

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Průtokově cytometrická analýza reaktivity
vybraných monoklonálních protilátek
s rekombinantními gp120 proteiny
navázanými na fluorescenční mikropartikule**

Diplomová práce

Bc. Alžběta Krčmarská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Alžběta Krčmarská
Název práce: Průtokově cytometrická analýza reaktivity monoklonálních protilátek s rekombinantními gp120 proteiny navázanými na fluorescenční mikropartikule
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Ústav Imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Virus HIV-1 napadá buňky imunitního systému a způsobuje onemocnění AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Na interakcích viru s receptory hostitelské buňky se významně podílí obalový glykoprotein gp120. Asi polovina molekulové hmotnosti gp120 je tvořena glykany. Glykosylační profily rekombinantních gp120 proteinů závisí na typu buněčné linie, kterou jsou produkovány. Tato diplomová práce se zabývá průtokově cytometrickou analýzou reaktivity vybraných monoklonálních protilátek s dvěma typy rekombinantních gp120 proteinů (293T a RD) navázaných na fluorescenčně značené mikropartikule. Je zkoumán vliv deglykosylace glykoproteinu enzymem PNGasa F na reaktivitu těchto monoklonálních protilátek.

Klíčová slova: HIV-1, gp120, průtoková cytometrie, glykosylace, monoklonální protilátky

Počet stran: 59

Počet příloh: -

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname Alžběta Krčmarská
Title Flow cytometry analysis of the reactivity of selected monoclonal antibodies with recombinant gp120 protein adsorbed on fluorescent microparticles
Type of thesis: Master
Department: Department of Immunology Medical fakulty of University Palacky in Olomouc
Supervisor: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

The year of presentation 2013

Abstract:

HIV-1 virus infects the immune cells and causes AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Envelope glycoprotein gp120 participates in interaction with host cell receptors. Approximately a half of the gp120 molecular mass is represented by glycans. Glycosylation patterns of recombinant gp120 depend on the type of expressing cell lines. In this diploma theses, reactivity of selected monoclonal antibodies with recombinant gp120 proteins (293T and RD) adsorbed on fluorescent microparticles was analyzed by flow cytometry. The contribution of gp120 glycans antibodies reactivity was analysed by comparsion of reactivity with glycosylated and PNGase F enzymatically deglycosylated protein.

Keywords: HIV-1, gp120, flow cytometry, glycosylation, monoclonal antibodies
Number of pages: 59
Number of appendices: -
Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením Doc. MUDr. Mgr. Milana Rašky, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....

Ráda bych poděkovala Doc. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, Ph.D. za cenné odborné rady a připomínky při vedení mé diplomové práce. Velký dík patří také pracovnímu kolektivu Ústavu Imunologie Lékařské fakulty UP. Tato diplomová práce byla financována v rámci Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci (2012 – 2013, i.c.: LF 2012 011).

Souhrn

Teoretická část diplomové práce se zabývá problematikou HIV-1 viru, jeho genomem, genetickou variabilitou a životním cyklem. Dále se zaměřuje na shrnutí dosavadních znalostí o struktuře a funkci virového proteinu gp120. Poslední část literární rešerše je věnována základním principům metody průtokové cytometrie.

V rámci experimentální části diplomové práce byla provedena optimalizace postupu průtokově cytometrické analýzy reaktivity monoklonálních protilátek s rekombinantními proteiny gp120 navázanými na fluorescenčně značené mikropartikule. Bylo nalezeno optimální ředění jednotlivých protilátek (b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9 a PG16) pro přípravu vzorků k průtokově cytometrické analýze. Byla testována reaktivita těchto monoklonálních protilátek s rekombinantními gp120 proteiny, produkovanými dvěma různými typy stabilně transfekovaných buněčných linií: 293T (Lidské embryonální ldeviny) a RD (Lidský rhabdomyosarkom). Dále byla provedena analýza vlivu deglykosylace enzymem PNGasa F na reaktivitu monoklonálních protilátek s rekombinantními gp120.

Summary

The theoretical part of this diploma thesis is focused on description of HIV-1 virus, its genome, genetic variability and life cycle. Next chapter provides a summary of knowledge about HIV gp120 protein including its structure and function. The basic principles of flow cytometry are described in the last part of the introduction.

The experimental part is focused on optimization of the flow cytometry analysis of the reactivity of selected monoclonal antibodies with recombinant gp120 protein adsorbed on fluorescent microparticle. The optimal concentration of antibodies (b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9 and PG16) was determined. The reactivity of all monoclonal antibodies with recombinant gp120 proteins was measured. Recombinant gp120 proteins were produced in two different permanently transfected cell types: 293T (Human embryonic kidney) and RD (Human rhabdomyosarcoma). The contribution of gp120 glycans antibodies reactivity was analysed by comparison of reactivity with glycosylated and PNGase F enzymatically deglycosylated protein.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Virus HIV.....	2
2.1.1	Systematické zařazení HIV viru	2
2.1.2	Stavba virové částice	2
2.1.3	Virový genom	4
2.1.3.1	Strukturní geny a jejich produkty	4
2.1.3.2	Regulační geny a jejich produkty	5
2.1.4	Životní cyklus HIV-1 viru	6
2.1.5	<i>Cis-</i> a <i>trans</i> -infekce.....	7
2.1.6	Kmeny HIV-1 a preference buněčných receptorů	7
2.1.7	Genetická variabilita HIV-1 viru	8
2.1.8	Způsoby přenosu a průběh infekce	9
2.1.9	Terapie	10
2.2	Obalový glykoprotein gp120	11
2.2.1	Struktura gp120	11
2.2.2	Protilátky a jejich vazba na gp120.....	12
2.2.3	Mechanismus vazby gp120 na buněčné receptory	14
2.2.4	Glykosylace proteinů	15
2.2.5	Glykosylace gp120	16
2.2.6	Rekombinantní gp120.....	17
2.3	Průtoková cytometrie	18
2.3.1	Základní komponenty průtokového cytometru.....	18
2.3.1.1	Zdroje záření	19
2.3.1.2	Optika	19
2.3.1.3	Fluidika	19

2.3.1.4	Elektronický systém – detektory záření.....	20
2.3.1.5	PC systém a informatika	20
2.3.2	Třídění buněk.....	20
2.3.3	Fluorescence a fluorochromy	21
3	Cíle práce	22
4	Metodika	23
4.1	Konjugace fluorescenčně značených mikropartikulí BD s protilátkou pentaHis a následná vazba rekombinantního gp120.....	23
4.1.1	Materiál.....	24
4.1.2	Roztoky a pufry	25
4.1.3	Přístroje a laboratorní vybavení.....	25
4.1.4	Provedení	26
4.2	Vazba monoklonálních protilátek na rekombinantní protein gp120 na mikrosférách s pentaHis protilátkou	28
4.2.1	Materiál.....	28
4.2.2	Roztoky a pufry	29
4.2.3	Přístroje a laboratorní vybavení.....	29
4.2.4	Provedení	29
4.3	Deglykosylace rekombinantního gp120 na mikropartikulích pomocí PNGasy F.....	32
4.3.1	Materiál.....	32
4.3.2	Roztoky a pufry	32
4.3.3	Přístroje a laboratorní vybavení.....	32
4.3.4	Provedení	33
5	Výsledky	34
5.1	Optimalizace koncentrace monoklonálních protilátek vázaných na rekombinantní gp120 proteiny konjugované na mikropartikulích	34

5.2 Průtokově cytometrická analýza reaktivity monoklonálních protilátek s rekombinantními gp120 proteiny (293T, RD) na mikropartikulích	35
5.3 Průtokově cytometrická analýza vlivu deglykosylace gp120 (293T, RD) na vazbu monoklonálních protilátek.....	41
6 Diskuze	46
7 Závěr	50
8 Seznam zkratek	51
9 Literatura.....	53

1 Úvod

Virus HIV je původcem celosvětově rozšířeného smrtelného onemocnění AIDS. Doposud nebyla vyvinuta dlouhodobě účinná terapie, která by byla schopna zabránit propuknutí terminálního stadia, končícího smrtí pacienta. Velká pozornost je věnována také vývoji efektivní vakcíny. Intenzivní studium životního cyklu HIV odhalilo několik virových proteinů, které by mohly být potenciálním cílem profylaktické vakcinace. Mezi nejvýznamnější kandidáty patří obalový glykoprotein *Env*, který sestává z podjednotek gp120 a gp41 sestavených do trimeru. Funkce *Env* spočívá ve zprostředkování interakce viru s hostitelskou buňkou (Teixeira, 2011). Podjednotka 120 se vyznačuje silnou glykosylací. Přibližně polovina její molekulové hmotnosti je tvořena glykany. Jedná se převážně o N-vázané glykany s menším zastoupením O-vázaných glykanů. Gp120 je cílem vazby specifických protilátek, z nichž určité jsou schopny neutralizovat virovou částici. Tato skutečnost by mohla být využita při vývoji vakcíny. Za účelem vakcinačních experimentů je produkován gp120 pomocí různých typů savčích buněčných linií. Rekombinantní proteiny však mají odlišný glykosylační profil než gp120, který je produkován lidskými T - lymfocyty během infekce HIV virem. V současné době je studován vliv struktury a složení sacharidů na reaktivitu protilátek s gp120 (Raška a kol., 2009).

Cílem předkládané diplomové práce bylo optimalizovat postup umožňující charakterizovat reaktivitu protilátek vůči rekombinantnímu gp120 proteinu navázanému na korpuskulární nosič – fluorescenčně značené kuličky umožňující provádět vyhodnocení reaktivity pomocí průtokového cytometru. Práce se zaměřuje na vyhodnocení reaktivity s různými variantami monoklonálních protilátek specifických k různým epitopům gp120 a dále na vyhodnocení změny této reaktivity po odštěpení odštěpení cukerné komponenty gp120 glykoproteinu.

Metoda průtokové cytometrie založená na fluorescenčně značených mikroparticulích umožňuje analýzu rekombinantních proteinů v podmínkách, které zachovávají maximálně jeho nativní konformaci. Standardně používané metody, jako je Western blotting nebo ELISA, ovlivňují konformaci zkoumané molekuly výraznějším způsobem. Další výhodou průtokové cytometrické analýzy je možnost testovat interakce ve velmi malém objemu, a tedy nižší spotřeba reagensů a s tím spjatá vyšší efektivita reakcí. Metoda je rovněž vhodná pro multiplexní analýzy.

2 Literární přehled

2.1 Virus HIV

Virus HIV (Human immunodeficiency virus) je původcem onemocnění AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom). Jedná se o celosvětově rozšířenou infekční chorobu, v jejímž důsledku dochází k výraznému oslabení socioekonomického systému mnoha zemí. Porozumění epidemiologii a patogenezi viru je nezbytné pro vývoj účinné léčby a profylaxe (Krejsek a kol., 2004).

První případ onemocnění AIDS byl hlášen roku 1981. Nemoc se pravděpodobně vyskytovala již dříve, ale nebyla rozpoznána a identifikována. O dva roky později byl popsán virus HIV jako původce této sekundární imunodeficience (Janeway a kol., 1999).

2.1.1 Systematické zařazení HIV viru

Virus HIV řadíme do čeledi obalených virů *Retroviridae*. Pro tuto čeleď je typický genom v podobě dvou kopií jednovláknové RNA, která je pomocí virové reverzní transkriptázy přepisována do formy dvoušroubovicové DNA. Podčeleď *Lentivirinae*, do které patří virus HIV, je charakteristická dlouhým bezpříznakovým obdobím, které je zakončeno cytopatickým efektem a lýzí hostitelské buňky (Krejsek a kol., 2004).

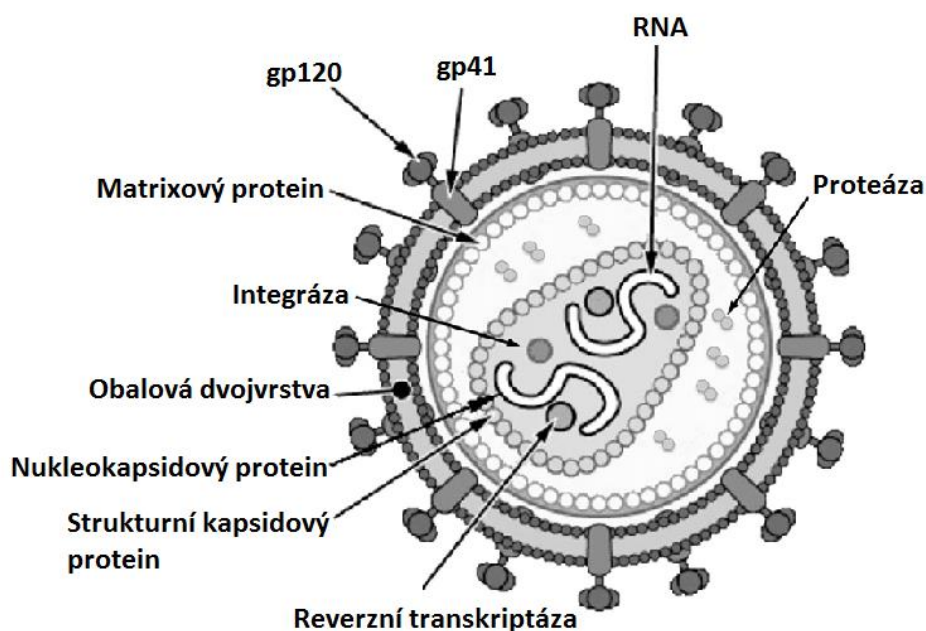
Jsou známy dva blízké příbuzné typy tohoto viru – HIV-1 a HIV-2. Většina případů AIDS je způsobena HIV-1, který zároveň vykazuje vyšší virulenci. Virus HIV-2 je endemický v západní Africe a v jiných oblastech se vyskytuje spíše ojediněle (Janeway a kol., 1999).

Virus HIV-1 se dále dělí do tří hlavních skupin: M, N a O. Skupina M, která je zodpovědná za většinu onemocnění v rámci světa, se dále dělí na 11 subtypů A – K. Subtyp B je rozšířen v Americe, Evropě, Asii a Austrálii, zatímco infekce způsobená subtypy A, C, D a E se vyskytuje převážně v Africe (Teixeira a kol., 2011).

2.1.2 Stavba virové částice

HIV virus patří mezi obalené RNA viry. Jeho genom v podobě dvou identických vláken jednořetězcové RNA je obklopen nukleokapsidem, který je složen z molekul proteinu p24 (Levinson, 2006). Toto jádro je spolu s třemi virovými enzymy – proteázou,

integrázou a reverzní transkriptázou uzavřeno ve struktuře tvořené kapsidovým a matrixovým proteinem. Na povrchu virové částice se nachází fosfolipidová dvojvrstva, která pochází z buněčné membrány hostitelské buňky. V membráně je zakotvený glykoprotein *Env* tvořený trimerem dvou nekovalentně svázaných podjednotek - gp120 a gp41 (Levinson, 2006). Virion má průměr přibližně 120 nm (Texeira, 2011). Schéma virionu HIV-1 je znázorněno na obr. 1.



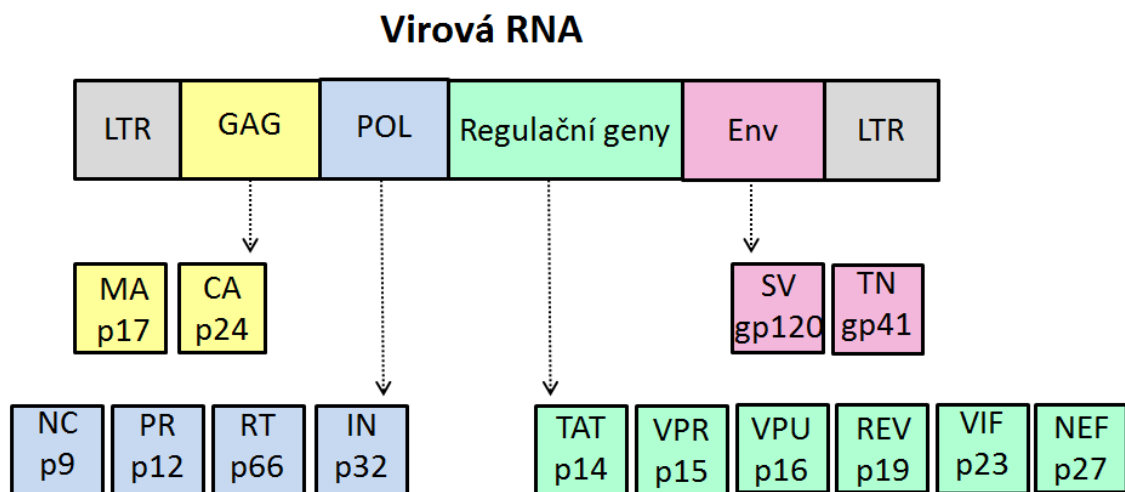
Obr. 1: Stavba virové částice HIV-1

(upraveno podle Texeira a kol., 2011)

Ve virové částici jsou inkorporovány některé strukturní molekuly hostitelské buňky. Jedná se o lipidovou dvojvrstvu, která obaluje zralé viriony, α a β řetězce molekul HLA (hlavní histokompatibilní komplex) II. třídy a α řetězce molekul HLA I. třídy. Mezi další molekuly, které mají původ v hostitelské buňce a jsou součástí virové částice, patří mikroglobulin, integrin, LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen), CD44, protektin a DAF (Decay accelerating factor) (Krejsek a kol, 2004).

2.1.3 Virový genom

Virová nukleová kyselina kóduje celkem 9 genů. Jedná se o 3 strukturální geny (*gag*, *pol*, *env*) a 6 dalších genů (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpu/vpx*), které mají regulační funkci a usměrňují replikaci viru. Virus HIV-1 obsahuje navíc gen *vpu*, zatímco HIV-2 obsahuje gen *vpx*. Sekvence genů je na 3'konci a 5'konci ohraničena LTR (long terminal repeats), které se účastní integrace viru do hostitelského genomu a jeho replikace (Janeway a kol., 1999). Genom HIV-1 viru a jeho proteinové produkty jsou schematicky znázorněny na obr. 2.



Obr. 2: Geny a proteiny HIV-1 viru

(upraveno podle Krejsek a kol., 2004)

2.1.3.1 Strukturální geny a jejich produkty

Geny *gag*, *pol* a *env* jsou společné pro všechny retroviry. Jejich produkty byly identifikovány ve zralých virových částicích společně s virovou nukleovou kyselinou.

Gen *gag* kóduje strukturální proteiny virového jádra. Jejich prekurzorem je p55, který je následně štěpen za vzniku matrixového proteinu p17 a dřevového proteinu p24 (Krejsek a kol., 2004). Antigen p24 je využíván v sérologických testech při diagnostice HIV infekce (Levinson, 2006).

Produkty genu *pol* jsou enzymy virová proteináza (p12), reverzní transkriptáza (p66) a virová integráza (p32). Tímto genem je také kódován nukleokapsidový protein p9, který je asociován s virovou nukleovou kyselinou (Krejsek a kol., 2004).

Virová proteináza štěpí prekurzorové polyproteiny viru na funkční polypeptidy. Reverzní transkriptáza je RNA-dependentní DNA polymeráza, ale uplatňuje se i při syntéze druhého DNA vlkána a tudíž má i aktivitu DNA-dependentní DNA polymerázy. Tento enzym využívá virovou genomickou RNA jako templát pro přepis do DNA. Jedná se o bifunkční enzym, který má zároveň aktivitu ribonukleázy H, která je zodpovědná za degradaci RNA v hybridním komplexu RNA-DNA. Integráza zabudovává DNA virového původu do genomu hostitelské buňky (Levinson, 2006).

Gp120 a gp41 jsou obalové glykoproteiny, vzniklé štěpením prekurzorového proteinu gp160, který je produktem genu *env*. Ke štěpení dochází v Golgiho aparátu. Oba vzniklé glykoproteiny zůstávají nekovalentně spojeny. Jsou zodpovědné za interakci s receptory hostitelské buňky a vstup viru přes cytoplazmatickou membránu (Krejsek a kol., 2004).

2.1.3.2 Regulační geny a jejich produkty

Regulační geny a jejich produkty kontrolují kvantitu a kvalitu transkripce virového genomu. Regulují proces syntézy virionů hostitelskou buňkou (Krejsek a kol., 2004).

Gen *tat* (transactivator of transcription) kóduje protein, který je pozitivním regulátorem transkripce a zvyšuje procesivitu hostitelské RNA polymerázy II. Transaktivace se týká aktivace transkripce genů, které jsou vzdáleny od daného genu, tj. jiných genů v rámci stejné provirové DNA nebo genů, které jsou součástí genomu hostitelské buňky (Levinson, 2006).

Produktem genu *rev* (regulator of viral expression) je protein p19, který reguluje transport nesestřížených transkriptů z jádra do cytoplazmy (Janeway a kol., 1999).

Produkt genu *vif* (viral infectivity) ovlivňuje infektivitu virové částice inhibicí enzymu APOBEC3G, který je příčinou vzniku hypermutací v retrovirové DNA (Levinson, 2006).

Gen *vpr* kóduje virový protein R (p15), který slouží k transportu DNA do jádra, zvyšuje produkci virionů a je zodpovědný za zastavení buněčného cyklu.

Gen *vpu* kóduje virový protein U (p16), který rozkládá buněčný protein CD4+ T-lymfocytů, ovlivňuje vylučování virionů z buňky a je unikátní pouze pro virus HIV-1.

Produkt genu *nef* (negative-regulation factor) – protein p27 působí jako transkripční regulátor (Janeway a kol., 1999; Rosypal a kol., 2000). Spolu s produktem genu *Tat* reprimuje syntézu MHC proteinů I. třídy, čímž znesnadňuje cytotoxickým T-lymfocytům rozpoznat buňky napadené HIV virem (Levison, 2006).

2.1.4 Životní cyklus HIV-1 viru

Virové částice HIV-1 napadají CD4+ T-lymfocyty a makrofágy (Janeway, 1999). Vstup virionu do hostitelské buňky lze rozdělit do tří po sobě jdoucích kroků: přichycení virionu k hostitelské buňce, interakce s koreceptorem a fúze (Texeira, 2011).

Schopnost viru proniknout do hostitelské buňky je dána expresí specifických receptorů na povrchu buňky. HIV-1 virus se dostává do hostitelské buňky pomocí virových glykoproteinů gp120 a gp41, které jsou součástí virového pláště a tvoří nekovalentně vázaný komplex. Protein gp120 je zodpovědný za afinitu k CD4 receptoru T-lymfocytů a makrofágů.

Než dojde k fúzi a průniku virové částice do buňky, musí komplex gp120-CD4 interagovat také s chemokinovými receptory, které mají funkci koreceptorů (Texeira, 2011). Chemokinové receptory mají 7 transmembránových domén. Hlavními koreceptory pro vstup HIV jsou CCR5 a CXCR4. Receptory CCR5 jsou exprimovány především na CD4 T-lymfocytech a makrofázích. Receptory CXCR4 se nachází na nativních T-lymfocytech (Janeway a kol., 1999).

Po navázání glykoproteinu gp120 na receptor a koreceptor dochází za účasti gp41 k fúzi virového obalu a plazmatické membrány hostitelské buňky (Krejsek a kol., 2004). Následuje přepis virové RNA do komplementární dvoušroubovicové DNA, která je poté zabudována do genomu hostitelské buňky v podobě proviru. Virus může zůstat v latentním provirovém stavu mnoho let, dokud nedojde ke stimulaci proviru v hostitelské buňce (Texeira, 2011).

Po aktivaci hostitelské buňky dochází k přepisu DNA proviru do jednošroubovicové RNA. Zároveň jsou produkovány prekurzorové molekuly, které jsou následně štěpeny a glykosylovány za vzniku funkčních proteinů (Krejsek a kol., 2004). Molekuly obalových proteinů jsou produkovány v hrubém endoplazmatickém retikulu a následně transportovány do Golgiho aparátu, kde dochází k dalším úpravám (Texeira, 2011). Nově sestavené viriony opouštějí hostitelskou buňku pučením přes její plazmatickou membránu. Hostitelská buňka při tomto procesu lýzuje (Krejsek a kol., 2004).

2.1.5 Cis- a trans-infekce

Cis-infekce je soubor procesů, které jsou součástí infekce hostitelské buňky. Jedná se o připojení virové částice na hostitelskou buňku, fúzi virové membrány s membránou hostitelské buňky, uvolnění nukleokapsidu do cytoplazmy, reverzní transkripce, integraci virové nukleové kyseliny do hostitelského genomu, transkripce viru a uvolnění zralých virionů z buňky (Wu a KewalRamani, 2006).

Virus HIV je schopen se na buňku vázat nejen přes CD4 receptory a chemokinové koreceptory. Může k tomuto účelu využívat i jiné struktury na povrchu buňky. Jedná se např. o některé lektiny typu C, syndecan, integrin α nebo membránové lipidy. Tyto interakce se podílejí na *trans*-infekci, díky které se virus šíří v rámci organismu. *Trans*-infekce nezahrnuje replikaci viru (Raška a Novák, 2010).

2.1.6 Kmeny HIV-1 a preference buněčných receptorů

Schopnost viru napadat určitý typ buněk je označována jako buněčný tropismus. Na základě preference specifických buněk rozlišujeme dva typy kmenů HIV. Jedná se o kmeny X4-lymfotropní a R5-tropní. X4-lymfotropní kmeny napadají T-lymfocyty, zatímco R5-tropní kmeny vykazují zvýšený tropismus k makrofágům (M-tropismus).

Infekce je přenášena kmenem s R5-tropismem. V průběhu bezpříznakového období dochází ke genetické diferenciaci, díky níž se zvyšuje podíl X4-lymfotropních kmenů. Ty jsou asociovány s pokročilými stadii infekce a objevují se v souvislosti s progresí onemocnění. Jsou zodpovědné za lýzi T-lymfocytů (Krejsek a kol., 2004,

Pollakis a kol., 2001). X4-lymfotropní kmeny na rozdíl od R5-tropních kmenů indukují tvorbu syncytií (Raška a Novák, 2010).

Kmeny s M-tropismem využívají ke vstupu receptor CCR5, T-lymfotropní kmeny pronikají přes CXCR4 receptor (fusin). Existují také duální kmeny, které využívají oba typy receptorů. Dendritické buňky exprimují oba typy receptorů a navíc mají na povrchu molekulu DC-SIGN, která se rovněž podílí na vstupu viru do buňky. Dendritické buňky transportují virus do lymfatických tkání, kde dochází k infekci dalších buněk imunitního systému. Přirozenými ligandy pro chemokinové receptory jsou RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β (pro CXCR5) a chemokin SDF-1 (pro CXCR4). Dalším koreceptorem pro HIV je CX₃CR1, který je exprimován zejména v mozku. Jeho přirozeným ligandem je chemokin fractalkine (Krejsek a kol., 2004).

V rámci studií, porovávajících chování viru v *in vitro* a *in vivo* podmínkách, bylo zjištěno, že M-tropní kmeny sice nenapadají linie T-lymfocytů *in vitro*, ale čerstvě izolované T-lymfocyty *in vitro* infikovat mohou. Na rozdíl od toho T-lymfotropní varianty infikují pouze T-lymfocyty *in vivo* (Janeway a kol., 1999).

2.1.7 Genetická variabilita HIV-1 viru

Virus HIV se vyznačuje neobvyklou genotypovou i fenotypovou rozmanitostí. Rozdílné kmeny se liší imunopatogenetickými vlastnostmi, agresivitou, účinností přenosu i buněčným tropismem. Odlišnosti jsou patrné nejen u různých geografických izolátů. Genetické změny můžeme pozorovat i v rámci kmene, který infikoval jediného pacienta (Krejsek a kol., 2004).

Variabilita je dána značnou chybovostí reverzní transkriptázy (RNA dependentní DNA polymerázy) a zároveň nepřítomností reparačních mechanismů. Reverzní transkriptáza generuje minimálně jednu chybu na jeden zabudovaný provirus. To je v kombinaci s intenzivní produkcí nových virových částic příčinou vzniku širokého spektra variant, v rámci kterých se snadno selektují mutantní viriony, schopné uniknout kontrole imunitního systému (Robinson, 2002).

Glykoproteiny gp120 a gp41 jsou typově specifické. Gen kódující gp120 rychle mutuje, což umožňuje vznik mnoha antigenních variant. Protilátky proti gp120 účinně neutralizují virovou částici, ale výskyt široké škály variant gp120 komplikuje vývoj efektivní vakcíny. Antigen p24 sice nevykazuje variabilitu, protilátky proti tomuto proteinu

však nesnižují infekčnost částice. Protilátky proti p24 se využívají v diagnostice HIV jako významný marker infekce (Levinson, 2006).

2.1.8 Způsoby přenosu a průběh infekce

Obecné schéma průběhu infekce HIV virem spočívá v souboru interakcí mezi HIV a imunitním systémem, které postupně vedou ke ztrátě funkce imunitního systému. Navozená imunodeficiencie se projeví v klinickém stadiu AIDS pomnožením patogenních mikroorganismů a propuknutím nádorových onemocnění (Douek a kol., 2009).

Virus HIV-1 je přenášen infikovanými CD4+ T-lymfocyty, dendritickými buňkami a makrofágy. Vyskytuje se volně v krvi, spermatu, poševním sekretu a mléce. K infikování dochází nechráněným heterosexuálním nebo homosexuálním pohlavním stykem, kontaminovanými injekčními jehlami nebo terapeutickým použitím infikované krve a krevních produktů. Přenos z matky na dítě je možný v průběhu těhotenství přes placentu, při porodu nebo mateřským mlékem při kojení (Janeway a kol., 1999).

Primární infekce může vyvolat příznaky podobné chřipkovému onemocnění, avšak mnoho pacientů je zcela asymptomatických. Jedná se o krátké období akutní fáze, kdy je virus přítomen v krevním řečišti ve vysokém titru a zároveň dochází přechodně k prudkému poklesu počtu CD4 T-lymfocytů (méně než 500 lymfocytů/ μ l krve). U většiny pacientů dochází také k aktivaci CD8 T-lymfocytů, které likvidují virem infikované buňky. K eliminaci viru však nedochází. Následuje tvorba specifických protilátek. Počet CD4 T-lymfocytů se zvýší na hodnotu okolo 800 lymfocytů/ μ l krve (u zdravého jedince je asi 1200 lymfocytů/ μ l krve) (Janeway a kol., 1999).

Pro virus HIV-1 je typické dlouhé asymptomatické období, kdy dochází k persistentní replikaci viru a postupnému poklesu počtu CD4 T-lymfocytů. Protože se virus množí zejména v aktivovaných T-lymfocytech, každá antigenní stimulace může vyvolat progresi onemocnění (Hořejší a Bartůňková, 2002).

Po asymptomatickém období, které trvá zpravidla několik let, následuje symptomatická fáze. Nové mutantní varianty virových částic umožní viru únik před imunitním systémem a zároveň se vyčerpává schopnost obnovovat kritické ztráty CD4 T-lymfocytů (Hořejší a Bartůňková, 2002). Poškození imunitního systému se projevuje vysokou náchylností k infekcím oportunními patogeny (*Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Herpes*

simplex) a k některým nádorovým onemocněním, jako je především Kaposiho sarkom, lymfom B-buněk nebo nádory endoteliálních buněk (Roitt a kol., 1996). Ve zvýšené míře se také vyskytují autoimunitní choroby a alergie (Hořejší a Bartůňková, 2002).

Když množství CD4 T-lymfocytů klesne pod hladinu 200-300/ μ l krve, hovoříme o klinickém stadiu AIDS. Jedná se o konečnou fázi infekce HIV virem (Janeway a kol, 1999). V této fázi klesá hladina CD4 lymfocytů téměř k nule a pacienti umírají nejčastěji na oportunní infekce (Hořejší a Bartůňková, 2002).

2.1.9 Terapie

Léčiva používaná k terapii HIV infikovaných osob lze rozdělit do tří základních skupin. První skupinou jsou nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI), mezi které patří mimo jiné Zidovudin (AZT). Jedná se o první antiretrovirotikum, používané k léčbě infikovaných osob již od roku 1985. Další dva typy antiretrovirotik jsou ne-nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI) a inhibitory proteázy (IP) (Teixeira, 2011).

Současná terapeutická strategie, označovaná jako „vysoce účinná antiretrovirová terapie“ (HAART), spočívá v použití kombinace látek z minimálně dvou různých tříd antiretrovirotik (Yeni a kol., 2004). Hlavními omezeními této strategie je riziko vzniku rezistentních kmenů v průběhu léčby a toxicita spojená s užíváním antiretrovirotik (Teixeira, 2011).

V posledních letech byly vyvinuty tři nové skupiny terapeutik. Jejich účinek je založen na zabránění procesu fúze viru s hostitelskou buňkou, inhibici virové integrázy a blokování vstupního virového kofaktoru CCR5. Mezi inhibitory vstupu HIV-1 viru do hostitelské buňky patří látky, které se váží na virové proteiny gp120 a gp41 (Robertson, 2003; Grinsztejn a kol., 2007; Yeni a kol., 2004).

2.2 Obalový glykoprotein gp120

Glykoprotein gp 120 tvoří společně s gp41 základní stavební jednotku obalového glykoproteinu HIV viru (*Env*). Společným prekurzorem gp41 a gp120 je gp160. Gp41 a gp120 vytváří trimerní komplex skládající se ze tří transmembránových podjednotek gp41, které ukotvují tři externí podjednotky gp120 (Go a kol, 2008). Tato struktura hraje klíčovou roli při vstupu viru do hostitelské buňky, jelikož zprostředkovává interakci virové částice s buněčnými receptory (Krejsek a kol., 2004).

Prekurzorový glykoprotein 160 je syntetizován v hrubém endoplazmatickém retikulu. Následuje transport do Golgiho aparátu, kde dochází k úpravě cukerné komponenty. Hostitelská proteáza furin následně štěpí gp160 na podjednotky gp120 a gp41. Proces je dokončen multimerizací vzniklých glykoproteinů a jejich skládáním do funkční konformace (Hallenberger a kol., 1992).

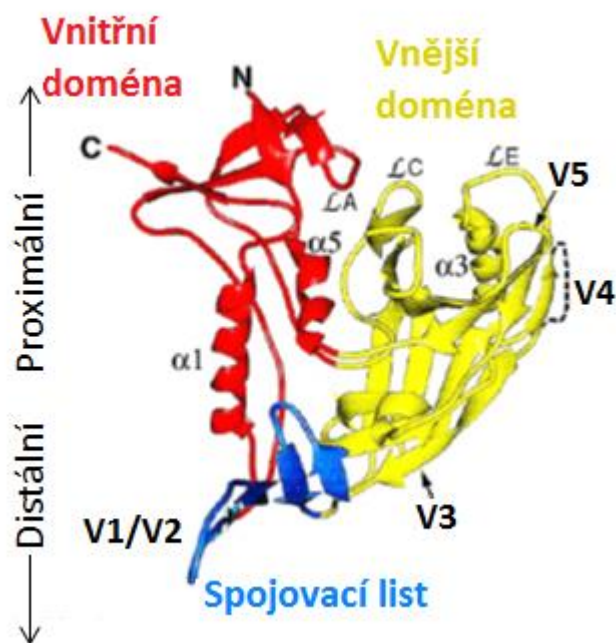
Proti glykoproteinu gp120 ale i gp41 jsou tvořeny v průběhu infekce specifické neutralizující protilátky, proto se na něj zaměřují mnohé studie, které mají za cíl vyvinout účinnou vakcínu proti HIV (Wyatt a kol., 1998).

2.2.1 Struktura gp120

Glykoprotein 120 lze na základě aminokyselinové sekvence rozdělit na pět konzervativních domén (C1 – C5) a pět variabilních domén (V1 – V5) (Wyat a kol., 1998). Konzervativní domény se podílejí na stavbě jádra gp120, zatímco variabilní domény jsou spolu s mnoha N-vaznými glykosylačními místy umístěny na povrchu molekuly. Variabilní oblasti vytváří smyčky, které jsou ve svých bázích spojeny disulfidovými vazbami (Leonard a kol., 1990). Deglykosylované jádro gp120 se svým tvarem blíží elipsoidu o rozměrech 50x50x25 Å (Kwong a kol, 1998).

Molekula gp120 v nativním stavu obsahuje vnitřní a vnější doménu. Vnitřní doména je zapojena do interakcí s gp41 a podílí se na vytváření trimerních obalových struktur. Vnější doména tvoří velkou část povrchu trimerních obalových hrotů (Rizzuto a kol., 1998). Vnější doména se na rozdíl od vnitřní domény vyznačuje silnou glykosylací. Kompletní struktura gp120 zahrnuje 5 helixů, 25 β-vláken a 10 smyček, označených jako LA - LE a V1 – V5 (Kwong a kol., 1998).

Vazba CD4 receptoru na gp120 indukuje významné konformační změny. Výsledkem je formace třetí domény, která je nazývána spojovací list (bridging sheet). Tato doména obsahuje dva páry anti-paralelních β -listů, které spojují vnitřní a vnější doménu a hrají významnou roli v interakci gp120 s virovými koreceptory (Rizzuto a kol., 1998). Struktura gp120 proteinu je zobrazena na obr. 3.



Obr. 3: Struktura gp120

(upraveno podle Wyatt a kol., 1998)

2.2.2 Protilátky a jejich vazba na gp120

Vazba protilátek na gp120 a obrana viru HIV proti neutralizačním protilátkám jsou základní mechanismy, jimž je potřeba porozumět pro efektivní návrh vakcíny. Stále se nepodařilo nalézt imunogen, který by byl schopen vyvolat tvorbu vysoce účinných protilátek se širokými neutralizačními schopnostmi (Go a kol, 2007).

Byly identifikovány tři oblasti gp120, které jsou schopny indukovat tvorbu široce účinných protilátek, potenciálně využitelných pro vývoj vakcíny. Jedná se o CD4-vazebné místo (CD4bs), cukry na vnější straně gp120 a oblast vázající chemokinový receptor. Každá z těchto oblastí však vykazuje v souvislosti s vývojem vakcíny určité komplikace.

CD4bs je vysoce imunogenní oblast. Dlouhou dobu byla známa jediná anti-CD4bs monoklonální protilátka s neutralizační aktivitou - IgG1 b12 (Zolla-Pazner, 2005).

Protilátka b12 byla izolována metodou „phage display library“, která využívá RNA z HIV-1 (Falkowska a kol., 2012). Je schopna neutralizovat širokou škálu primárních izolátů HIV-1 v *in vitro* podmínkách. Také byla prokázána schopnost b12 bránit HIV-1 infekci při pasivní imunizaci experimentálních zvířat (Saphire a kol., 2007). Tato protilátka však vykazuje autoreaktivitu (Zolla-Pazner, 2005).

V poslední době bylo izolováno a následně testováno několik dalších anti-CD4bs protilátek. Jedná se například o VRC01, 3BNC117 a NIH45. Všechny zmíněné protilátky byly schopny neutralizovat okolo 90 % cirkulujícího izolátu HIV-1 viru. Tyto protilátky indukují konformační změny virového gp120 proteinu podobným způsobem jako vazba CD4 receptoru. Další testovanou protilátkou je PGV04, známá také pod označením VRC-PGV04. Jedná se o monoklonální protilátku, která je charakteristická širokou účinností a vysokým neutralizačním potenciálem. PGV04 indukuje konformační změny gp120 odlišným mechanismem než vazba CD4 receptoru (Falkowska a kol., 2012).

Karbohydrátový epitop gp120 je slabě imunogenní a je definován monoklonální protilátkou, která má aberantní strukturu a pravděpodobně je u člověka produkována jen velmi vzácně (Zolla-Pazner, 2005). Tato protilátka (IgG1 2G12) je specifická k terminální části oligosacharidů s vysokým podílem manózy v oblasti označované jako „silent face“ gp120. Mechanismus ochrany u 2G12 (podobně jako u protilátky b12) spočívá ve sterickém blokování vazby obalového proteinu viru na buněčný receptor CD4 (Roux a kol., 2004). Jedním z hlavních problémů protilátek proti karbohydrátové oblasti je odlišnost cukerné složky v závislosti na typu buňky, kterou je glykoprotein produkována (Go a kol., 2007).

Oblast, která se váže na chemokinový receptor, je rozpoznávána minimálně dvěma odlišnými sety monoklonálních protilátek. Oba sety inhibují vazbu gp120 na chemokinový receptor.

První set rozpoznává „bridging sheet“ a je označován jako CD4-indukované monoklonální protilátky. Ty jsou u infikovaných jedinců produkovány ve velkém množství, ale pouze jejich Fab fragmenty jsou schopny neutralizovat primární izoláty. Mezi tuto skupinu protilátek patří například 17b, která byla izolována z krve HIV+ jedince (Wu a kol., 1996).

Druhý set, označovaný jako anti-V3 protilátky, je přítomen u většiny HIV+ jedinců. Jedná se o několik monoklonálních protilátek, které dokážou neutralizovat primární izoláty jako kompletní anti-V3 IgG molekuly. Komplikací je skutečnost, že k indukci tvorby anti-V3 protilátek se skutečně širokou křížovou reaktivitou je zapotřebí dlouhodobá antigenní stimulace. Značné množství virů je navíc díky částečnému maskování tohoto epitopu rezistentních k neutralizaci typickými anti-V3 protilátkami (Zolla-Pazner, 2005). Mezi anti-V3 protilátky patří například F425 (Pantophlet a kol., 2007).

2.2.3 Mechanismus vazby gp120 na buněčné receptory

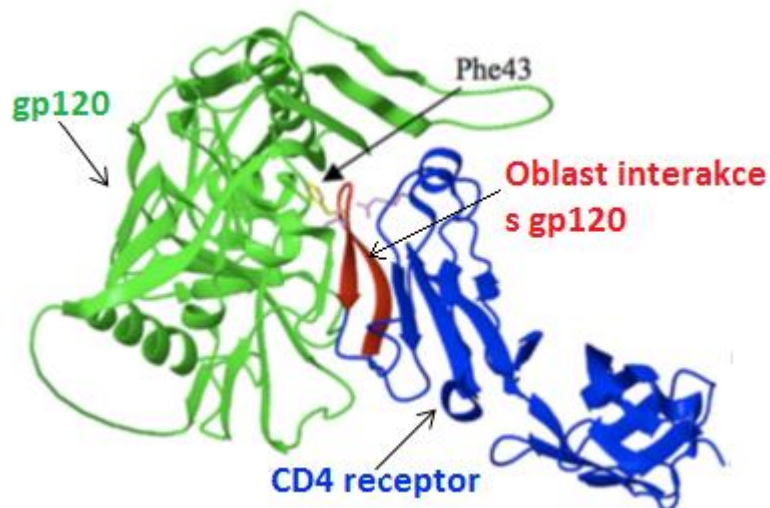
Primárním receptorem pro vstup viru HIV do hostitelské buňky je CD4. Tato molekula, nacházející se na povrchu některých T-lymfocytů, patří do strukturní rodiny imunoglobulinů (Roitt a kol., 1996). CD4 receptor interaguje s molekulou gp120. Oblast gp120 interagující s CD4 se nachází v prohlubni poblíž rozhraní mezi vnitřní doménou, vnější doménou a spojovacím listem (viz obr. 4) (Texeira a kol., 2011). Přestože je glykoprotein 120 jako celek považován za geneticky značně heterogenní, vazebné místo pro CD4 receptor je konzervované (Fisher a kol., 1988).

Ke kontaktu gp120-CD4 dochází mezi 22 aminokyselinami CD4 a 26 aminokyselinami gp120. Tato interakce zahrnuje 12 vodíkových vazeb a 219 van der Waalsových vazeb. K vazbě CD4 dochází na několika místech gp120. Jedná se o reziduum v oblasti V1/V2 smyčky, smyčku LD, oblast $\beta 15 - \alpha 3$, vlásenku $\beta 20 - \beta 21, \beta 23$ a spojení $\beta 25 - \alpha 5$ (Sweet a kol., 1991).

Po vazbě CD4 receptoru dochází v molekule gp120 k několika významným konformačním změnám. Jedná se především o formaci struktury spojovacího listu. Vyskytují se také další změny, jako je například přesun V1/V2 a V3 domén. Navázání CD4 receptoru také zesiluje expozici spojovacího listu. Dochází ke změně orientace spojovacího listu a V3 smyčky směrem k membráně cílové buňky, kde se nachází virové koreceptory (Trkola a kol., 1996).

V důsledku topografického nesouladu mezi povrchy gp120 a CD4 vznikají na rozhraní mezi interagujícími proteiny dvě dutiny. Menší dutina se vnořuje hluboko do hydrofobního nitra gp120. S molekulou CD4 je spojena pouze vazbou s Phe43 (Wyatt a Sodorski, 1998). Odhaduje se, že toto reziduum představuje až 23 % celkové energie vazby gp120-CD4 (Madani, 2004). Větší dutina je méně zanořena do povrchu gp120 a je

naplněna vodou (Wyatt a Sodorski, 1998). Je lemována hydrofilními rezidui gp120 a CD4. Rezidua gp120, která ji ohraničují (Asp368, Glu370, Trp427 a Asp457), jsou vysoce konzervovaná (Teixeira a kol., 2011). Struktura gp120 navázaného na CD4 receptor je vyobrazena na obr. 4.



Obr. 4: Glykoprotein gp120 navázaný na CD4 receptor

CD4 receptor je zobrazen modře, gp120 zeleně. Zóna CD4 interagující s gp120 je vyznačena červeně. Žlutou barvou je zvýrazněno reziduum CD4 (Phe 43), které hraje významnou roli v této interakci.

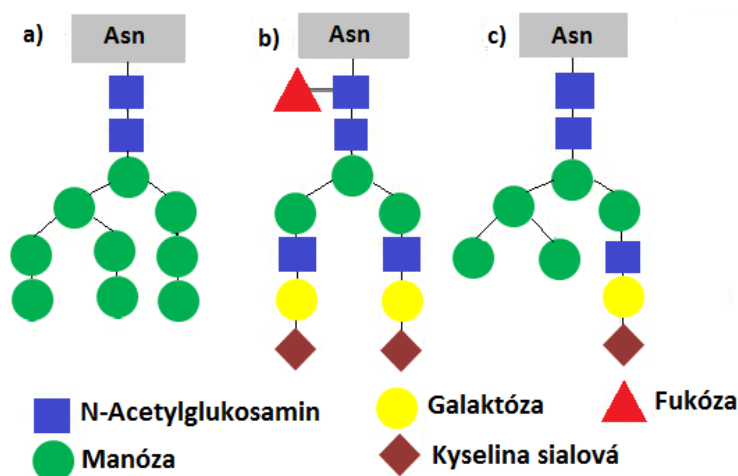
(upraveno podle Teixeira a kol., 2011)

2.2.4 Glykosylace proteinů

Glykosylace je jednou z nejběžnějších post-translačních modifikací proteinů. Hraje významnou roli nejen ve strukturní organizaci, ale i v signálních a rozpoznávacích procesech. Existují dva základní typy vazby cukerného rezidua na protein: N-glykosylace a O-glykosylace (An a kol., 2009).

V případě N-glykanů je sacharidová složka (N-acetylglukosaminové reziduum) vázána na asparaginové reziduum v aminokyselinovém motivu Asn-X-Ser/Thr, přičemž X může být libovolná aminokyselina s výjimkou prolinu. Glykoproteiny obvykle obsahují několik potenciálně N-glykosylovaných míst, z nichž každé může, ale nemusí být obsazeno (An a kol., 2009). N-glykany jsou na protein přenášeny vcelku (en bloc) jako tetradecasacharid. Ten je dále upravován v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu (Weerapana a Imperiali, 2006). K připojení prekurzorů N-glykanů dochází v hrubém endoplazmatickém retikulu. V Golgiho aparátu jsou jednotlivé monomery dále upravovány

za vzniku komplexních glykanů, hybridních glykanů a glykanů s vysokým obsahem manózy (Hallenberger a kol., 1992). Základní typy N-glykanů jsou znázorněny na obr. 5.



Obr. 5: Příklad struktury základních typů N-vázaných glykanů

a) N-glykan s vysokým obsahem manózy; b) Komplexní N-glykan; c) Hybridní N-glykan

(upraveno podle Sánchez-Pomales a G., Zangmeister, R., 2011)

O-vázané glykany se mohou vyskytovat na jakémkoliv serinovém nebo threoninovém reziduu. Na rozdíl od N-glykanů se připojují postupně – jeden za druhým. Není známa žádná konsenzuální sekvence (An a kol., 2009). K O-glykosylaci dochází v Golgiho aparátu (Voet a kol., 1995).

2.2.5 Glykosylace gp120

Přibližně polovina molekulové hmotnosti gp120 je tvořena glykany. Jedná se převážně o N-glykany, v menší míře jsou zastoupeny také O-glykany (Zhu a kol., 2000).

N-glykany se skládají ze dvou N-acetylglukózáminových reziduí, tří manózových reziduí s variabilním zastoupením dalších glykanů, manózy, N-acetylglukózáminu, galaktózy, fukózy a kyseliny sialové. U obalového glykoproteinu byly detekovány všechny tři známé typy N-glykanů: glykany s vysokým obsahem manózy, hybridní glykany a komplexní glykany (Raška a Novák, 2010; Zhu a kol., 2000; Mizuochi, 1990).

Sacharidová složka hraje významnou roli v imunitní odpovědi hostitelského organismu na napadení virem. Některé glykany mohou virus chránit proti neutralizačním protilátkám produkovaným hostitelským organismem. Jiné glykany mohou na druhou stranu představovat cíl pro neutralizační protilátky (Raška a kol., 2009).

Napojení oligosacharidů modifikuje nejen povrchovou strukturu *Env*. Glykany mají vliv na skládání trimeru *Env*, proto mohou nepřímo ovlivňovat vazbu virové částice na buněčné receptory CD4, CCR5 a CXCR4. Konkrétně byla zjištěna asociace mezi N-glykosylací V1/V2, V3 a V4 smyček a využitím receptorů CCR5 a CXCR4 (Decker a kol., 2005). Během procesu infekce dochází k mutacím, které vedou ke změnám vazebných míst pro glykany. Tyto mutace přispívají k tranzici z CCR5-tropních virů na CXCR4-tropní kmeny. Ztráta N-vázaných glykanů je spolu se zvýšením náboje ve V3 smyčce nezbytným krokem k využití buněčného receptoru CXCR4 virem HIV (Clevestig a kol. 2006; Pantophlet, 2009).

Počet N-glykosylačních motivů se u různých subtypů HIV liší. Pohybuje se od 18 do 33 s mediánem 25. Ne všechny N-glykosylační motivy jsou obsazeny glykany, proto bývají častěji nazývány jako potenciální N-glykosylační místa (PNGS) (Go a kol., 2008).

2.2.6 Rekombinantní gp120

Glykoprotein gp120 je za účelem vakcinačních experimentů produkován různými typy stabilně transfekovaných klonů buněk. Jedná se například o buněčné linie CHO (Chinese hamster ovary); 293T - HEK (Human embryonic kidney); Jurkat (CD4+ T-cell leukemia), Sf9 (Spodoptera frugiperda insect) nebo RD (Human rhabdomyosarcoma). Nejčastěji bývají používány linie s vysokou mírou proteosyntézy jako je CHO nebo 293T, (Raška a kol., 2010 - 2).

Typ buněčného systému, který je využit pro expresi, ovlivňuje strukturu, složení a heterogenitu připojených glykanů (Mizuochi a kol., 1990). Glykosylace je zásadně ovlivněna původem buněčné kultury a její metabolickou aktivitou. Virový genom determinuje PNGS, zatímco biosyntetický aparát hostitelské buňky významně ovlivňuje složení glykanů. Rozdílné připojení oligosacharidů na aminokyselinový řetězec značně ovlivňuje vazbu různých typů monoklonálních protilátek i polyklonálních protilátek ze sér HIV-1 infikovaných pacientů ((Go a kol, 2009; Raška a kol., 2010 - 2).

2.3 Průtoková cytometrie

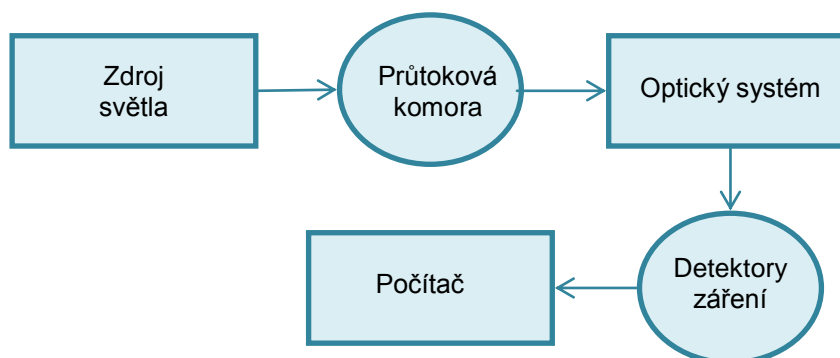
Průtoková cytometrie je moderní technika, která zaujímá zcela unikátní místo v rámci biologických a medicínských nástrojů. Umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu optických a fluorescenčních vlastností částic v suspenzi. V současnosti lze pomocí průtokového cytometru analyzovat různé typy částic – buňky, chromozómy, fragmenty DNA, jádérka, viry, syntetické částice apod. Díky pokroku v elektronice a informatice probíhá analýza v současné době rychlostí až 100 000 částic za sekundu (Marinov, 2008).

První zařízení tohoto typu bylo sestrojeno v roce 1934 Andrew Moldavanem. Jednalo se o přístroj, který měl pomocí mikroskopu a fotodetektoru identifikovat jednotlivé buňky (Robinson a Grégori, 2007). V 60. letech byl sestaven analyzátor, který byl schopen kvantifikovat fyzikální a chemické vlastnosti buněk a zároveň obsahoval tzv. sorter, sloužící k výběru konkrétních typů částic. První komerčně vyráběné cytometry se objevily v 70. letech. Kvůli vysoké ceně a náročným požadavkům na obsluhu byly využívány pouze pro vědecké účely (Shapiro, 2003).

V současné době je průtoková cytometrie rutinně využívána v mnoha oblastech, včetně buněčné biologie, genetiky, imunologie, molekulární biologie a environmentálních věd (Robinson a Grégori, 2007).

2.3.1 Základní komponenty průtokového cytometru

Průtokový cytometr je komplexní přístroj, který lze rozdělit na několik dílčích komponent (viz obr. 6): zdroj záření, optiku, fluidiku a detektory záření. Nezbytná je rovněž informatika, která umožňuje počítačové zpracování získaných dat.



Obr. 6: Základní schéma průtokového cytometru
(upraveno podle Omerod, 2008)

2.3.1.1 Zdroje záření

Moderní průtokové cytometry jsou ve většině případů vybaveny lasery. Tyto zdroje produkují monochromatické záření o vysoké intenzitě. Umožňují zaměření paprsku na velmi malý objem, díky čemuž lze dosáhnout maximální excitace jediné buňky (Ormerod, 2008). Obvykle se jedná o modrý a červený laser. Modrý laser emituje světlo o vlnové délce 488 nm, červený laser je zdrojem světla o vlnové délce 635 nm (Marinov, 2008).

Některé přístroje využívají jako zdroje elektromagnetického záření výbojky, které emitují široké spektrum vlnových délek (Robinson a Grégori, 2007). Průtokové cytometry s výbojkou je zapotřebí vybavit optickými filtry, které selektují vhodnou vlnovou délku. Výbojky neposkytují dostatečnou citlivost pro detekci slabších fluorescenčních signálů, lze je však využít jako levnější alternativu například při analýze DNA, kde je fluorescence dostatečně silná (Ormerod, 2008).

2.3.1.2 Optika

Pomocí zaostřovací čočky je paprsek laseru zaměřen na kyvetu se vzorkem, který obsahuje částice značené fluorochromem. Za kyvetou je umístěn detektor přímého rozptylu (forward scatter channel, FSC), který sbírá signál v úhlu 20° od osy paprsku zdroje. V úhlu 90° vzhledem k ose paprsku je sbíráno fluorescenční záření a původní rozptýlené světlo (side scatter channel, SSC). Na základě intenzity FSC signálu určujeme velikost částic. Intenzita SSC poskytuje informaci o granularitě částic. Díky unikátnosti SSC a FSC signálů pro různé částice lze pomocí těchto hodnot identifikovat a charakterizovat částice v heterogenním vzorku (Marinov, 2008).

2.3.1.3 Fluidika

Fluidní systém slouží k nasátí vzorku a jeho následnému průtoku přístrojem. Klíčovou součástí fluidiky je průtoková komora, ve které dochází k mísení nosného roztoku se vzorkem (Robinson a Grégori, 2007). Díky laminárnímu průtoku nosného roztoku se vytváří tzv. fokusovaný proud jednotlivých po sobě jdoucích částic. Tato hydrodynamická fokusace umožňuje snímání signálů z každé částice zvlášť (Marinov, 2008). Pomocí rozdílu mezi tlakem vzorku a unášecí tekutiny lze měnit parametry hydrodynamické fokusace. Například malý rozdíl tlaků způsobuje úzký proud vzorku, který je vhodný k analýze nukleových kyselin (Hawley a Hawley, 2012).

2.3.1.4 Elektronický systém – detektory záření

Fotodetektory přijímají fotony a produkují elektrony. Vytvořený elektrický proud je následně převeden do digitální podoby. Existují dva typy fotodetektorů – fotodiody a fotonásobiče (PMT). Fotodiody jsou vyrobeny z fotosenzitivních materiálů. Jsou rychlé, poměrně levné a nevyžadují napájení. Jejich nevýhodou je především limitované využití pro detekci fluorescence. Fotonásobiče jsou komplexnější. Obsahují fotokatodu, která je umístěna za skleněné nebo křemenné okénko. Jejich výhodou je větší senzitivita. Jsou také vhodnější pro sbírání signálů o nízké intenzitě a signálů produkovaných malými fluorescenčními částicemi (Robinson a Grégori, 2007). Míra citlivosti PMT závisí na vlnové délce záření. Například pro detekci světla o vlnové délce 600 nm a více jsou voleny fotonásobiče citlivé na červené světlo (Ormerod, 2008).

2.3.1.5 PC systém a informatika

Všechny moderní průtokové cytometry jsou spojeny s počítačovým programem, který řídí cytometr v průběhu zpracování dat. Získaná data jsou následně uložena na pevný disk (Ormerod, 2008). Nejčastějším formátem, používaným pro data z průtokového cytometru, je FCS (Flow Cytometry Standard) (Robinson a Grégori, 2007).

Počítačový program je využíván k volbě parametrů měření, nastavení napětí fotodetektorů, výběru logaritmické nebo lineární amplifikace nebo nastavení barevné kompenzace (Ormerod, 2008). Je možno provést elektronickou selekci analyzovaných částic (tzv. „gating“). Data mohou být zobrazena v jednoparametrových histogramech, dvouparametrových histogramech nebo trojrozměrných izometrických grafech. (Givan, 2001; Robinson a Grégori, 2007).

2.3.2 Třídění buněk

Existují dva základní typy třídění buněk (resp. částic) pomocí průtokového cytometru. Častěji používané je elektrostatické vychýlení nabitých kapek pomocí tzv. kapénkového sorteru. Alternativní metodou je mechanické třídění buněk tzv. fluidním switch sorterem (Ormerod, 2008). Existuje také třetí typ sorteru, který je založen na technice „photodamage“. Všechny částice jsou ozářeny vysokoenergetickým laserovým pulzem, který indukuje poškození DNA. Tento systém je však používám spíše výjimečně (Herweijer a kol., 1988).

Princip elektrostatického třídění spočívá ve schopnosti identifikovat cílovou částici na základě jejich optických vlastností (rozptyl světla, fluorescence) a determinovat s vysokou přesností její pozici v proudu kapaliny, který je následně rozbit na jednotlivé kapičky pomocí vibrací. Kapky, které obsahují analyzovanou částici, jsou na základě náboje odchýleny od proudu a poté sbírány. Kapénkový sorter je schopen třídít několik tisíc částic za sekundu (Robinson a Grégori, 2007).

Fluidní switch sorter využívá mechanické zařízení k odchýlení částic. Tyto přístroje nepotřebují kalibrovat, jejich nevýhodou je však omezená rychlost třídění (maximálně 300 částic za sekundu) a nemožnost separace více než jedné populace (Ormerod, 2008).

2.3.3 Fluorescence a fluorochromy

Fluorescence je fyzikálně chemický jev, který je jedním z typů luminiscence. Látka absorbuje energii ve formě fotonů, což vede k přechodu elektronů ze základního do excitovaného stavu. Při návratu excitovaných elektronů do původní energetické hladiny dochází k emisi světelného záření, které má vždy větší vlnovou délku a nižší energii než světlo excitační (Ormerod, 2008). Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emisního záření je označován jako Stokesův posun. Díky tomuto rozdílu ve vlnové délce lze od sebe excitační a emisní záření oddělit pomocí optických filtrů (Saphiro, 2003).

Barviva schopná absorbovat excitační záření určité vlnové délky a následně vyzařovat emisní záření o nižší energii se nazývají fluorochromy. V průtokové cytometrii se používají dva typy fluorochromů. Prvním typem jsou fluorochromy, které se kovalentně vážou na buněčné struktury. Druhou skupinu tvoří fluorochromy kovalentně vázané na jiné próby. Do speciální kategorie patří fluorescenční proteiny, mezi které patří například zelený fluorescenční protein (GFP). Používají se jako reportérové geny při vnášení konstruktů genu do buňky (Ormerod, 2008). Existují také tandemové fluorochromy, u kterých excitace primárního fluorochromu vede k aktivaci sekundárního fluorochromu (Marinov, 2008).

3 Cíle práce

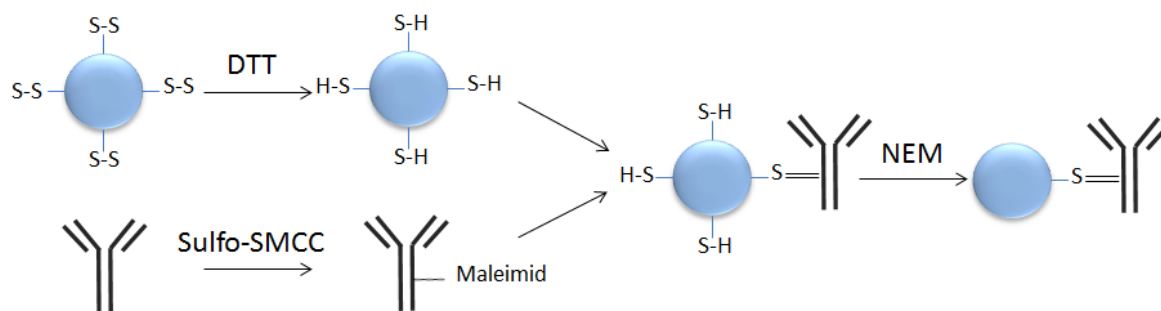
- Seznámení s průtokovou cytometrií
- Optimalizace podmínek adsorpce vazných protilátek na mikrosféry
- Optimalizace podmínek vazby gp120 proteinu na mikropartikule potažené vaznou protilátkou
- Charakterizace navázaného gp120 proteinu pomocí monoklonálních protilátek

4 Metodika

4.1 Konjugace fluorescenčně značených mikroparticulí BD s protilátkou pentaHis a následná vazba rekombinantního gp120

BDTM Functional Beads jsou fluorescenčně značené mikrosféry, které jsou určeny ke konjugaci libovolného proteinu nebo protilátky na jejich povrch. K vazbě dochází pomocí sloučeniny Sulfo-SMCC. Mikroparticule jsou ošetřeny roztokem DTT (Dithiothreitol), čímž dojde k redukci disulfidických vazeb za vzniku S-H skupin. V roztoku protilátky nebo proteinu dochází po přidání Sulfo-SMCC (Sulfocukcinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyklohexan 1-karboxylát) k aktivaci všech volných aminoskupin. Po smíchání připravených mikrosfér s roztokem protilátky nebo proteinu vznikají kovalentní vazby mezi aktivovanými aminoskupinami proteinu a S-H skupinami na povrchu mikrosfér. Konjugační procedura je schematicky znázorněna na obr. 7

Nekonjugovaná mikrosféra



Purifikovaná protilátka

Obr. 7: Konjugace protilátky na mikrosféru pomocí Sulfo-SMCC

DTT – Dithiothreitol; **Sulfo-SMCC** - Sulfocukcinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyklohexan 1-karboxylát;

NEM - N-Ethylmaleimid

Pro kovalentní navázání protilátky pentaHis na fluorescenčně značené mikrosféry BD (A6) byl použit Functional Bead Conjugation Buffer set (BD). Pro úspěšnou konjugaci je zapotřebí dodržovat určitá pravidla:

- Veškeré zkumavky obsahující mikroparticule musí být po celou dobu chráněny před světlem nejlépe pomocí hliníkové folie.
- Roztok proteinu (resp. protilátky), použitý pro konjugaci, nesmí obsahovat BSA, glycin, Tris ani jiné proteiny nebo stabilizační aditiva. Jeho pH by mělo být 7,2.

Procedura se skládá z 5 základních kroků:

- 1) Příprava mikropartikulí
- 2) Modifikace protilátky
- 3) Výměna pufru za účelem odstranění nezreagovaných komponent
- 4) Konjugace protilátky
- 5) Konjugace rekombinantního proteinu gp120 na mikrosféry s navázanou protilátkou

Následující postup je uveden pro přípravu 1000 μ l suspenze konjugovaných mikropartikulí.

4.1.1 Materiál

- **Mikrosféry BDTM CBA Functional Beads A6**

Tyto fluorescenčně značené (APC-Cy7, APC) polystyrenové mikrosféry o velikosti 7,5 μ m jsou vhodné k průtokově cytometrické analýze. Jsou skladovány v pufrovaném roztoku, který obsahuje ≤ 0.09 % azidu sodného při teplotě 4 °C.

- **Rekombinantní gp120 proteiny**

293T - produkován stabilně transfekovanou buněčnou linií 293T odvozenou z lidských embryonálních ledvin, c = 1 mg/ml

RD - produkován stabilně transfekovanou buněčnou linií RD odvozenou z lidského rhabdomyosarkomu, c = 3,3 mg/ml

Oba proteiny obsahují V5 peptid (značku, TAG) a pentaHis peptid (značku, TAG). V5 TAG umožňuje vazbu rekombinantních proteinů gp120 na fluorescenčně značenou anti-V5 protilátku. Pomocí PentaHis TAGu jsou rekombinantní proteiny vázány na pentaHis protilátku, které jsou konjugovány na povrch fluorescenčně značených mikropartikulí.

Proteiny jsou skladovány hluboce zamrazené (-80°C). Jejich koncentrace byla orientačně stanovena srovnáním denzity proužku gp120 proteinu s denzitou proužků odpovídajících titrační řadě kalibračního proteinu po SDS-PAGE a obarvení proteinů Coomassie Brilliant Blue R-250. Pro použití při konjugační proceduře je zapotřebí pracovat se zásobními roztoky o koncentraci 1 mg/ml.

- **Protilátka pentaHis, Mouse monoclonal IgG₁** (Qiagen, Cat. No.: 34660)

Alikvoty o koncentraci 1 mg/ml v PBS je potřeba skladovat při teplotě -4 °C.

4.1.2 Roztoky a pufr

DTT (Dithiothreitol) (Duchefa, Cat. No.: D1309) – roztok v destilované vodě, c = 1 mg/ml je skladován při teplotě + 4 °C

Sulfo-SMCC (Sulfosukcinimidyl 4-N-maleimidomethylcyklohexan-1-karboxylát) (Thermo Scientific, Cat. No.: 23322) – roztok v deionizované vodě (c = 1 mg/ml) – tento roztok je nutno připravit bezprostředně před použitím.

NEM (N-Ethylmaleimid) (Thermo Scientific, Cat. No.: 20303) – roztok v DMSO (Dimethylsulfoxid), c = 2 mg / ml je skladován při teplotě + 4 °C.

Konjugační pufr (Coupling Buffer) - součást Functional Bead Conjugation Buffer setu

Uskladňovací pufr (Storage Buffer) - součást Functional Bead Conjugation Buffer setu

1xPBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline 1x) (Invitrogen, Cat. No.: 14040-117)

4% fetální bovinní sérum (FBS) v 1x PBS

Do sterilní plastové zkumavky o objemu 50 ml byly napipetovány 2 ml FBS. Zkumavka byla doplněna do 50 ml 1x PBS. Roztok byl zvortexován a přefiltrován do nové sterilní zkumavky. Byl skladován v ledničce.

4.1.3 Přístroje a laboratorní vybavení

Analytické váhy (Mettler AE 240), centrifuga (CR 312; MiKRO 22R), sonikační lázeň (Transonic T460), flow box (LC 2.12), minitřepačka (IKA MS3 basic), třepačka (Multi-functional Orbital Shaker), Bio-Spin 30 Tris kolona (BioRad, Cat. No.: 732-6231).

4.1.4 Provedení

1) Příprava mikrosfér

Mikrosféry byly vortexovány po dobu 30 s. Bylo odebráno 150 μ l mikrosfér do nové zkumavky. Odebrané mikrosféry byly sonikovány 1 minutu.

K mikrosférám bylo přidáno 3,8 μ l roztoku DTT o $c = 1 \text{ mg / ml}$ v ddH₂O vodě. Po krátkém vortexování (5 s) byla provedena inkubace mikrosfér s DTT na třepačce 1 hodinu při pokojové teplotě.

Po ukončení inkubace byl k mikrosférám přidán 1 ml konjugačního pufru. Byla provedena centrifugace 3 min při 900 g a následné odsátí supernatantu, aniž by došlo k porušení peletu. Přidání 1 ml pufru, centrifugace a odsátí supernatantu bylo provedeno celkem 3x. Poté byl pelet rozpuštěn ve 40 μ l konjugačního pufru.

2) Modifikace protilátky pentaHis

Byl připraven roztok protilátky pentaHis o koncentraci 1 mg/ml v PBS. Z roztoku bylo odebráno 180 μ l do nové zkumavky. K roztoku pentaHis byly přidány 4 μ l čerstvě připraveného roztoku sulfo-SMCC o koncentraci 2 mg/ml v deionizované vodě. Po krátkém vortexování (5s) byla provedena inkubace proteinu se sulfo-SMCC na třepačce 1 hodinu při pokojové teplotě.

3) Výměna pufru za účelem odstranění nezreagovaných komponent

Bio-Rad Spin kolonka byla umístěna do zkumavky a 3x promyta konjugačním puftrem. Poté byla centrifugována 2 min při 2000 g.

Kolonka byla přemístěna do nové zkumavky. Poté na ni byla nanesena veškerá protilátka po inkubaci se sulfo-SMCC (viz krok 2). Byla provedena centrifugace 2 min 15 s při 2000 g. V průběhu centrifugace se do zkumavky dostala veškerá modifikovaná protilátka, rozpuštěná v konjugačním pufru. Poté bylo nutno ihned přistoupit ke konjugaci pentaHis s mikrosférami.

4) Konjugace protilátky pentaHis

Veškerý roztok modifikované protilátky, který protekl kolonkou, byl přenesen do zkumavky s mikrosférami inkubovanými s DTT (viz krok 1). Po krátkém vortexování (5s) byla provedena inkubace na třepačce 1 hodinu při pokojové teplotě.

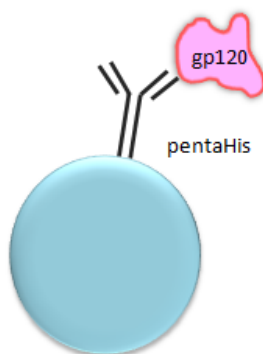
K mikrosférám s protilátkou byly přidány 4 μ l roztoku NEM v DMSO ($c = 2$ mg/ml). Po krátkém vortexování (5s) byla provedena inkubace na třepačce 15 min při pokojové teplotě.

Po skončení inkubace byl přidán 1 ml uskladňovacího pufru. Byla provedena centrifugace 3 min při 900 g následné odsátí supernatantu, aniž by došlo k porušení peletu. Přidání 1 ml pufru, centrifugace a odsátí supernatantu bylo provedeno celkem 3x. Následně bylo provedeno navázání rekombinantního gp120 proteinu na takto připravené mikrosféry.

5) Navázání proteinu gp120 na mikrosféry aktivované pentaHis protilátkou

Připravené mikrosféry byly inkubovány 1 h na třepačce v 1 ml 4% FBS v 1x PBS za účelem blokace nespecifických vazebných míst. Po inkubaci byla provedena centrifugace (5 min, 1000 g). Byl odsán supernatant a k peletu bylo přidáno 180 μ l rekombinantního gp120 proteinu (RD, 293T) o koncentraci 1 mg/ml. Po krátkém vortexování (5s) byla provedena inkubace 1,5 h na třepačce a následná centrifugace 5 min při 1000 g. Po odsátí supernatantu byl pelet resuspendován v 1 ml uskladňovacího pufru.

Výsledná koncentrace konjugovaných mikrosfér v roztoku je 6×10^6 mikrosfér / ml. Pro jeden test je zapotřebí 30 000 konjugovaných mikrosfér, tj. 5 μ l připraveného roztoku konjugovaných mikrosfér. Konjugované mikrosféry jsou znázorněny na obr. 8.



Obr. 8: Mikrosféry s pentaHis protilátkou, na kterou je navázán gp120 protein

pentaHIS – protilátka proti pentaHIS epitopu

4.2 Vazba monoklonálních protilátek na rekombinantní protein gp120 na mikrosférách s pentaHis protilátkou

Mikrosféry s navázaným gp120 proteinem (293T, RD) byly použity pro analýzu reaktivity monoklonálních protilátek proti různým epitopům gp120. K ověření vazby gp120 proteinu na pentaHis protilátku na mikrosférách byla použita protilátka proti V5-značce rekombinantního gp120 proteinu značená FITC (fluorescein isothiokyanát). Jako detektor vazby testovaných lidských monoklonálních protilátek na gp120 protein byla použita protilátka proti lidskému IgG značená PE (fykoerythrinem). Bylo zapotřebí experimentálně otestovat koncentraci analyzovaných protilátek vhodnou pro jejich vazbu na gp120 protein na mikrosférách.

4.2.1 Materiál

- **Mikrosféry BDTM Functional Beads s gp120 proteinem (RD, 293T)**
(viz kapitola 4.1)
- **Monoklonální protilátky:**
 - IgG1 b12** (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 2640) – vazba na CD4-vazebné místo gp120 proteinu
 - 2G12** (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 1476) – vazba na cukernou komponentu gp120 proteinu
 - F425 B4a1** (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 7625) – vazba na V3 smyčku gp120 proteinu
 - 257-D IV** (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 1510) – vazba na V3 smyčku gp120 proteinu
 - 268** - (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 1511) – vazba na V3 smyčku gp120 proteinu
 - PG9** (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 12149) – vazba na variabilní smyčky gp120 proteinu
 - PG16** (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. number: 12150) – vazba na variabilní smyčky gp120 proteinu

- **Protilátka Mouse anti-V5 TAG - FITC** (AbD serotec, MCA 2894F) – slouží k ověření vazby rekombinantního gp120 na pentaHis protilátky konjugované na povrchu mikrosfér
- **Protilátka Goat anti-human IgG - PE** (Santa Cruz Biotechnology, sc – 3736) – slouží k detekci vazby testovaných monoklonálních protilátek na rekombinantní gp120

4.2.2 Roztoky a pufrý

4% FBS v 1x PBS

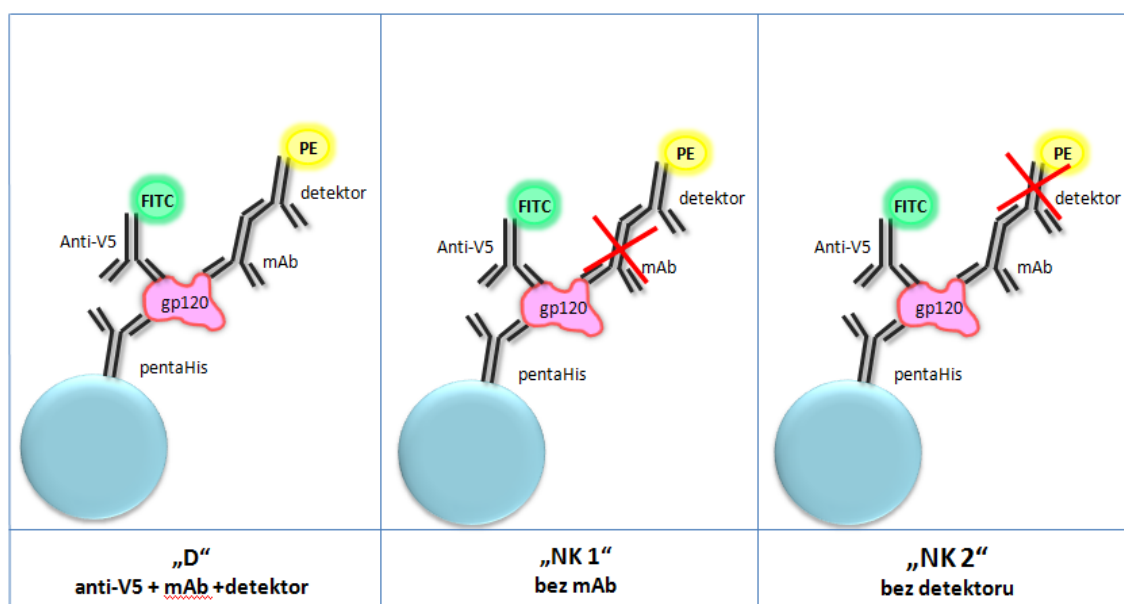
1x PBS, (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline 1x) (Invitrogen, Cat. No.: 14040-117)

4.2.3 Přístroje a laboratorní vybavení

Průtokový cytometr (BD FACS Canto II), centrifuga (CR 312; MiKRO 22R), minitřepačka (IKA MS3 basic), třepačka (Multi-functional Orbital Shaker).

4.2.4 Provedení

Postup je uveden pro analýzu reaktivity jedné monoklonální protilátky. Při testování byly použity dvě negativní kontroly: NK 1 (bez monoklonální protilátky) a NK 2 (bez detektoru - Goat anti-human IgG - PE). Vlastní vzorek (D) obsahoval zároveň testovanou monoklonální protilátku a Goat anti-human IgG – PE. Vazba protilátek v jednotlivých typech vzorků je schematicky znázorněna na obr. 9. Během inkubace byly vzorky s mikrosférami chráněny před světlem hliníkovou folií.



Obr. 9: Vazba protilátek u jednotlivých typů vzorků

Anti-V5 - Mouse anti V5-TAG: FITC; **mAb** – monoklonální protilátka (b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9, PG16); **detektor** - Goat anti-human IgG-PE; **pentaHis** – protilátka proti pentaHis epitopu; **D** – vlastní vzorek; **NK 1** – negativní kontrola 1, **NK 2** – negativní kontrola 2

Z roztoku připravených mikrosfér konjugovaných s rekombinantním gp120 proteinem (234T, RD) bylo po důkladném vortexování odebráno 5 μ l. K odebraným mikrosférám byl přidán 4% FBS v 1x PBS a roztok 1000x naředěné protilátky podle následující tab. I. Protilátky byly ředěny v 1x PBS. Za účelem optimalizace byla u jednotlivých monoklonálních protilátek testována ředění 30 000x, 50 000x, 80 000x a 100 000x. Byla provedena inkubace na třepačce po dobu 1,5 h.

Tab. I: Složení reakční směsi pro testovaná ředění monoklonálních protilátek

Výsledné ředění protilátky	4 % FBS v 1x PBS [μ l]	1 000x naředěná protilátka [μ l]	Konjugované mikrosféry [μ l]
30 000x	478	17	5
50 000x	485	10	5
80 000x	489	6	5
100 000x	490	5	5

Po ukončení inkubace byla provedena centrifugace (1000 g, 5 min) a odsátí 400 μ l supernatantu. Zbývajících 100 μ l supernatantu s peletem bylo důkladně zvortexováno a rozděleno po 50 μ l do dvou mikrozkušavek „NK 2“ a „D“.

Do zkumavky označené jako „NK 2“ bylo přidáno 0,5 μ l 10x zředěné protilátky Mouse anti-V5 TAG - FITC. Do zkumavky označené jako „D“ bylo přidáno 0,5 μ l 10x zředěné protilátky Mouse anti-V5 TAG - FITC a 2 μ l Goat anti-human IgG - PE. Do nové zkumavky označené jako „NK 1“ bylo napipetováno 47,5 μ l 4% FBS v 1x PBS, 2,5 μ l mikrosfér konjugovaných s gp120, 0,5 μ l 10x zředěné protilátky anti-V5 značené FITC a 2 μ l Goat anti-human IgG značené PE. Vzorky byly inkubovány s fluorescenčně značenými protilátkami po dobu 1 h. Přehled jednotlivých typů vzorků je uveden v tab. II.

Tab. II: Obsah komponent u jednotlivých typů vzorků

Typ vzorku	4% FBS v 1x PBS [μ l]	Konjug. mikrosféry [μ l]	Mouse anti-V5 TAG-FITC [μ l]	Goat anti-human IgG – PE [μ l]	Testovaná protilátka
D	47,5	2,5	0,5	2	ANO
NK 1	47,5	2,5	0,5	2	-
NK 2	47,5	2,5	0,5	-	ANO

Po ukončení inkubace byl k oběma vzorkům přidán 1 ml PBS a byla provedena centrifugace (1000 g, 5 min). Supernatant byl odsán do sucha, pelet byl resuspendován ve 150 μ l PBS a po důkladném vortexování přenesen do zkumavky určené k měření na průtokovém cytometru.

4.3 Deglykosylace rekombinantního gp120 na mikropartikulích pomocí PNGasy F

Rekombinantní proteiny gp120 (203T, RD) byly ošetřeny PNGasou F, čímž došlo k odštěpení N-glykanů. Cílem bylo testovat vliv deglykosylace na vazbu jednotlivých typů monoklonálních protilátek.

4.3.1 Materiál

- **Mikropartikule BDTM Functional Beads s gp120 proteinem (RD, 293T)**
(viz kapitola 4.1)
- **PNGasa F (Peptide-N-Glykosidáza F, N-Glykanáza)**
(Prozyme, Cat No.: PZGKE-5006B) - 200mU v 80 μ l
Enzym štěpí všechny typy N-glykanů - komplexní, hybridní a vysoce-manózoové.
- Materiál potřebný k analýze reaktivity monoklonálních protilátek (viz kapitola 4.2.1)

4.3.2 Roztoky a pufrы

5x Reakční pufr (Prozyme) – dodáván s N-glycanasou

Dd H₂O

1x PBS ((Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline 1x) (Invitrogen, Cat. No.: 14040-117)

Roztoky a pufrы potřebné k analýze reaktivity monoklonálních protilátek (viz kapitola 4.2.2)

4.3.3 Přístroje a laboratorní vybavení

Flow box (LC 2.12), termostat (BT 120 M)

Přístroje a vybavení potřebné k analýze reaktivity monoklonálních protilátek (viz kapitola 4.2.3)

4.3.4 Provedení

Deglykosylace PNGasou F byla provedena za nativních podmínek na gp120 proteinech navázaných na fluorescenčně značené mikropartikule. Pro provedení deglykosylace bylo zapotřebí 5 μ l roztoku mikropartikulí konjugovaných s gp120 proteinem. Jako kontrola bylo použito stejné množství mikropartikulí, u kterých byly provedeny všechny procedury kromě přidání enzymu PNGase F. Před provedením deglykosylace bylo zapotřebí mikropartikule 4x promýt v PBS (k odstranění azidu obsaženém v uskladňovacím pufru). Deglykosylace byla provedena podle tab. III:

Tab. III: Deglykosylace pomocí PNGasy F

1x reakce	ddH ₂ O	5x Reakční pufr	Konjug. mikropartikule	PNGasa F
Deglykosylace	15 μ l	6 μ l	5 μ l	4 μ l
Kontrola	19 μ l	6 μ l	5 μ l	-

Připravené vzorky byly inkubovány 30 h při 37 °C a následně byly 4x promyty v 1x PBS (k odstranění enzymu a reakčního pufru).

U obou vzorků byla provedena analýza reaktivity jednotlivých protilátek postupem, který je uveden v kapitole 4.3. Jedinou odlišností je skutečnost, že při analýze deglykosylace již nebyly vzorky dále děleny na negativní kontrolu a vlastní vzorek. Ke kontrolnímu i deglykosylovanému vzorku byla přidána jak protilátka proti lidským IgG značená PE (Goat anti-human IgG – PE) - k detekci vazby monoklonální protilátky, tak i protilátka proti V5-značce gp120 proteinu (Mouse anti-V5 TAG – FITC) - k ověření vazby gp120.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace koncentrace monoklonálních protilátek vázaných na rekombinantní gp120 proteiny konjugované na mikropartikulích

Cílem bylo stanovení optimálního ředění různých typů monoklonálních protilátek za účelem průtokově cytometrické analýzy reaktivity s proteiny gp120.

Reaktivita vybraných monoklonálních protilátek (b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9 a PG16) byla testována v různých koncentracích. Výsledné ředění protilátek se pohybovalo v rozmezí 30 000x – 80 000x. Optimalizace ředění je uvedena v tab. IV.

Tab. IV: Optimalizace vazby monoklonálních protilátek na mikropartikule s gp120 proteiny

Monoklonální protilátka	Výsledné ředění			
	30 000x	50 000x	80 000x	100 000x
b12	*	*	**	***
2G12	*	***	*	*
F425	*	**	***	**
257	**	***	*	-
268	**	***	*	-
PG9	-	*	***	*
PG16	**	***	**	**

*** - detekce silně pozitivní reaktivity

** - detekce středně pozitivní reaktivity

* - detekce slabě pozitivní reaktivity

- - detekce žádné reaktivity

Jako hranice positivity byla stanovena intenzita fluorescence PE (fykoerythrinu) 3×10^3 . Události pod touto hranicí byly považovány za negativní, události nad stanovenou mezí byly považovány za pozitivní. Hranice pozitivní reaktivity byla stanovena na základě negativních kontrol (vzorků bez Goat anti-human IgG-PE).

V případě, že se nad hranicí 3×10^3 vyskytovalo více než 90 % událostí, byla reaktivita označena jako „silně pozitivní“. Pro hodnoty 50 – 89 % bylo použito označení „středně pozitivní reaktivita“. Pro hodnoty 49 – 10 % bylo použito označení „slabě

pozitivní reaktivita“. Pokud se nad hranicí 3×10^3 vyskytovalo méně než 10 % událostí, byl vzorek považován za negativní („detekce žádné reaktivity“).

Ředění 50 000x bylo stanoveno jako optimální pro protilátky 2G12, 257, 268 a PG16. U protilátek PG9 a F425 byla stanovena optimální koncentrace při ředění 80 000x. Nejvyšší reaktivita protilátky b12 byla detekována při ředění 100 000x.

5.2 Průtokově cytometrická analýza reaktivity monoklonálních protilátek s rekombinantními gp120 proteiny (293T, RD) na mikropartikulích

Cílem této analýzy bylo detekovat rozdíly v reaktivitě rekombinantních proteinů gp120 (293T, RD) s monoklonálními protilátkami cílenými proti různým epitopům. Vazba testovaných monoklonálních protilátek na rekombinantní gp120 proteiny (293T, RD) byla detekována pomocí protilátky Goat-anti human IgG značené PE.

Jako negativní kontroly byly použity vzorky:

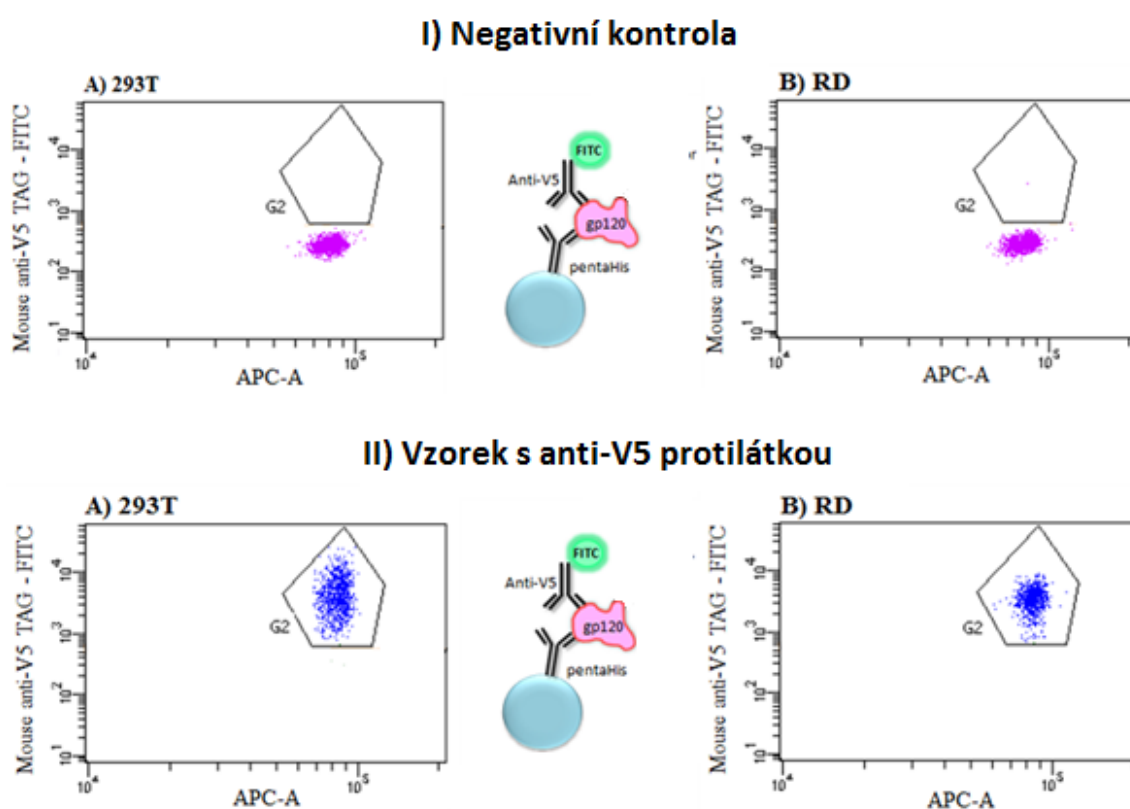
- a) **NK 1** – vazba Goat-anti human IgG – PE, bez monoklonální protilátky
- b) **NK 2** – vazba monoklonální protilátky, bez Goat anti-human IgG - PE

Vlastní vzorek (**D**) obsahoval Goat anti-human IgG – PE a testovanou monoklonální protilátku.

Oblast pozitivní reaktivity s Goat anti-human IgG – PE byla označena jako Gate 1 (G1). Oblast pozitivní reaktivity s Mouse anti-V5 TAG – FITC byla označena jako Gate 2 (G2). Procentuální hodnoty udávají zastoupení událostí v příslušné oblasti pozitivní reaktivity (G1 nebo G2).

U každého vzorku bylo provedeno ověření vazby rekombinantního gp120 proteinu na pentaHis protilátku konjugovanou na povrch fluorescenčně značených mikroparticulí. Detekce vazby byla provedena fluorescenčně značenou protilátkou proti V5 epitopu, který je součástí testovaných rekombinantních gp120 proteinů 293T a RD. Jako negativní kontrola byl použit vzorek bez Mouse anti-V5 TAG – FITC (viz obr. 10).

Hodnoty reaktivity gp120 proteinu s Mouse anti-V5 TAG – FITC se pohybovaly v rozmezí 88,6 % - 100,0 % (s průměrnou hodnotou 98,7 %), viz tab V. Lze tedy konstatovat, že navázání gp120 proteinu bylo úspěšné.



Obr. 10: Ověření vazby rekombinantního gp120 proteinu na mikrosféry konjugované s pentaHis protilátkou pomocí Mouse anti-V5 TAG - FITC

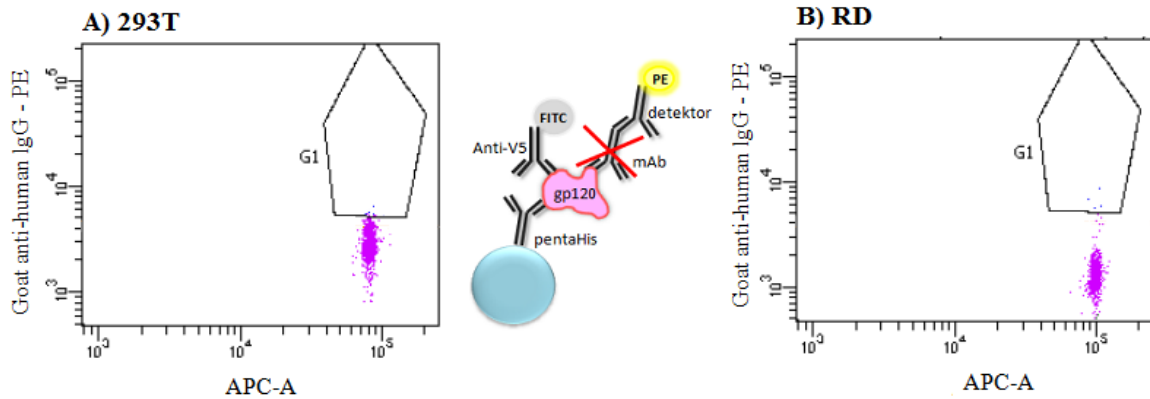
G2 – gate2 (vymezuje události odpovídající pozitivní reakci s Mouse-anti V5-TAG-FITC)
APC-A – intenzita fluorescence značených mikrosfér

U jednotlivých vzorků byla následně analyzována reaktivita rekombinantního gp120proteinu (293T, RD) s monoklonálními protilátkami (b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9 a PG16).

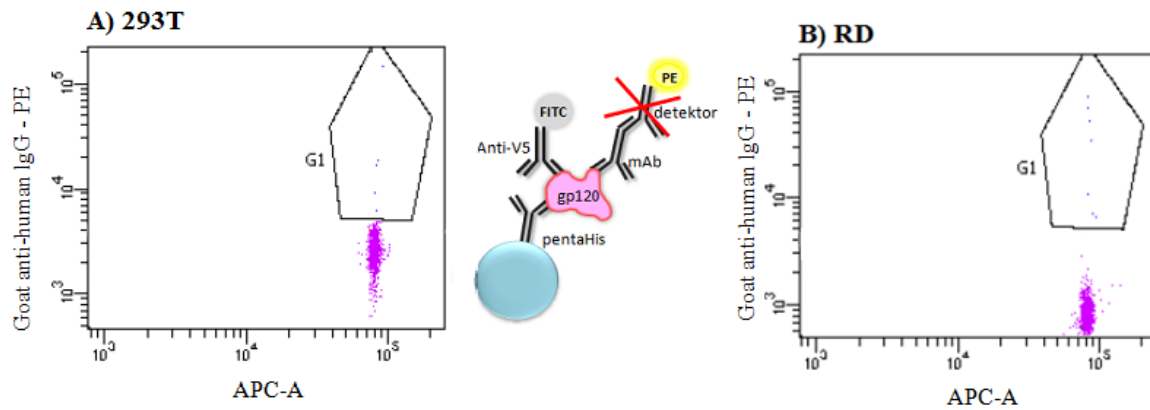
Reaktivita (% událostí v G1) negativních kontrol se pohybovala v rozmezí 0,0 – 2,2 % s průměrnou hodnotou 0,5 %. U vlastních vzorků obsahujících Goat anti-human IgG – PE byla naměřena reaktivita (% událostí v G1) 88,9 – 98,9 s průměrem 94,9 %.

Na základě získaných dat lze konstatovat, že reaktivita testovaných monoklonálních protilátek s rekombinantním proteinem produkovaným linií 293T (HEK) se výrazně nelišila od reaktivity s gp120 exprimovaným buňkami RD. U všech protilátek vykazoval nepatrně vyšší reaktivitu protein RD. Největší rozdíl v reaktivitě mezi 293T a RD, který činil 6,5 %, byl zjištěn u protilátky PG9. Nejmenší rozdíl byl detekován u protilátky F425 (0,7 %). Na obr. 11 je výstup průtokově cytometrické analýzy reaktivity gp120 proteinu produkovaného linií 293T a RD s monoklonální protilátkou 268.

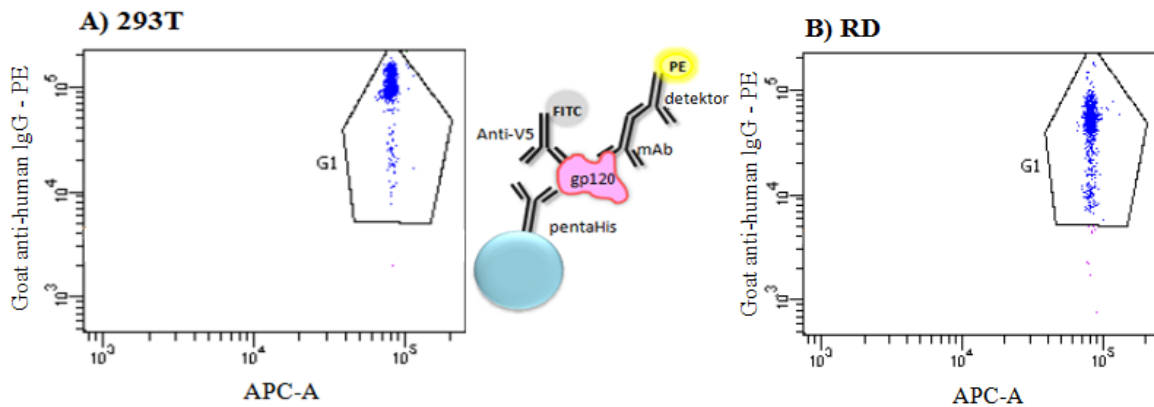
I) Negativní kontrola 1



II) Negativní kontrola 2



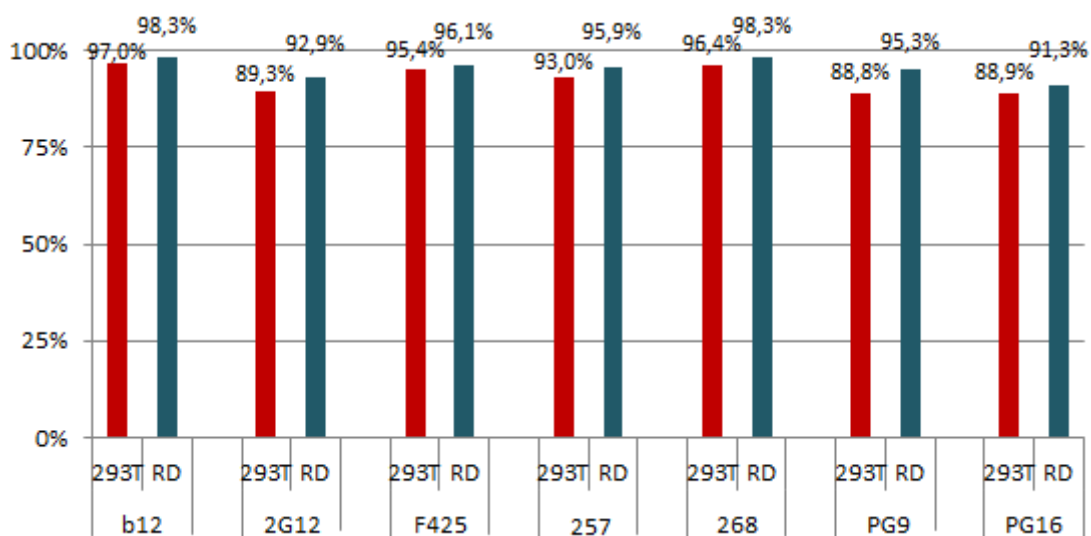
III) Vlastní vzorek



Obr. 11: Průtokově cytometrická analýza reaktivity monoklonální protilátky 268 s rekombinantními gp120 proteiny (293T, RD)

G1 . gate 1 (vymezuje události odpovídající pozitivní reakci s monoklonální protilátkou)
APC-A – intenzita fluorescence značených mikrosfér

Vlastní reaktivita jednotlivých vzorků byla vypočtena jako rozdíl hodnoty reaktivity získané měřením vlastního vzorku - D (% událostí v G1) a nejvyšší hodnoty pozadí u negativních kontrol - NK 1 a NK 2 (% událostí v G1). Hodnoty reaktivity vzorků po odečtení pozadí jsou uvedeny v grafu 1. Souhrnné výsledky průtokově cytometrické analýzy jsou uvedeny v tab. V.



Graf 1: Reaktivita rekombinantních gp120 293T a RD s monoklonálními protilátkami po odečtení pozadí

Tab. V: Reaktivita monoklonálních protilátek (b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9 a PG16) s rekombinantními gp120 proteiny (293T, RD)

Protilátka	gp120	Typ vzorku	Reaktivita s Goat- anti Human IgG – PE	Reaktivita s Mouse anti-V5 TAG – FITC
			Události v G1 [%]	Události v G2 [%]
b12	293T	NK 1	0,5	99,9
		NK 2	0,1	99,6
		D	97,5	99,5
	RD	NK 1	0,4	99,8
		NK 2	0,6	99,9
		D	98,9	98,9
2G12	293T	NK 1	0,7	90,7
		NK 2	0,1	98,6
		D	90,0	88,6
	RD	NK 1	0,8	99,5
		NK 2	0,2	89,5
		D	93,7	98,1
F425	293T	NK 1	0,4	100,0
		NK 2	0,5	100,0
		D	95,9	99,4
	RD	NK 1	0,5	100,0
		NK 2	0,1	99,1
		D	96,6	99,0
257	293T	NK 1	0,5	99,1
		NK 2	0,1	99,8
		D	93,5	100,0
	RD	NK 1	2,2	92,9
		NK 2	0,2	99,9
		D	98,1	100,0
268	293T	NK 1	0,5	99,9
		NK 2	0,6	99,6
		D	97,0	99,4
	RD	NK 1	0,4	99,5
		NK 2	0,5	99,7
		D	98,8	99,6
PG9	293T	NK 1	0,6	99,6
		NK 2	3,3	100,0
		D	92,1	99,9
	RD	NK 1	0,0	100,0
		NK 2	0,3	99,9
		D	95,6	99,9

Protilátka	gp120	Typ vzorku	Reaktivita s Goat-anti Human IgG – PE	Reaktivita s Mouse anti-V5 TAG – FITC
			Události v G1 [%]	Události v G2 [%]
PG16	293T	NK 1	0,0	100,0
		NK 2	0,0	99,9
		D	88,9	100,0
	RD	NK 1	0,0	100,0
		NK 2	0,0	100,0
		D	91,3	100,0

D – vlastní vzorek; NK 1 – negativní kontrola 1; NK 2 – negativní kontrola 2

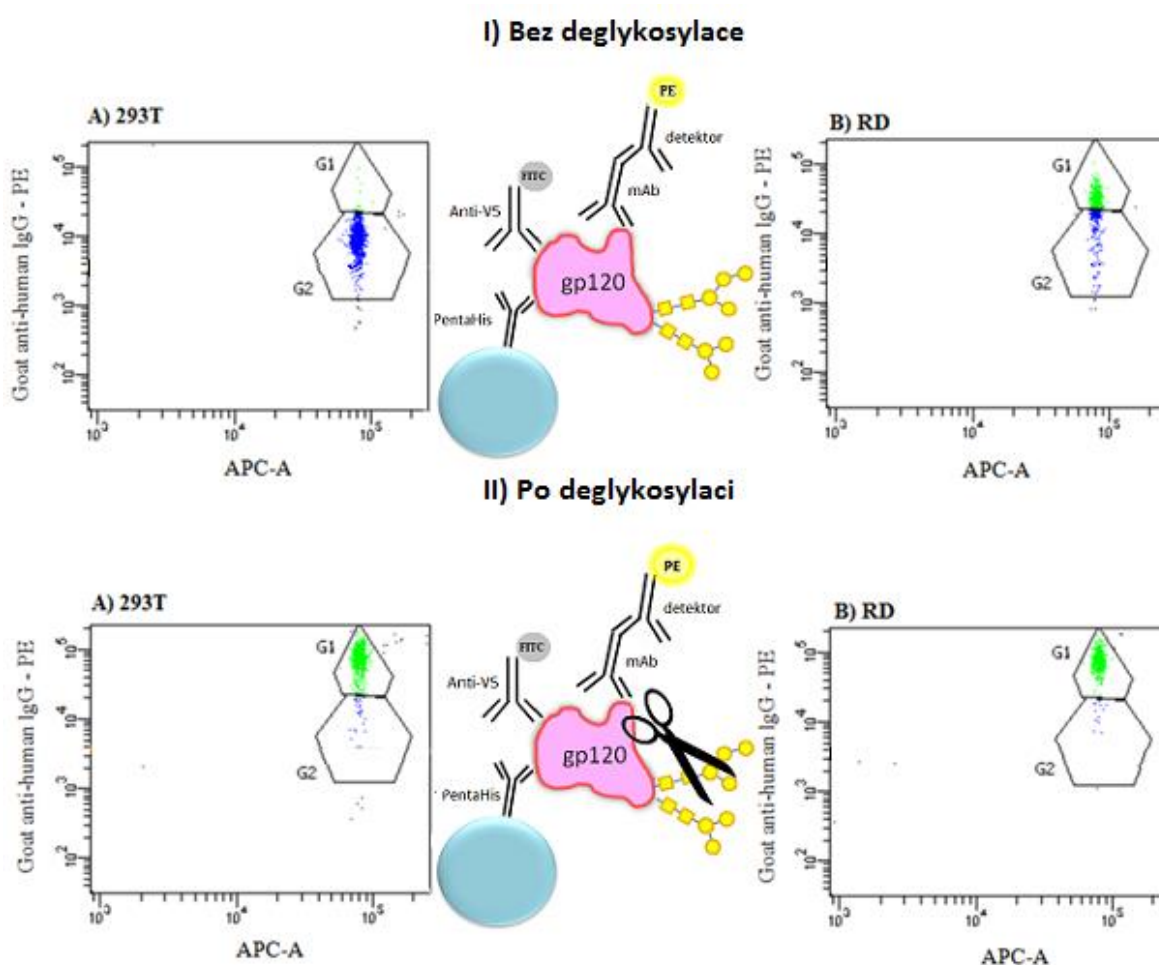
5.3 Průtokově cytometrická analýza vlivu deglykosylace gp120 (293T, RD) na vazbu monoklonálních protilátek

Rekombinantní gp120 proteiny (293T, RD) navázané na fluorescenčně značené mikropartikelky byly ošetřeny enzymem PNGasou F. Tento enzym odštěpuje N-vázané glykany. Deglykosylace proběhla za nativních podmínek. Následně byla provedena průtokově cytometrická analýza reaktivity monoklonálních protilátek b12, 2G12, F425, 257, 268, PG9 a PG16. Reaktivita protilátek s deglykosylovanými gp120 proteiny byla srovnána s reaktivitou u kontrolních vzorků, které nebyly ošetřeny PNGasou F. Cílem bylo vyhodnocení změn v reaktivitě monoklonálních protilátek po odštěpení N-glykanů.

Oblast vymezující události odpovídající vyšší reaktivitě testovaných monoklonálních protilátek byla vyznačena jako Gate 1 (G1). Oblast vymezující události odpovídající nižší reaktivitě testovaných monoklonálních byla vyznačena jako Gate 2 (G2). Oblast vymezující události odpovídající pozitivní reaktivitě s Mouse anti-V5 TAG – FITC byla označena jako Gate 3 (G3).

U všech vzorků byla ověřena úspěšnost konjugace gp120 na mikropartikelky pomocí Mouse anti-V5 TAG – FITC. Hodnoty reaktivity gp120 proteinu s Mouse anti-V5 TAG – FITC se pohybovaly v rozmezí 83,1 – 99,5 % (s průměrnou hodnotou 95,0 %). Lze tedy konstatovat, že navázání gp120 proteinu na pentaHis protilátku konjugovanou na fluorescenčně značené mikropartikelky bylo úspěšné a provedení deglykosylace nevedlo k odstranění gp120 z mikroparticulí.

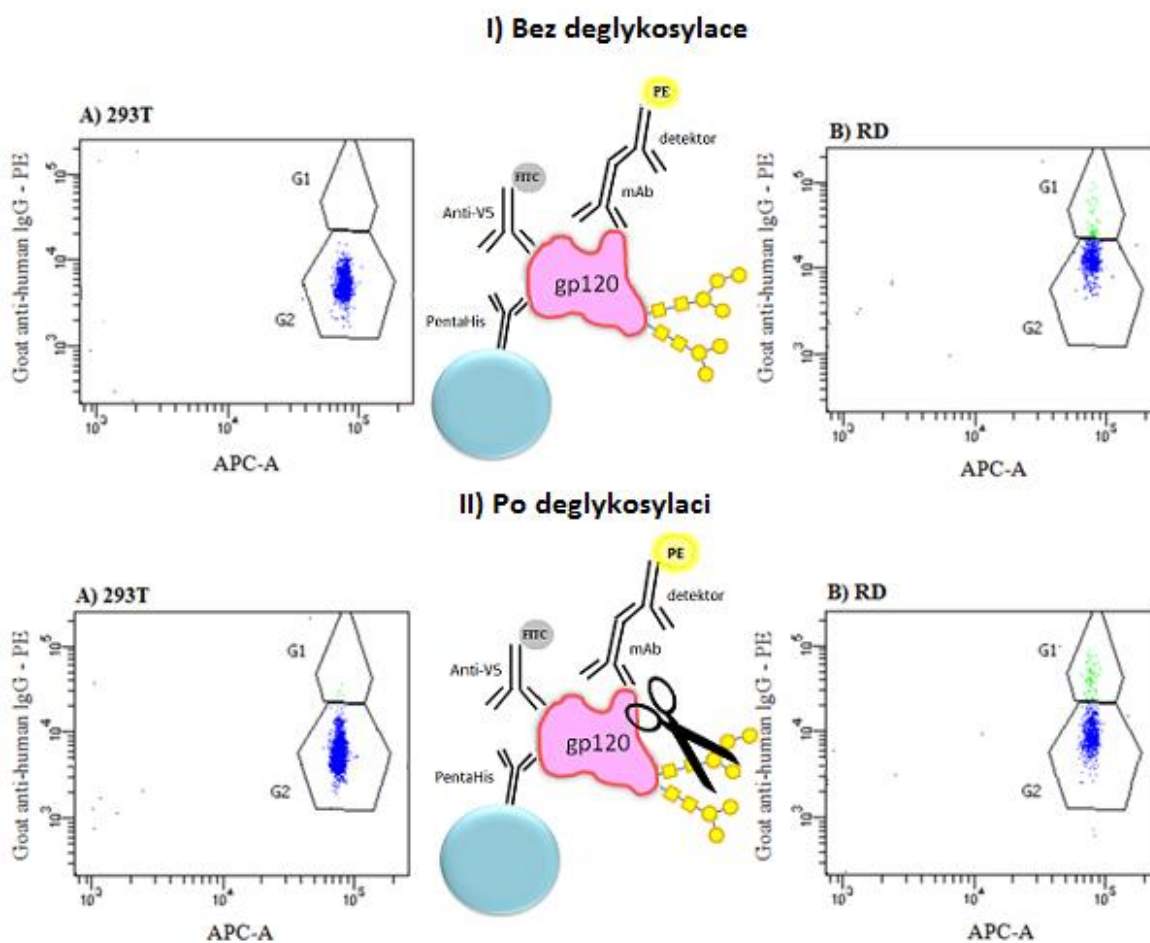
Příkladem monoklonální protilátky, která vykazovala po deglykosylaci PNGasou F výrazné změny v reaktivitě, je protilátka 2G12. Jak je patrné na obr. 12, u vzorků ošetřených PNGasou F byl zaznamenán nárůst procentuálního zastoupení událostí v oblasti G1 (vymezuje vyšší reaktivitu s Goat anti Human IgG – PE) oproti kontrolním vzorkům, které nebyly podrobeny deglykosylaci. U proteinu produkovaného linií 293T byl detekován vzrůst procentuálního zastoupení událostí v G1 z 1,1 % (bez deglykosylace) na 72,1 % (po deglykosylaci). U proteinu RD není tato změna natolik výrazná. Procentuální zastoupení událostí v G1 se zvýšilo ze 45,2 % na 53,2 %. Změna reaktivity 2G12 s RD proteinem je patrnější při porovnání procentuálního zastoupení v oblasti menší reaktivity (G2). Zde došlo k poklesu z 24,3 % (bez deglykosylace) na 1,5 % (po deglykosylaci).



Obr. 12: Ovlivnění vazby monoklonální protilátky 2G12 na rekombinantní proteiny gp120 (293T, RD) enzymatickým působením PNGasy F

G1 – gate 1 (vymezuje události odpovídající vyšší reaktivitě s protilátkou)
G2 – gate 2 (vymezuje události odpovídající nižší reaktivitě s protilátkou)
APC-A – intenzita fluorescence značených mikrosfér

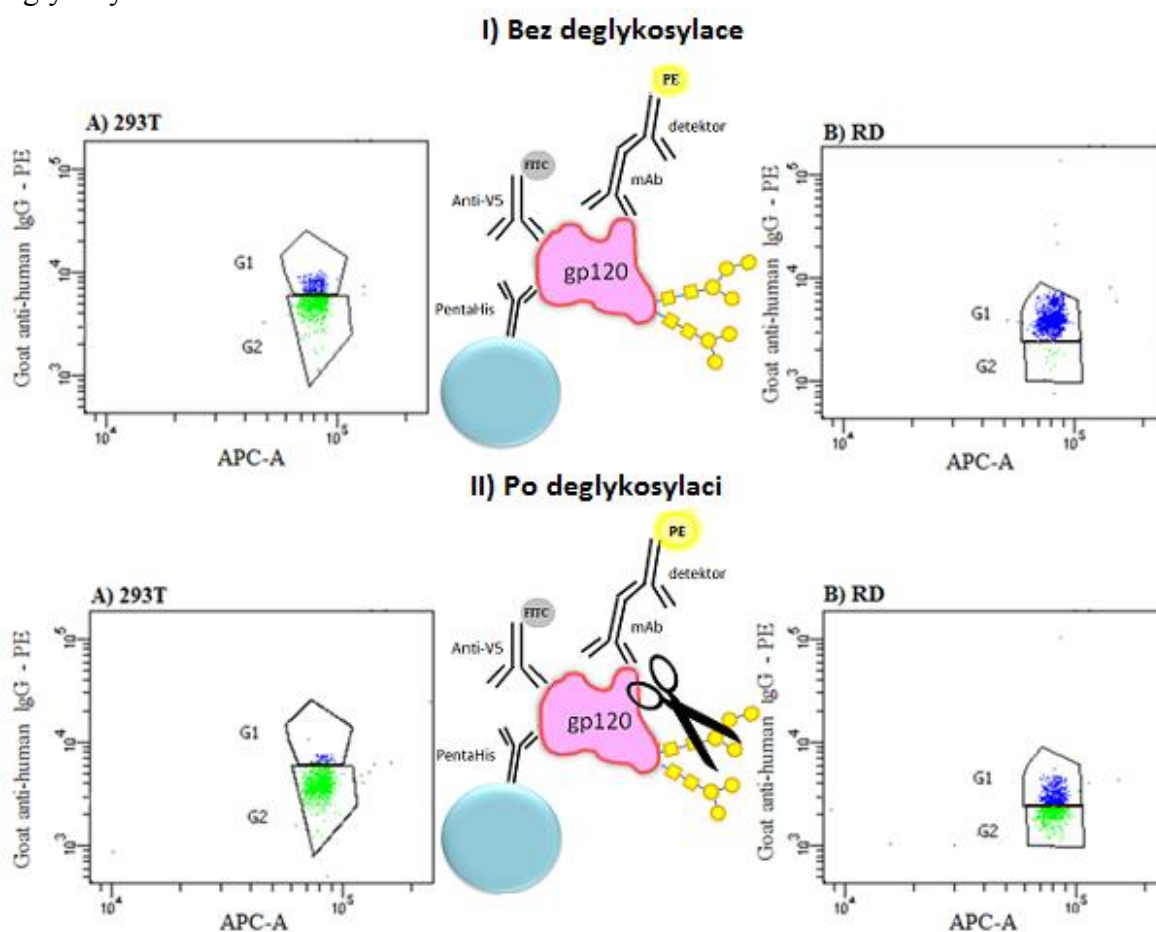
Reaktivita protilátky 257 nebyla výrazně ovlivněna deglykosylací PNGasou F u žádného z rekombinantních gp120 proteinů (RD, 293T). Na obr. 13 lze pozorovat, že u vzorků podrobených deglykosylaci nebyla zaznamenána výraznější změna v procentuálním zastoupení událostí v G1 (vymezuje vyšší reaktivitu s Goat anti Human IgG – PE) oproti kontrolním vzorkům, které nebyly podrobeny deglykosylaci. V případě 293T bylo zaznamenáno mírné zvýšení procentuálního zastoupení událostí v G1 z 0,4 % (bez deglykosylace) na 4,0 % (po deglykosylaci). U RD byl zaznamenán vzrůst z 5,9 % na 10,0 % U obou proteinů tedy došlo po odštěpení N-glykanů pouze k velmi mírnému zvýšení reaktivity s protilátkou 257.



Obr. 13: Ovlivnění vazby monoklonální protilátky 257 na rekombinantní proteiny gp120 (293T, RD) enzymatickým působením PNGasy F

G1 – gate 1 (vymezuje události odpovídající vyšší reaktivitě s protilátkou)
 G2 – gate 2 (vymezuje události odpovídající nižší reaktivitě s protilátkou)
 APC-A – intenzita fluorescence značených mikrosfér

Odštěpení N-glykanů z gp120 pomocí PNGasy F ovlivnilo reaktivitu protilátky PG9. U vzorků ošetřených enzymem je patrné snížení procentuálního zastoupení událostí v oblasti G1 (vymezuje vyšší reaktivitu s Goat anti Human IgG – PE) oproti kontrolním vzorkům, které nebyly podrobeny deglykosylaci (viz obr. 14). V případě proteinu produkovaného linií 293T byl zaznamenán pokles událostí v G1 ze 17,2 % (bez deglykosylace) na 3,6 % (po deglykosylaci). U proteinu exprimovaného buňkami RD byl pozorován pokles z 81,1 % (bez deglykosylace) na 29,8 % (po deglykosylaci). Na základě těchto výsledků lze říct, že reaktivita PG9 s rekombinantními gp120 proteiny se po deglykosylaci snížila.

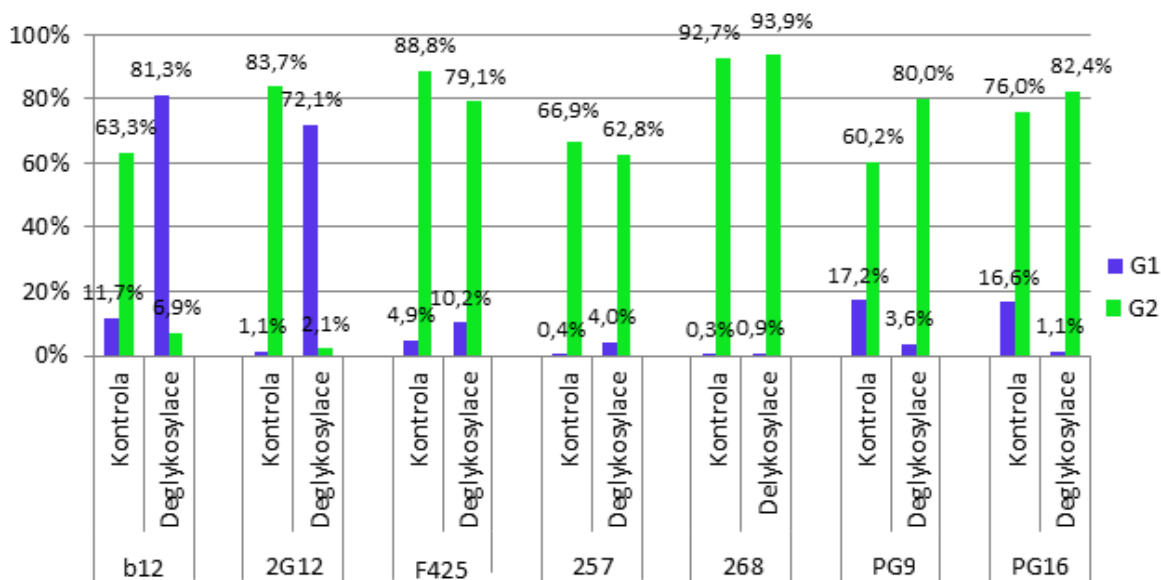


Obr. 14: Ovlivnění vazby monoklonální protilátky PG9 na rekombinantní proteiny gp120 (293T, RD) enzymatickým působením PNGasy F

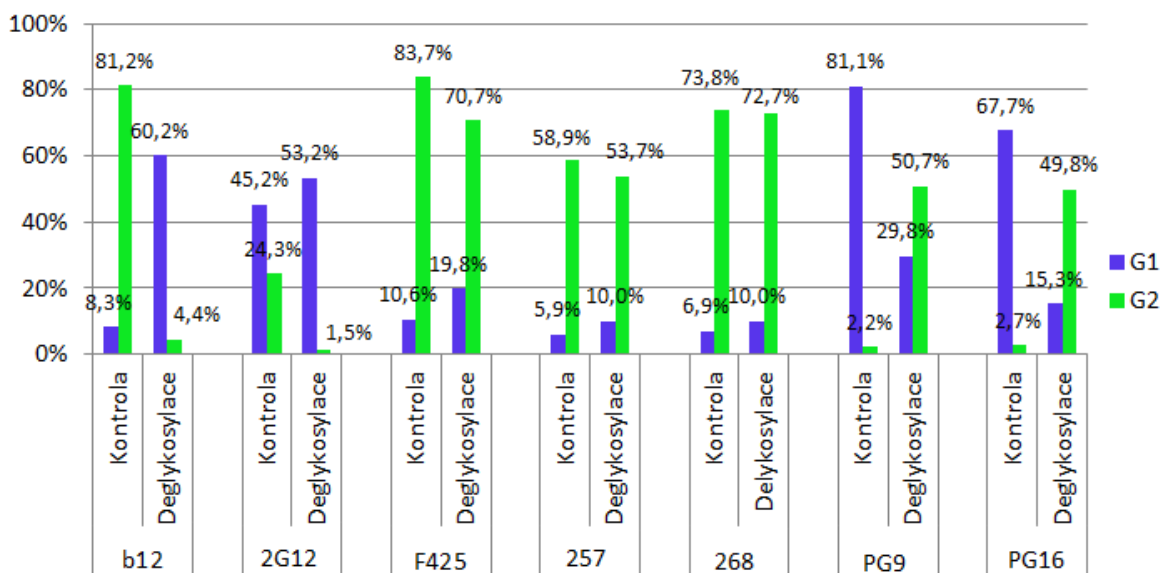
G1 – gate 1 (vymezuje události odpovídající vyšší reaktivitě s protilátkou)
G2 – gate 2 (vymezuje události odpovídající nižší reaktivitě s protilátkou)
APC-A – intenzita fluorescence značených mikrosfér

Výraznější zvýšení reaktivity po deglykosylaci bylo pozorováno kromě protilátky 2G12 také u b12. Protilátky F425 a 268 nevykazovaly žádnou výraznou změnu reaktivity po ošetření PNGasou F. Reaktivita protilátky PG16 se po odštěpení N-vázaných glykanů

snížila. Snížení reaktivity u PG16 bylo mírně výraznější u proteinu RD. Srovnání změn reaktivity protilátek s rekombinantními gp120 mezi kontrolními vzorky a vzorky podrobenými deglykosylaci je patrné na grafech 2 a 3. Modré sloupce reprezentují G1 - oblast vyšší reaktivity, zelené sloupce reprezentují G2 - oblast nižší reaktivity (viz obr. 12 - 14).



Graf 2: Vliv deglykosylace PNGasou F na reaktivitu monoklonálních protilátek s rekombinantním gp120 proteinem produkovaným linií 293T (HEK)



Graf 3: Vliv deglykosylace PNGasou F na reaktivitu monoklonálních protilátek s rekombinantním gp120 proteinem produkovaným linií RD

Legenda ke grafům 2 a 3:

G1 - Oblast vymezující události odpovídající vyšší reaktivitě s příslušnou protilátkou

G2 – Oblast vymazující události odpovídající nižší reaktivitě s příslušnou protilátkou

6 Diskuze

Glykoprotein gp120 se spolu s gp41 nachází na povrchu virové částice HIV-1 viru. Podílí se na interakci viru s receptory hostitelské buňky. Gp120 se vyznačuje silnou glykosylací. N-vázané glykany tvoří až polovinu jeho molekulové hmotnosti (Go a kol, 2008). V současné době je gp120 intenzivně studován s cílem vyvinout účinnou vakcínu, která by chránila proti HIV-infekci (Texeira a kol., 2011). Pro účely vakcinačních pokusů jsou rekombinantní proteiny gp120 produkovány různými typy buněčných kultur. Jedná se například o Jurkat, CHO, RD nebo 293T (Raška a kol., 2010 - 2).

Tato práce se zabývala průtokově cytometrickou analýzou reaktivity vybraných monoklonálních protilátek popsanych u různých osob infikovaných virem HIV s rekombinantními gp120 proteiny produkoványmi dvěma typy buněk – 293T a RD. Buněčné linie 293T jsou používány pro produkci vakcinačních antigenů, zatímco RD buňky reprezentují běžně používaný cíl pro DNA vakcíny.

Rekombinantní proteiny gp120 produkové různémi typy buněčných linií se vyznačují odlišnou glykosylací. N-glykany jsou připojeny k peptidovému řetězci ve specifických pozicích, charakterizovaných aminokyselinovým motivem N-X-S/T. Tyto pozice jsou kódovány genomem HIV-1 viru, avšak k samotnému připojení glykanů dochází v hostitelské buňce. Typ hostitelské buňky a s ním spojený způsob připojení glykanů tedy výrazným způsobem ovlivňuje výsledný glykosylační profil (Go a kol., 2009).

U různých typů rekombinantních gp120 byly prokázány odlišnosti v obsahu manózových a komplexních glykanů, stejně jako v celkové heterogenitě N-glykanů. Rozdíly ve složení N-glykanů mezi Jurkat (T-cell lines) a 293T jsou výrazné. To indikuje omezené využití expresního systému 293T pro produkci gp120 jako antigenu k vakcinačním pokusům a krystalografickým analýzám obzvláště v tomto případě, kdy hraje zastoupení N-glykanů důležitou roli. Naopak podobnost gp120 produkováného linií RD s proteinem produkováným T-lymfocyty nasvědčuje tomu, že je vhodné použít tyto buňky pro produkci antigenu k indukci humorální imunitní odpovědi (Raška a kol., 2010 – 2).

Průtokově cytometrická analýza ukázala, že reaktivita všech testovaných monoklonálních protilátek byla nižší u proteinu produkovaného buňkami 293T ve srovnání s RD. Rozdíl byl však relativně malý – nepřekročil 6,5 %. V dosud nepublikované studii vzniklé v laboratoři Ústavu imunologie UP byla detekována pomocí ELISA u gp120 produkovaného 293T (HEK) nejnižší reaktivita se všemi testovanými protilátkami (2G12, b12, 268, F425, 257, 227-52D a 19b). V této studii byly porovnávány proteiny produkované liniemi 293T, Jurkat, RD, HepG2 a CHO.

V rámci předložené diplomové práce byla analyzována reaktivita rekombinantních gp120 proteinů se sedmi různými monoklonálními protilátkami. Rovněž byla analyzována změna této reaktivity po deglykosylaci PNGasou F za účelem zjištění vlivu přítomnosti sacharidové složky na vazbu jednotlivých protilátek. Testovány byly dvě široce neutralizační protilátky (b12, 2G12), tři protilátky proti V3 smyčce (F425, 257, 268) a dvě protilátky proti variabilním smyčkám gp120 proteinu (PG9, PG16).

Monoklonální protilátka b12 se váže na konzervovaný epitop gp120 – CD4 vazebné místo. Je jednou z mála protilátek, které jsou schopny neutralizovat široké spektrum primárních izolátů HIV-1. CD4 receptor a b12 protilátka se vážou na stejnou oblast virového glykoproteinu, přičemž protilátka b12 vykazuje vyšší afinitu než CD4 (Sterjovski a kol., 2012). Konformační změny vyvolané vazbou protilátky b12 jsou méně rozsáhlé než ty, které jsou indukovány CD4 receptorem (Liu a kol., 2008). Tato protilátka při průtokově cytometrické analýze vykazovala po odštěpení N-vázaných glykanů zvýšenou reaktivitu s gp120. Lze tedy předpokládat, že N-glykany brání jejímu navázání na epitop. Míra snížení reaktivity byla přibližně stejná u proteinu 293T i RD.

Podobné výsledky byly zjištěny rovněž u protilátky 2G12. Tato protilátka rozpoznává klastr vysoko-manózových oligosacharidů gp120. Jedná se konkrétně o terminální alfa 1,2-vázanou manózu N-glykanových reziduí, která jsou k proteinovému základu gp120 připojena v pozicích 332, 392 a v menší míře také 339. 2G12 se vyznačuje širokou neutralizační schopností (Gray a kol., 2007, Poon a kol., 2007).

Při průtokově cytometrické analýze bylo detekováno zvýšení reaktivity 2G12 s gp120 po deglykosylaci. Toto zjištění poukazuje na zvýšenou rezistenci sacharidových reziduí, na které se 2G12 váže, vůči PNGase F. Po odštěpení sousedních

N-glykanů také pravděpodobně dochází ke zlepšení dostupnosti vazebných glykanů pro 2G12. Průtokově cytometrická analýza také ukázala poněkud vyšší reaktivitu 2G12 s rekombinantním gp120 RD, který obsahuje méně komplexních a více vysokomanózových glykanů. V dosud nepublikované studii byla testována reaktivita 2G12 s rekombinantními proteiny produkovanými různými typy buněčných linií. Při Western blott analýze za redukčních podmínek byla detekována nulová reaktivita 2G12 s gp120, deglykosylovaným PNGasou F za denaturačních podmínek, protože došlo k odštěpení všech N-glykanů.

Protilátky F425, 257 a 268 rozpoznávají V3 variabilní smyčku virového proteinu gp120. V3 oblast je kritická pro virovou infekčnost. Zprostředkovává vazbu koreceptorů cílových buněk a jeho sekvence determinuje koreceptorový tropismus (Bell a kol., 2008). Protilátky F425 a 268 se váží na krátký lineární peptidový epitop na vrcholu V3 smyčky. Rezidua rozpoznávaná protilátkou 257 jsou lokalizována v N-terminálním β -řetězci V3 (Gorny a kol., 1997).

Průtokově cytometrická analýza nedetekovala u těchto protilátek výrazný rozdíl v reaktivitě při porovnání gp120 293T a RD. Také změna reaktivity protilátek proti V3 smyčce po deglykosylaci byla jen nepatrná. Podobné výsledky byly zjištěny také při použití metody ELISA používané standardně na Ústavu imunologie UP. Také v tomto případě protilátky 268 a F425 reagovaly podobným způsobem se všemi testovanými rekombinantními gp120. To naznačuje, že přilehlé glykany výrazně nezamezují přístupu na tento poměrně značně vyčnívající epitop. Naproti tomu výsledky Western blott analýzy ukázaly poměrně výrazné rozdíly vazebné schopnosti protilátek 268 a F425 na různé typy gp120 v souvislosti s denaturovaným a redukovaným stavem glykoproteinu (Raška a kol, 2010 - 1).

PG9 a PG16 jsou protilátky, u nichž byla prokázána schopnost neutralizovat 70 – 80 % izolátů HIV-1. Obě protilátky vykazují preferenční vazbu na trimer gp120 a interagují s epitopem formovaným z konzervativních regionů V1/V2 a V3 variabilních smyček. Mutace V1/V2 a v některých případech i V3 domény ovlivňují neutralizační schopnosti PG9 a PG16. Tyto mutace jsou závislé na kmenu HIV-1 (Pancera a kol., 2012). Byla zjištěna závislost neutralizační schopnosti obou protilátek na N-glykosylaci gp120 v pozici 160 (Walker, 2009). Mutace N-glykosylačního místa V2 smyčky N160 zcela ruší neutralizační schopnosti těchto protilátek. To naznačuje, že

glykan N160 hraje důležitou roli při formování vazebného epitopu pro PG9 a PG16 (Doores a Burton, 2010).

V rámci průtokově cytometrické analýzy byl u protilátky PG9 zjištěn výraznější rozdíl mezi reaktivitou s gp120 různého původu (293T, RD) než u protilátky PG16. Vyšší reaktivita s PG9 byla zaznamenána u gp120 produkovaného buňkami RD. Působení PNGasy F poměrně značně ovlivnilo reaktivitu obou protilátek (PG9, PG16) s rekombinantními proteiny RD a 293T. Deglykosylace výrazně snížila reaktivitu PG9 a PG16 s oběma typy rekombinantních proteinů. Lze tedy předpokládat, že vazba obou protilátek je závislá na přítomnosti N-glykanů, které jsou na rozdíl od glykanů rozlišovaných 2G12 relativně citlivé k PNGase F.

Průtoková cytometrie poskytuje výsledky srovnatelné se standardně používanými metodami ELISA. Na rozdíl od metody Western blott jsou podmínky při průtokově cytometrické analýze nedenaturující a provedení výrazně nedenaturuje analyzovaný protein. Mikrosféry využívané v průtokově cytometrické analýze se vyznačují velkým vazebným povrchem, což omezuje sterické bránění interagujících molekul. Oproti technice ELISA je zde menší spotřeba reagensů. Významné jsou především minimální nároky na kvantitu rekombinantního proteinu a testovaných protilátek, jelikož tento biologický materiál je často dostupný jen v omezeném množství. Navíc, například uvedená deglykosylace pomocí PNGasy F může být provedena na již navázaném proteinu a to ve velmi malém objemu oproti analogicky provedené reakci při použití ELISA. Reakce lze také provádět ve velmi malých objemech. Průtoková cytometrie využívající fluorescenčně značené mikrosféry je rovněž velmi vhodnou technikou pro provádění multiplexních analýz.

7 Závěr

Teoretická část této diplomové práce se zabývala třemi základními tématy. Prvním je virus HIV-1, jeho životní cyklus, stavba virové částice, složení virového genomu a genetická variabilita. Další část práce se věnovala obalovému glykoproteinu gp120. Shrnula dosavadní poznatky o jeho struktuře a interakcích s receptory hostitelské buňky a protilátkami. Zaměřovala se na glykany, které tvoří podstatnou část molekuly tohoto glykoproteinu a také na produkci rekombinantních gp120 různými typy buněčných linií. Poslední část literární rešerše se zabývala problematikou průtokové cytometrie.

Experimentální část se věnovala technice konjugace rekombinantního proteinu gp120 na fluorescenčně značené mikropartikule BDTM Funcitonal Beads. Dále se zabývala optimalizací postupu pro průtokově cytometrickou analýzu monoklonálních protilátek s gp120 proteinem konjugovaným na BDTM Funcitonal Beads. Součástí byla také deglykosylace konjugovaného gp120 pomocí enzymu PNGasa F, který odštěpuje N-vázané glykany.

V rámci diplomové práce jsem se seznámila s technikou průtokově cytometrické analýzy. Optimalizovala jsem postup pro konjugaci rekombinantních proteinů gp120 na fluorescenčně značené mikrosféry a pro následnou průtokově cytometrickou analýzu reaktivity různých typů monoklonálních protilátek s těmito proteiny. Metoda průtokové cytometrie byla pro studium gp120 zvolena jako vhodná alternativa ke klasickým metodám ELISA a Western blott. Poskytuje několik výhod, mezi které patří zachování nativní konformace proteinu a menší spotřeba analyzovaných protilátek. Na rozdíl od metody ELISA lze při použití průtokové cytometrie provádět reakce ve velmi malých objemech. Zároveň je tato metoda velmi vhodná pro multiplexní analýzy.

8 Seznam zkratek

293T (HEK) – buňky lidské embryonální ledviny (Human embryonic kidney)

AIDS – syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immunodeficiency Syndrom)

AZT - Zidovudin

CCR5 – chemokinový receptor typu 5 (C-C motiv)

CHO – buňky ovaria čínského křečka (chinese hamster ovary)

CD4bs – vazebné místo pro CD4 receptor (CD4-binding site)

CXCR4 – chemokinový receptor typu 4 (C-X-C motiv)

CX₃CR1 – chemokinový receptor typu 1 (C-X₃-C motiv)

DAF – faktor urychlující rozpad (Decay accelerating factor)

DC-SIGN - dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

Env – gen kódující obalové proteiny (envelope)

FSC – forward scatter channel

GFP – zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)

Gp41 – glykoprotein 41

Gp120 – glykoprotein 120

Gp160 – glykoprotein 160

HAART – vysoce účinná antiretroviróvá terapie (Highly Active AntiRetroviral Therapy)

HIV – virus lidské imunodeficiency (Human immunodeficiency virus)

HLA – hlavní histokompatibilní komplex

Jurkat – CD4⁺ T-cell leukemia cells

LFA-1 – antigen asociovaný s funkcí lymfocytů (Lymphocyte function associated antigen)

LTR – dlouhé terminální repetice (long terminal repeats)

Nef – faktor negativní regulace (Negative-regulation factor)

NNRTI – ne-nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

NRTI – nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

PE - fykoerythrin

PNGS – potenciální N-glykosylační místa

PMT - fotonásobiče

Pol – gen kódující virovou polymerázu

RD – buňky lidského rhabdomyosarkomu (Human rhabdomyosarcoma)

Rev – regulátor virové exprese

RNA – ribonukleová kyselina

RRE – Rev responsivní element

Sf9 – spodoptera frugiperda insect cells

SSC – side scatter channel

Tat – transaktivátor

Vif – gen ovlivňující virovou infekčnost (Viral infectivity)

Vpr – gen kódující virový protein R

9 Literatura

An, H.J., Froehlich, J.W., Lebrilla, C.B. (2009): Determination of Glycosylation Sites and Site-specific Heterogeneity in Glycoproteins. *Curr Opin Chem Biol* 13 (4). 421 – 426

Bell, C.H., Pantophlet, R., Schiefner, A., Cavacini, L.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Wilson, I.A. (2008): Structure of Antibody F425-B4e8 in Complex with a V3 Peptide Reveals a New Binding Mode for HIV-1 Neutralization. *Journal of Molecular Biology* 375, 969–978

Clevestig, P., Pramanik, L., Leitner, T., Ehrnst A. (2006): CCR4 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol* 87. 607 – 612

Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Wang, S., Levy, D. N., Wang, W., Delaporte, E., Peeters, M., Derdeyn, C. A., Allen, S., Hunter, E., Saag, M. S., Hoxie, J. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., Robinson, J. E., and Shaw, G. M. (2005): Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *J. Exp. Med.* 201, 1407–1419

Devitt, G., Emerson, V., Pisch, T., Keppler, O. T., Bosch, V. (2006): Analysis of the exposure of induced HIV glycoprotein epitopes in a potential pseudovirion vaccine. *Vaccine* 25. 2161 – 2167

Doores, K.J., Burton, D.R. (2010): Variable Loop Glycan Dependency of the Broad and Potent HIV-1 Neutralizing Antibodies PG8 a PG16. *Journal of Virology*, 10510 – 10521.

Douek, D. C., Roederer, M., Koup, R. A. (2009): Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*, 60. 471 – 484

Falkowska, E., Ramos, A., Feng, Y., Zhou, T., Moquin, S., Walker, L.M., Wu, X., Seaman, M.S., Wrin, T., Kwong, P.D., Wyatt, R.T., Mascola, J.R., Pognard, P., Burton, D.R.(2012): PGV04, an HIV-1 gp120 CD4 binding site antibody, is broad and potent in neutralization but does not induce conformational changes characteristic of CD4. *J. Virol.* 86(8): 4394-4403

Fisher, R.A., Bertonis, J.M., Meier, W., Johnson, V.A., Costopoulos, D.S., Liu, T., Tizard, R., Walker, B.D., Hirsch, M.S., Schooley, R.T. (1988): HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* 331. 76 – 78

Givan, A.L. (2001): *Flow cytometry: first principles* (Second edition). Wiley-Liss, Inc. ISBN 0-471-38224-8

Go, E.P., Irungu, J., Zhang, J., Dalpathado, D. s., Liao, H.X., Sutherland, L.L., Alam, S. M., Haynes, B.F., Desaire, H. (2008): Glycosylation Site-Specific Analysis of HIV Envelope Proteins (JR-FL and NOC-S) Reveals Major Differences in Glycosylation Site Occupancy, Glycoform Profiles, and Antigenic Epitopes' Accessibility, *Journal of Proteome Research* 7 (4), 1660 – 1674

Go, E.P., Chang Q., Liao H.X., Sutherland L.L., Alam S.M., Haynes B.F., Desaire H. (2009): Glycosylation site-specific analysis of clade c HIV-1 envelope proteins. *Journal of Proteome* 8: 4231-42.

Gorny, M.K., VanCott, T.C., Hioe, C., Israel, Z.R., Michael, N.L., Conley, A.J., Williams, C., Kessler, J.A., Chigurupati, P., Burda, B., Zolla-Pazner, S. (1997): Human monoclonal antibodies to the V3 loop of HIV-1 with intra- and interclade cross-reactivity. *The journal of Immunology* 159: 5114-5122

Gray, E.S., Moore, P.L., Panthoplet, R.A., Pantophlet, R.A., Morris, L. (2007): N-Linked Glycan Modifications in gp120 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Render Partial Sensitivity to 2G12 Antibody Neutralization. *Journal of Virology* 81, 10769-10776

Grinsztejn, B.Y. Nguyen, C. Katlama, J.M. Gatell, A. Lazzarin, D. Vittecoq, C.J. Gonzalez, J. Chen, C.M. Harvey, Isaacs, R.D. (2006): Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial, *Lancet* 369, 1261 - 1269

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

Hawley, T. S., Hawley, R.G. (2004): *Flow cytometry protocols* 2nd ed., New Jersey, Humana press.

Herweijer, H., Stokdijk, W., Visser, J.W.M. (1988): High-speed photodamage cell selection using bromodeoxyuridine/Hoechst 33342 photosensitized cell killing. *Cytometry* 9. 143 - 149

Hořejší, V., Bartůňková, J. (2002): *Základy imunologie* (2. vydání). Triton. ISBN: 80-7254-215-X.

Janeway C.A., Travers P., Walport M, Capra JD (1999): *Immunobiology : The Immune System in Health and Disease*, 4th ed. New York: Garland Pub., ISBN 0-8153-3217-3.

Krejsek J., Kopecký O. (2004): *Klinická imunologie*; 1. vydání, Nucleus HK, ISBN 80-86225-50-X.

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

Leonard, C. K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N., Gregory, T.J. (1990): Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265, 10373-10382

Levinson, W. (2002): *Review of Medical Microbiolog and Immunology*, Ninth Edition. The McGraw-Hill Companies. ISBN: 0-07-146031-4.

Li, M., Gao, F., Mascola, J. R., Stamatatos, L., Polonis, V. R., Koutsoukos, M., Voss, G., Goepfert, P., Gilbert, P., Greene, K. M., Bilska, M., Kothe, D. L., Salazar-Gonzalez, J. F., Wei, X., Decker, J. M., Hahn, B. H., Montefiori, D. C. (2005): Human Immunodeficiency Virus Type 1 env Clones from Acute and Early Subtype B Infections for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* 79, 10108–10125

Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M.J., Sapiro, G., Subramaniam, S., (2008): Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455, 109–113

Madani, N., Perdigoto, A.L., Srinivasan, K., Cox, J.M., Chroma, J.J., LaLonde, J., Head, M., Smith III, A.b., Sodorski, J.G. (2004): Localized Changes in the gp120 Envelope Glycoprotein Confer Resistance to Human Immunodeficiency Virus Entry Inhibitors BMS-806 and #155. *Journal of virology* 78(7). 3742-3752.

Marinov, Iuri (2008): *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*, pp 21 - 32 Triton, 1998. ISBN 978-80-7387-143-7

Mizuochi, T., Matthews, T. J., Kato, M., Hamako, J., Titani, K., Solomon, J., Feizi, T. (1990): Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharidic with bisecting N-acetylglucosamine residues. *Journal of Biological Chemistry* 265. 8519–8524

Ormerod, M. G. 2008. *Flow Cytometry - A Basic Introduction* [online]. Los Angeles: De Novo Software. [cit. 4. 2. 2013]. Dostupné na [www: <http://flowbook.denovosoftware.com>](http://flowbook.denovosoftware.com)

Pancera, M., McLellan, J.S., Shahzad-ulHussan, S., Doria-Rose, N., Zhang, B., Yang, Y., Burton, D.R., Koff, W.C., Bewley, C.A., Kwong, P.GD. (2012): Structural comparison of somatically related PG9 and PG16 in complex with their epitope reveals differences in glycan recognition. *Retrovirology* 9.

Pantophlet, R., Aguilar-Sino, R.O., Wrin, T., Cavacini, L.A., Burton, D.R. (2007): Analysis of the neutralization breadth of the anti-V3 antibody F425-B4e8 and re-assessment of its epitope fine specificity by scanning mutagenesis. *Virology* 364. 411 – 453

Pantophlet, R., Wang, M., Aguilar-Sino, R. O., Burton, D. R. (2009): The human immunodeficiency virus type 1 envelope spike of primary viruses can suppress antibody access to variable regions. *Journal of Virology* 83, 1649–1659

Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M. I. M., Goudsmit, J. a Paxton, W. A. (2001): N-Linked Glycosylation of the HIV Type-1 gp120 Envelope Glycoprotein as a Major Determinant of CCR5 and CXCR4 Coreceptor Utilization. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (16). 13433–13441

Poon, A. F., Lewis, F. I., Pond, S. L., and Frost, S. D. (2007): Evolutionary Interactions between N-Linked Glycosylation Sites in the HIV-1 Envelope. *PLoS Comput.Biol.* 3, e11

Raška, M., Novák, J. (2010): Involvement of envelope-glycoprotein glycans in HIV-1 biology and infection. *Arch. Immunol. Ter. Exp.* 58 (3). 191 – 208.

Raška, M., Elliott, M.C., Hall, S., Czerneková, L., Zachová, K., Moldoveanu, Z., Brown, R., Městecký, J., Novák, J. (2010): HIV-1 gp120 glycosylation is cell type-specific and influences reactivity with HIV-1-specific antibodies. In: Daniel, R., Hejnar, J., Skalka, A.M., Svoboda, J.(ed.): Centennial Retrovirus Meeting, pp. 55 – 59, Medimond International Proceedings. ISBN 978-88-7587-586-2 (1)

Raška, M., Takahashi, K., Czernekova, L., Zachova, L., Hall, S., Moldoveanu, Z., Elliott, M.C., Wilson, L., Brown, R., Jancova, D., Barnes, S., Vrbkova, J., Tomana, M., Smith, P.D., Mestecky, J., Renfrow, M.B., Novak, J. (2010): Glycosylation Patterns of HIV-1 gp120 Depend on the Type of Expressing Cells and Affect Antibody Recognition. *The Journal of Biological Chemistry* 285. 30860 – 20869 (2)

Rizzuto, C.D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., kwong, P.D., (1998): A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280, 1949 - 1953

Robertson, D. (2003): US FDA approves new class of HIV therapeutics, *Nat. Biotechnol.* 21, 470 - 471

Robinson, H. L. (2006): New hope for an AIDS vaccine. *Nature reviews – immunology*, Volume 2, 239 – 250.

Robinson, J.P., Grégori, G. (2007): Principles of Flow cytometry. In: Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (ed): *Flow Cytometry with Plant Cells*, pp. 19 – 40, Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN 978-3-527-31487-4

Roitt,I., Brostoff, J., Male, D. (1996): *Immunology (Fourth Edition)*, Times Mirror International Publishers Limited. ISBN 0-7234-2178-1

Rosypal, S: 2000: Úvod do molekulární biologie III. Brno, 3. vydání, ISBN 80-902562-2-8.

Roux, K.H., Zhu, P., Seavy, M., Katinger, H., Kunert, R., Seamon, V. (2004): Electron microscopic and immunochemical analysis of the broadly neutralizing HIV-1-specific, anti-carbohydrate antibody, 2G12. *Molecular Immunology* 41: 1001 – 1011.

Sánchez-Pomales, G., Zangmeister, R. (2011): Recent Advantages in Electrochemical Glycobiocensing. *International Journal of Electrochemistry*, 2011.

Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry* [online]. 4th ed. Hoboken : Wiley-liss. [cit. 11. 2. 2013]. Dostupné na www:

<<http://www.coulterflow.com/bciflow/practical/book/index.html>>

Sterjovski, J., Churchill, M., Ellett, A., Wesselingh, S.L., Ramsland, P.A., Gorry, P.R. (2012): Structural elements of primary CCR5-using HIV-1 gp120 proteins influencing sensitivity and resistance to the broadly neutralizing monoclonal antibody b12. *Virology* 432, 394 – 404

Sweet, R.W., Truneh, A., Hendrickson, W.A. (1991): CD4: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target. *Curr. Opin. Biotech.* 2. 622 - 633

Teixeira, C., Gomes, J. R. B., Gomes, P., Maurel, F. (2011): Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 979 – 992.

Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., Moore, J.P. (1996): CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384. 184 – 187

Voet, D. a kol. (1995): *Fundamentals of biochemistry*, pp 283 – 293, Victoria Publishing.

Walker, L. M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.Y., Wagner, Phung,, D.P., Goss, J.L., Wrinn, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., Lehrman, J.K., Priddy, F.H., Olsen, O.A.,

Frey, S.M., Hammond, P.W., Kaminsky, S., Zamb, T., Moyle, M., Koff, W.C., Poignard, P. and Burton, D.R.. 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326:285–289.

Weerapana, E., Imperali, B. (2006): Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 16(6): 91R – 101R.

Wu, L., KewalRamani, V. N. (2006): Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral Dissemination. *Nat Rev Immunol* 6 (11): 859 – 868.

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

Yeni, P.G., Hammer, S.M., Hirsch, M.S., Saag, M.S., Schechter, M., Carpenter, C.C., Fischl, M.A., Gatell, j.M., Gazzard, B.G., Jacobsen, D.M., Katzenstein, D.A., Montaner, J.S., Richman, D.D., Schooley, R.T., Thompson, M.A., Vella, S., Volberding, P.A. (2004): Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA panel, *J. Am. Med. Assoc.* 292 (2004), 251 - 265.

Zhu, X., Borchers, C., Bienstock, R. J. (2000): Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* 39, 11194 – 11204.

Zolla-Pazner, S. (2005): Improving on nature: focusing the immune response on the V3 loop. *Hum. Antibodies* 14 (3-4):69 – 72.