kompletní odštěpení.

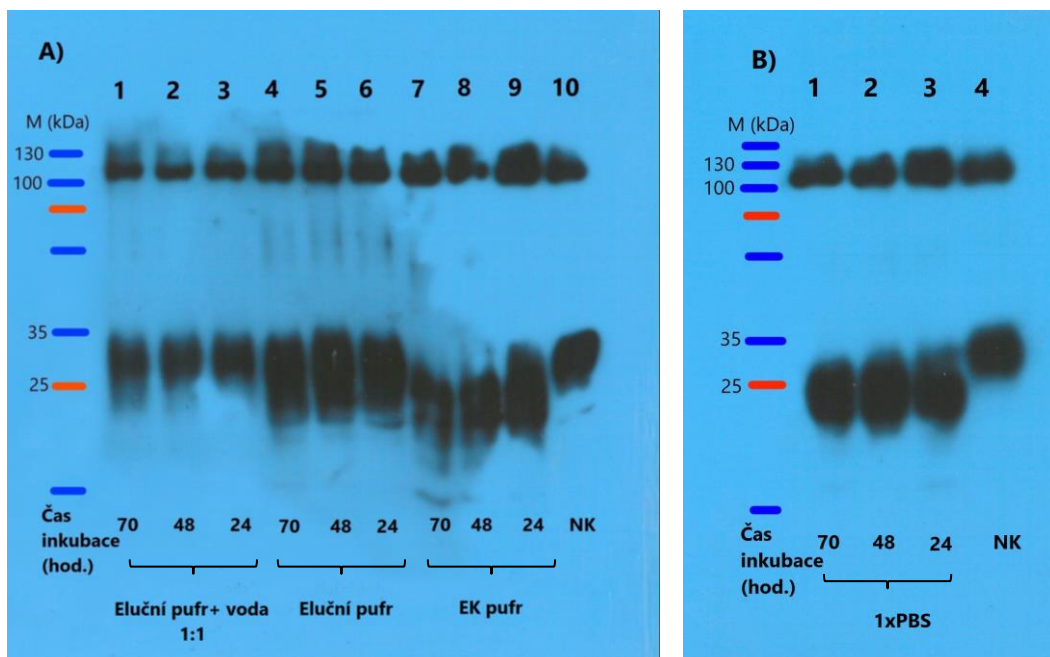
Specifikace enzymového štěpení jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 6). Koncentrace proteinu před štěpením byla 1 µg/µl. U všech prostředí byla koncentrace vápníku 2 mM vycházející z koncentrace vápníku v pufru pro EK.

**Tabulka 6** Parametry enzymového štěpení enterokinasou

Reakce	Objem gp140 SOSIP (µl)	Objem pufru (µl)	Objem reakce (µl)	EK
1x PBS+CaCl <sub>2</sub>	5	35	40	5 U/0,2 µl
Eluční pufr 1:1 +CaCl <sub>2</sub>	5	35	40	5 U/0,2 µl
Eluční pufr 1:2 + CaCl <sub>2</sub>	5	35	40	5 U/0,2 µl
Pufr pro EK	5	35	40	5 U/0,2 µl

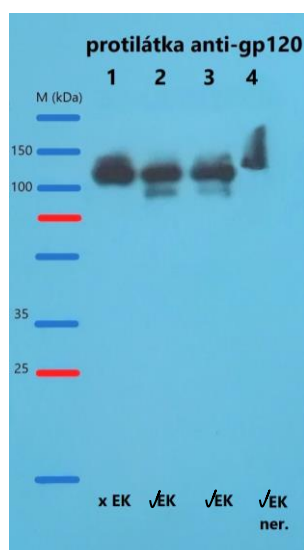
V dalším kroku byla z PVDF memby použité pro charakterizaci štěpených proteinů (viz Obr. 15) odmyta protilátka anti-V5 a membrána byla následně inkubována se sérem pacienta infikovaného virem HIV, který má vysoké titry protilátek proti Env proteinu. Na obrázku A i B se ve výšce 120 kDa nachází bandy signalizující přítomnost glykoproteinu gp140 SOSIP. V poloze mezi 25-35 kDa u vzorků v prostředí elučního pufru ředěného 1:1 s dd H<sub>2</sub>O a elučního pufru nezředěného (dráhy 1-6) lze po srovnání s neošetřeným proteinem (dráha 10) konstatovat, že nedošlo k rozštěpení, a to vlivem inhibičního působení imidazolu v elučním pufru. Signál u vzorků v prostředí naředěného pufru (dráhy 1-3) je slabší což značí, že dochází k slabé enzymové aktivitě. K ideálnímu štěpení, které je detekovatelné díky poklesu bandu z oblasti cca. 35 kDa do oblasti 20-25 kDa. dochází v prostředí EK pufru (dráhy 7-9).

Na obrázku 16 B je ve drahách 1-3 protein ošetřený enzymem v prostředí 1x PBS s přídatkem vápníku. Při srovnání vzorků ošetřených enzymem a negativní kontroly (dráha 4) je opět viditelný pokles výšky signálu, značící odštěpení sekvence V5 a oligohistidinové značky.



**Obrázek 16** Ověření enzymatického štěpení metodou imunoblot s patientským sérem P15  
**A)** 1-EK + gp140 po 70 hod., 2-EK + gp140 po 48 hod., 3-EK + gp140 po 24 hod., 4-EK + gp140 po 70 hod., 5-EK + gp140 po 48 hod., 6-EK + gp140 po 24 hod., 7-EK + gp140 po 70 hod., 8-EK + gp140 po 48 hod., 9-EK + gp140 po 24 hod., 10-negativní kontrola. **B)** 1-EK + gp140 po 70 hod., 2-EK + gp140 po 48 hod., 3-EK + gp140 po 24 hod., 4-negativní kontrola. Ředění protilátky (1:100000), expoziční čas 5s.

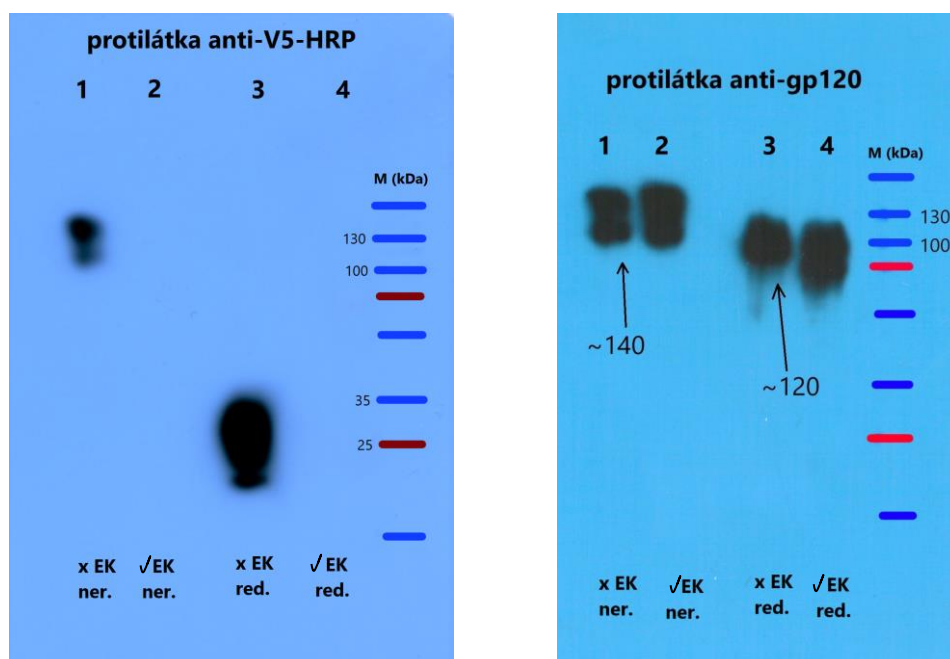
Po optimalizaci byl enterokinasou ošetřen veškerý exprimovaný protein a dle výsledků optimalizace inkubován s enzymem po dobu 48 hodin, aby došlo k odštěpení všech afinitních značek. Následně byly provedeny analýzy a srovnání pomocí metody Western-blot za použití různých protilátek.



**Obrázek 17** Srovnání proteinu gp140 SOSIP P4W CC\_EK před a po štěpení enterokinasou s detekcí anti-gp120. 1-protein neošetřený enterokinasou, 2-protein ošetřený enterokinasou před zakoncentrováním, 3-protein ošetřený enzymem po zakoncentrování v redukčním prostředí, 4-

protein ošetřený enzymem po zakoncentrování v neredukčním prostředí, 5- protein neošetřený enterokinasou, 6- protein ošetřený enterokinasou před zakoncentrováním, 7- protein ošetřený enzymem po zakoncentrování v redukčním prostředí, 8- protein ošetřený enzymem po zakoncentrování v neredukčním prostředí. Ředění protilátky 1:5000. Expoziční čas 10 s.

V drahách 1, 2 a 3 na obr. 17, do kterých byly nanášeny proteiny v redukčních podmínkách se nachází proužky odpovídající 120 kDa. V drahách 2 a 3, je proužek v poloze 90-100 kDa značí částečnou deglykosylaci či štěpení jinou proteasou. Vzorek ve čtvrté dráze je analyzován za neredukčních podmínek, nedochází tedy řádně k rozdělení trimerního proteinu na jednotlivé podjednotky, a proto se při analýzách často objevuje přesně neohraničený proužek.



**Obrázek 18 A) Analýza proteinu gp140 SOSIP P4W pomocí metody imunoblot s protilátkou anti-V5-HRP.** 1-protein neošetřený EK v neredukčním prostředí, 2-protein ošetřený EK v neredukčním prostředí, 3-protein neošetřený EK v redukčním prostředí, 4-protein ošetřený EK v redukčním prostředí, vzorky byly nanášeny v množství odpovídajícím 200 ng vzorku proteinu na jamku. Ředění protilátky 1:10000, expoziční čas 3 s. **B) Analýza proteinu gp140 SOSIP P4W pomocí metody imunoblot s protilátkou anti-gp120.** 1-protein neošetřený EK v neredukčním prostředí, 2-protein ošetřený EK v neredukčním prostředí, 3-protein neošetřený EK v redukčním prostředí, 4-protein ošetřený EK v redukčním prostředí, vzorky byly nanášeny v množství odpovídajícím 200 ng vzorku proteinu na jamku. Ředění protilátky 1:5000, expoziční čas 2 s.

V první dráze obrázku 18 A se nachází band ve výšce odpovídající velikosti 140 kDa a opět není band přesně ohraničen. V dráze druhé není viditelný žádný band, byl tam nanesen protein po odštěpení sekvence V5 a oligohistidinové značky. V dráze č. 3 je protein který nebyl ošetřen enzymem a je proto patrný výrazný signál v oblasti 25-35 kDa. Mezi vzorky nanesenými do druhé a třetí dráhy byla ponechána volná jamka, aby

se zamezilo případné nežádoucí redukci proteinu u vzorků v neredukčním prostředí. Po analýze byla membrána stripována a analyzována s protilátkou anti-gp120 aby byla prokázána přítomnost proteinu ve všech analyzovaných vzorcích (viz Obr 18 B).

V drahách 1 a 2 obrázku 18 B jsou vidět proužky odpovídající cca. 140 kDa a tedy glykoproteinu gp140 SOSIP P4W s coiled-coil kotvou. Ve třetí a čtvrté dráze jsou proteiny v redukčním prostředí a proužek odpovídá zhruba 120 kDa. U proteinu neošetřeného (3) a ošetřeného (4) lze pozorovat změnu v intenzitě signálu. Protein ošetřený enzymem se částečně deglykosyloval či štěpil, a proto je signál i ve výšce 90-100 kDa.

## 5 DISKUZE

HIV virus je příčinou syndromu imunodeficience AIDS, a i dlouho po jeho objevení stále nebyla vyvinuta efektivní vakcína. Podle současných poznatků o protekci by měla vakcína vyvolat tvorbu protilátek, schopných neutralizovat široké spektrum variant HIV-1 v populaci (tzv. bnAbs). Do hostitelské buňky se virus dostane díky navázání části glykoproteinu Env, podjednotky gp120, na CD4 receptor a následné fúzi za kterou zodpovídá další podjednotka Env, gp41 (Kovacs *et al.*, 2014). Vzhledem k tomu, jsou neutralizační protilátky cíleny na tyto podjednotky.

Mezi komplikace bránící konstrukci efektivní HIV vakcíny patří vysoká variabilita Env glykoproteinu. Dalším problémem je omezená schopnost naivních B-lymfocytů vázat vakcinační antigeny a po maturaci dát vzniknout bnAbs podobné těm které byly identifikovány u dlouhodobě odolných jedinců. V neposlední řadě musí být antigen v konformaci shodné s konformací jakou Env zaujímá na povrchu virionu, aby obsahoval správné protektivní epitopy pro neutralizaci. Env antigen je stabilní na povrchu virionu, ale sám o sobě stabilní není a je proto nutné ho stabilizovat, aby byl co nejpodobnější své nativní formě.

Jednou ze současných cest vedoucích stabilizaci biologicky relevantní konformaci je modifikace proteinu gp140 označovaná jako SOSIP, kdy je protein stabilizován pomocí záměrně vnesených cysteinů vytvářejících disulfidický můstek a záměnou aminokyseliny izoleucin za prolin v oblasti blízké místu štěpení prekurzoru gp160 na podjednotky gp120 a gp41 (Sanders *et al.*, 2002). Protein trimerizuje a zároveň je solubilní (Sanders *et al.*, 2013). Se stabilitou proteinu souvisí i již zmiňované správné složení proteinu, které je ovlivněno glykosylací a může být ovlivněno i připojením dalších sekvencí např. coiled-coil kotvy. Cílem práce bylo připravit rekombinantní glykoprotein gp140 SOSIP obsahující kotvu typu coiled-coil a základní charakterizace proteinu. Pro experimentální část byla použita varianta glykoproteinu Env identifikovaná u pacienta nacházejícího se v chronické fázi infekce HIV-1 subtypu B.

Pro odstranění pomocných značek (His a V5) ve struktuře proteinu byl využit enzym enterokinasa, která je pro tyto účely často využívána podobně jako trombin (Waugh, 2011). Ke štěpení dochází v prostředí vhodném pro tento enzym, do kterého musí být protein převeden. Při manipulaci s proteinem však většinou dochází k nežádoucím

ztrátám a ideální by proto bylo minimalizovat převádění proteinu do dalších roztoků. Eluční pufr používaný při purifikaci však obsahuje imidazol, ve kterém je enterokinasa téměř inaktivní. Jak ale ukázaly výsledky, je možné provést enzymatické štěpení v prostředí 1x PBS s přidavkem vápníku bez nutnosti převedení proteinu do pufru pro enterokinasu a až následně do 1xPBS. Omezením nadbytečné manipulace se rovněž můžeme vyvarovat částečné degradace či deglykosylace proteinu.

Připravený antigen je použitelný nejen pro přípravu vakcíny, ale rovněž umožňuje srovnáním s analogickým proteinem z akutní fáze HIV infekce studovat např. rozdíl mezi glykosylací časně a pozdní varianty Env u téhož pacienta, rozdíly mezi stabilitou jednotlivých rekombinantních Env proteinů, rozdíly v reaktivitě časně a chronické varianty Env s různými mononukleárními protilátkami, rozdíly ve vazbě sér HIV-1 pozitivních pacientů a rozdíly v indikované imunitní odpovědi experimentálních zvířat po různé kombinaci Env z časně a pozdní fáze či variant s cíleně modifikovanou glykosylací. Protein připravený v rámci realizace předložené diplomové práce byl již pro uvedené imunizační experimenty použit a krátká budoucnost několika týdnů ukáže biologický dopad a potvrzení či vyvrácení hypotéz, které jsou s jeho pomocí nyní testovány.

Největším úspěchem v oblasti vývoje vakcíny proti HIV je klinická studie, která prokázala cca. 30% účinnost. (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Ačkoliv se stále zlepšuje napodobení nativní formy Env glykoproteinu z hlediska multimerizace, konformace atd. jak demonstruje právě modifikace SOSIP, otázkou zůstávají postupy, které stimulují naivní B-lymfocyty k tvorbě bnAbs. V této oblasti zaznamenal poslední výzkum značný pokrok a zdá se, že detailní imunologické a proteinově strukturní analýzy vytyčily cestu k přípravě úspěšné vakcíny, ačkoliv dosud otestované pouze na zvířecím modelu.

## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala problematikou rekombinantních proteinů, jejich přípravou a metodami purifikace. Dále popisem viru HIV a možností vývoje vakcín včetně zmínek o překážkách, které tomuto vývoji stojí v cestě. Poslední část literární rešerše byla věnována liposomům, jejich charakterizaci, metodám přípravy a využití.

V experimentální části byl navrhnout plasmid kódující protein gp140 SOSIP P4W s coiled-coil kotvou, V5 a oligohistidinovou značkou. Tento plasmid byl připraven metodou molekulárního klonování z plasmidu obsahujícího SPM modul. DNA byla osekvenována a plasmid amplifikován. Transfekována byla eukaryotická buněčná linie HEK 293F. Rekombinantní protein gp140 ve variantě SOSIP byl úspěšně purifikován metodou metalochelatační chromatografie a charakterizován pomocí metod SDS-PAGE a Western blot. Pro odštěpení pomocných značek byla použita předem inkorporovaná sekvence rozpoznávána enterokinasou. Pro štěpení je nutné protein převést do vhodného prostředí, což má za následek ztráty proteinu a jeho částečnou deglykosylaci. Z těchto důvodů byla metoda optimalizována pro různá prostředí. Protein získaný po odštěpení pomocných značek je nyní připraven k dalším analýzám nebo přípravě vakcín pomocí navázání na proteonanoliposomy.

## 7 LITERATURA

- Ahn, S. and Sung, Y. (2009) 'AIDS Vaccine Development : the Past , the Present , and the Future', (Table I), pp. 5–7.
- Akbarzadeh, A. *et al.* (2013) 'Liposome: classification, preparation, and applications.', *Nanoscale research letters*. Springer, 8(1), p. 102. doi: 10.1186/1556-276X-8-102.
- Alberts, B. *et al.* (2014) *Molecular Biology of the Cell 6e*, Garland Science. doi: 10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.
- Andersen, D. C. and Krummen, L. (2002) 'Recombinant protein expression for therapeutic applications', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, 13(2), pp. 117–123. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00300-2.
- Apostolovic, B., Danial, M. and Klok, H.-A. (2010) 'Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials', *Chemical Society Reviews*, 39(9), p. 3541. doi: 10.1039/b914339b.
- Applications of recombinant proteins* (2017). Available at: <https://www.cusabio.com/c-20272.html> (Accessed: 6 March 2018).
- Arnau, J. *et al.* (2006a) 'Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins', *Protein Expression and Purification*. Academic Press, 48(1), pp. 1–13. doi: 10.1016/J.PEP.2005.12.002.
- Arnau, J. *et al.* (2006b) 'Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins', *Protein Expression and Purification*. Academic Press, 48(1), pp. 1–13. doi: 10.1016/J.PEP.2005.12.002.
- Arthur, L. O. *et al.* (1992) 'Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines.', *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), pp. 1935–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470916> (Accessed: 22 November 2017).
- Bolanos-Garcia, V. M. and Davies, O. R. (2006) 'Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(9), pp. 1304–1313. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.027.
- Bonomelli, C. *et al.* (2011) 'The glycan shield of HIV is predominantly oligomannose independently of production system or viral clade.', *PloS one*. Public Library of Science, 6(8), p. e23521. doi: 10.1371/journal.pone.0023521.
- Bornhorst, J. A. and Falke, J. J. (2000) 'Purification of proteins using polyhistidine affinity tags.', *Methods in enzymology*. NIH Public Access, 326, pp. 245–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036646> (Accessed: 5 March 2018).
- Briggs, J. A. G. *et al.* (2003) 'Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 22(7), pp. 1707–15. doi: 10.1093/emboj/cdg143.
- Burton, D. R. *et al.* (2004) 'HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem', *Nature Immunology*, 5(3), pp. 233–236. doi: 10.1038/ni0304-233.
- Burton, D. R. *et al.* (2012) 'A blueprint for HIV vaccine discovery', *Cell Host Microbe*, 12(4), pp. 396–407. doi: 10.1016/j.chom.2012.09.008.A.
- Calarota, S. A. and Weiner, D. B. (2003) 'Present status of human HIV vaccine development.', *AIDS (London, England)*, 17 Suppl 4, pp. S73-84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15080183> (Accessed: 7 March 2018).
- Cohen, J. (2003) 'Public health. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 299(5611), pp. 1290–1. doi: 10.1126/science.299.5611.1290.
- Cyster, J. G. (2010) 'B cell follicles and antigen encounters of the third kind', *Nature Immunology*, 11(11), pp. 989–996. doi: 10.1038/ni.1946.
- Dhawan, G. (2015) *About Ultrafiltration Technical Article | Applied Membranes Inc.* Available at: [https://www.appliedmembranes.com/media/wysiwyg/pdf/membranes/about\\_ultrafiltration\\_technical\\_article.pdf](https://www.appliedmembranes.com/media/wysiwyg/pdf/membranes/about_ultrafiltration_technical_article.pdf) (Accessed: 6 March 2018).
- Eloy, J. O. *et al.* (2014) 'Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to



- enhance encapsulation and delivery', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, 123, pp. 345–363. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2014.09.029.
- Epstein, F. H. and Greene, W. C. (1991) 'The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection', *New England Journal of Medicine*, 324(5), pp. 308–317. doi: 10.1056/NEJM199101313240506.
- Feeney, M. E. *et al.* (2005) 'HIV-1 viral escape in infancy followed by emergence of a variant-specific CTL response.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(12), pp. 7524–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944251> (Accessed: 7 March 2018).
- Flynn, N. M. *et al.* (2005) 'Placebo-Controlled Phase 3 Trial of a Recombinant Glycoprotein 120 Vaccine to Prevent HIV-1 Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 191(5), pp. 654–665. doi: 10.1086/428404.
- Gallo, R. C. (2005) 'The end or the beginning of the drive to an HIV-preventive vaccine: a view from over 20 years', *The Lancet*, 366(9500), pp. 1894–1898. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67395-3.
- Garber, D. A., Silvestri, G. and Feinberg, M. B. (2004) 'Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers', *The Lancet Infectious Diseases*, 4(7), pp. 397–413. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01056-4.
- Gene Transfer | BioNinja* (no date). Available at: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/gene-transfer.html> (Accessed: 6 March 2018).
- German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood', G. A. C. B. (Arbeitskreis and Blood', S. 'Assessment of P. T. by (2016) 'Human Immunodeficiency Virus (HIV).', *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. Karger Publishers, 43(3), pp. 203–22. doi: 10.1159/000445852.
- Girard, M. P., Osmanov, S. K. and Kieny, M. P. (2006) 'A review of vaccine research and development: The human immunodeficiency virus (HIV)', *Vaccine*, 24, pp. 4062–4081. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.02.031.
- Go, E. P. *et al.* (2011) 'Characterization of glycosylation profiles of HIV-1 transmitted/founder envelopes by mass spectrometry.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 85(16), pp. 8270–84. doi: 10.1128/JVI.05053-11.
- Gonzalez, S. F. *et al.* (2011) 'Trafficking of B Cell Antigen in Lymph Nodes', *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp. 215–233. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101255.
- Goulder, P. J. R. and Watkins, D. I. (2004) 'HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design', *Nature Reviews Immunology*, 4(8), pp. 630–640. doi: 10.1038/nri1417.
- Greenwood, B. (2014) 'The contribution of vaccination to global health: past, present and future.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 369(1645), p. 20130433. doi: 10.1098/rstb.2013.0433.
- Grundner, C. *et al.* (2005) 'Analysis of the neutralizing antibody response elicited in rabbits by repeated inoculation with trimeric HIV-1 envelope glycoproteins', *Virology*, 331(1), pp. 33–46. doi: 10.1016/j.virol.2004.09.022.
- Hagel, L. (2001) 'Gel-Filtration Chromatography', in *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. Unit 10.9. doi: 10.1002/0471142727.mb1009s44.
- Immordino, M. L., Dosio, F. and Cattel, L. (2006) 'Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential.', *International journal of nanomedicine*. Dove Press, 1(3), pp. 297–315. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717971> (Accessed: 7 March 2018).
- Jardine, J. G. *et al.* (2016) 'HIV-1 broadly neutralizing antibody precursor B cells revealed by germline-targeting immunogen.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 351(6280), pp. 1458–63. doi: 10.1126/science.aad9195.
- Knecht, S. *et al.* (2009) 'Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni<sup>2+</sup>-NTA surfaces', *Journal of Molecular Recognition*, 22(4), pp. 270–279. doi: 10.1002/jmr.941.
- Kong, L. and Sattentau, Q. J. (2012) 'Antigenicity and Immunogenicity in HIV-1 Antibody-Based Vaccine Design', *J AIDS Clinic Res*, S8, pp. 1–23. doi: 10.4172/2155-6113.Antigenicity.
- Kovacs, J. M. *et al.* (2014) 'Stable, uncleaved HIV-1 envelope glycoprotein gp140 forms a tightly folded trimer with a native-like structure.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(52), pp. 18542–7. doi: 10.1073/pnas.1422269112.
- Kwong, P. D. *et al.* (2002) ‘HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites’, *Nature*, 420(6916), pp. 678–682. doi: 10.1038/nature01188.
- Lemey, P. *et al.* (2003) ‘Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), pp. 6588–6592. doi: 10.1073/pnas.0936469100.
- Li, M. *et al.* (2005) ‘Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies.’, *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 79(16), pp. 10108–25. doi: 10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005.
- Mason, J. M. and Arndt, K. M. (2004) ‘Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications’, *ChemBioChem*. WILEY-VCH Verlag, 5(2), pp. 170–176. doi: 10.1002/cbic.200300781.
- McGuire, A. T. *et al.* (2013) ‘Engineering HIV envelope protein to activate germline B cell receptors of broadly neutralizing anti-CD4 binding site antibodies’, *The Journal of Experimental Medicine*, 210(4), pp. 655–663. doi: 10.1084/jem.20122824.
- Medina-Ramírez, M. *et al.* (2017) ‘Design and crystal structure of a native-like HIV-1 envelope trimer that engages multiple broadly neutralizing antibody precursors in vivo.’, *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller University Press, 214(9), pp. 2573–2590. doi: 10.1084/jem.20161160.
- Mergulhão, F. J. M., Summers, D. K. and Monteiro, G. A. (2005) ‘Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*’, *Biotechnology Advances*. Elsevier, 23(3), pp. 177–202. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2004.11.003.
- Merk, A. and Subramaniam, S. (2013) ‘HIV-1 envelope glycoprotein structure.’, *Current opinion in structural biology*. NIH Public Access, 23(2), pp. 268–76. doi: 10.1016/j.sbi.2013.03.007.
- Michael, N. L. (1999) ‘Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis’, *Current Opinion in Immunology*, 11(4), pp. 466–474. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80078-8.
- Monteiro, N. *et al.* (2014) ‘Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine.’, *Journal of the Royal Society, Interface*. The Royal Society, 11(101), p. 20140459. doi: 10.1098/RSIF.2014.0459.
- Nascimento, I. P. and Leite, L. C. C. (2012) ‘Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies’, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), pp. 1102–1111. doi: 10.1590/S0100-879X2012007500142.
- Nath, A. (2002) ‘Human Immunodeficiency Virus (HIV) Proteins in Neuropathogenesis of HIV Dementia’, *The Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press, 186(s2), pp. S193–S198. doi: 10.1086/344528.
- Palmer, I. and Wingfield, P. T. (2004) ‘Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*.’, *Current protocols in protein science*. NIH Public Access, Chapter 6, p. Unit 6.3. doi: 10.1002/0471140864.ps0603s38.
- Parren, P. W. *et al.* (1999) ‘The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.’, *AIDS (London, England)*, 13 Suppl A, pp. S137–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885772> (Accessed: 7 March 2018).
- Patil, Y. P. and Jadhav, S. (2014) ‘Novel methods for liposome preparation’, *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, pp. 8–18. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011.
- Petsch, D. and Anspach, F. B. (2000) ‘Endotoxin removal from protein solutions.’, *Journal of biotechnology*, 76(2–3), pp. 97–119. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656326> (Accessed: 3 January 2018).
- Raska, M. *et al.* (2010) ‘Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition.’, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(27), pp. 20860–9. doi: 10.1074/jbc.M109.085472.
- Raska, M. *et al.* (2014) ‘Differential glycosylation of envelope gp120 is associated with differential recognition of HIV-1 by virus-specific antibodies and cell infection.’, *AIDS research and therapy*. BioMed Central, 11, p. 23. doi: 10.1186/1742-6405-11-23.
- Raska, M. and Novak, J. (2010) ‘Involvement of Envelope-Glycoprotein Glycans in HIV-1 Biology and Infection’, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. SP Birkhäuser Verlag

- Basel, 58(3), pp. 191–208. doi: 10.1007/s00005-010-0072-3.
- Raška, M. *et al.* (2010) ‘ŠKOLA MOLEKULÁRNÍCH BIOTECHNOLOGIÍ’, *Profession. Olomouc*. Available at: [http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/SMB\\_Profession\\_Teorie.pdf](http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/SMB_Profession_Teorie.pdf) (Accessed: 3 January 2018).
- Rerks-Ngarm, S. *et al.* (2009) ‘Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand’, *New England Journal of Medicine*, 361(23), pp. 2209–2220. doi: 10.1056/NEJMoa0908492.
- Roosendaal, R. *et al.* (2009) ‘Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles.’, *Immunity*. NIH Public Access, 30(2), pp. 264–76. doi: 10.1016/j.immuni.2008.12.014.
- Sahil, K. *et al.* (2011) ‘STEALTH LIPOSOMES: A REVIEW’, *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(5), pp. 1534–1538. Available at: [http://www.ijrap.net/admin/php/uploads/650\\_pdf.pdf](http://www.ijrap.net/admin/php/uploads/650_pdf.pdf) (Accessed: 7 March 2018).
- Salim, M. *et al.* (2014) ‘Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics’, *Med. Chem. Commun.* The Royal Society of Chemistry, 5(11), pp. 1602–1618. doi: 10.1039/C4MD00085D.
- Sanders, R. W. *et al.* (2002) ‘Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1.’, *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 76(17), pp. 8875–89. doi: 10.1128/JVI.76.17.8875-8889.2002.
- Sanders, R. W. *et al.* (2013) ‘A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies’, *PLoS Pathogens*. Edited by A. Trkola. Public Library of Science, 9(9), p. e1003618. doi: 10.1371/journal.ppat.1003618.
- Shaheen, S. *et al.* (2006) ‘Liposome as a Carrier for Advanced Drug Delivery’, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(6), pp. 1181–1191. Available at: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2006/1181-1191.pdf> (Accessed: 7 March 2018).
- Sharma, A. and Sharma, U. S. (1997) ‘Liposomes in drug delivery: progress and limitations’, *International Journal of Pharmaceutics*, 154(123). Available at: [https://ac.els-cdn.com/S037851739700135X/1-s2.0-S037851739700135X-main.pdf?\\_tid=23ac2edd-4c50-4f46-a1b4-2f2a8d20840a&acdnat=1520416559\\_49dfe2ed014861a7f9da36ec066a5110](https://ac.els-cdn.com/S037851739700135X/1-s2.0-S037851739700135X-main.pdf?_tid=23ac2edd-4c50-4f46-a1b4-2f2a8d20840a&acdnat=1520416559_49dfe2ed014861a7f9da36ec066a5110) (Accessed: 7 March 2018).
- Shin, S. Y. (2016) ‘Recent update in HIV vaccine development.’, *Clinical and experimental vaccine research*. Korean Vaccine Society, 5(1), pp. 6–11. doi: 10.7774/cevr.2016.5.1.6.
- Singh, A. *et al.* (2015) ‘Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process.’, *Microbial cell factories*. BioMed Central, 14, p. 41. doi: 10.1186/s12934-015-0222-8.
- Soler, E. and Houdebine, L.-M. (2007) ‘Preparation of recombinant vaccines’, in *Biotechnology annual review*, pp. 65–94. doi: 10.1016/S1387-2656(07)13004-0.
- Spriestersbach, A. *et al.* (2015) ‘Purification of His-Tagged Proteins’, in *Methods in enzymology*, pp. 1–15. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.003.
- Stanley, B. J. *et al.* (2008) ‘Structural Insight into the Human Immunodeficiency Virus Vif SOCS Box and Its Role in Human E3 Ubiquitin Ligase Assembly’, *Journal of Virology*, 82(17), pp. 8656–8663. doi: 10.1128/JVI.00767-08.
- Terpe, K. (2003) ‘Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), pp. 523–533. doi: 10.1007/s00253-002-1158-6.
- Turánek, J. (2016) *Liposomy pro konstrukci cílených terapeutik a vakcín*. Masarykova univerzita.
- Turner, B. G. and Summers, M. F. (1999) ‘Structural biology of HIV’, *Journal of Molecular Biology*, 285(1), pp. 1–32. doi: 10.1006/jmbi.1998.2354.
- U.S. Department of Health and Human Services (no date) *Envelope | Definition | AIDInfo*. Available at: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/230/envelope> (Accessed: 25 April 2018).
- Verma, R., Boleti, E. and George, A. J. . (1998) ‘Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems’, *Journal of Immunological Methods*. Elsevier,

- 216(1–2), pp. 165–181. doi: 10.1016/S0022-1759(98)00077-5.
- Waugh, D. S. (2011) ‘An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags.’, *Protein expression and purification*. NIH Public Access, 80(2), pp. 283–93. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.005.
- Wei, X. *et al.* (2003) ‘Antibody neutralization and escape by HIV-1’, *Nature*, 422(6929), pp. 307–312. doi: 10.1038/nature01470.
- Wyatt, R. and Sodroski, J. (1998) ‘The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens.’, *Science (New York, N.Y.)*, 280(5371), pp. 1884–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632381> (Accessed: 7 March 2018).
- Yin, J. *et al.* (2007) ‘Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes’, *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 127(3), pp. 335–347. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2006.07.012.
- Zouhar, J. (1999) ‘Afinní chromatografie na vázaných kovových iontech’, *Chem. Listy*, 93, pp. 683–685. Available at: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_11\\_683-685.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_11_683-685.pdf) (Accessed: 6 March 2018).

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
bnAb	<i>broadly neutralizing antibody</i>
CBB	Coomassie Blue Brilliant
<i>env/Env</i>	<i>envelope gene/obalový glykoprotein</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Gag	virový protein
<i>Gag</i>	<i>group specific antigen gene</i>
gp120	glykoprotein 120
gp41	glykoprotein 41
gp160	glykoprotein 160
HBV	hepatitida B
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
LUV	velké unilamelární vesikuly
MLV	multilamelární vesikuly
p17	matricový protein
p7	nukleokapsidový protein
p9	virová proteasa
p24	kapsidový protein
p38	virová integráza
p51/p66/RT	virová reverzní transkriptáza
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	polyethylenglykol
SUV	malé unilamelární vesikuly
<i>Pol</i>	<i>DNA polymerase gen</i>
WHO	světová zdravotnická organizace

## 9 PŘÍLOHY

Návrh oligonukleotidů:

Forward:

5' AATTCGTGGCAGCGCTGAAAGAGAAGGTTGCGGCCTTGAAAGAGAAGGTGGCGG  
CACTGAAAGAAAAGGTCGCCGCTCTGAAAGAGAAGGATGACGATGACAAGC 3'

Reverse:

5' TCGAGCTTGTTCATCGTCATCCTTCTCTTTTCAGAGCGGCGACCTTTTCTTTTCAGTGC  
CGCCACCTTCTCTTTCAAGGCCGCAACCTTCTCTTTTCAGCGCTGCCACG 3'

Sekvence plasmidu:

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTG  
ATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGT  
AGTGC GCGAGCAAAATTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCAT  
GAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGAT  
ATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAT  
TAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC  
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC  
ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTA  
AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG  
ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG  
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG  
CGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCC  
AAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGG  
ACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT  
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGC  
TTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGT  
TAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGCGCCACCATGGTGCTGCAGACCCAGGTGT  
TCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCGAGAACCTGTGGGTGACC  
GTGTACTACGGCGTGCCCGTGTGGAAGGAGGCCACCACCACCTGTTCTGCGCCAG  
CGACGCCAAGGCCTACGACACCGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCCACGCCTGC  
GTGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGCTGGAGAACGTGACCGAGAACTT  
CAACATGTGGAAGAACAACATGGTGGAGCAGATGCACGAGGACATCATCAGCCTG  
TGGGACCAGAGCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACCCCTGTGCGTGACCCTGAA  
CTGCACCAACGTGAACGTGACCAACCTGAAGAACGAGACCAACACCAAGAGCAGC  
AGCGGCGGCGAGAAGATGGAGGAGGGCGAGATGAAGAAGTGCAGCTTCAACGTGA  
CCACCCTGATCAGAAACGAGAGAAAGACCGAGTACGCCCTGTTCTACAAGCTGGAC  
GTGATGCCCATCGACAACGACAACACCAGCTACACCCTGATCAACTGCAACAGCAG  
CACCATACCCAGGCCTGCCCCAAGGTGAGCTTCGAGCCATCCCCATCCACTTCTG  
CGCCCCGCGGGCTTCGCCATCCTGAAGTGCAACGACAAGAAGTTCAACGGCACCG  
GCCCTGCAAGAACGTGAGCACCGTGCAGTGCACCCACGGCATCAGACCCGTGGTG  
AGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGCAGCTGGCCGAGGAGGACATCGTGATCAGAA  
GCGAGAACTTCACCGACAACGCCAAGAACATCATCGTGCAGCTGAACGTGAGCATC  
GGCATCAACTGCATCAGACCCAACAACAACACCAGAAAAGAGAATCACCCCTGGGCC  
CCGGCAGAGTGCTGTACACCACCGCGAGATCATCGGCGACATCAGAAGAGCCCA  
CTGCAACCTGAGCAGAACCAGCTGGAACAACACCCTGAAGCAGATCGTGAAAAG  
CTGAGAGAGATGGAGCAGTTCAAGAACAAGACCATCGTGTTCAAGCAGAGCAGCG  
GCGGCGACCCCGAGATCGTGATGCACAGCTTCAACTGCGGCGGCGAGTTCTTCTAC  
TGCAACAGCACCCAGCTGTTCAACAGCACCTGGAACGCCACCGGCACCTGGAACAA  
GACCGAGGGCGCCGACAACAACATCACCCCTGCCCTGCAGAATCAAGCAGATCATC  
AACAGATGGCAGGAGGTGGGCAAGGCCATGTACGCCCCCCCCATCGAGGGCCAGA  
TCAGATGCCTGAGCAACATCACCGGCCTGCTGCTGACCAGAGACGGCGGCAGCAGC

AAGGACAACCAGACCGAGATCTTCAGACCCGGCGGGCGGCAACATGAAGGACA  
ACTGGAGAAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGATCGAGCCCCTGGGCGTGGC  
CCCCACCAAGTGTAAAGCGTCGTGTGGTTCAGCGCCGCCGCGCAGACGGGCAGTGG  
GGATGCTGGGTGCCATGTTTCTCGGTTTCTGGGCGCAGCCGGTAGCACTATGGGA  
GCAGCCTCTATGACTTTGACTGTTCAAGGCGCGGCTCTTGCTGTCCGGTATCGTGCAA  
CAGCAAAACAACCTGTTGCGCGCGCCTGAGGCTCAGCAGCACTTGCTGCAGCTGAC  
CGTGTGGGGTATCAAGCAGCTGCAAGCTAGAGTGCTGGCAGTTGAGCGCTACCTGA  
AGGACCAGCAGCTGCTGGGGATCTGGGGCTGTTCCGGTAAGCTCATTGCTGTACC  
ACCGTGCCTTGAATGCCAGCTGGAGCAACAGGTCCCAGGACCATATTTGGAATAA  
CATGACATGGATGGAGTGGGAGCGGAGATCAATAATTACACCGGCCTCATCTACA  
ACCTGATCGAAGAGTCCCAAATCAGCAGGAAAAAACGAACAGGAGCTGCTGGA  
GCTGGACGAATTCGTGGCAGCGCTGAAAGAGAAGGTTGCGGCCTTGAAGAGAAG  
GTGGCGGCACTGAAAGAAAAGGTCGCCGCTCTGAAAGAGAAGGATGACGATGACA  
AGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTGAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTC  
GGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGC  
TGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCC  
GTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTCTCTAATAAAATGAG  
GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG  
GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG  
GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCC  
CCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCG  
TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTT  
TCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCTCCGTCAGCTCTAAATCGGGGCATCCCTTTAGG  
GTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATG  
GTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGGACGTTGGAGT  
CCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT  
CGGTCTATTCTTTTGAATTAATAAGGGATTTTGGGGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAA  
ATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTT  
AGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCA  
TCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAA  
GTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCG  
CCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTA  
ATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG  
TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTG  
TATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTG  
AACAAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGC  
TATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC  
AGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATG  
AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGC  
GCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGA  
AGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCAT  
CATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCG  
ACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTCCGGATGGAAGCCGGTCTT  
GTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTT  
CGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCG  
ATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACT  
GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGAT  
ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATC  
GCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA  
GCGGGACTCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCAC  
GAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCC  
GGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCC  
CACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC  
AAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACT  
CATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTA

ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAA  
CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA  
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC  
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCG  
CTCTTCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGTTCGGTTCGGGCGAGC  
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG  
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG  
CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC  
GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT  
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA  
CCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAG  
GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC  
CGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGT  
AAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG  
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAA  
GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTG  
TTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC  
TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGT  
CATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTT  
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT  
CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCCTGACT  
CCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG  
CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAG  
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCA  
GTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCG  
CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGC  
TTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTG  
CAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCG  
CAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCAT  
CCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT  
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA  
CATAGCAGA ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC  
CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAA  
CTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAG  
GCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA  
CTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT  
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC  
CGAAAAGTGCCACCTGACGTC

ORF:MVLQQTQVFISLLLWISGAYGENLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEV  
HNVWATHACVPTDPNPQEVVLENTENFNMWKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVK  
LTPLCVTLNCTNVNVTNLKNETNTKSSSGGEKMEEGEMKNCSFNVTTLIRNERKTEYA  
LFYKLDVMPIDNDNTSYTLINCNSSTITQACPKVSFEPIPIHFCAPAGFAILKCNDDKFN  
TGPCKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEDIVIRSENFTDNAKNIIVQLNVSIGINCI  
RPNNNTRKRITLGPGRVLYTTGEIIGDIRRAHCNLSRTSWNNTLKQIVEKLREMEQFKN  
KTIVFKQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWNATGTWNKTEGADNNITLPC  
RIKQIINRWQEVGKAMYAPPIEGQIRCLSNITGLLLTRDGGSSKDNQTEIFRPGGGMKD  
NWRSELKYKYKVVKIEPLGVAPTCKRRRVVQRRRRRRAVGM LGAMFLGFLGAAGSTM  
GAASMTLTVQARLLSGIVQQQNNLLRAPEAQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYL  
KDQQLGIWGC SGKLICCTTPWNASWSNRSQDHIWNNMTWMEWEREINNYTGLIYN  
LIEESQNQOEKNEQELLEDEFVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKEKDDDDKLE  
SRGPAVRGKPIP NPLLGLDSTRTGHHHHH