UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Produkce HIV–1 pseudovirových částic

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Patrik Hrubčík**
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.**
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen 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 ..... ……..

Patrik Hrubčík

Rád bych poděkoval vedoucímu práce Mgr. Petru Kosztyu, Ph.D. za cenné rady, doporučení, připomínky, trpělivost, pozitivní náladu a vedení při vypracování teoretické i experimentální části. Mé poděkování patří rovněž Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého za možnost realizace experimentální části práce a výzkumné skupině imunomodulace za přátelský přístup a ochotu pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Patrik Hrubčík
Název práce	Produkce HIV–1 pseudovirových částic
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Teoretická část práce se zabývá HIV–1. Virus je charakterizován s popisem struktury a funkce jednotlivých proteinů. Rozebrány jsou mechanismy, které virus využívá pro únik imunitnímu dohledu, jakož i jeho životní (replikační) cyklus. Větší pozornost je věnována povrchovým glykoproteinům gp41 a gp120, které jsou zásadní pro schopnost HIV–1 infikovat cílovou buňku. Je popsána jejich struktura a významné antigenní determinanty, které jsou potenciálními cíli tzv. široce neutralizujících protilátek, schopných zabránit vstupu viru do buňky u širokého spektra virových kmenů. Široce neutralizující protilátky jsou charakterizovány společně s principem jejich tvorby, mechanismem působení a budoucností možné vakcíny proti HIV–1.

Experimentální část si klade za cíl vyprodukovat sadu HIV–1 pseudovirových částic, které bude následně možno využít při neutralizačních experimentech, kdy se měří neutralizační aktivita široce neutralizačních protilátek. Pomocí metod molekulární biologie jako je transformace bakterií, izolace nukleových kyselin, transfekce na bázi liposomů, titrace pseudovirů a měření luminiscence, byly pseudoviry vyprodukovány a otestovány. Nakonec bylo zjištěno potřebné ředění pseudovirových titrů pro standardní využití při testování neutralizační aktivity protilátek. Infektivita působení byla otestována jako míra luminiscence způsobená štěpením luciferinu, který slouží jako substrát pro luciferasu produkovanou indikátorovými buňkami v důsledku vazby pseudoviru.

Klíčová slova	HIV–1, pseudovirové částice, virus, široce neutralizační protilátky, glykoprotein gp41/gp120, plasmid

Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Patrik Hrubčík
Title	Production of HIV–1 pseudotyped viruses
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Petr Kosztyu, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

The theoretical part of the work deals with HIV-1. The virus is characterized by descriptions of the structure and function of individual proteins. The mechanisms the virus uses to escape immune surveillance, as well as its life (replication) cycle, are depicted. Greater attention is paid to gp41 and gp120 superficial glycoproteins, which are essential for the ability of HIV-1 to infect the target cell. Their structure and major antigenic determinants are described as potential targets for so-called broadly neutralizing antibodies, capable of preventing virus entry into the cell in a wide range of virus strains. Broadly neutralising antibodies are characterised together with the principle of their formation, the mechanism of action and the future of a possible HIV-1 vaccine.

The experimental part aims to produce a set of HIV-1 pseudo-viral particles that can subsequently be used in neutralization experiments, when the neutralizing activity of broadly neutralizing antibodies is measured. Using molecular biology methods such as bacterial transformation, nucleic acid isolation, liposome-based transfections, pseudovirus titration and luminescence measurements, pseudoviruses were produced and tested. Finally, the necessary dilution of pseudoviral titres, for standard use in antibody neutralization activity testing, was calculated. Infectivity of pseudotyped viruses was tested as a measure of luminescence due to the cleavage of luciferin, which serves as a substrate for luciferase produced by indicator cells in response to pseudovirus binding.

Keywords	HIV-1, pseudoviral particles, virus, broadly neutralizing antibodies, glycoprotein gp41/gp120, plasmid
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD 12

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 13

2.1 Charakterizace a původ HIV 13
2.2 Struktura HIV–1 13
2.2.1 Regulační a doplňkové proteiny 14
2.2.2 Proteiny s enzymatickou funkcí 18
2.2.3 Strukturní proteiny 18
2.3 Struktura povrchových glykoproteinů 20
2.3.1 Glykoprotein gp41 20
2.3.2 Glykoprotein gp120 23
2.4 Replikační cyklus HIV–1 24
2.4.1 Vstup HIV–1 do cílové buňky 25
2.4.2 Reverzní transkripce 26
2.4.3 Integrace virové DNA do hostitelského genomu 27
2.4.4 Proteosyntéza virových proteinů 28
2.4.5 Tvorba nových virových částic 28
2.5 HIV–1 neutralizační protilátky 30
2.5.1 Rysy široce neutralizačních protilátek 30
2.5.2 Studium neutralizačních protilátek 31
2.5.3 Hlavní oblasti antigenních determinant a jejich bnAb 32
2.6 Vakcína proti HIV–1 35
2.6.1 Vakcinační strategie a vývoj vakcíny proti HIV–1 35
2.6.2 Budoucnost HIV–1 vakcíny 37

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 38

3.1 Materiál 38
3.1.1 Biologický materiál 38
3.1.2 Chemikálie 38
3.1.3 Složení roztoků 39
3.1.4 Komerční soupravy 39
3.1.5 Přístrojové vybavení 39
3.1.6 Spotřební materiál 40
3.1.7 Software 41
3.2 Metody 42
3.2.1 Příprava agaru 42

3.2.2 Příprava plasmidů 42
3.2.3 Transformace bakterií 42
3.2.4 Selekce kolonie 43
3.2.5 Izolace a purifikace plasmidové DNA 43
3.2.6 Transfekce buněk 293T/17 45
3.2.7 Titrace pseudovirů 46
3.2.8 Měření luminiscence 47

4 VÝSLEDKY A DISKUSE 48

4.1 Plasmid 48
4.2 Koncentrace plasmidové DNA 49
4.3 Transfekce buněk 293T/17 49
4.4 Titrace pseudovirových částic 50
4.4.1 Kvantifikace buněk TZM – bl 50
4.4.2 Měření luminiscence 50

5 ZÁVĚR 55

6 LITERATURA 56

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 61

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Zpracování literární rešerše na téma HIV–1 (struktura viru, HIV–1 neutralizační protilátky, jejich tvorba a význam, vývoj vakcíny proti HIV–1).

Experimentální část

Transformace bakterií, izolace plasmidu, transfekce savčích buněk a produkce pseudovirů, titrace pseudovirů s využitím cílových buněk TZM–bl.

1 ÚVOD

HIV–1, jako jeden z nejrozšířenějších virů, se v lidské populaci pohybuje již 4 desetiletí, stále však není dostatečně probádán. Virus napadá, pro imunitní systém zásadní, T_H– lymfocyty, ale také dendritické buňky či makrofágy. V důsledku toho se koncentrace těchto buněk v organismu při napadení virem razantně snižuje a postupně selhávají obranné reakce proti dalším patogenům. V konečném stádiu vede infekce k rozvoji onemocnění AIDS, tedy totálnímu selhání imunitního systému a postižený se není schopen bránit invazi různých patogenních organismů a částic. Onemocnění se však rozvíjí i řadu let, až desetiletí od infekce. V současnosti probíhá v laboratořích po celém světě intenzivní výzkum vývoje účinné vakcíny proti tomuto viru. Ten je založen zejména na tvorbě široce neutralizujících protilátek, které jsou schopny neutralizace, tj. inaktivace virových částic a tím zamezení infekce. Takové protilátky jsou produkovány u HIV – pozitivních pacientů, až po několika letech od nákazy. Důvodem je zřejmě vystavení imunitního systému a setkání orgasnismu s mnoha kmeny viru. HIV–1 intenzivně podléhá mutacím a dalším změnám, které způsobují značnou divergenci různých virových kmenů. Vakcína by měla být schopna navodit tvorbu široce neutralizujících protilátek během krátké doby. V současnosti je výzkum podstaty vakcíny orientován na povrchové glykoproteiny HIV–1, které jsou v nativním viru nositely významných antigenních determinant, jež představují potenciální cíl vazby protilátek. Při experimentech jsou nejčastěji využívány různé formy rekombinantně připravených variant těchto proteinů. Významným problémem je jejich glykosylace, která je navozena enzymatickým aparátem cílové buňky. Organismus ji pak chápe jako jemu vlastní a tvorba protilátek proti nim je výrazně potlačena. Při hodnocení neutralizační aktivity, ať už připravených či přirozenou infekcí získaných protilátek, lze využít tzv. pseudoviry. Pseudovirus je částice vyprodukovaná molekulárně biologickými metodami, kdy do vhodných buněk je vnesem plasmid nesoucí genetickou informaci o produkci glykoproteinů gp41 a gp120. Buňky začnou tuto informaci číst, vytvářet příslušné proteiny a do média produkovat pseudovirové částice, které jsou schopny vazby na indikátorové buňky. V důsledku toho je v indikátorových buňkách tvořen enzym luciferasa štěpící luciferin za produkce světla, jež může být měřeno na luminometru. V případě přítomnosti neutralizující protilátky k vazbě nedochází a enzym není exprimován. Je tak možné hodnotit případnou neutralizační aktivitu různých vzorků, což má značné využití v rámci výzkumu vývoje vakcíny proti HIV–1.

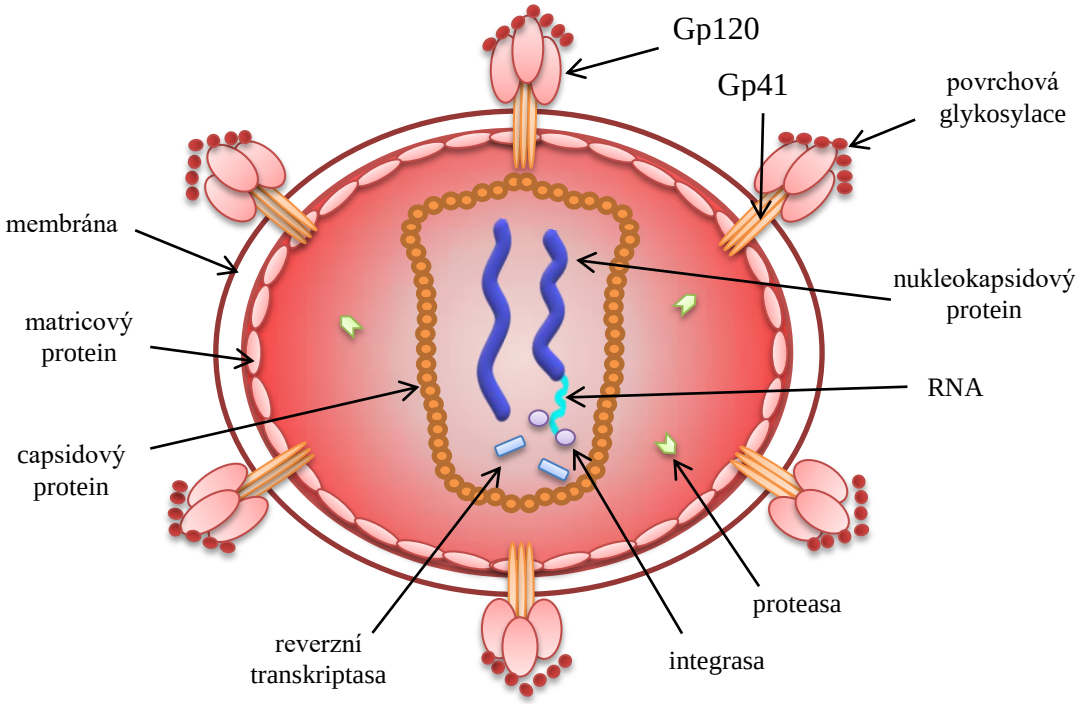
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Charakterizace a původ HIV

Virus lidské imunodeficience (HIV; z anglického Human immunodeficiency virus) je jedním z nejznámějších, globálně rozšířených virů. Vir způsobuje onemocnění tzv. syndrom získaného imunodeficitu (Acquired Immune Deficiency Syndrome), zkráceně AIDS. Podle International Committee on Taxonomy of Viruses se HIV řadí do rodiny *Retroviridae,* rod *Lentivirus*. Na počátku 80. let 20. století byla publikována studie popisující rozvoj agresivní formy Kaposiho sarkomu nebo pneumocystové pneumonie v důsledku dramatické snížení koncentrace CD4+ T–lymfocytů v krvi u mladých homosexuálních mužů (Centers for Disease Control and Prevention, 1981). V roce 1983 bylo potvrzeno podezření, že se jedná o problémy virového původu, kdy byl izolován a identifikován HIV (Barré–Sinoussi *et al.*, 1983). Dnes je obecně přijímaná teorie, připisující původ HIV k viru opičí imunodeficience (SIV). Virus má tedy zoonotický původ, kdy do lidské populace penetroval pojídáním nedostatečně tepelně zpracovaného masa a mozků ulovených primátů obyvateli rovníkové Afriky (Abbas *et al.*, 2012).

2.2 Struktura HIV–1

HIV–1 (Obr. 1) má podobu kulovité částice s přibližným průměrem 100 nm. Doposud byly popsány 2 typy HIV (typ 1, pro člověka zásadní význam a typ 2 s minoritním



Obr. 1: Schématická struktura HIV–1.

dopadem na lidskou populaci) s řadou mnoha různých kmenů. Oba typy se od sebe liší určitými odlišnostmi v genomové struktuře. Existence mnoha kmenů je pak důsledkem obecné náchylnosti retrovirů k mutacím, které vedou k dalším, ať už strukturním či funkční změnám (Krejsek *et al.*, 2016).

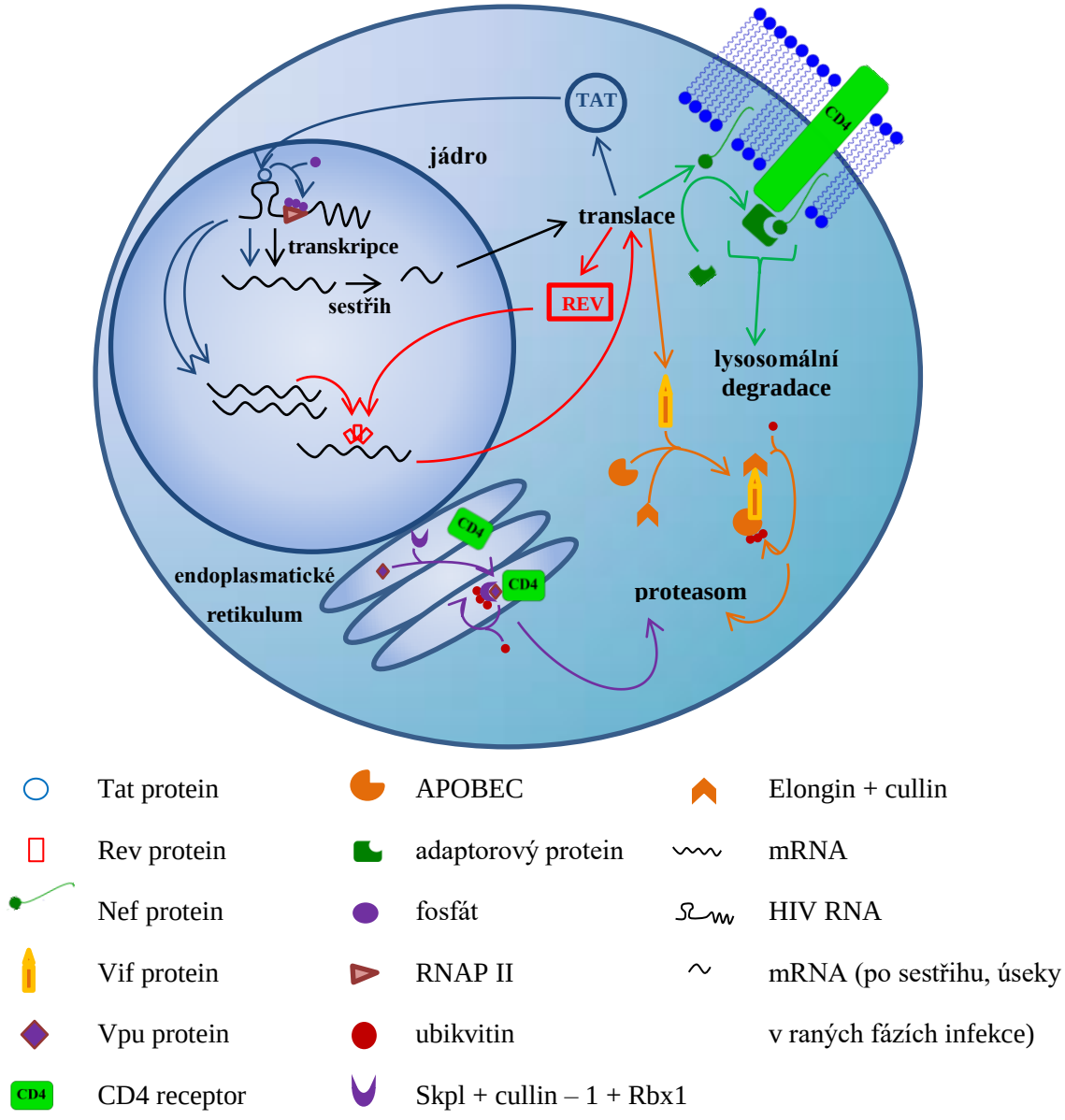
Pro rodinu *Retroviridae* je typické, že se jedná o viry, jejichž genom je tvořen nukleovou kyselinou typu RNA. Tak je tomu i v případě HIV. Genom vytváří 2 identické jednovláknové molekuly RNA (single stranded ribonucleic acid, ssRNA), každá o délce asi 9500 párů bazí (bp). Nukleová kyselina kóduje celkem 9 genů (Tab. 1). Pro geny kódující zejména strukturní proteiny je typické, že primárním produktem proteosyntézy je polyprotein, jenž je na vlastní funkční proteiny následně štěpen proteinasou (Langer a Sauter, 2017; Burmester *et al.*, 2013).

2.2.1 Regulační a doplňkové proteiny

Regulační proteiny jako produkty příslušných genů působí v hostitelské buňce různými mechanismy (Obr. 2), většinou již na genové úrovni. Výsledkem těchto dějů je regulace buněčných procesů pro optimální virovou replikaci. Doplňkové proteiny obecně fungují jako adaptéry, které narušují normální pochody v buňce pro potřeby viru (Bour a Strebel, 2003). Inaktivace těchto přídatných proteinů vedla jen k menšímu poškození životního cyklu viru *in vitro* (proto jsou označovány jako doplňkové), zatímco *in vivo* bylo prokázáno, že mohou dramaticky ovlivnit průběh a závažnost infekce (Bour a Strebel, 2003).

Tab. 1 Geny tvořící genom HIV–1 a jejich genové produkty

<table>
<tr><th>gen</th><th>produkt</th><th>gen</th><th>produkt</th></tr>
<tr><td>gag</td><td>strukturní proteiny (MA = p17, CA = p24, NC = p7, P6)</td><td>vpr</td><td rowspan="5">stejnojmenné doplňkové proteiny</td></tr>
<tr><td>pol</td><td>proteiny s enzymatickou funkcí (RT, IN, PR)</td><td>nef</td></tr>
<tr><td>env</td><td>gp120, gp41</td><td>vif</td></tr>
<tr><td>tat</td><td rowspan="2">stejnojmenné proteiny regulující replikaci viru</td><td>vpu</td></tr>
<tr><td>rev</td><td>tev</td><td>výskyt pouze u některých izolátů</td></tr>
</table>



Obr. 2: Princip působení některých proteinů a enzymů HIV–1 v hostitelské buňce.

Anti–repression trans–activator (Rev) je protein, který se přímo váže na RNA a účastní se přenosu mRNA do cytoplasmy. Tvoří se již v časných fázích replikačního cyklu, kdy jsou tvořeny kratší úseky mRNA i s informací pro expresi Rev proteinu. Ten je díky nukleární lokalizační sekvenci transportován do jádra, kde se až 6 těchto proteinů váže s vysokou afinitou, každý prostřednictvím 17 reziduí dlouhého α–helixu na IIB smyčku mRNA. Na nukleární exportní sekvenci Rev proteinu se následně váží hostitelské proteiny CRM1 (chromosonal region maintenence 1) a RanGTP (Ras related nuclear protein). Takto vytvořený komplex dokáže aktivním přenosem transportovat mRNA do cytoplasmy k translaci virových proteinů (Malim a Pollard, 1998).

Protein Trans–Activator of transcription (Tat) je důležitý pro stimulaci transkripční elongace. Váže se na vlásenku tar (trans activatinon respons elemens), jež je součástí dlouhé terminální repetice (LTR) RNA. Současně je iniciováno uvolnění komplexu P–TEFb (Positive transcription elongation factor), nutného k vytvoření transkripčního komplexu, z proteinových souborů vázajících se na chromatin a inaktivujících RNA polymerasu II (RNAP II). P–TEFb se skládá z cyklin–dependentní kinázy 9 (CDK9) a cyklinu T1. Komplex se napojí na Tat ještě s dalšími proteiny a CKD9 fosforyluje karboxylovou terminální doménu RNAP II společně s multiproteinovými komplexy Negative elongation factor (NELF) a Death inducing signaling (DSIF), jež by svou vazbou RNAP II inhibovaly. Takto fosforylovaná RNAP II může začít transkripci, která je navíc značně amplifikována a urychlena (Weeks *et al*, 1990). V některých izolátech se vyskytuje i doplňkový protein tev (Tobacco Etch virus), který nese informace z určitých sekvencí proteinu tat, rev a envelope glykoprotein (env) (Benko *et al.*, 1990).

Negative regulatory factor (Nef) je obranným proteinem, který působí proti hostitelské obraně. Je tvořen z 206 aminokyselinových reziduí, přičemž rozlišujeme N – terminální konec (rezidua 1 – 78), jádro (rezidua 79 – 203) a C – terminální konec (rezidua 204 – 206). Součástí jádra je centrální smyčka (rezidua 149 – 179) vytvářející motiv dileucinu. Prostřednictvím ní se protein může vázat na své cíle v buňce (Buffalo *et al*., 2019). Konformačně je velmi plastický, což je jeden z důvodů, proč je dnes známo až 80 dalších proteinů, s nimiž se může vázat (Mailler *et al.*, 2019). Prostřednictvím myristoylace je asociován s plasmatickou membránou. Zásadní je jeho význam při úniku imunitnímu dohledu, kdy váže adaptorový protein a navádí jej ke svému cíli, přičemž společně s clathrinem pak iniciuje endocytózu tohoto cíle. Cílem proteinu Nef jsou především integrální transmembránové proteiny jako je CD4, CD8 a CD28, nezbytné k vyvolání adaptivní imunity. Stejně tak je schopen navádět adaptorový protein ve vazbě na protein Arf1 (ADP–ribosylation factor 1), nacházející se v *trans* oblasti Golgiho aparátu na svůj cíl, kdy zde se především jedná o molekuly MHC–I, které informují imunitní buňky o možné infekci. Opět spolu s clathrinem, nef iniciuje jejich lysosomální degradaci. Těmito mechanismy HIV–1 do značné míry uniká imunitnímu dohledu, což je příznivé pro jeho replikaci a zvýšení infekčnosti viru (Buffalo *et al*., 2019).

Viral protein R (Vpr) je dalším malým doplňkovým proteinem. Je tvořen 96 aminokyselinovými rezidui, která vytváří 3 α–helixy (rezidua 17 – 33, 38 – 50 a 55 – 78), přičemž poslední helix je bohatý na obsah leucinu, čímž je na jedné straně vytvořen

hydrofobní povrch, který může sloužit k tvorbě dimeru nebo interakci s dalšími proteiny přes motiv leucinového zipu (Schuler *et al.*, 1999; Wecker *et al.*, 1999). Vpr se váže na C – terminální oblast Pr55Gag (prekurzorový Gag protein), čímž se dostává do nově vznikajících virionů. Po štěpení proteasou je ve virionu schopen interakce s genomovou RNA, reverzní transkriptasou a integrasou, které tak kolokalizuje (Zhang *et al.*, 1998). Pomáhá tím po infekci započít proces reverzní transkripce, přičemž ovlivňuje i její přesnost. Je totiž schopen interagovat s Uracil – DNA glykosylasou, která má opravnou funkci. Tím je výrazně sníženo riziko mutací, které potenciálně mohou vzniknout chybným zařazením uracilu a významně pak ovlivňují syntézu druhého řetězce DNA při reverzní transkripci (Mansky, 1996). Vpr je také značně karyofilní. Jako součást tzv. preintegračního komplexu napomáhá vytvořenou DNA transportovat cytoskeletárními mikrotubuly do jádra k následnému zabudování do jaderného genomu. Další významnou funkcí Vpr je zastavení buněčného cyklu infikovaných buněk v G2 fázi inaktivací cyklin–dependentní kinasy p34/cdc2, která se napojuje na cyklin B1, čímž reguluje přechod mezi G2 a M fází buněčného cyklu. Tím je dosaženo dostatečného prostoru pro reverzní transkripci viru (He *et al.*, 1995).

Dalším malým doplňkovým proteinem je Viral infectivity factor (Vif). Tento protein zneškodňuje antivirovou ochranu buněk, která je tvořena rodinou enzymů APOBEC (apolipoprotein B mRNA – edditing catalytic polypeptide). Jedná se o cytidin deaminasy, jejichž funkcí je navození mutací ve virové genetické informaci deaminací cytidinu za vzniku uridinu (Teng *et al.*, 1993). Nejznámějším je APOBEC3G, který se ve větší míře vyskytuje v CD4+ lymfocytech (Chiy *et al.*, 2005). Vif má 2 funkčně důležité domény. Doména HCCH vytvářející motiv zinkového prstu, přes který se na něj váže cullin – 5. Druhá doména je tvořena sekvencí aminokyselin SLQ(Y/F)LA, na níž se váže elongin C spolu s elonginem B. Celý komplex je enzymaticky aktivní a tvoří ubikvitin – ligasu (E_3). Protože Vif specificky váže také APOBEC proteiny, zprostředkovává jejich ubikvitinaci. APOBEC jsou tak označeny pro degradaci v proteasomu, čímž se virus vyhýbá této antivirové buněčné ochraně (Goila – Gaur a Strebel, 2008).

Vpu je strukturně tvořen pouze 81 aminokyselinami, kdy N–terminální konec svými 29 rezidui tvoří transmembránovou doménu, která je následována amfipatickým α–helixem (rezidua 32 – 51), z jedné strany interagujícím s plasmatickou membránou díky jednostrannému hydrofobnímu povrchu a dalším α–helixem (rezidua 57 – 72) odkloněným do cytoplasmy. Jeho odklonění je způsobeno specifickou fosforylací

serinů, které jsou součástí vysoce konzervovaného motivu DSGNES spojujícího oba helixy (Henklein *et al.*, 2000; Goadou *et al.*, 2002). Hlavní role Vpu je v degradaci CD4 receptorů, které teprve vznikají v membráně endoplasmatického retikula. Na fosforylované seriny se může napojit protein βTrCP (β–transducin repeat containing) a přes něj další faktory jako je Skpl (S–phase kinase–associated protein 1) , cullin – 1 a Rbx1 (RING–box protein 1). Dohromady tak vytváří enzymaticky aktivní komplex ubikvitin – ligasy (E_3). Cullin – 1 vytváří vazebné místo pro ubikvitin – konjugační enzym (E_2). Jejich prostřednictvím jsou molekuly CD4 v membráně endoplasmatického retikula označeny ubikvitinem, čímž se odsoudí k degradaci v proteasomu (Margottin *et al.*, 1998; Yaron *et al.*, 1998). Vpu také účinně pomáhá v uvolňování virových částic. Jedním z možných mechanismů, jak toho docílí je tvorba homo – pentamerního kanálu v plasmatické membráně pro Na^+ a K^+ ionty. Mechanismy tohoto působení nejsou zcela přesně známy, ale předpokládá se, že lokální modulace membránového napětí v důsledku změny koncentrací těchto iontů, by uvolňování nových virionů mohla podpořit (Ewart *et al.*, 1996; Bour a Strebel, 2003).

2.2.2 Proteiny s enzymatickou funkcí

Produkty *pol* genu (DNA polymerase gene) mají funkci enzymatickou. Tím jsou také významným cílem vývoje léčiv. Výsadní postavení zde má reverzní transkriptasa (přesněji RNA-dependentní DNA polymerasa, RT). Jedná se o enzym umožňující syntézu molekuly DNA z virové RNA, čímž je schopna porušit tzv. centrální dogma molekulární biologie (Waheed a Freed, 2011). Mezi další enzymy patří integrasa (IN), která zajistí inkorporaci DNA vytvořené RT do genomu hostitelské buňky a proteasa (PR), zásadní pro maturaci nových částic HIV (Mirambeau *et al*., 2007).

2.2.3 Strukturní proteiny

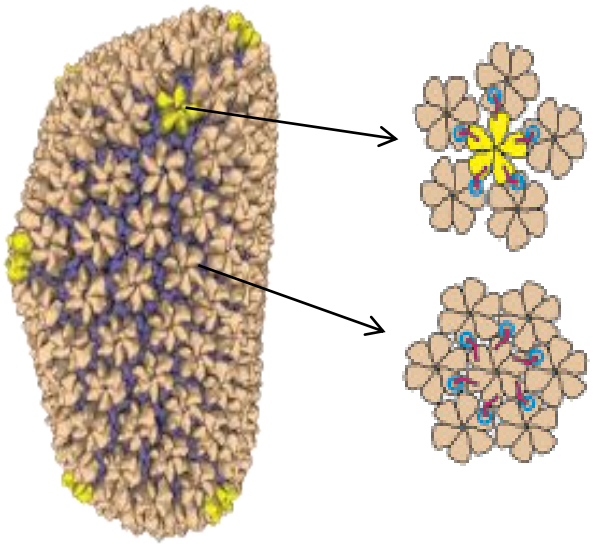
Strukturní proteiny vznikají jako produkty *gag* genu (group–specific antigen). Nejdříve dochází k syntéze prekurzorového gag proteinu (Pr55Gag), který bude virovou proteasou štěpen na jednotlivé funkční polypeptidy (Lee a Yu, 1998).

Patří mezi ně nukleokapsidový protein (dále NC), pro který je charakteristická přítomnost dvou domén s motivem zinkového prstu, pomocí nichž se váže na virovou RNA. Nukleovou kyselinu tak stabilizuje, ale má rovněž funkci při replikaci, kdy ještě jako součást Pr55Gag pomáhá zapouzdřovat RNA do nově vznikající virové částice (Yu *et al*., 2016). Také je důležitá funkce v multimerizaci gag proteinů a tvorbě nových

virových částic s dostatečnou hustotou potřebných proteinových součástí. (Lee a Yu, 1998).

Samotnou virovou kapsidu (Obr. 3) tvoří kapsidový protein (CA). Je tvořen 2 doménami, jež jsou flexibilně spojeny linkerem. Větší doména (N–terminální) se následně asociuje s dalšími CA do kruhu s celkem 6, popř. 5 jednotkami. Tyto kruhy jsou pak vzájemně propojeny menší doménou (C–terminální), která je také označována jako dimerizační. Objevuje se tedy motiv hexameru obklopeného 6 dalšími hexamery nebo pentameru obklopeného 5 hexamery, kde v důsledky absence 1 CA v základním kruhu dochází k přiblížení okolních hexamerů a většího zalomení celkového povrchu (Obr. 3). Dohromady pak má kapsida, pro HIV–1 typický, kuželovitý tvar (Obr. 3), neboť v místech, kde se nachází pentamery (vrcholy), dochází k určitému zalomení (Zhao *et al*., 2013).

N–terminální doména původního Pr55Gag po štěpení proteasou tvoří matricový protein (MA). MA je modifikován acylací, kdy se napojuje kyselina miristová na N – terminální Gly, čímž dojde k jeho inkorporaci na vnitřní stranu plazmatické membrány (Fiorentini *et al*., 2006). Do acylace se však zřejmě zapojuje více proteinových domén (McDonnell *et al.*, 1998). Strukturně je protein tvořen asi ze 130 aminokyselin, převážně seskupených do α–šroubovic a jedním třívláknovým β–listem. 30 C–terminálních reziduí tvoří α–helix na který je v Pr55Gag vázán CA (Massiah *et al.*, 1994). Výzkumy naznačují, že MA je důležitý pro začlenění env glykoproteinů do membrány a to přímou interakcí s plazmatickým ocáskem gp41 (Cosson, 1996), kdy je



Obr. 3: Kapsida HIV–1, pentamerní (žlutá) a hexamerní uspořádání kapsidového proteinu (převzato a upraveno z Summers *et al*., 2019).

ale potřeba, aby byl udržován v trimerním stavu, tak jako povrchové glykoproteiny (Hill *et al.*, 1996).

Předpokládá se, že v blízkosti membrány se nachází i protein p6, jenž hraje roli při skládání nových virových částic. O jeho funkci ve zralém stavu se ví málo, avšak zřejmě má funkci v pozdním stádiu replikace, při samotném uvolňování nové virové částice od cytoplazmatické membrány hostitelské buňky (Huang *et al.*, 1995; Schmalen *et al*., 2018)

Plazmatická membrána je poslední obrannou vrstvou. Vytváří samotný povrch viru. Pochází z hostitelské buňky, protože nový virus z ní vzniká pučením. Díky tomu membrána obsahuje řadu membránových proteinů, typických právě pro HIV–1 hostitele, ale také velmi významné produkty genu *env*. Jedná se o povrchové glykoproteiny gp41 a gp120 naprosto zásadní pro infekčnost virové částice (Abbas *et al*., 2012).

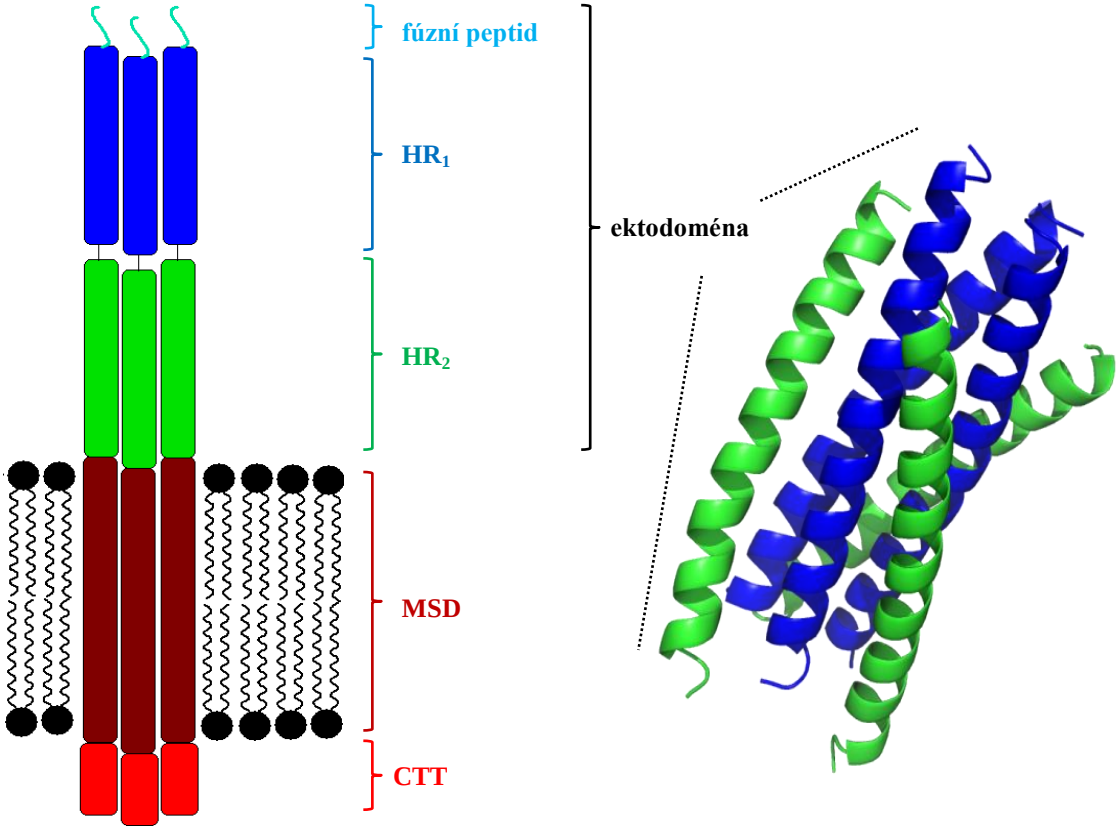
2.3 Struktura povrchových glykoproteinů

Glykoproteiny gp41 (41 kDa) a gp120 (120 kDa) se nachází na samotném povrchu viru. V případě gp41 se jedná o transmembránový glykoprotein, s nímž nekovalentně interaguje gp120 a vytváří tak komplex označovaný jako env protein. V něm jsou oba glykoproteiny obsaženy trimerně. Jedná se tedy o trimerní heterodimer. Jejich struktura se odvíjí od stavu viru, kdy rozlišujeme nativní a fúzní stav (Chan *et al*., 1997). Vzniknou proteolytickým štěpením prekurzorového glykoproteinu gp160, produktu *env* genu, buněčnou proteasou furinem v trans – Golgiho aparátu v rámci posttranslačních procesů (Abbas A. K. *et al*., 2012; Hallenberger *et al.*, 1992).

2.3.1 Glykoprotein gp41

Jedná se o α–helikální trimer. Zajišťuje fúzi virové a hostitelské membrány, čímž umožní uvolnění virového obsahu do hostitelské buňky. Tím, že jde o transmembránový protein, je dělen na 3 základní části (Obr. 4). Extracelulární doména (ektodoména) vyčnívající vně viru, samotná část procházející membránou (MSD = membrane spanning – domain) a intracelulární doména, nazývaná též jako tzv. C–terminální ocas (CTT = C–terminal tail).

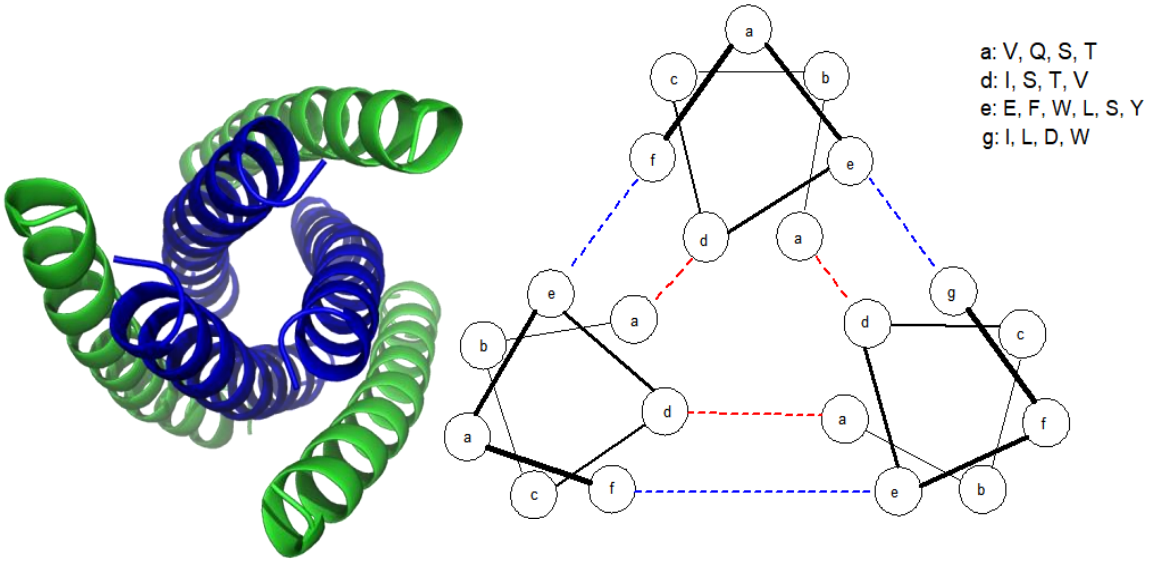
Ektodoména se skládá ze tří základních částí (Obr. 4). Hydrofóbní N – koncová oblast, také označavaná jako fúzní peptid, obecně bohatý na glycin. Za normálního stavu je zakotven a schován v komplexu s gp120. Jedná se asi o prvních 30 reziduí



Obr. 4: Schematická struktura gp41 a ektodoména ve fúzně aktivním stavu (hexamerní uspořádání).

(Chan *et al.*, 1997). Při infekci se zabuduje do membrány cílové buňky. Na fúzní peptid navazují oblasti HR1 (zvaná také jako N36 – helix, rezidua 546 – 581) a HR2 (C34 – helix, rezidua 628 – 661) spojené disulfidickým můstkem (Chat *et al.*, 1997). Objevuje se u nich motiv heptadové repetice (ve 3 až 4 opakování), tedy 7 opakujících se aminokyselin dle předpisu *abcdefg*, kde *a* a *d* jsou s vysokou pravděpodobností nepolární aminokyseliny. Jejich konkrétní složení je značně proměnlivé. Na základě nekovalentních interakcí, především mezi *a* – *d* a elektrostatických interakcí mezi *e* – *g*, dochází k vzájemné asociaci trimerů do motivu tzv. svinuté cívky (Obr. 5).

MSD je vlastní transmembránovou částí, jež fosfolipidovou dvouvrstvou prochází. Funkcí této části je ukotvení celého env proteinu (tedy gp41 i gp120) v membráně. Primární struktura byla určena jako posloupnost aminokyselin *LFIMIVGGLVGLRIVFAVLSI* (Kim *et al.*, 2009). V současnosti se předpokládá, že tato sekvence vytváří α–šroubovici. Struktura však zcela jasná není, neboť některé studie naznačovaly, že ke zmíněné sekvenci může být přiřazen ještě další krátký peptid, který by celkové uspořádání narušil (Gangupomu a Abrams, 2010).



Obr. 5: Hexamerní uspořádání trimerního gp41 (vlevo, pohled ze shora, peptid C43 zeleně, peptid N51 modře) se schámatickou mapou (vpravo) nejčastěji se vyskytujících AMK v daných pozicích helixů HR_1 s jejich elektrostatickými (červená) a nekovalentními (modrá) interakcemi.

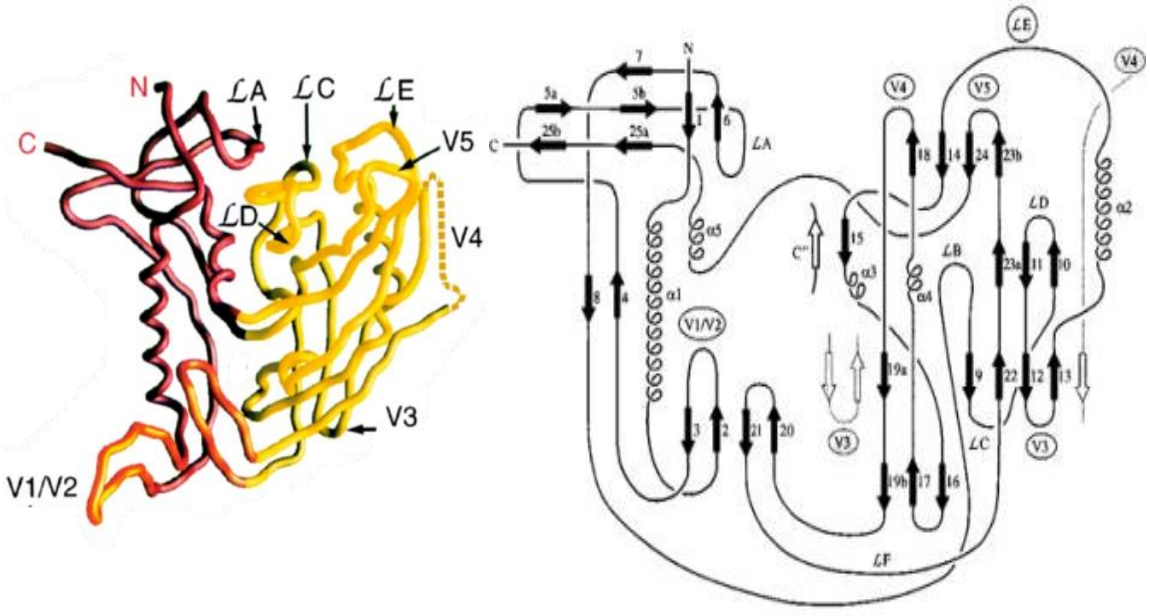
CTT je poslední součástí gp41, dlouhý až 150 aminokyselin, lokalizován uvnitř viru. Jeho přesná struktura opět zcela objasněna není. Předmětem výzkumu se staly pouze určité sekvence tzv. lentivirové peptidy (LPP), které jsou značně hydrofobní (Eisenberg a Wesson, 1990). Jejich umělá strukturální analoga vykazovala α – helikální strukturu (Steckbeck *et al.*, 2011). V nesouladu s touto hypotézou byly experimenty tvorby neutralizujících protilátek u některých izolátů, kdy se protilátky vázaly do oblasti tzv. Kenedyho epitopu (rezidua 728 – 745). To by znamenalo, že tato část musí být lokalizována vně viru, neboť protilátky nemohou projít přes plasmatickou membránu. Byl tedy navržen model, kdy CTT vytváří smyčku (s obsahem Kenedyho epitopu vně viru) podepřenou třemi transmembránovými β – listy, následovanými sekvencemi LPP1, LPP2 a LPP3 (uvnitř viru) interagujícími s membránou (Hollier a Dimmock, 2005). Pro CTT bylo prokázáno, že se jedná o část důležitou pro začlenění proteinu env do membrány skrze interakci LPP2 s MA doménou prekurzorového proteinu Gag, čímž je modifikována infekčnost, neboť začlenění je umožněno, až po rozštěpení prekurzorového Gagového proteinu (Kol *et al.*, 2007).

Fúzně aktivní stav (Obr. 4 a Obr. 5) má za následek strukturní změny především v ektodoméně, které vznikají v důsledku konformačních změn po vazbě viru na hostitelskou buňku. Peptidy N51 (v HR1 doméně, rezidua 540 – 590) a C43 (v HR2 doméně, rezidua 624 – 666) se orientují antiparalelně a vytváří trimerický komplex

heterodimerů. Tento pravděpodobný model byl vytvořen pomocí menších subdomén, a sice peptidu N36 (rezidua 546 – 581) a C34 (628 – 661), které vykazovaly *in vitro* ještě větší stabilitu (Lu *et al.*, 1995). Peptidy se řadí jako α šroubovice tak, že v centru jsou 3 paralelní šroubovice N36 peptidů sbalující se do levotočivé superšroubovice. Do „drážek“ mezi nimi se pak nekovalentně váží (resp. navinují) C34 šroubovice. C34 jsou tedy na povrchu superšroubovice trimeru N36 uspořádány ve sklonu odpovídajícímu rýhám a opět levotočivě (Chan *et al.*, 1997).

2.3.2 Glykoprotein gp120

Glykoprotein gp120 (Obr. 6) nekovalentně interaguje s gp41. Funkčně zodpovídá za vazbu příslušných receptorů hostitelské buňky. Obecně se skládá z variabilních (smyčky V_{1-5} a ℒA – F) a konstantních oblastní, tvořících jádro celého glykoproteinu. V_{1-4} jsou exponovány na povrchu glykoproteinu a připojeny k jádru skrze disulfidické můstky u báze (Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998). Strukturně je možné jádro rozdělit do 2 hlavních domén (Obr. 6), z nichž vychází různé odchylky a smyčky. Vnitřní doména se vyznačuje přítomností 2 α–helikálních struktur a 5 antiparalelními β–vlákny tvořícími motiv β – sandwiche v proximální části. V distální části vystupuje smyčka V_1/V_2. Přes ℒB přechází peptidický řetězec do vnější domény. Ta se skládá ze 3 α–helixů a antiparalelních β – listů tvořících tzv. double barrel. Proximální část vnější domény



Obr. 6: Struktura gp120 (vlevo, červeně interní doména, žlutě externí doména, oranžově přemosťující list) (Wyatt *et al.*, 1998) a jeho mapa s vyznačením sekundárních struktur (vpravo), (Kwong *et al.*, 2014).

zahrnuje smyčky V_4, V_5, ℒE a ℒD. Poblíž se nachází i ℒC. Distální část vnější domény zahrnuje smyčku V_3 a přechod přes ℒF do β – vlásenky (β_{20-21}), která je v blízkosti V_1/V_2. Tato oblast je označována jako „přemosťující list“, který tak je v interakci s vnější i vnitřní doménou (Kwong *et al.*, 1998).

Gp120 je mohutně glykosylován, přičemž napojené sacharidy vytváří až polovinu jeho hmotnosti. Glykosylace v kombinaci s četnými mutacemi propůjčují proteinu a tím i celému viru značnou schopnost obrany proti imunitnímu systému, neboť sacharidy vytváří štít překrývající důležité antigenní determinanty. Imunitní systém navíc tyto sacharidy vnímá do značné míry jako vlastní, protože jejich syntéza a napojení na virové proteiny není kódována virem, ale glykosylaci vykonávají enzymy vlastní cílové buňce. Glykanový štít tak částečně kryje důležité antigenní determinanty, ale ukázalo se, že sám může být imunogenní (Scanlan *et al.*, 2007; Sadamand *et al.*, 2016). Zásadní je N – glykosylace, při které se oligosacharidový zbytek (glykan) napojuje na amidovou skupinu postranního řetězce Asn v sekvenci Asn – X – Ser/Thr, kde X může být kteroukoliv proteinogenní aminokyselinou kromě prolinu. V gp120 je přítomno asi 25 glykosylačních míst, kdy 4 se nachází ve vnitřní doméně, 7 – 8 ve smyčkách V_1/V_2 a V_3 a zbytek je přítomen v doméně vnější. Přítomny jsou nedostatečně zpracované glykany (sacharidová část glykoproteinu), obvykle zakončeny 5 – 9 mannosovými jednotkami (tzv. oligomannosový typ). Jejich tvorbu zajišťují v endoplasmatickém retikulu a cis – Golgiho aparátu enzymy mannosidasy, přičemž výrazný vliv na další glykosylaci má prostorová dostupnost substrátů pro příslušné enzymy (Behrens a Crispin, 2017). Nedostatečně zpracované glykany mají tendenci se shlukovat. Jsou tedy v blízkosti dalších glykanů či proteninové páteře a vytváří tzv. „vnitřní mannosové náplasti“ (Helenius a Aebi, 2001).

Povrch vnitřní domény, překlenutý α–helixem je pravděpodobné místo interakce s gp41. Tuto hypotézu podporuje i výrazně snížená glykosylace této oblasti (Wyatt *et al.*, 1997).

2.4 Replikační cyklus HIV–1

HIV–1 se šíří tělními tekutinami, nejčastěji při homosexuálních či heterosexuálních aktivitách. Po jeho průniku do krevního řečiště může napadat cílové buňky. Tropismus viru, tedy buňka, kterou virus napadá je pro HIV–1 především T_H lymfocyt (T–lymfocyt). Může napadat také makrofágy či monocyty. Jedná se o buňky, jež mají na povrchu přítomný receptor CD4 (cluster of differentiation 4) a koreceptor CCR5 (C – C

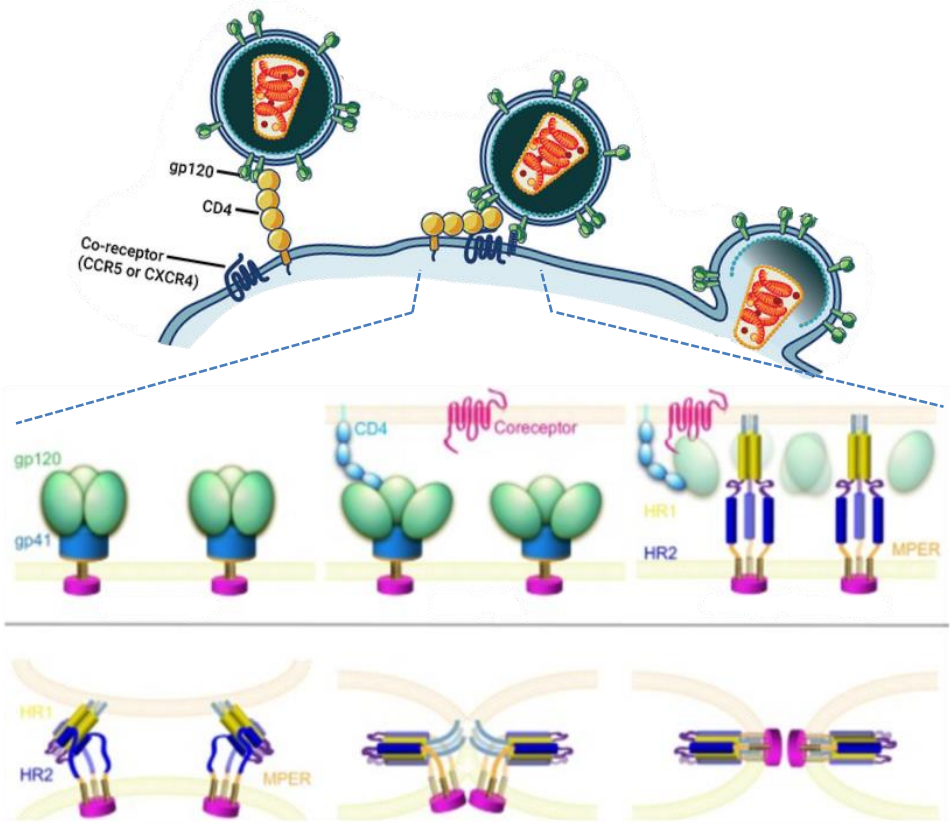
chemokinový receptor typu 5) nebo CXCR4 (C – X – C typu 4), nutné pro vstup viru do buňky. Tyto buňky pak označujeme jako CD4+. V užším slova smyslu se toto označení používá přímo pro T_H – lymfocyty pro něž je receptor typický.

2.4.1 Vstup HIV–1 do cílové buňky

Vstup HIV–1 do hostitelské buňky (Obr. 7) zahrnuje interakci mezi povrchovým trimerem gp120/gp41 a receptory cílové buňky CD4, CXCR4 nebo CCR5. Celý proces je energeticky značně náročný.

Na rozhraní vnitřní a vnější domény gp120 je hydrofobní dutina, která představuje vazebné místo pro CD4 receptor obsahující Phe43, který funguje jako spojovník, neboť nekovalentně interaguje s dalšími, v primární struktuře dalece vzdálenými, aminokyselinovými rezidui. Na struktuře dutiny a tím i vazby s CD4 receptorem se dále podílí smyčka ℒB, vlákno β15 a β20 přecházející do β21 a dále do přemosťujícího listu (Kwong *et al.*, 1998).

Vazbou receptoru CD4 se spustí konformační změny vedoucí k fúzi membrán (Obr.



Obr. 7: Mechanismus vstupu HIV–1 do buňky (převzato a upraveno z Chen, 2019; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Home Page: https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle (5. 4. 2021)).

7) (Wyatt *et al.*, 1998). Tyto změny mají za následek reorganizaci gp120, kdy dochází ke stáčení domén, což má za následek jejich oddalování od centrální osy, kdy se smyčky V_1/V_2 a V_3 vystavují membráně hostitelské buňky. Také se mění poloha dvou vnějších domén receptoru CD4 (D_1 a D_2) vůči doménám vnitřním (D_3 a D_4). Tyto reakce přitahují virovou a hostitelskou membránu blíže k sobě (Blumenthal *et al.*, 2012; Chen, 2019).

Následně je nutná vazba koreceptoru CXCR4 nebo CCR5 na vystavenou smyčku V_3. Vazby se také účastní část přemosťujícího listu. Celkově se těmito konformačními změnami odhaluje ektodoména gp41, až doposud „ukrytá“ v gp120. Ektodoménový fúzní peptid se vloží do hostitelské membrány. V návaznosti na to dochází k dalším konformačním změnám, kdy se HR2 domény gp41 v trimeru vkládají do drážek mezi HR1 domény gp41 v trimeru a vytváří tak strukturu svazku šesti šroubovic (Obr. 7). Při sestavování svazku se virová membrána postupně přibližuje k hostitelské. Vnitřní list membrány je obohacen o fosfoinositoly, které podporují a usnadňují membránový ohyb (Chan *et al.*, 2008). Následně dochází k membránové hemifúzi a poté fúzi úplné, kdy se vytváří fúzní pór, který je zpočátku příliš malý pro průnik virové kapsidy (průměr asi 50 nm). Jeho dilatace je energeticky velmi náročná a probíhá za účasti cytoskeletu, který byl pro ni aktivován signální dráhou z intracelulárních domén CD4 a CXCR4 nebo CCR5 (Iyengar *et al.*, 1998; Jiménez-Baranda *et al.*, 2007; Blumenthal *et al.*, 2012). Vstupu viru brání ještě kortikální aktin nacházející se těsně pod plasmatickou membránou. Jeho remodelace je spuštěna signální dráhou, která je vyvolána vazbou viru na koreceptor (CCR5 nebo CXCR4). Dráha vede k aktivaci cofilinu jako hlavního aktinového depolymeračního faktoru (Yoder *et al.*, 2008). Vytvořeným pórem pak může virová kapsida proniknout do buňky.

2.4.2 Reverzní transkripce

Po vstupu virové kapsidy do cytoplasmy buňky je třeba genetickou informaci transportovat do jádra. Předpokládá se vazba kapsidového CA přes adaptérový protein bicaudal D2 (BICD2) na dyneinový motor, který je schopen aktivního pohybu po mikrotubulárním vláknu k jeho (−) konci a přenášet tak virový genom směrem k jádru (Dharan *et al.*, 2017). Během této cesty probíhá proces reverzní transkripce, kdy je potřeba virovou RNA přeměnit na DNA k začlenění do hostitelského genomu. Při tomto ději zřejmě dochází k tzv. odkapávání, tedy rozpadu virové kapsidy, kdy proměnlivou kapsidovou strukturu označujeme jako RTC (reverse trascription complex – komplexy

virového genomu, který prochází procesem reverzní transkripce a obsahuje tak zprvu RNA a později hybrid RNA – DNA). RTC postupně přechází v preintegrační komplexy (PIC), které již obsahují pouze DNA (Arhel, 2010).

Genom HIV–1 je tvořen 2 molekulami pozitivní ssRNA. Součástí kapsidy je až 50 molekul reverzní transkriptasy (RT), přesněji RNA – dependentní DNA polymerasy. Můžeme u ní pozorovat aktivitu DNA polymerasy a RNasy H (Telesnitsky a Golf, 1993). Ke své činnosti potřebuje RNA primer. Jako primer je využita $tRNA^{Lys3}$, která se svým 3' koncem komplementárně váže k 5' konci virové RNA. RT pak využívá virovou RNA jako matrici pro syntézu negativního vlákna DNA. RT patří mezi DNA polymerasy, pro které je typické, že komplementární vlákno syntetizují ve směru 5'→ 3'. Následně je vlákno původní virové RNA odstraněno aktivitou RNasy H, proti které je však odolná tzv. ppt sekvence, bohatá na puriny, jež slouží jako primer pro syntézu pozitního vlákna DNA. V případě HIV–1 je ppt sekvence přítomna v RNA 2x a sice poblíž 3´ konce a přibližně ve středu (Charmeau *et al.,* 1992). RT svou polymerasovou aktivitou dosyntetizuje druhé vlákno, tedy (+)DNA a aktivitou RNasy H odstraní i primery. Výsledkem tak je kompletní double strand (±) DNA (dsDNA) v PIC (Hu a Hunhughes, 2012).

2.4.3 Integrace virové DNA do hostitelského genomu

PIC kromě virové dsDNA obsahuje CA, IN a Vrp. U těchto proteinů byly prokázány výrazné karyofilní vlastnosti, díky kterým je možné v interakci s dalšími buněčnými faktory nukleárního importu přenést dsDNA do jádra skrze jaderný pór. Všechny 3 proteiny jsou schopny interagovat s vytvořenou DNA a jejich karyofilita je dána schopností vázat se za účasti různých buněčných faktorů (např. α a β integriny) na proteiny nukleárního póru (Haffar *et al.,* 2000).

Integrasa je homodimerní, kdy každý monomer se skládá z N – terminální části jako součást dimerového rozhraní, katalyticky aktivního jádra a C – terminální části zodpovědné za vazbu virové DNA. Dimerní struktura enzymu umožňuje vazbu obou konců dvouřetězce virové DNA. Aktivní místo v jádře je značně flexibilní a obsahuje 2x Asp, Glu a Lys. Zde dochází k vazbě cílové (hostitelské) DNA a integraci vázané, virové DNA do ní. Aktivní místo integrasy nevykazuje významnou specifitu a místo integrace tak není přesně určeno. Samotné vazbě integrasy na cílovou DNA můžou napomáhat buněčné faktory (např. LEDGF/p75), ale není na nich přímo závislá. Proces integrace je zahájen odštěpením dinukleotidu CA z 3' konce virové DNA, čímž se

odhalí 3' OH, které nukleofilně napadají dvojici fosfodiesterových vazeb v cílové DNA. Místa napadení jsou v případě HIV oddělena 5 bp na každém řetězci. Na cílovou DNA se tak svým 3' koncem kovalentně navázala virová DNA, přičemž její 5' konec zůstává volný, stejně jako 3' konec štěpené cílové DNA. K jejich spojení je třeba odstranění 2 nepárových nukleotidů na 5' konci virové DNA, vyplnění mezer a spojení řetězců, k čemuž jsou využity enzymy hostitelské buňky (především DNA polymerasa a DNA ligasa). Takto začleněná virová DNA v hostitelském genomu je označována jako provirus. Ve stádiu proviru jsou obvykle HIV pozitivní pacienti několik (i desítek) let.

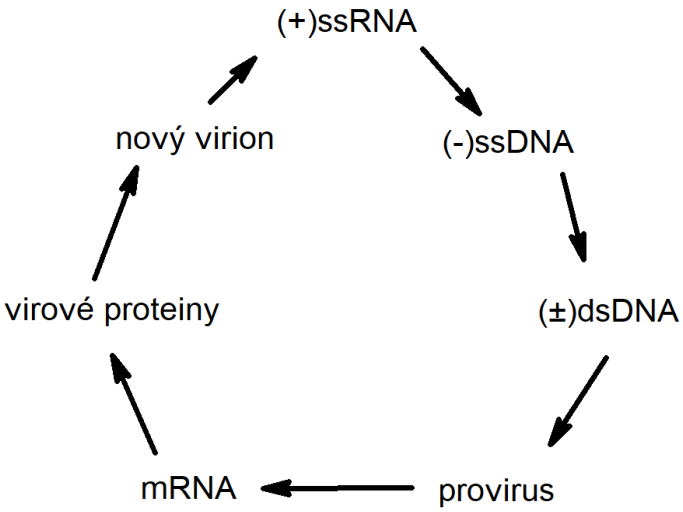
2.4.4 Proteosyntéza virových proteinů

Provirus slouží jako matrice pro transkripci virových proteinů i jeho genomické RNA. Pro proces proteosyntézy jsou využity enzymy a buněčné faktory hostitelské buňky, zejména pak RNA polymerasa II, která nasedá na promotor v oblasti 5' LTR (long terminal repeat) proviru. Zpočátku je výnos mRNA nízký, protože až v pozdějších fázích je nasyntetizován protein tat, který rychlost i účinnost transkripce výrazně amplifikuje (Obr. 2). Vznikají tak molekuly pre – mRNA, které prochází alternativním sestřihem (splicing). Později mohou být produktem molekuly mRNA, které představují genomickou RNA rodící se virové částice nebo různě sestříhané mRNA pro další syntézu virových proteinů procesem translace na ribozomech v cytoplasmě, kam jsou transportovány za účasti virového rev proteinu. Zejména pro strukturní proteiny je typická syntéza tzv. preproteinů, z nichž se následně proteolytickým štěpením získají jednotlivé funkční virové proteiny mající mnohočetné funkce pro zajištění optimálních podmínek virové replikace (Cooper *et al.,* 2011; Campbell a Hope, 2008).

2.4.5 Tvorba nových virových částic

V pozdní fázi replikačního cyklu je tvořeno velké množství virových proteinů. Protein gag-pol je preproteinem zahrnující domény budoucích samostatných strukturních proteinů MA, CA, NC a enzymatických proteinů (Lu *et al.,* 2011).

NC doména dokáže díky konzervované sekvenci aminokyselin Cys – Cys – His – Cys vytvářející motiv zinkového prstu (je nutný atom Zn^{2+}) interagovat s tzv. Ψ oblastí nesestříhané molekuly RNA, která se nachází na jejím 5' konci. Tato oblast podporuje dimerizaci molekul RNA. MA doména Gag proteinu prochází myristoylací, kdy dochází k napojení kyseliny myristové a celý protein je pak naváděn k cytoplasmatické membráně, čemuž napomáhá afinita k fosfatidylinositol–4, 5–biosfosfátu (PIP2)



Obr. 8: Schéma replikačního cyklu HIV–1.

v membráně přítomného (Lu *et al.*, 2011). Takto dochází k multimerizaci gagových preproteinů (některé přináší dimerizovanou RNA) pod buněčnou membránou, což vyvolává její pučení v této oblasti (Cullen, 2014). Již během pučení, nebo až v nově vytvořeném viru, jsou proteasou rozštěpeny preproteiny na jednotlivé domény, které plní funkci samostatných proteinů. Pučením se tak od hostitelské buňky oddělí nové virové částice a cyklus se uzavírá (Obr. 8). Na samotném oddělení se podílí proteinový komplex ESCRT–III (endosomal sorting complexes required for transport), který obkrouží a stáhne membránu při oddělování nového virionu. (Cullen, 2014; Lu *et al.*, 2011).

Jedním z významných důsledků infekce viru je dramatické snížení hladiny zejména T_H– lymfocytů, také však dendritických buněk či maktrofágů. Toto je způsobeno spuštěním procesu apoptosy. Jednou z možných signalizačních drah jejího spuštění je přechod Vrp proteinu skrze VDAC (napětím řízený iontový kanál) ve vnější mitochondriální membráně. Vrp se tak dostává do mitochondriálního mezimembránového prostoru, kde je schopen vazby na ANT (adeninnukleotidový translokátor), který tak rozšiřuje. V důsledku této reakce se zvyšuje propustonost vnitřní mitochondriální membrány a uvolňují se pro – apoptické signály směřující buňku do procesu apoptosy (Basañez a Zimmerberg, 2001).

2.5 HIV–1 neutralizační protilátky

Protilátky, resp. imunoglobuliny, jsou glykosylované polypeptidy, produkovány aktivovanými B–lymfocyty jako odpověď na přítomnost antigenu v organismu v rámci adaptivní imunity. Jedná se o extrémně variabilní molekuly, kdy v důsledku genetických sestřihů a přesmyků jsou při jejich tvorbě tvořeny protilátky s maximální specifitou vůči antigenu, který jejich tvorbu vyvolal. HIV je značně heterogenní, což je dáno vysokou frekvencí mutací, které mají za následek obrovské množství variant HIV. Proti viru imunitní systém začne přirozeně vytvářet protilátky. V případě HIV je pozornost tvorby protilátek zaměřena především na povrchový trimer gp41/gp120. Ten je ale vlivem „sacharidového štítu" a lokálně proměnlivé struktury díky mutacím, či konformačním změnám při vazbě na cíl, pro protilátky špatně dostupný. To je hlavní důvod, proč doposud nebyla vytvořena účinná vakcína. Předmětem výzkumu a vývoje vakcíny proti HIV, pak jsou tzv. široce neutralizující protilátky (bnAb z anglického broadly neutralizing antibodies), které cílí na relativně stálé a konzervované oblasti povrchu env proteinu a jsou tak schopny neutralizovat široké spektrum kmenů HIV. Jako neutralizační jsou protilátky označovány v případě minimálně 30% účinnosti, tj. neutralizováno bude 30% virové nálože v organismu, navzdory různým variantám viru. První bnAb byly objeveny v 90. letech 20. století, dnes známe přes 100 typů (Sadanand *et al.*, 2016).

2.5.1 Rysy široce neutralizačních protilátek

Pro bnAb jsou charakteristické určité rysy napříč všemi rodinami. Jsou značně mutovanější, než klasické sérové protilátky (AB), mívají abnormálně dlouhé CDR_H3 smyčky variabilních domén, které mají průměrnou délku 21 aminokyselinových reziduí oproti běžné délce 8 – 16 aminokyselin. Taková délka umožní průnik skrze glykanový štít na samotný proteinový povrch. bnAb také často vykazují polyreaktivitu. (Sadanand *et al.*, 2016). Ta je u různých typů bnAb různá. Některé jsou schopny vazby na vlastní lipidy (např. kardiolipin), glykany i samotné proteiny včetně enzymů. Příkladem může být kynureninasa, enzym štěpící meziprodukt metabolismu tryptofanu kynurenin. V důsledku poškození této dráhy se rozvíjí řada různých defektů, např. poruchy nervové soustavy – tzv. HIV demence (Finney a Kelsoe, 2018; Routy *et al.*, 2015).

2.5.2 Studium neutralizačních protilátek

Je několik strategií výzkumu neutralizačních protilátek proti HIV. Možností je screening a zisk séra od HIV pozitivních pacientů, ze kterého je možné protilátky izolovat, např. chromatografickými technikami či přímo testovat jejich neutralizační aktivitu.

Laboratorním přístupem je kultivace a třídění paměťových B – lymfocytů či tvorba hybridomů. Tyto buňky mohou přímo produkovat protilátky do média nebo mohou být zdrojem genů pro jejich tvorbu. Geny se mohou pomocí vektoru přenést do vhodných buněk transfekcí, a ty začnou přijatou genetickou informaci exprimovat (Burton a Hangartner, 2016).

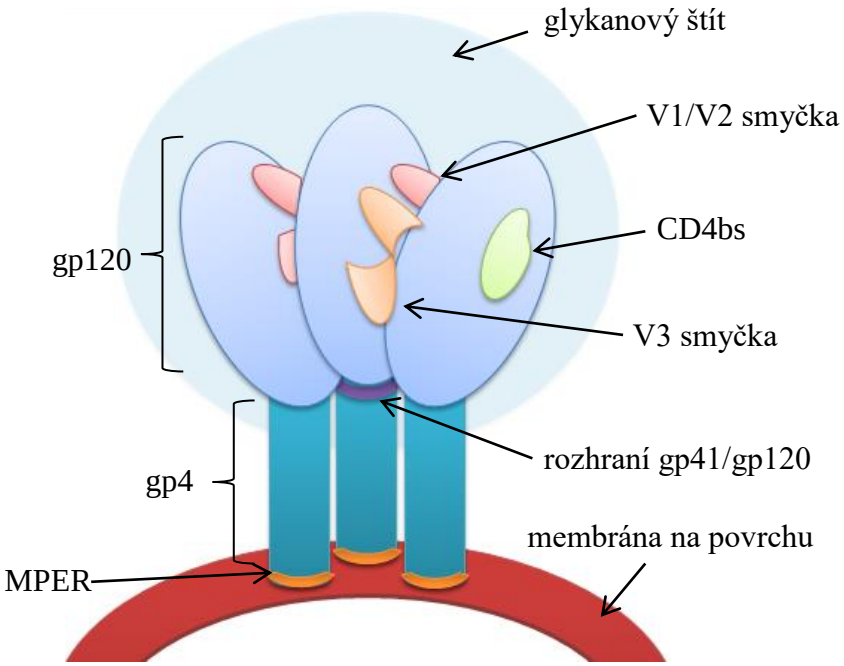
Neutralizační aktivita protilátek se zjišťuje neutralizačními experimenty v různých obměnách. Jejich principem je inkubace kultury viru, protilátek (např. vzorek séra, laboratorně připravených protilátek,…) a vhodné buněčné kultury, mající charakter cílových buněk viru. V případě neutralizační aktivity je protilátkami znemožněna infekce a virus je inaktivován, zatímco v nepřítomnosti neutralizační aktivity je infekce možná. Ta pak vyvolává změny, které mohou být detekovány, pozorovány a zaznamenány jako změna morfologie buněk, enzymová aktivita, luminiscence, změna zbarvení,… (Šebek J., 2018).

Neutralizační protilátky také slouží k objasnění struktury povrchových i dalších HIV proteinů, ať už nativních, či uměle vytvořených (rekombinantních). Jejich vazbou se značně proměnlivá a nestabilní glykoproteinová struktura stabilizuje a může být řešena pomocí hmotnostní spektrometrie, NMR, elektronovou tomografií s využitím RTG záření, krystalografie,… Problém pro experimenty u povrchových glykoproteinů gp41 a gp120 je, že se v nativní formě vyskytují jako trimery, zatímco laboratorní experimenty využívají rekombinantní monomerní formu. Současně nejmodernější napodobeninou env glykoproteinu je protein BG505.SOSIP (Alsahafi *et al.* 2018). Často se v kombinaci s těmito technikami využívájí molekulárně biologické metody jako je zavádění mutací do genetické informace daného proteinu a zkoumá se pak její dopad na strukturu a funkci proteinu.

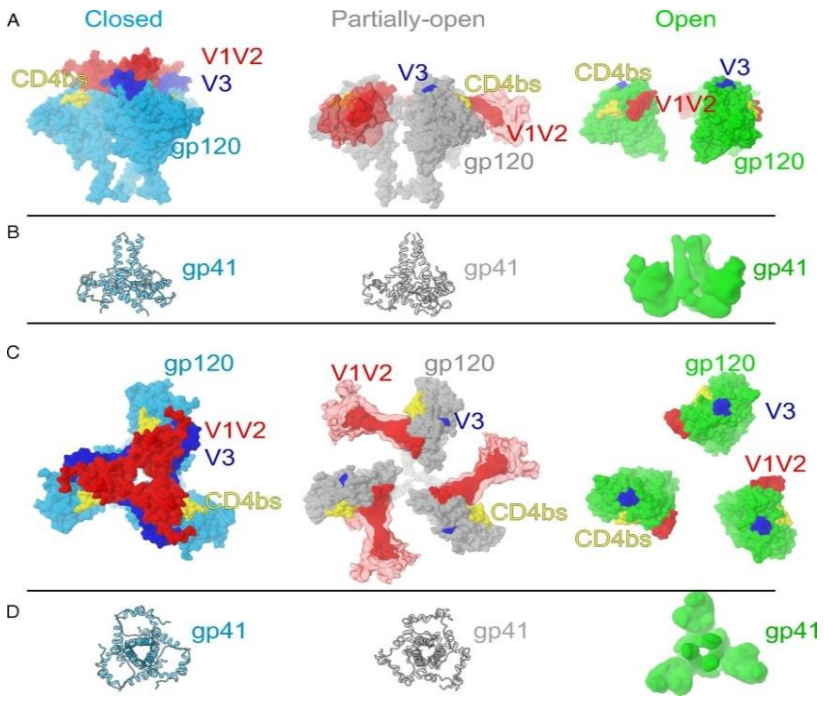
2.5.3 Hlavní oblasti antigenních determinant a jejich bnAb

Ve struktuře povrchového trimerního gp41/gp120 byla postupně objevena řada významných antigenních determinant (epitopů) (Obr. 9), kam jsou schopny se bnAb vázat. Jejich dostupnost je dána i konformačním stavem (uzavřený, částečně otevřený, otevřený) env proteinu (Obr. 10) měnícím se po vazbě na příslušné receptory (Pinto *et al.*, 2019).

Nejvýznamnějším epitopem je CD4 vazebné místo (CD4 binding site, CD4bs). Jedná se o oblast mezi vnitřní a vnější doménou gp120, kam se váže CD4 receptor hostitelské buňky viru, kdy po navázání protilátek je tato vazba znemožněna. CD4bs zahrnuje dutinu na rozhraní vnitřní a vnější domény gp120 v jejímž centru se nachází Phe43. Dalšími typicky významnými rezidui jsou Asp368 a Glu370, jejichž laboratorně navozené mutace znemožnily vazbu bnAb. Ze strany vnější domény je dutina lemována smyčkou ℒD, jejíž součástí je místo glykosylace Asn276. V blízkosti je další glykosylační místo Asn386. Glykosylace stěžuje průnik bnAb k samotné proteinové struktuře (Burton a Hangartner, 2016; Wiatt *et al.*, 1998). Mezi CD4bs – specifické bnAb patří např. VRC01 – like AB, IgG1b12, CH103. Jejich společným rysem je dlouhá CDR_H 3 a naopak krátká CDR_L 3 smyčka. Tyto strukturní rysy obchází částečné stínění CD4bs a ovlivňování struktury přemosťujícím listem, jehož součástí je i V1/V2



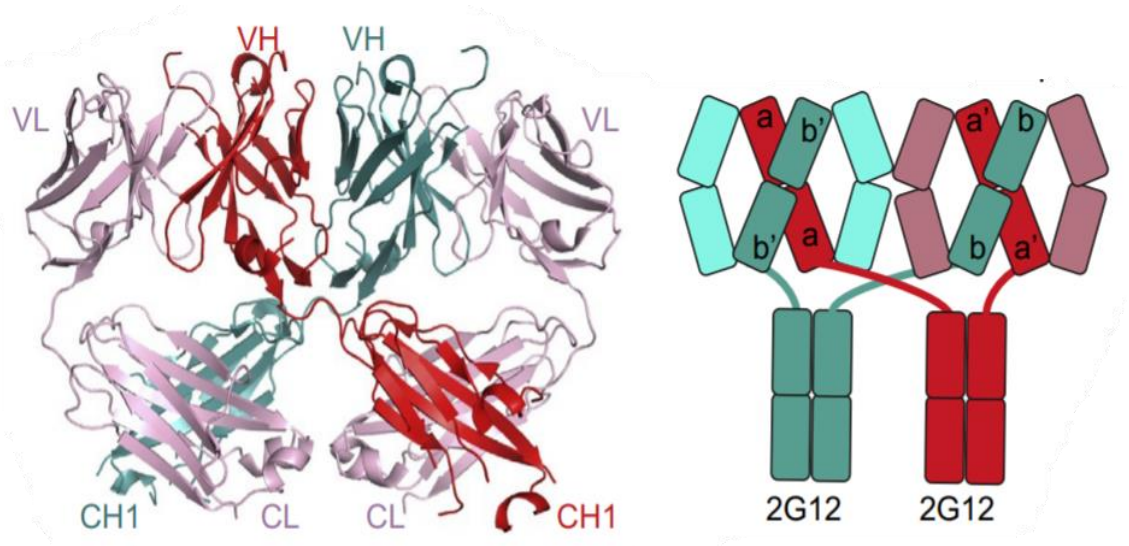
Obr. 9: Schématické znázornění hlavních oblastí antigenních determinant na env proteinu.



Obr. 10: Konformační stavy env proteinu s epitopy pro bnAb. A,B – pohled z boku, C,D – pohled shora (převzato z Wang *et al*., 2016).

smyčka gp120. Pro IgG1b12 je navíc typická částečná vazba na V1/V2 smyčku, která je již součástí jiné epitopové oblasti (Burton a Hangartner, 2016).

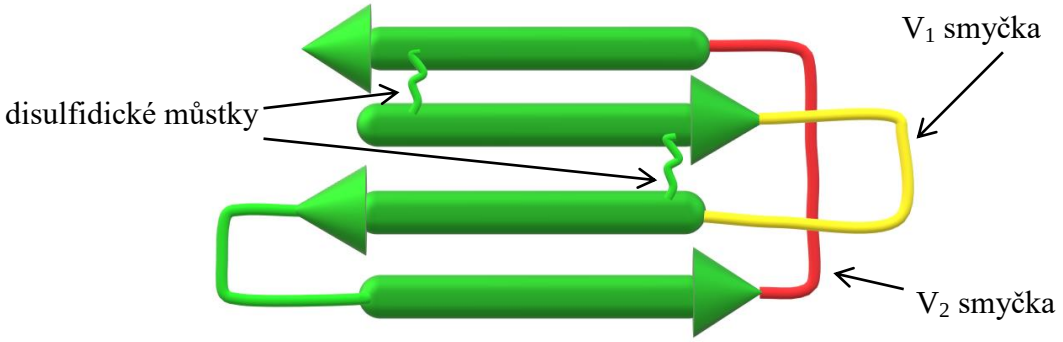
Tzv. mannosová náplast je epitopem nacházejícím se na vnější doméně gp120. V oblasti je zahrnuta smyčka V4 a stopka smyčky V3. Protein je zde výrazně glykosylován glykany s vysokým obsahem mannosy, což mu dodává značnou heterogenitu a toleranci imunitním systémem. Tvorba sem mířících protilátek je tedy značně náročná, aby nezískaly autoreaktivitu. Oblast byla nalezena díky vazbě bnAb 2G12, která je jako jedna z mála schopna do vazby zahrnout glykany, zejména na N332 dále N295, 301, 332, 339, 386 a 392. 2G12 má unikátní schopnost tzv. doménové výměny, která spočívá ve křížení Fab ramen dvou imunoglobulinů (Obr. 11). V této struktuře se VH doména obou Fab ramen kříží s přilehlými VH doménami druhého monomeru imunoglobulinu. Výsledná struktura pak vypadá jako by těžký řetěz Fab fragmentu vytvořil tvar X s lehkými řetězy, které reagují s V_H a C_H1 ze dvou různých těžkých řetězů. Celkovým důsledkem zkřížení je protilátka s lineárním tvarem, namísto tradičního tvaru Y a s širší antigen – vázající oblastí (Daniels a Saunders, 2019; Wyatt *et al.*, 1998). Dalšími bnAb jsou rodiny PG a PGT jako např. PGT121, PGT128, PGT135, které pro vazbu využívají V3 smyčku. Okolí smyčky V3 je označováno jako imunologicky tichá oblast, díky vysoké glykosylaci se zde váže jen minimum protilátek.



Obr. 11: Struktura (vlevo) a schématické znázornění (vpravo) dimerního uspořádání bnAb 2G12 (převzato z Daniels a Saunders, 2019).

Oblast sousedí s CD4bs, která je sice glykanů zbavena, ale je jimi lemována, což zřejmě také představuje obranu proti vazbě bnAb (Wyatt a Sodroski, 1998; Daniels a Saunders, 2019). Pro bnAb vazající se do mannosové náplasti je typická velmi dlouhá smyčka CDR_H3, která pak proniká přes glykanový štít k povrchu proteinu. Účinkem vazby těchto bnAb je sterická zábrana, kdy se virus není schopen dostatečně přiblížit k receptorům hostitelské buňky (Burton a Hangartner, 2016).

Významným epitopem pro bnAb je také hrot smyček V_1/V_2 (Obr. 12), která je součástí tzv. přemosťujícího listu gp120 (Wyatt *et al.*, 1998). Oblast V_1/V_2 je tvořena čtyřvláknovým β – listem, který je propojen disulfidickými můstky, V_1 a V_2 smyčkou. Konkávní strana je bez glykanu a hydrofobní, zatímco konvexní strana je hydrofilní s glykanem vázaným na centrální Asn. Sekvence aminokyselin na méně variabilní



Obr. 12: Schématické znázornění hrotu smyčky V_1/V_2 gp120.

smyčce V_2 je bohatá na Lys. Pro bnAb je opět typická dlouhá CDR_H 3 s vysokým zastoupením kyselých aminokyselin (obvykle jde o sulfatované Tyr nebo Glu) pro vazbu na bazická lysinová rezidua. Typickou V_1/V_2 – specifickou protilátkou je PG9 nebo PG16 (Burton a Hangartner, 2016; McLellan *et al.*, 2011).

Rozhraní gp41 – gp120 je rovněž považováno za významný epitop bnAb. Je typický pouze pro trimerní uspořádání gp4/gp120, tedy k vazbě protilátky jsou nutné části ze všech tří protomerů gp41/gp120. Vazbou bnAb jsou inhibovány konformační změny při vazbě viru na receptory. Řadí se sem skupina bnAb $PGT_{151-158}$. Tento typ bnAb také vykazuje neúplnou neutralizaci, je však hojně využíván pro stabilizaci trimerního glykoproteinu, což se hojně využívá při experimentech s cílem zkoumat strukturu a vazbu protilátek do trimerní formy na místo rekombinantního monomeru (Blattner *et al.*, 2014).

Na gp41 se nachází oblast MPER (z anglického membrane proximal external region). Zahrnuje proximální část transmembránové MSD těsně nad membránou. Blízkost membrány představuje problém vývoje MPER – specifických bnAb, protože část z nich je schopná interakce s lipidy membrány, což je příčinou různého stupně autoreaktivity, kterou tyto bnAb následně vykazují (Pinto *et al.*, 2019). MPER je špatně dostupná v nativním trimerním uspořádání gp41/gp120. K odkrytí je zapotřebí konformačních změn vyvolaných vazbou viru na receptor. Mezi hlavní zástupce MPER – specifických bnAb patří imunoglobuliny 4E10, 10E8, DH511 a VRC42, kdy první dvě právě vykazují i interakci s membránovými lipidy. Tyto bnAb obsahují, v porovnání s běžnými protilátkami, delší CDR_H 3 smyčku výrazného hydrofobního charakteru, což podporuje myšlenku vazby na lipidy (Irimia *et al.*, 2016). Vykazují tzv. neúplnou neutralizaci, tj. neutralizace daného izolátu danou protilátkou nedosahuje 100% (Burton a Hangartner, 2016).

2.6 Vakcína proti HIV–1

2.6.1 Vakcinační strategie a vývoj vakcíny proti HIV–1

Principem vakcinace je, aby vhodný imunogen (imunogenní látka mající vlastnosti antigenu), který tvoří podstatu vakcíny, dokázal po aplikaci v těle stimulovat specifickou imunitní odpověď, čímž imunizovaný jedinec získá protilátky a paměťové B – buňky schopné rychlé aktivace, tedy obranu při napadení virem.

Problémem HIV je jeho značná různorodost a autologní protilátková odezva, tj. protilátky jsou pouze kmenově specifické a neschopné neutralizace širšího spektra virových kmenů. bnAb, které jsou schopny kříženě neutralizovat široké spektrum různých, heterogenních kmenů HIV–1, však vznikají asi jen u 1/3 infikovaných pacientů a to až po několika letech od počátku infekce v důsledku „setkání“ s mnoha variantami viru, který je mutacemi vytváří (Moog *et al.*, 1997; Sadamand *et al.*, 2016; van Gils *et al.*, 2009). Cílem vakcíny je tuto dobu zkrátit. Při přirozené infekci mutující virus stále uniká před bnAb, které také prochází mutacemi, aby se zlepšila jejich vazebná afinita k epitopům, což vede k rozšíření neutralizační šíře (Sadamand *et al.*, 2016).

Je několik přístupů vývoje vakcín. Základním přístupem je aplikace různých variant či částí env proteinu jako imunogenu, který je v případě HIV jediným cílem bnAb. Strategií je podávat tyto různé varianty imunogenu postupně nebo v jednom. Cílem je rychlé navození široké neutralizační šíře u vznikajících protilátek. Studie probíhají imunizací různých živočichů (nejtypičtěji myš, králík, morče, makak, ale také lama, tur a další), přičemž protilátková odezva na stejný vakcinační typ se u různých živočichů liší. Jedním z mechanismů navození tvorby bnAb je *in vitro* snížit expozici mimocílových non – bnAb epitopů jako je např. smyčka V3, která na sebe stahuje protilátkovou odpověď na úkor epitopů pro bnAb. Dalším přístupem je soustředit protilátkovou odpověď na konzervované epitopy rekombinantního env proteinu vytvořením otvorů v glykanovém štítu, kdy je protein zbaven glykanů, ale během vakcinace se postupně glykosylovaný protein dodává.

Jako nejčastěji experimentálně využívané imunogeny jsou nativní trimerický gp160, gp150 (c – terminálně zkrácený gp160), SOSIP (disulfidem stabilizované štěpené trimerické formy gp140, v současnosti nejvíce se podobající trimerickému gp120), monomerní gp120, peptidické fragmenty gp41 (zde především fragmenty odpovídající fúznímu peptidu) (Robinson, 2018). Všechny tyto imunogeny jsou za účelem studia možných epitopů různě modifikovány (glykosylací, deglykosylací, zaváděním mutací,…) (van Schooten a van Gils, 2018). K těmto imunogenům se často přidává jako adjuvantní látka interleukin IL – 21 (řídí vývoj B – lymfocytů zárodečném centru sekundárního folikulu lymfatické uzliny) a IL – 12 (ovlivňuje tvorbu IL – 21) jednak pro zvýšení imunogenosti, ale také pro podporu vývoje specifických B – lymfocytů (Sadamand *et al.*, 2016).

Při imunizačních experimentech bylo prokázáno, že pro tvorbu neutralizační šíře bnAb je výhodnější použít více mírně odlišných variant konkrétního imunogenu, než tyto varianty přidávat postupně za sebou. Např. při imunizaci králíků trimerním SOSIP typu A, B a C vykazovali jedinci očkovaní všemi třemi typy SOSIP najednou, nižší autologní odpověď, než jedinci očkovaní látkami postupně (van Schooten a van Gils, 2018).

2.6.2 Budoucnost HIV–1 vakcíny

Úkolem výzkumu vakcíny HIV–1 je připravit vhodný imunogen, který by navodil rychlou a dostatečně silnou protilátkovou odpověď, přičemž protilátky by měly uspokojivou neutralizační šíři k neutralizaci širokého spektra kmenů HIV–1. Snahou je také získávat a aktivovat B – buňky jakožto i podporovat jejich delší setrvání a tedy intenzivnější vývoj v zárodečném folikulu lymfatické uzliny. Současné výsledky experimentů jsou nadějné pro dosažení tohoto cíle. Doposud se však nepodařilo připravit vhodný imunogen nebo směs jeho variant, která by navodila tvorbu bnAb dostatečného titru a neutralizační šíře (Burton a Hangartner, 2016; Robinson, 2018). Předpokládá se, že za současného stavu výzkumu by účinná vakcína mohla být na trhu nejdříve za 10 až 20 let. (Krejsek *et al.*, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- Plasmidy:
  - HIV–1 Env Expression vector QH359. 21M. ENV. D1 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)
  - HIV–1 Env Expression vector CRF13 cpx Clone 258 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)
  - HIV–1 1054 Env Expression vector p. 1054. TC4. 1499 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)
  - HIV–1 Env Expression vector CRF01_AE clone 269 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)
  - HIV–1 $pSG3^{\Delta Env}$ Non-infectious Molecular Clone (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)
- Buněčné kultury:
  - Bakteriální buňky NEB® 5 – alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) (New England Biolab, Ipswich, USA)
  - 293T/17 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)
  - TZM – bl (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Manassas, USA)

3.1.2 Chemikálie

- Select agar (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Diethylaminoethyl – Dextran (DEAE – Dextran) (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- ethanol (70%) (VWR International, Radnor, USA)
- Trypanová modř (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Hydrofosforečnan sodný dihydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dihydrofosforečnan sodný monohydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrofosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

- LB (lysogeny broth) medium (VWR International, Radnor, USA)
- SOC (super optimal broth) medium (Biosera, Nuaillé, Francie)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Dulbecco's PBS (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- RPMI1640 medium (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA)
- Fetální bovinní serum (FBS, 10%) (Gibco™, Waltham, USA)
- Trypsin – EDTA (0,25 %) (Gibco™, Waltham, USA)
- Ampicilin (10 $mg \cdot ml^{-1}$) (Gibco™, Waltham, USA)
- Penicillin–Streptomycin (10 $mg \cdot ml^{-1}$) (Gibco™, Waltham, USA)

3.1.3 Složení roztoků

LB agar	7,5 g LB media 4,5 g Select agar 300 doplint do 300 ml ddH_2O, autoklávovat 300 µl ampicilin (100 $\mu g \cdot ml^{-1}$)
RPMI kompletní růstové medium	na 500 ml media: 450 ml RPMI 50 ml FBS 5 ml Penicillin–Streptomyin
DMEM kompletní růstové medium	na 500 ml media: 450 ml DNEM 50 ml FBS 5 ml Penicillin–Streptomyin

3.1.4 Komerční soupravy

- NucleoSpin®Plasmid/Plasmid (NoLid) (MACHEREY–NAGEL GmbH, Düren, Německo)
- Britelite Plus Reporter Gene Assay (Promega, Madison, USA)

3.1.5 Přístrojové vybavení

- Automatické pipety
  - 1 – 5 ml, 2 – 20 µl, 1 – 10 µl; 0,2 – 1 µl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
  - 40 – 200 µl (Thermo Labsystems Inc, Waltham, USA)
- CO_2 inkubátor (Schoeller Pharma Praha, Praha, ČR)

- Mikroskop inverzní (Opton, Německo)
- Reader multidetekční (BioTek®, Bad Friedrichshall, Německo)
- Třepačka včetně inkubátoru (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Německo)
- Třepačka Vortex MS 3 basic (IKA, Staufen im Breisgau, Německo)
- Laboratorní váha (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- Box hlubokomrazící (Schoeller instruments, Praha, ČR)
- Sterilizátor stolní DX–90 (Systec, Linden, Německo)
- Centrifuga multifunkční (MPW MED. INSTRUMENS, Varšava, Polsko)
- Top Count NXT (Biocompare, Meriden, USA)
- Flowbox (SafeFAST TOP, Cornaredo, Itálie)
- Laminární box – Aura VF48 (BioAir, Siziano, Itálie)
- Termoblok (BioCote® Stuart equipment, Staffordshire, Velká Británie)
- Multikanálová pipeta (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Automatická pipeta (Hirschmann, Eberstadt, Německo)
- Pipety Finnpipette (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.6 Spotřební materiál

- T-25 lahve (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- T-75 lahve (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- 96 jamková mikrotitrační destička (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Pipetovací špičky
  - 1 ml (Neptune Scientific, USA)
  - 10 µl (AHN/iBioTech, ČR)
  - 200 µl (Alpha Laboratories ltd., Velká Británie)
- 1,5 ml mikrozkumavky (Eppendorftubes®, Německo)
- 15 ml kónické zkumavky (SPL Life Sciences co., Ltd., Korea)
- 15 ml propylenové zkumavky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Petriho misky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- 500 ml Erlenmayerova baňka
- 100 ml odměrná baňka
- Bakteriologická klička

3.1.7 Software

Microsoft Office Excel 2010, Microsoft Office PowerPoint 2010, ChemSketch, Pymol + RCSB Protein Database Bank, Pixlr foto editor (úprava fotografií a obrázků), Microsoft Malování 3D, Microsoft malování.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava agaru

Do Erlenmayerovy baňky bylo nalito 300 ml destilované vody (ddH_2O). Následně bylo v tomto objemu rozpuštěno 7,5 g LB média a 4,5 g Select agaru. Takto připravené médium bylo na 2 h vloženo do autoklávu pro sterilizaci. Připravený agar byl vychlazen při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 300 µl antibiotika ampicilin o koncentraci 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (na výslednou koncentraci v agaru 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$) a agar byl rozlit po 20 ml do Petriho misek. Po ztuhnutí byl agar uchován při teplotě 4 °C.

3.2.2 Příprava plasmidů

5 µg plasmidu bylo lyofilizováno a skladováno ve stabilizačním roztoku DNAstable PLUS v mrazicím boxu při teplotě − 80˚C. Plasmidy byly vytemperovány na laboratorní teplotu a zcentrifugovány 5 min. při 5000 x g. Následně byly hydratovány přidáním 10 µl ddH_2O a inkubovány 15 min. při pokojové teplotě. Plasmidy byly poté naředěny 1:10 (1 µl z každé ze čtyř mikrozkumavek + 10 µl ddH_2O).

3.2.3 Transformace bakterií

Bakterie *E. coli*, skladované při teplotě − 80˚C, byly umístěny na led. Do čtyř čistých 1,5 ml mikrozkumavek bylo napipetováno 10 µl bakteriální suspenze a ke každé byl přidán 1 µl ze čtyř připravených a naředěných plasmidů. Směs byla velmi opatrně promíchána „ťuknutím“ prstu do dna mikrozkumavky. Poté byla směs inkubována po dobu 30 min. na ledu. Transformace bakterií byla provedena metodou teplotního šoku. Bakterie byly přeneseny do termobloku vyhřátého na 42˚C po dobu 30 s. Poté byly okamžitě přeneseny na led na dobu 1 min. Do každé mikrozkumavky bylo napipetováno 250 µl SOC média, obsah byl promíchán a bakterie byly inkubovány po dobu 1 h v inkubátoru na třepačce při teplotě 37˚C.

Bakterie byly napipetovány na Petriho misku s agarem a rozetřeny pomocí očkovací hokejky rovnoměrně po jeho povrchu. Tato miska se označila názvem použitého plasmidu a číslem 1. Hokejka nebyla nijak dezinfikována a byla použita pro rozetření zbytků bakterií na jejím povrchu na další Petriho misku s agarem, která pak byla označena číslem 2. Obdobně se postupovalo ještě pro jednu misku, označenou číslem 3. Petriho misky byly inkubovány dnem nahoru při teplotě 37˚C přes noc.

3.2.4 Selekce kolonie

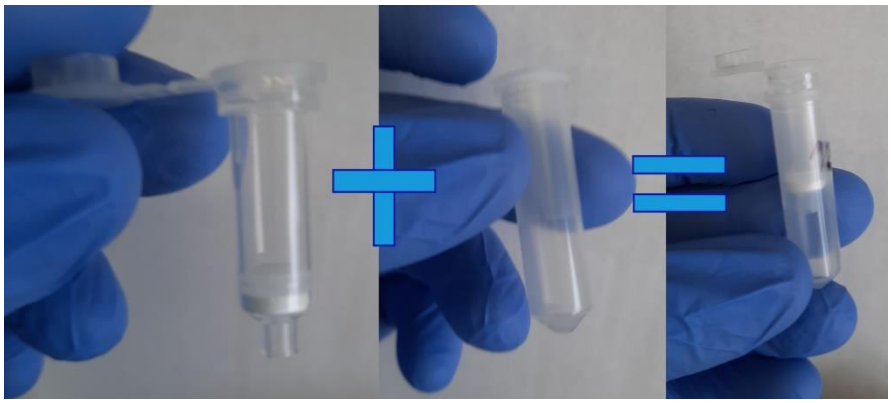
Ze série tří Petriho misek s narostlými koloniemi, pro každý plasmid byla vybrána jedna s opticky optimální hustotou kolonií. Z jednotlivých vybraných Petriho misek byly 3 kolonie bakterií pipetou přeneseny do 3 zkumavek obsahujících 6 ml růstového LB média s přídavkem 6 µl amipicilinu o koncentraci 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a inkubovány při 37°C na třepačce přes noc.

3.2.5 Izolace a purifikace plasmidové DNA

Izolace a purifikace plasmidové DNA byla prováděna dle standardního laboratorního protokolu (MACHEREY–NAGEL). Po inkubaci byla pro každý plasmid vybrána jedna zkumavka s opticky nejvíce narostlou kulturou bakterií.

Následující kroky byly provedeny pro každou ze čtyř vybraných zkumavek (pro každý plasmid). Zkumavka byla dobře promíchána a 2 ml suspenze byly odpipetovány do čisté 1,5 ml mikrozkumavky, která byla centrifugována 10 min. při 8000 x g. Následně bylo pipetou odsáto médium tak, aby nebyl porušen bakteriální pelet na dně mikrozkumavky. Byly přidány další 2 ml bakteriální kultury a proces cetrifugace byl opakován.

Po odsátí media bylo do mikrozkumavky k bakteriálnímu peletu napipetováno 250 µl resuspendačního roztoku A1. Mikrozkumavka pak byla vortexována pro důkladné rozsuspendování peletu. Následně bylo přidáno 250 µl lyzačního roztoku A2 a po 5 min. 300 µl neutralizačního roztoku A_3. Roztok byl centrifugován po dobu 8 min. při 11 000 x g. Pro další kroky bylo třeba umístit kolonu NucleoSpin®Plasmid/Plasmid (NoLid) Culumn do zkumavky Collection Tube (Obr. 13). Centrifugací 1 min. při

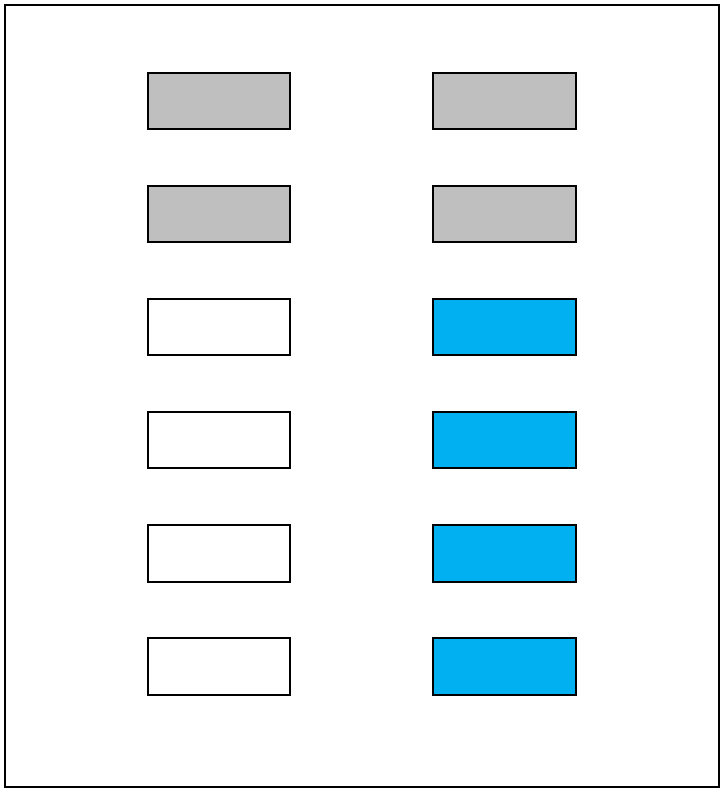


Obr. 13: Umístění kolonky do zkumavky pro purifikaci plasmidové DNA.

11 000 x g došlo na koloně k dekantaci, kdy se na koloně zachytí molekuly DNA. Balastní obsah zkumavky byl odstraněn a pipetou bylo na kolonku přidáno 600 µl promývacího roztoku A4. Mikrozkumavka byla centrifugována 1 min. při 11 000 x g. Roztok, který protekl kolonou byl odstraněn. K vysušení membrány v koloně byla mikrozkumavka s kolonkou centrifugována ještě jednou 2 min. při 11 000 x g.

Poté se kolonky přemístily do čisté mikrozkumavky. Bylo přidáno 40 µl elučního roztoku (ddH_2O) a mikrozkumavky byly centrifugovány 1 min. při 10 000 x. Následně byly kolonky přemístěny opět do čistých mikrozkumavek a bylo přidáno 20 µl ddH_2O. Mikrozkumavky s kolonkami byly centrifugovány 1 min. při 10 000 x g. Získány tak byly 4 mikrozkumavky s obsahem 40 µl roztoku DNA v ddH_2O a 4 mikrozkumavky s obsahem 20 µl roztoku DNA v ddH_2O.

Koncentrace DNA ve vzorku byla změřena spektrofotometricky v UV oblasti při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Na destičku kapkového spektrofotometru byly do příslušných polí naneseny 2 µl z každého z vyizolovaných plasmidů dle schématu na Obr. 14. Jako blank byly pipetovány 2 µl ddH_2O. Na bázi Lambert–Beerova zákona byla zjištěna koncentrace DNA ve vzorku.



Obr. 14: Schéma nanesení vzorků na destičku pro měření absorbance. Šedá pole představují blank ddH2O, bílá pole vzorky plasmidů z objemu 40 µl, modrá z objemu 20 µl.

3.2.6 Transfekce buněk 293T/17

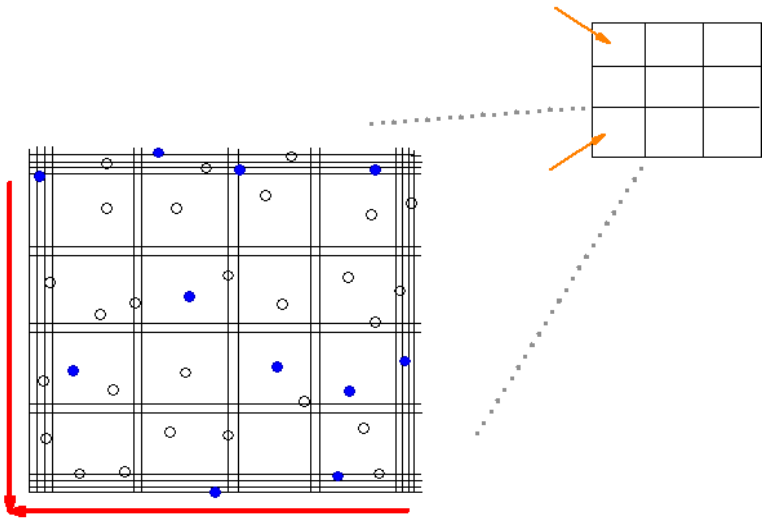
Adherentní buňky 293T/17 byly kultivovány v T – 75 lahvích. Pro jejich uvolnění bylo odstraněno kultivační medium a stěna byla opláchnuta 2 ml DPBS. Následně byl přidán 1 ml roztoku Trypsin – EDTA a láhev byla inkubována 5 min. při 37°C. Poté bylo přidáno 5 ml RPMI media a buňky byly rozsuspendovány.

Pro zjištění životnosti buněk a jejich koncentrace bylo smícháno 10 µl z buněčné suspenze s 10 µl 0,4 % roztoku trypanové modři. 10 µl směsi bylo přepipetováno na podložní sklíčko na Bürkerově komůrce, která byla umístěna pod světelný mikroskop.

Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce dle schématu na Obr. 15. Mrtvé buňky byly obarveny modře. Pro výpočet byly zvoleny 2 z 9 čtvercových polí a byl stanoven počet buněk v těchto polích, přičemž bylo uplatňováno tzv. pravidlo L, kdy v případě, že buňky leží na hranici dvou polí, pak do celkového počtu byly zahrnovány pouze ty, které byly umístěny na dvou hranách majících společný vrchol (Obr. 15). Mrtvé buňky nebyly do celkového počtu buněk zahrnovány.

600 µl buněčné kultury odpovídající 1×10^6 buňkám bylo smícháno s 5 ml RPMI media, přepipetováno do čisté kultivační láhve T-25 a inkubováno v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% atmosféře CO_2 přes noc.

Do mikrozkumavek byly napipetovány odpovídající objemy plasmidů tak, aby v každé bylo obsaženo 1,5 µg plasmidové DNA nesoucí env gen a 3 µg páteřní plasmidové DNA v DMEM médiu. Do dalších mikrozkumavek bylo přidáno 218 µl



Obr. 15: Schéma počítací komůrky. Do výpočtu byly zahrnovány pouze buňky ležící uvnitř pole a na hranách podél červených šipek. Využity byly 2 pole (oranžové šipky).

DMEM media a 16 µl 293fektinu. Mikrozkumavky byly byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Celý objem zkumavky s plasmidovou DNA byl přenesen do zkumavky s DMEM mediem a 293fektinem. Zkumavky pak byly inkubovány 30 min. při pokojové teplotě. Celý jejich obsah pak byl přenesen do T – 25 kultivačních lahví s buňkami 293T/17 připravenými den předem a narostenými na 60-90% konfluency. Buňky byly inkubovány 4 hod. v inkubátoru při 37°C v 5% atmosféře CO_2.

Následně bylo medium odsáto a nahrazeno 5 ml čerstvého RPMI media. Buňky pak byly inkubovány 48 hod. v inkubátoru při teplotě 37°C v 5% atmosféře CO_2.

4 ml supernatantu s vyprodukovanými pseudoviry bylo z každé lahve přepipetováno do čisté zkumavky a bylo přidáno 0,4 ml FBS. Pseudoviry byly rozpipetovány do 10 mikrozkumavek (po 400 µl). Mikrozkumavky byly označeny názvem plasmidu, datem a zmraženy při teplotě −80°C do dalšího použití.

3.2.7 Titrace pseudovirů

Na standardní 96 – jamkovou destičku bylo napipetováno 100 µl DMEM media do všech jamek kromě krajních. Do krajních pozic bylo napipetováno 200 µl PBS. Pseudoviry byly pipetovány v tripletech, kdy z rozmrazených zkumavek bylo přeneseno 25 µl vzorku na jamky B2 – D2 a další vzorek pseudoviru na jamky E2 – G2 (Obr. 16).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	10
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CC	PBS
C	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CC	PBS
D	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CC	PBS
E	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CC	PBS
F	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CC	PBS
G	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CC	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Obr. 16**:** Schéma pipetování vzorků na 96 – jamkovou destičku. V krajních pozicích PBS, světle a tmavě modrá pole 1 – 9 představují triplety vzorků dvou různých pseudovirů při postupném osminásobném ředění faktorem 5, B – G 11 buněčná kontrola (CC).

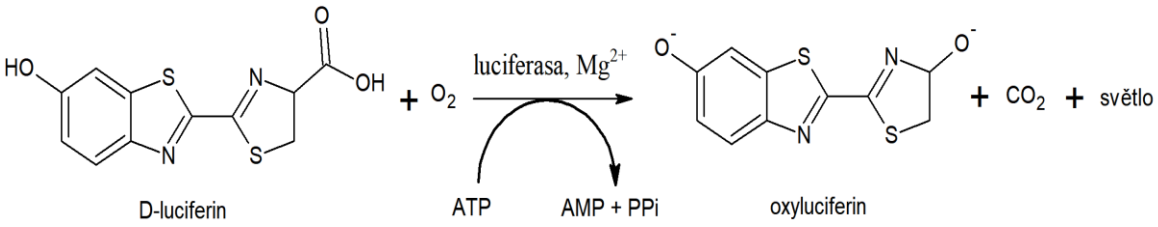
Následně bylo využito ředění faktorem 5, tj. 25 µl z předchozí jamky bylo přeneseno na jamku následující (např. B2 → B3 → B4 → B5 → B6 → B7 → B8 → B9 → B10). Z jamek ve sloupci 10 bylo 25 µl roztoku přepipetováno do odpadu. Poslední sloupec (B11 – G11) sloužil jako buněčná kontrola, bez pseudovirů (Obr. 16).

Do jamek byly následně přidány indikátorové buňky TZM – bl, které byly standardně kultivovány v T75 – lahvích. Z lahví bylo odsáto kultivační médium a buňky byly promyty 2 ml DPBS. Po odsátí DPBS byl přidán 1 ml roztoku Trypsin – EDTA. Buňky byly inkubovány 1 minutu při pokojové teplotě. Poté byl roztok odsán a buňky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 4 min. Následně bylo přidáno 5 ml DMEM média a buňky byly rozsuspendovány a počítány v Bürkerově komůrce pod mikroskopem obdobně jako v případě buněk 293T/17.

500 µl buněšné kultury odpovídající $1{,}3\times10^{6}$ buňkám bylo smícháno s 12,5 ml DMEM media a 12 µl DEAE – Dextranu o koncentraci 25 $mg\cdot ml^{-1}$). Do každé jamky (kromě krajních) bylo napipetováno 100 µl naředěných buněk, což odpovídá 10 000 buněk v jamce. Destičky pak byly inkubovány v inkubátoru po dobu 48 hod. při teplotě 37°C v 5% atmosféře CO_2.

3.2.8 Měření luminiscence

Desky byly 10 minut temperovány při pokojové teplotě. Z každé jamky bylo odpipetováno 150 µl media. Následně bylo do každé jamky přidáno 30 µl lyzačního pufru obsahujícího luciferin (Britelite Plus kit). Destičky byly poté inkubovány po dobu 2 min. při pokojové teplotě. 100 µl lyzátu bylo z každé jamky přepipetováno do odpovídajících jamek na černé destičce. Luminiscence, vyvíjena na základě enzymatického působení luciferázy (Obr. 17) byla změřena v luminometru TopCount NXT (Perkin Elmer) v jednotkách RLU (relative luciferase units) pro jednotlivé jamky.



Obr. 17: Enzymatická reakce luciferasy.

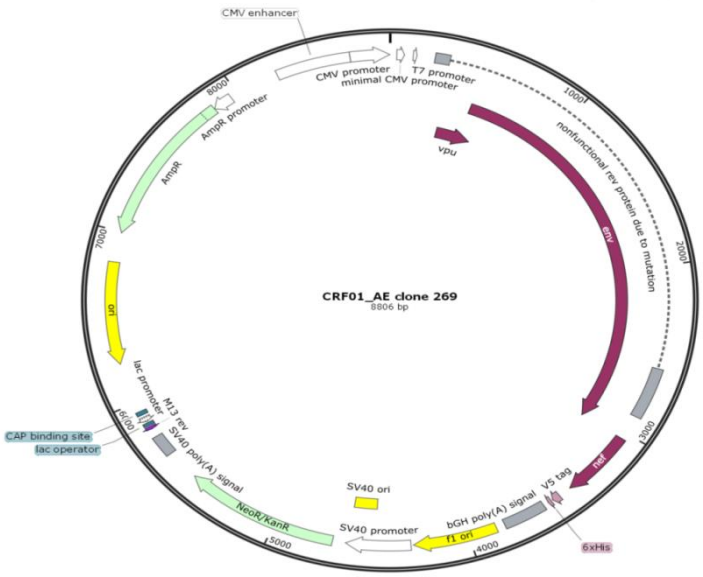
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Plasmid

Plasmidy (Obr. 18) použité pro tvorbu pseudovirů (Tab. 2) byly získány jako klony nesoucí *env/rev* sekvence izolované z virové DNA z periferní krve HIV pozitivních pacientů. Tyto sekvence byly vneseny do expresního vektoru pcDNA 3.1D vytvářející páteř plasmidu s obsahem *gag/pol* sekvence zajišťující balení vznikajících pseudovirů. Plasmidy byly amplifikovány v buňkách *E. coli* a standardně jsou dodávány jako 5 µg purifikované DNA stabilizované v roztoku DNAstablePLUS. Důležitou součástí plasmidového genomu je také selekční marker, díky němuž je možné vyselektovat buňky, které plasmid přijaly a jsou schopny získanou genetickou informaci exprimovat. V případě použitých plasmidů se jednalo o rezistenci na antibiotikum ampicilin nebo gentamicin (bylo možné využít i neomycin).

Tab. 2: Názvy použitých plasmidů a jejich velikost

plasmid	zkratka	velikost (bp)
CRF13_cpx clone 258	AG258	8601
P1054. TC4. 1499	1054	8461
QH359. 21M. ENV. D1	QH259.D1	8542
CRF01_AE clone 269	AG269	8806



Obr. 18: Genová mapa plasmidu CRF01_AE clone 269, HIV reagent program: https://www.hivreagentprogram.org/Catalog/Clones/ARP-11603.aspx (26. 3. 2021).

4.2 Koncentrace plasmidové DNA

Ve vzorcích jednotlivých plasmidů po amplifikaci v buňkách *E. coli*, izolaci a purifikaci byla měřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima DNA 260 nm a vlnové délce absorpčního maxima balastních proteinů 280 nm. Z poměru obou absorbancí lze usuzovat čistotu vzorku, kdy hodnota poměru abosorbancí by se měla pohybovat okolo hodnoty 1,8. Na základě Lambert – Beerova zákona byla získána koncentrace plasmidové DNA ve vzorcích. Výsledky měření jsou shrnuty v Tab. 3. Koncentrace plasmidu AG258 byla 120,975 $ng \cdot \mu l^{-1}$, plasmidu 1054 276,075 $ng \cdot \mu l^{-1}$, plasmidu QH259.D1 170,175 $ng \cdot \mu l^{-1}$ a plasmidu AG269 byla koncentrace 222,575 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Hodnota poměru A_{260}/A_{280} leží ve všech případech v intervalu 1,884 – 1,979; což je pro transfekci vhodná čistota. Podařilo se tedy vyprodukovat a vypurifikovat plasmidovou DNA u všech vzorků v dostatečném množství a čistotě.

4.3 Transfekce buněk 293T/17

Na bázi liposomů byla plasmidová DNA, kódující jednotlivé varianty env proteinu společně s páteřním vektorem $pSG3^{\Delta Env}$ vnesena do buněk 293T/17. K transfekci bylo třeba 1,5 µg plasmidové DNA a 3 µg páteřního plasmidu. Na základě zjištěných koncentrací nukleových kyselin byl dopočítán potřebný objem vzorků nutný k trasfekci (Tab. 4). Byly vypočítány objemy 12,399 µl pro plasmid AG258; 5,453 µl pro plasmid 1054; 8,815 µl pro plasmid QH259.D1 a 6,739 µl pro plasmid AG269. Tyto objemy byly napipetovány do transfekční směsi společně s 1,250 µl páteřní vektorové DNA, která byla vyizolována již dříve.

Tab. 3: Koncentrace plasmidové DNA

plasmid	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	c ($ng \cdot \mu l^{-1}$)
AG258	0,121	0,064	1,884	120,975
1054	0,276	0,140	1,979	276,075
QH259.D1	0,170	0,087	1,960	170,175
AG269	0,223	0,114	1,955	222,575

Tab. 4 Koncentrace plasmidů a jejich objem potřebný k transfekci 293T/17 buněk

plasmid	koncentrace DNA ($ng \cdot \mu l^{-1}$)	objem (µl)
AG 258	120,975	12,399
1054	276,075	5,453
QH259.D1	170,175	8,815
AG 269	222.575	6,739
$pSG3^{\Delta Env}$	$2{,}4 \cdot 10^3$	1,250

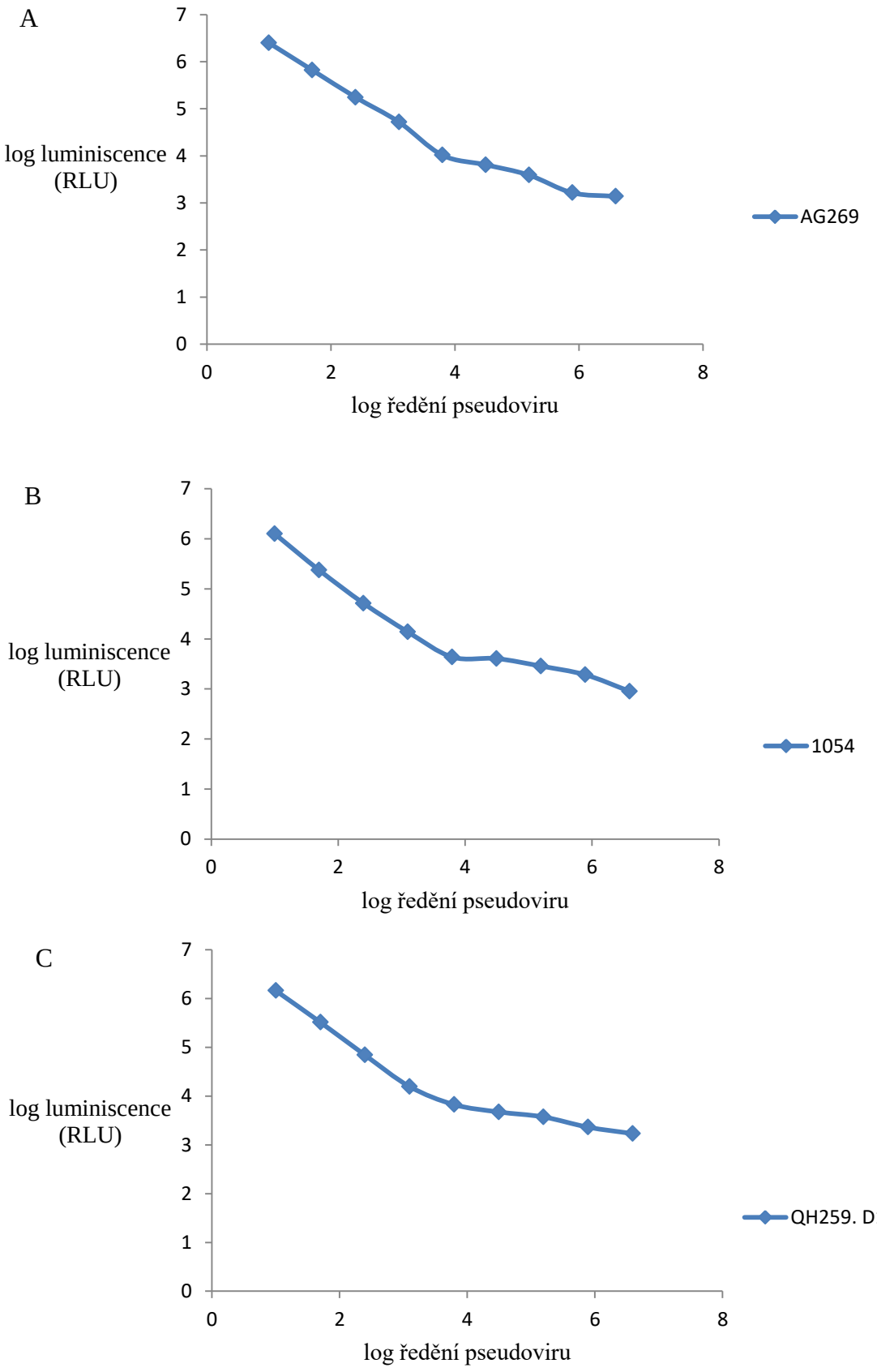
4.4 Titrace pseudovirových částic

4.4.1 Kvantifikace buněk TZM – bl

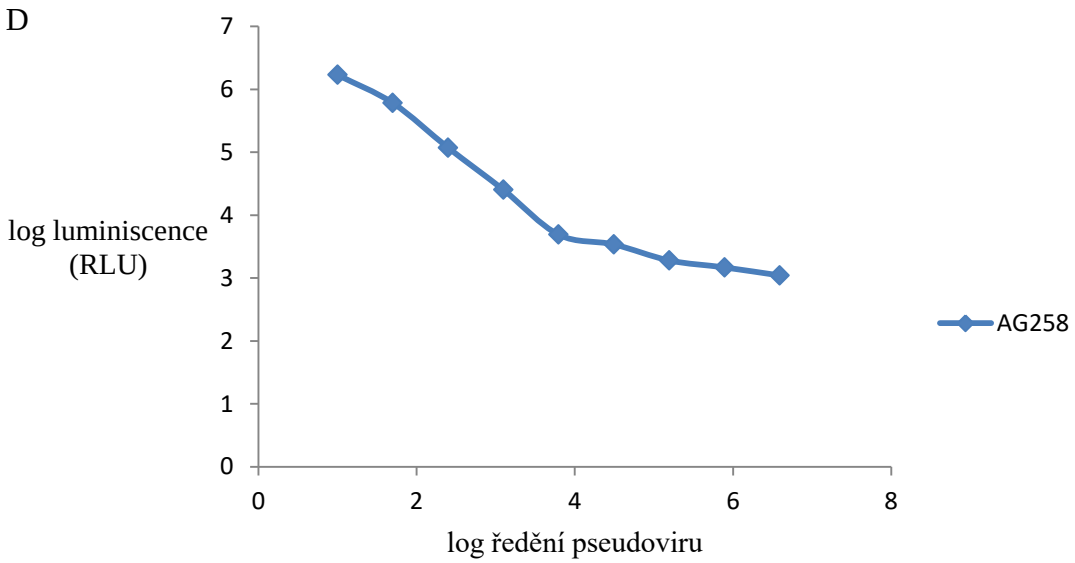
Ve dvou krajních polích Bürkerovy komůrky bylo napočítáno 260 životaschopných buněk (x). Koncentrace buněk v trypsinizované buněčné kultuře byla zjištěna na základě vztahu: $y = x \cdot 10^4$, kde y je počet buněk/ml a x zjištěný počet buněk ve 2 polích Bürkerovy komůrky. Zjištěná koncentrace buněk byla $260 \cdot 10^4$ na 1 ml media. V dalším postupu bylo využito $1{,}3 \cdot 10^6$ buněk, což odpovídá 0,5 ml buněčné kultury (Tab. 5).

4.4.2 Měření luminiscence

V jednotlivých jamkách destiček byla změřena luminiscence jako jednotky RLU (relative light units) na základě enzymatické reakce luciferasy s luciferinem. Byla vytvořena závislost luminiscence na ředění sady pseudovirových částic, která byla vynesena v honotách dekadického logaritmu do grafů (Obr. 19). Dle očekávání, čím větší ředění vzorku (menší buněčná koncentrace), tím menší luminiscence byla detekována. Z průběhu křivek je patrné, že se podařilo vyhnout tzv. cytopatickému či cytotoxickému efektu, který by měl za následek destrukci a lýzi buňky. V důsledku toho by křivky mohly lokálně vykazovat rostoucí, nikoliv klesající závislost luminiscence na ředění.



Obr. 19: Grafická závislost luminiscence na ředění pro jednotlivé sady pseudovirových částic. A –pseudoviry AG269, B – pseudoviry 1054, C – pseudoviry QH259.D1, D - pseudoviry AG258.



Obr. 19: Grafická závislost luminiscence na ředění pro jednotlivé sady pseudovirových částic. A – pseudoviry AG269, B – pseudoviry 1054, C – pseudoviry QH259.D1, D - pseudoviry AG258. *(pokračování)*

Tab. 5: Počet buněk TZM – bl v Bürkerově komůrce, počet buněk v trypsinizované buněčné kultuře a potřebný objem buněčné kultury k získání $1{,}3 \cdot 10^6$ buněk určených k titraci pseudovirů

počet buněk	počet buněk/ml media	objem media s $1{,}3 \cdot 10^6$ buněk (µl)
260	$260 \cdot 10^4$	500

Pro neutralizační experimenty, kde se pseudoviry následně využívají, je nutná hodnota 150 000 RLU jako protokolově určená standardní hodnota optimální koncentrace pseudovirů. Byla proto vybrána 2 ředění pro každý plasmid, mezi jejichž naměřenými hodnotami RLU leží standardní hodnota 150 000 RLU. Z těchto hodnot byla lineární regresí pro každý plasmid získána přímka, z jejíž rovnice bylo určeno ředění odpovídající 150 000 RLU (Tab. 6). Pro pseudoviry AG269 bylo vypočítáno potřebné ředění 456x, pro pseudoviry 1054 144x, pro pseudoviry AG258 237x a pro pseudoviry QH259.D1 180x. Takto je třeba zředit objem vyprodukovaných pseudovirových částic (celkově vyprodukovány 4 ml media s pseudovirovými částicemi z každého plasmidu, tj. 10 mikrozkumavek po 400 µl) pro dosažení optimální koncentrace při následném využití v neutralizačních experimentech.

Tab. 6: Ředění media s pseudovirovými částicemi odpovídající luminiscenci 150 000 RLU

plasmid	AG269	1054	AG258	QH259. D1
ředění odpovídající 150 000 RLU	456	144	237	180

Vzhledem k vysoké genetické rozmanitosti HIV–1 je cílem vývoje vakcíny, navodit produkci bnAb, které budou schopny neutralizace širokého spektra geneticky různých variant viru. Neutralizační aktivitu protilátek je možné sledovat pomocí pseudovirových částic v buněčných testech, které pak souží jako nástroj pro hodnocení neutralizační aktivity séra či uměle připravených protilátek. V rámci experimentální části práce se podařilo vyprodukovat sadu HIV–1 pseudovirových částic transformací buněk *E. coli* 4 variantami plasmidů s *env* genem a následnou transfekcí buněk 293T/17. Funkčnost pseudovirů a úspěšnost produkce byla otestována s indikátorovými buňkami TZM–bl měřením luminiscence.

Bylo postupováno dle standardního protokolu podle Montefiori Laboratory (Duke University). V postupu je řada důležitých kroků, při jejichž nedodržení by mohlo dojít k razantnímu snížení účinnosti a výtěžnosti produkce pseudovirů. Zejména se jedná o dodržení časových a teplotních intervalů. Např. při ručním rozmrazování buněk namísto rozmrazování na ledu (velké riziko zahřátí nad 0°C) nebo příliš dlouhá inkubace plasmidové DNA s buňkami *E. coli* se každých 10 min. nad doporučenou dobu účinnost transformace snižuje, a to až dvojnásobně.

Důležitá je také obezřetnosti a opatrnost při manipulaci s buňkami. Buňky 293T/17 jsou méně adherentní než jim příbuzné buněčné linie. Při samotné transfekci se přidáním transfekčního činidla zvyšuje permeabilita buněk. Proto by neměla být přítomna antibiotika, která by mohla zvýšit cytotoxicitu. Po 48 hodinách transfekce by medium s buňkami mělo mít typicky oranžově růžový nádech. Žlutě zbarvené médium se obvykle promítá do špatných výtěžků pseudotypovaných částic a je často výsledkem problémů s hustotou inokulace buněk nebo vysokým počtem pasáží.

Získané ředění při luminiscenci 150 000 RLU odpovídá optimální koncentraci vyprodukovaných pseudovirových částic. Může sloužit také jako kritérium úspěšnosti produkce, neboť větší ředění při stejné luminiscenci odpovídá většímu množství přítomných pseudovirů. Výsledky napovídají, že produkce pseudovirů byla dostatečná.

Pseudovirové částice slouží k charakterizaci pouze samotné infekce, tj. hodnocení vstupu viru do buňky. Nejsou tedy vhodné pro studium dalších částí virového replikačního cyklu. Skladování pseudovirových částic v kryovialkách při − 80˚C udržuje jejich stabilitu po několik měsíců bez znatelného snížení infekčnosti. Není doporučeno částice podrobovat opakovaným cyklům zmrazení a rozmrazení, neboť by to s časem mohlo vést k snížení infekčnosti. Je vhodné skladování v několika alikvótních podílech a rozmrazení těsně před použitím v testu.

5 ZÁVĚR

Předmětem zájmu práce byla problematika HIV–1. Popsána byla struktura viru a funkce jednotlivých proteinů, které vytváří virovou identitu a zajišťují optimální podmínky pro úspěšnou replikaci. Pozornost byla věnována struktuře a funkci env proteinu, fungujícímu jako ligand pro receptor CD4 na povrchu imunitních buněk. V další části byly charakterizovány široceneutralizační protilátky včetně jejich epitopů na povrchu viru. Možnosti rychlého a cíleného navození tvorby široce neutralizačních protilátek prostřednictvím stimulace imunitního systému vhodným imunogenem je podstatou aktuální snahy o vývoj vakcíny proti HIV–1.

V rámci praktické části se podařilo pomocí molekulárně – biologických metod vyprodukovat sadu HIV–1 pseudovirových částic. Výchozím materiálem byly 4 plasmidy nesoucí různé vatianty pro *env* gen. Plasmidy se podařilo dostatečně amplifikovat v buňkách *E. coli* a vypurifikovat pro následnou transfekci živočišných buněk 293T/17, které na základě přijaté genetické informace začnou pseudovirové částice produkovat do media. Funkčnost pseudovirů byla ověřena měřením luminiscence indikátorových buněk TZM-bl. Ze získaných hodnot bylo určeno potřebné ředění odpovídající luminiscenci 150 000 RLU jako optimální koncentrace pseudovirových částic pro jejich aplikaci v neutralizačních experimentech. Námi vyprodukované sady pseudovirů v mediu byly uskladněny při teplotě − 80˚C k jejich následnému možnému využití.

6 LITERATURA

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S., (2012): Congenital and Acquired Immunodeficiencies. In: *Cellular and Molecular Immunology* 7., (Gruliow R., Stingelin L.), Elsevier, U. S. A., 445-470.

Alsahafi N., Anand S. P., Castillo-Menendez L., Verly M. M., Medjahed H., Prévost J., Herschhorn A., Richard J., Schön A., Melillo B., Freire E., Smith A. B., Sodroski J., Finzi A. (2018): SOSIP Changes Affect Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Conformation and CD4 Engagement. *Journal of Virology* **92**, 19.

Arhel N. (2010): Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, **7**, 96.

Barré-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler–Blin C., Vézinet–Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 4599-4868.

Basañez, G., Zimmerberg J. (2001): HIV and apoptosis death and the mitochondrion. *The Journal of experimental medicine* **193**, 4.

Behrens A. – J., Crispin M. (2017): Structural principles controlling HIV envelope glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* **44**, 125-133.

Benko D. M., Schwartz S., Pavlakis G. N., Felber B. K. (1990): A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev shares sequences with tat, env and rev proteins. *Journal of virology* **64**, 2505-2518.

Blattner C., Lee J. H., Sliepen K., Derking R., Falkowska E., Torrents de la Peña A., Cupo A., Julien J. – P., van Gils M. (2014): Structural Delineation of a Quaternary, Cleavage-Dependent Epitope at the gp41-gp120 Interface on Intact HIV-1 Env Trimers. *Immunity* **40**, 669-680.

Blumenthal R., Durell S., Viard M. (2012): HIV Entry and Envelope Glycoprotein-mediated Fusion. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 40841-40849.

Bour S., Strebel K. (2000): HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex systém. *Advances in Pharmacology* **48**, 75-120.

Bour S., Strebel K. (2003): The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes and Infection* **5**, 1029-1039.

Buffalo C. Z., Iwamoto Y., Hurley, J. H., Ren X. F., (2019): How HIV Nef Proteins Hijack membrane traffic to promoter incection. *Jouranal of Virology* **94**, 24.

Burmester G. – R., Pezzutto A., Wirth J. (2013): Immunodeficiencies. In: Color atlas of Immunology. 4th, (Ulrichs T. a Aicher A.), Thieme, Germany, 108-113.

Burton D. R., Hangartner L. (2016): Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design. *Annual Review of Immunology* **34**, 635-659.

Campbell E. M., Hope T. J. (2008): Live cell imaging of the HIV-1 life cycle. *Trends in Microbiology* **16**, 580-587.

Centers for Disease Control and Prevention (1981): Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men—New York City and California. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **30**, 305-308.

Cooper D. A., Kelleher A. D., Murray J. M. (2011): Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected $CD4^+$ T Cells in a population of HIV – infected Individuals. *Journal of Virology* **85** 10798-10805.

Cosson, P. (1996): Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *The EMBO Journal* **15**, 5783-5788.

Cullen B. R. (2014): HIV-1 Packing to Leave. *Cell* **159**, 975-976.

Daniels C. N., Saunders K. O. (2019): Antibody responses to the HIV-1 envelope high mannose patch. *Advances in Immunology* **143**, 11-73.

Dharan A., Opp S., Abdel-Rahim O., Keceli S. K., Imam S., Diaz-Griffero F., Campbell E. M. (2017): Bicaudal D2 facilitates the cytoplasmic trafficking and nuclear import of HIV-1 genomes during infection. *National Academy of Sciences* **50**, 10707-10716.

Eisenberg D., Wesson M. (1990): The most highly amphiphilic α – helices include two aminoacid segments in human immunodeficiency virus glycoprotein 41. *Biopolymers* **29**, 171-177.

Ewart G. D., Sutherland T., Gage P. W., Cox G. B. (1992): The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *Journal of Virology* **70**, 7108-7115.

Fan L., Peden K. (1992): Cell – free transmission of Vif mutants of HIV – 1. *Virology* **190**, 19-29.

Finney J., Kelsoe (2018): Poly- and autoreactivity of HIV-1 bNAbs: implications for vaccine design. *Retrovirology* **15**, 53.

Fiorentini S., Marini E., Caracciolo S., Caruso A. (2006): Function of the HIV–1 matrix protein p17. *The new microbiologica* **29**, 1.

Gallo R. C., Montagnier L. (2003): The discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England Journal of Medicine* **349**, 2283-2285.

Goadou G., Evrard-Todeschi N., Gharbi-Benarous J., Benarous R., Girault J. P. (2002): HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) solution structure of the 41–62 hydrophilic region containing the phosphorylated sites Ser52 and Ser56. *International Journal of Biological Macromolecules* **30**, 23-40.

Goh W. C., Rogel M.E., Kinsey C.M., Michael S.F., Fultz P.N., Nowak M. A., Hahn B. H., Emerman M. (1998): HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nature Medicine* **4**, 65-71.

Goila – Gaur R., Strebel K. (2008): HIV-1 Vif, APOBEC and Intrinsic Immunity. *Retrovirology* 5, 51.

Grangupomu V. K., Abrams C. F. (2010): All – atom models of the membrane – spanning domain of HIV–1 gp41 from metadynamics. *Biophysical Journal* **99**, 3438-3444.

Haffar O. K., Popov S., Dubrovsky L., Agostini I., Tang H., Pushkarsky T., Nadler S. G., Bukrinsky M. (2000): Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Journal of Molecular Biology* **299**, 359-368.

Hallenberger S., Bosch V., Angliker H., Shaw E., Klenk H. D., Garten W. (1992): Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361.

He J., Choe S., Walker R., Di Marzio P., Morgan D. O., Landau N. R. (1995): Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of Virology* **69**, 6705-6711.

Helenius A., Aebi M. (2001): Intracellular function of N – linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.

Hemelaar J. (2012): The origin and diversity of the HIV – 1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 182-192.

Henklein P., Kinder R., Schubert U., Bechinger B. (2000): Membrane interactions and alignment of structures within the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain: effect of phosphorylation of serines 52 and 56. *FEBS Letters* **482**, 220-224.

Hill C. P., Worthylake D., Bancroft D. P., Christensen A. M., Sundquist W. I. (1996): Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: Implications for membrane association and assembly. Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA **93**, 3099-3104.

Hollier M. J., Dimmock N. J. (2005): The C – terminal tail of the gp41 transmembrane envelope glycoprotein HIV–1 clades A, B, C and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure and function. *Virology* **337**, 284-296.

Hu W. S., Hughes S. H. (2012): HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect in Medicine*, **2**, a006882.

Huang M., Orenstein J. M., Martin M. A., Freed E. O. (1995): p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *Journal of Virology* **69**, 6810-6818.

Chan D. C., Fass D., Berger J. M., Kim P. S. (1997): Core structure of gp41 from the HIV envelope glykoprotein. *Cell* **89**, 263-273.

Chan D. C., Fass D., Berger J. M., Kim P. S. (1997): Core structure of gp41 from the HIV Envepole Glykoproteins. *Cell* **89**, 263-273.

Chan R., Uchil P. D., Jin J., Shui G., Ott D. E., Mothes W., Wenk M. R. (2008): Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *Journal of Virology* **82**, 11228-38.

Charneau P., Alizon M., Clavel F. (1992): A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *Journal of Virology* **66**, 2814-2820.

Chen B. (2019): Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends in Microbiology* **27**, 878-891.

Chiu Y. Ll., Soros V. B., Kreisberg J.F., Stopak K., Yonemoto W., Greene W. C. (2005): Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* **435**, 108-114.

Irimia A.**,** Sarkar A.**,** Stanfield R. L.**,** Wilson I. A. (2016): Crystallographic identification of lipid as an integral component of the epitope of HIV broadly neutralizing antibody 4E10. *Immunity* **44**, 21–31.

Iyengar S., Hildreth J. E., Schwartz D. H. (1998): Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *Journal of Virology* **72**, 5251-5255.

Jiménez-Baranda S., Gómez-Moutón C., Rojas A., Martínez-Prats L., Mira E., Ana Lacalle R., Valencia A., Dimitrov D. S., Viola A., Delgado R., Martínez-A. C., Mañes S. (2007): Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nature Cell Biology* **9**, 838–846.

Kim J. H., Hartley T. L., Curran A. R., Engelman D. M. (2009): Molecular dynamics studies of the transmembrane domain of gp41 from HIV–1. *Biochym Biophys Acta* **1788**, 1804-1812.

Kol N., Shi Y., Tsvitov M., Barlam D., Shneck R. Z., Kay M. S., Rousso I. (2007): A stiffness switch in human immunodeficiency virus. *Biophysical Journal* **92**, 1777-1783.

Krejsek J., Andrýs C., Krčmová I. (2016): Infekce virem HIV–1 a imunopatogeneze syndromu získané imunitní nedostatečnosti AIDS. In: *Imunologie člověka*. 1., (Taneček L., Liebich J.), Garamon s.r.o., Hradec Králové, 410-416.

Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A. (1998): Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648–659.

Langer S., Sauter D. (2017): Unusual Fusion Proteins of HIV–1. *Frontiers in Microbiology* **7**, 42-52.

Lee Y. M. a Yu X. F. (1998): Identification and characterization of virus assembly intermediate complexes in HIV-1-infected CD41 T cells. *Virology* **243**, 78-93.

Leem J., Deane C. M. (2018): High-Throughput Antibody Structure Modeling and Design Using ABodyBuilder. *Methods in Molecular Biology* **1851**, 367–380.

Lu K., Heng X., Summers, M. F. (2011): Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *Journal of Molecular Biology* **410**, 609–633.

Lu M., Blacklow S. C., Kim P. S. (1995): A trimeric structural domain of the HIV–1 transmembrane glycoprotein. *Nature structural biology* **2**, 1075-1082.

Mailler E., Waheed A. A., Park S. Y., Gershlick D. C., Freed E. O., (2019): The autophagy protein ATG9A promotes HIV-1 infectivity. *Retrovirology* **16**, 18.

Malim M. H., Emerman M. (2008): HIV–1 accessory proteins – ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell host & Microbe* **6**, 388-398.

Malim M. H., Pollard V. M. (1998): The HIV–1 Rev protein. *Annual review of mikrobiology* **52**, 491-532.

Mansky L. M. (1996): The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology* **222**, 391-400.

Margottin F., Bour S. P., Durand H., Selig L., Benichou S., Richard V., Thomas D., Strebel K. (1998): A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular Cell* **1**, 565-574.

Massiah M. A., Starich, M. R., Paschall C., Summers M. F., Christensen A. M., Sundquist W. I. (1994): Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *Journal of Molecular Biology* **244**, 198-223.

McDonnell J. M., Fushman, D., Cahill S. M., Zhou W., Wolven A., Wilson C. B., Nelle T. D., Resh M. D., Wills J., Cowburn, D. (1998): Solution structure and dynamics of the bioactive retroviral M domain from Rous sarcoma virus *Journal of Molecular Biology* **279**, 921-928.

McLellan J. S., Pancera M., Carrico C., Gorman J., Julien J. P., Khayat R., Louder R., Pejchal R., Sastry M., Dai K., O'Dell S., Patel N., Shahzad-ul-Hussan S., Yang Y., Zhang B., Zhou T., Zhu J., Boyington J. C., Chuang G. Y., Diwanji D., Georgiev I., Kwon Y. D., Lee D., Louder M. K., Moquin S., Schmidt S. D., Yang Z. Y., Bonsignori M., Crump J. A., Kapiga S. H., Sam N. E., Haynes B. F., Burton D. R., Koff W. C., Walker L. M., Phogat S., Wyatt R., Orwenyo J., Wang L. X., Arthos J., Bewley C. A., Mascola J. R., Nabel G. J., Schief W. R., Ward A. B., Wilson I. A., Kwong P. D. (2011): Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* **23**, 336-343.

Mirambeau G., Lyonnais S., Coulaud D., Hameau L., Lafosse S., Jeusset J., Borde I., Restle T., Reboud–Ravaus M., Gorelick R. J., Le Cam E. (2014): HIV–Protease and Reverse transcriptase control the architecture of their nucleocapsid partner. *PLOS One* **8**, e669.

Moog C., Fleury H. J., Pellegrin I., Kirn A., Aubertin A. M. (1997): Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1 – infected individuals. *Journal of Virology* **71**, 3734–3741.

Pinto D., Fenwick C., Caillat C., Silacci C., Guseva S., Dehez F., Chipot C., Barbieri S., Minola A., Jarrossay D., Tomaras G. D., Shen X., Riva A., Tarkowski M., Schwartz O., Bruel T., Dufloo J., Seaman M. S., Montefiori D. C., Lanzavecchia A., Weissenhorn W. (2019): Structural Basis for Broad HIV-1 Neutralization by the MPER-Specific Human Broadly Neutralizing Antibody LN01. *Cell host & microbe* **26**, 623–637.

Robinson H. L. (2018): HIV/AIDS Vaccines: 2018. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **104** 1062-1073.

Routy J. P., Mehraj V., Vyboh K., Cao W., Kema I., Jenabian M. A. (2015): Clinical Relevance of Kynurenine Pathway in HIV/AIDS: An Immune Checkpoint at the Crossroads of Metabolism and Inflammation. AIDS Reviews **17**, 96-106.

Sadanand S., Suscovich T. J., Alter G. (2016): Broadly Neutralizing AntibodiesAgainst HIV: New insights to Inform Vaccine Design. *Annual Review of Medicine* **67**, 635-659.

Scanlan C., Offer J., Zitzmann N., Dwek R. A. (2007): Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **446**, 1038-1045.

Schuler W., Wecker K., de Rocquigny H., Baudat Y., Sire J., Roques B. P. (1999): NMR structure of the (52–96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *Journal of Molecular Biology* **285**, 2105-2117.

Steckbeck J. D., Craigo J. K., Barnes C. O., Montelaro R. C. (2011)**:** Highly conserved structural properties of the C – terminal tail of HIV–1 gp41 protein despite substantial sequence variation among diverse clades: implications for functions in viral replication. Journal of Biological Chemistry **286**, 27156-27166.

Summers B. J., Digianantonio K. M., Smaga S. S., Huang P. – T., Zhou K., Gerber E. E., Wang W., Xiong Y. (2019): Modular HIV-1 Capsid Assemblies Reveal Diverse Host-Capsid Recognition Mechanisms. *Cell Host & Microbe* **26**, 203-216.

Šebek J. (2018): Příklady využití buněčných kultur. In: *Buněčné kultury v medicíně.* 1 (Houdek L.), Galén, Praha, Česká republika, 105-116.

Telesnitski A., Golf S. P. (1993): Two defective forms of reverse transcriptase can complement to restore retroviral infectivity. *The EMBO Journal* **12**, 4433-4438.

Teng B., Burant C. F., Davidson N. O. (1993): Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* **260**, 1816-1819.

Torrents de la Peña A., de Taeye S. W., Sliepen K., LaBranche C. C., Burger J. A., Schermer E. E., Montefiori D. C., Moore J. P., Klasse P. J., Sanders R. W. (2018): Immunogenicity in rabbits of SOSIP trimers from clades A, B and C, given individually, sequentially or in combinations. *Journal of Virology* **92**, e01957-17.

van Gils M. J., Euler Z., Schweighardt B., Wrin T., Schuitemaker H. (2009): Prevalence of cross-reactive HIV-1-neutralizing activity in HIV-1-infected patients with rapid or slow disease progression. *AIDS* **23**, 2405-2414.

van Schooten J., van Gils M. (2018): HIV-1 immunogens and strategies to drive antibody responses towards neutralization breadth. *Retrovirology* **15**, 74.

Waheed A. A. a Freed E. O. (2011): HIV type 1 Gag as e target for anthiviral therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses* **28**, 54-75.

Wang H., Cohen A. A., Galimidi R. P., Gristick H. B., Jensen G., J., Bjorkman P. J. (2016): Cryo-EM structure of a CD4-bound open HIV-1 envelope trimer reveals structural rearrangements of the gp120 V1V2 loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 7151-7158.

Wecker K., Roques B. P. (1999): NMR structure of the (1–51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr. European Jouranl of Biochemistry **266**, 359-369.

Weeks K. M., Ampe C., Schultz S. C., Steitz T. A., Crothers D. M. (1990) Fragmens of the HIV–1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* **249**, 1281-1285.

Wyatt R., Desjardin E., Olshevsky U., Nixon C., Binley J., Olshevsky V., Sodroski J. (1997): Analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV–1) gp120 envelope glycoprotein with the gp41 transmembrane glycoprotein. *Journal of Virology* **71**, 9722-9731.

Wyatt R., Kwong P. D., Desjardins E., Sweet R. W., Robinson J., Hendrickson W. A., Sodroski J. G. (1998): The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393,** 705-711.

Wyatt R., Sodroski J. (1998): The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888.

Yaron A., Hatzubai A., Davis M., Lavon I., Amit S., Manning A. M., Andersen J. S., Mann M., Mercurio F., Ben – Neriah Y. (1998): Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* **396**, 590-594.

Yoder A., Yu D., Dong L., Iyer S. R., Xu X., Kelly J., Liu J., Wang W., Vorster P. J., Agulto L., Stephany D. A., Cooper J. N., Marsh J. W., Wu Y. (2008): HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* **134**, 782-792.

Yu K. L., Lee S. H., Lee E. S., Changa You J. (2016): HIV nucleocapsid proteins localizes efficyently to the nukleus and nucleolus. *Virology* **492**, 204-212.

Zhang S., Pointer D., Singer G., Feng Y., Park K., Zhao L. J. (1998): Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* **212**, 157-166.

Zhao G., Perilla J. R., Yufenyuy E. L., Meng X., Chen B., Ning J., Ahn J., Groneborn A. M., Schulten K., Aiken C., Zhang P. (2013): Mature HIV-1 capsid structure by cryo–electron microscopy and all–atom molecular dynamics. *Nature* **497**, 643-646.

HIV reagent program: https://www.hivreagentprogram.org/Catalog/Clones/ARP-11603.aspx (26. 3. 2021)

International Committee on Taxonomy of Viruses: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ (28.10. 2020).

National Institute of Allergy and Infectious Diseases Home Page: https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle (5. 4. 2021).

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AIDS	Human immunodeficiency virus
AMK	aminokyseliny
ANT	adenin – nukleotidový translokátor (adenine nukleotide translokator)
APOBEC	apolipoprotein B mRNA – edditing catalytic polypeptide
Arf1	ADP–ribosylation factor 1
BCR	B – buněčný receptor (B – cell receptor)
BICD2	bicaudal D2
BICD2	bicaudal D2 (bicaudal D cargo adaptor 2)
bnAB	široce neutralizující protilátky (brodly neutralizing antibodies)
bp	base pair
CA	kapsidový protein
CCR5	C – C chemokinový receptor typu 5
CD4	cluster of differentiation 4
CD4bs	CD4 vazebné místo (CD4 binding site)
CDR	complementarity determing region
CRM1	chromosonal region maintenence 1
CTT	C – terminal tail
CXCR4	C – X – C chemokinový receptor typu 4
Da	dalton
dsDNA	dvouvláknová DNA (double stranded deoxyribonucleic acid)
DSIF	Death inducing signaling
ESCRT III	endosomal sorting complexes required for transport
gag	group–specific antigen
Gly	glycin
gp	glykoprotein
HIV	Human immunodeficiency virus
IN	integrasa
LPP	lentivirové peptidy
LTR	dlouhá terminální repetice (long terminal repeat)
LTR	long terminal repeat
MA	matricový protein
MPER	membrane proximal external region
MSD	membrane spanning – domain
Nef	Negative regulatory factor
NEF	Negative regulatory factor
NELF	Negative elongation factor (NELF)
PIC	preintegrační komplex
PIP2	fosfatidylinositol–4, 5–biosfosfát
pol	DNA polymerase gene
PR	proteasa
Pr55Gag	prekurzorový Gag protein
P–TEFb	Positive transcription elongation factor
RanGTP	Ras related nuclear protein
Rbx1	RING–box protein 1
Rev	Anti–repression trans–aktivátor
RNAP II	RNA polymeráza II
RT	reverzní transkriptasa

RTC	reverse trascription complex
SIV	Simian immunodeficiency virus
Skp1	S–phase kinase–associated protein 1
ssRNA	jednovláknová RNA (single stranded ribonucleic acid)
tar	trans–activation response element (místo vázající TAT)
Tat	trans–activation of transcription (proteins transaktivující transkripci)
Tat	Trans–Activator of transcription
Tev	Tobacco Etch virus protein
VDAC	napětím řízený aniontový kanál (voltage-dependent anion channel)
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral protein R
βTrCP	β–transducin repeat containing protein