

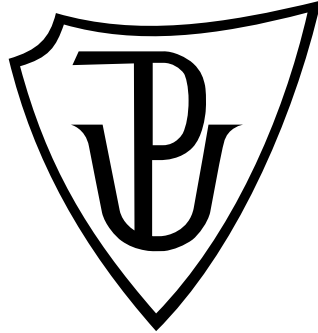
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2018**

**Terézia Kurová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Produkce rekombinantních antigenů viru HIV za  
využití eukaryotických expresních systémů**

**Bakalářská práce**

**Terézia Kurová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.**

Čestně prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci s názvem „Produkce rekombinantních antigenů viru HIV za využití eukaryotických expresních systémů“ zpracovala samostatně pod vedením pana Mgr. Michala Křupky, Ph.D. na Ústavu imunologie LF UP v Olomouci, s využitím literatury uvedené v závěru této práce.

V Olomouci dne .....

.....

## **SOUHRN**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium produkce rekombinantních antigenů viru lidské imunodeficiency za využití eukaryotických expresních systémů. Teoretická část této práce se zabývá historií viru, jeho epidemiologií, terapií, možnou vaxcinací, strukturou viru HIV, významem glykosylace obalového proteinu gp120, možnostmi produkce rekombinantních proteinů za využití savčích expresních systémů a jejich purifikaci za pomoci afinitních chromatografických metod. Nejčastěji používaným expresním systémem je buněčná linie HEK 293. Purifikace proteinů je prováděna nejčastěji za využití imobilizované kovově-afinitní chromatografie k purifikaci rekombinantních proteinů obsahujících krátkou afinitní značku, složenou ze zbytků polyhistidinu.

Experimentální část bakalářské práce se věnuje optimalizaci kotransfekce eukaryotické buněčné linie HEK 293F pomocí plazmidu kódující sekretující se formu env.gp140.SOSIP proteinu a plazmidu kódujícího proteinázu furin v různých poměrech. Poté kotransfekci s plazmidem, který nese sekvenci pro tři env.gp140.SOSIP proteiny. Závěr experimentální části se věnuje chromatografické metodě sloužící k purifikaci proteinů.

## **SUMMARY**

This Bachelor's thesis is devoted to the study of production of recombinant antigens of human immunodeficiency virus using eukaryotic expression systems. The theoretical part of this Bachelor's thesis discusses history, epidemiology, treatment and the structure of HIV virus and possible vaccination. Further it deals with the significance of glycosylation of envelope glycoprotein GP120, the possibilities of production of recombinant proteins using mammalian expression systems and their purification using methods of affinity chromatography. The most frequently used expression system is the cell line HEK 293. The protein purification is most frequently performed by applying immobilized metal-affinity chromatography to purify recombinant proteins containing a short affinite tag which consists of polyhistidine residue.

The practical part of this Bachelor's thesis deals with the optimization of cotransfection of eukaryotic cell lines HEK 293F by applying various proportions of plasmid which encodes secreted form of protein env.gp140.SOSIP and plasmid which encodes proteinase furin followed by cotransfection using plasmid which contains a sequence of three env.gp140.SOSIP proteins. In conclusion, the Bachelor's thesis discusses methods of chromatography used to protein purification.

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při zpracování této bakalářské práce. Moje poděkování dále patří také všem pracovníkům Ústavu imunologie LF UP v Olomouci za pomoc zejména při zpracování experimentální části této práce, která byla podpořena studentskými granty IGA\_LF\_2017\_009 a IGA\_LF\_2018\_016.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍL PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Historie objevu HIV .....	3
3.2	Epidemiologie .....	4
3.3	Struktura viru HIV .....	5
3.4	Terapie.....	8
3.5	Mutace delta 32 .....	10
3.6	Berlínský pacient.....	11
3.7	Vakcinace .....	11
3.8	GP120 – význam glykosylace .....	12
3.9	Možnosti produkce a purifikace rekombinantních proteinů za využití savčích buněčných linií a chromatografických metod .....	15
4	Materiál a metodika .....	19
4.1	Biologický materiál .....	19
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	22
5	Výsledky.....	30
5.1	Optimalizace kotransfekce eukaryotních buněk 293F .....	30
5.2	Kotransfekce eukaryotních buněk 293F.....	31
6	Diskuze .....	35
7	Závěr.....	37
8	Literatura .....	38

## Seznam použitých zkratk a symbolů

<b>AIDS</b>	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
<b>ART</b>	antiretroviróvá terapie
<b>nAb</b>	<i>neutralizing antibody</i>
<b>bnAb</b>	<i>broadly neutralizing antibody</i>
<b>BSA</b>	albumin z bovinního séra
<b>CDC</b>	centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
<b>CHO</b>	buňky vaječníků čínského křečka
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>env/Env</b>	<i>envelope gene</i> nebo <i>envelope glycoprotein</i>
<b>gag</b>	<i>group specific antigen gene</i>
<b>gp120</b>	glykoprotein 120 = povrchový glykoprotein
<b>gp160</b>	glykoprotein 160
<b>gp41</b>	glykoprotein 41 = transmembránový glykoprotein
<b>HAART</b>	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
<b>HEK-293F</b>	buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk typu freestyle
<b>HEK-293T</b>	buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk
<b>HIV-1, HIV-2</b>	virus lidské imunodeficiency typ 1, typ 2
<b>IMAC</b>	imobilizovaná kovově-afinitní chromatografie
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> (otevřený čtecí rámec)
<b>p15 = Vpr</b>	<i>viral protein R</i>
<b>p16 = Vpu</b>	<i>unique viral protein</i>
<b>p19 = Rev</b>	<i>regulator of viral proteins expression</i>
<b>p23 = Vif</b>	<i>viral infectivity factor</i>
<b>p27 = Nef</b>	<i>negative regulatory factor</i>
<b>p28 = Tat</b>	<i>trans-activator of transcription</i>
<b>pol</b>	<i>DNA polymerase gene</i>
<b>PNGS</b>	potencionální N-glykosylační místa
<b>RNA</b>	<i>ribonukleová kyselina</i>
<b>SDS-PAGE</b>	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
<b>SIV</b>	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
<b>Sf9</b>	hmyzí buňky
<b>T/F</b>	<i>transmitted founder</i> – zakladatelský vir
<b>WB</b>	<i>western blotting</i>



## Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma virového genomu – Kompletní genom HIV s hlavními geny .....	6
Obrázek 2: Struktura viru HIV .....	7
Obrázek 3: Struktura HIV-1 proteázy v komplexu s inhibitorem .....	10
Obrázek 4: Struktura glykoproteinu gp120 .....	14
Obrázek 5: Schéma vazby histidinové značky na Ni-NTA .....	18
Obrázek 6: Schéma plazmidu pcDNA3.1 env.MBL.gp140.SOSIP/C (TF) .....	19
Obrázek 7: Schéma gp140.SOSIP štěpeného proteinázou furinem.....	20
Obrázek 8: Schéma Bürkerovy komůrky.....	23
Obrázek 9: Optimalizace kotransfekce buněk 293F pomocí plazmidů gp140.SOSIP/cladeC/TF a FURIN.ORF.clone (detekce anti-V5) za denaturačních podmínek .....	30
Obrázek 10: Western blot vypurifikovaných proteinů získaných kotransfekcí buněk 293F s plazmidem furinem a plazmidem gp140.SOSIP (TF/Y1/Y3) detekované pomocí tzv. „séra pacienta“ .....	32
Obrázek 11: Detekce a určení koncentrace syntetizovaných proteinů po obarvení Coomassie Brilliant Blue za použití standardu BSA .....	33

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Příprava transfekčních reagensů .....	24
Tabulka 2: Příprava 10% polyakrylamidového gelu .....	25
Tabulka 3: Vyhodnocení Western blotu gp140.SOSIP/clade C/TF štěpený proteinázou furinem, detekovaný pomocí protilátky anti-V5.....	31
Tabulka 4: Vyhodnocení western blotu kotransfekce buněk 293F s furinem a gp140.SOSIP (TF/Y1/Y3) detekovaného pomocí patientského séra .....	32
Tabulka 5: Výsledné koncentrace zakoncentrovaných rekombinantních proteinů .....	34

# 1 ÚVOD

Virus lidské imunodeficiency (HIV) je původcem jednoho z nejrozšířenějších onemocnění na světě, a to syndromu získaného selhání imunity (AIDS). Od objevu viru v roce 1980 do současné doby nebyla nalezena účinná vakcína k prevenci tohoto onemocnění. I když vývoj vakcíny započal velmi brzy po objevu viru HIV, přetrvávající překážkou pořád zůstává genetická variabilita viru HIV. Za klíčový komponent při vývoji vakcíny je považován obalový protein Env. Jeho součástí je glykoprotein gp120, který je silně glykosylován, vytváří společně s glykoproteinem gp41 obalový protein HIV viru. Hlavní funkce obalového proteinu Env spočívá ve zprostředkování interakce viru s hostitelskou buňkou. Za nejdůležitější imunitní mechanismus obrany je považováno zamezení vazby HIV viru na receptory buněk pomocí Env specifických neutralizačních látek. Glykoprotein gp120 je produkován savčími, buněčnými liniemi za účelem tvorby vakcín. Savčí buněčné linie jsou velmi důležité, protože mají schopnost vyrábět proteiny ve správně složené glykosylované formě.

Právě tímto způsobem je možné, metodou kotransfekce, vyrobit rekombinantní proteiny. Pomocí této metody lze vložit plazmidy do buněk a následnou expresí genu, který plazmid nese, vyprodukovat rekombinantní proteiny. Tyto proteiny je pak možné využít na imunizaci při vývoji vakcín. Nutnou podmínkou pro produkci rekombinantních proteinů je exprese genu. Důležitým procesem pro produkci rekombinantních proteinů viru HIV-1 je N-vázaná glykosylace, proto jsou pro jejich produkci využívány savčí buněčné linie. Aby bylo možné co nejpřesněji napodobit povrch virionu, byl vytvořen glykoprotein gp140, který obsahuje podjednotku gp120 a zkrácenou podjednotku gp41 (gp20). Právě proto je optimalizace kotransfekce důležitá pro správné štěpení přechodného místa glykoproteinu gp140 proteinázou furinem. K následné purifikaci vyprodukovaného rekombinantního proteinu slouží afinitní chromatografie, která se založena na interakci aminokyseliny s kovem.

## 2 CÍL PRÁCE

1. Zvládnutí práce s odbornými literárními databázemi.
2. Vypracování literární rešerše zaměřené na strukturu a funkci povrchových proteinů viru HIV a možnosti produkce a purifikace rekombinantních proteinů za využití savčích buněčných linií a chromatografických metod.
3. Praktická část je zaměřena na zvládnutí práce s tkáňovými kulturami a na základní metody purifikace, detekce a analýzy rekombinantních proteinů. (SDS PAGE, imunoblot, afinitní chromatografie). Cílem této části bude optimalizace kotransfekce eukaryotních buněk 293F plazmidy FURIN.ORF.clone a env.MBL.gp140.SOSIP. Plazmid env.MBL.gp140.SOSIP kóduje trimerní protein gp140.SOSIP, který je blízce podobný nativní hrotu viru HIV-1, je rozpustný a podjednotky gp120 a gp20 jsou stabilizované disulfidovou vazbou. Po zjištění optimálního poměru plazmidů je provedena kotransfekce buněk 293F v optimálním poměru plazmidů, poté je rekombinantní protein izolován, purifikován a zakoncentrován. Takto vyrobený rekombinantní protein může dále sloužit k imunizaci a výrobě vakcín.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Historie objevu HIV

HIV se dostalo do popředí pozornosti v oblasti zdravotnictví v době, kdy v polovině roce 1981 byly u homosexuálních mužů a uživatelů drog užívaných intravenózně rozpoznány neobvyklé infekce (Gallin *et* Fauci, 1985). Poté v roce 1982 americké centrum pro kontrolu nemocí a prevenci (CDC) určilo rizikové skupiny pro šíření HIV infekce. V rizikové skupině se vyskytovali homosexuálové, drogově závislí a lidé s hemofilií. Testování afrických přistěhovalců na HIV v Belgii ukázalo, že virus HIV se vyskytoval mezi Afričany již v roce 1983. Nicméně epidemie v této zemi byla uznána mnohem později, a to ze strachu z negativních důsledků na ekonomiku afrických zemí. Právě toto zpoždění mělo za následek vysokou úmrtnost, morbiditu a sociální důsledky. Následná reakce zahrnovala kontrolu a výzkum epidemiologie HIV (Kagaayi *et* Serwadda, 2016).

Jakmile výzkumníci začali popisovat epidemiologii a rizikové faktory systematickým způsobem, objevilo se mnoho teorií, co je příčinou záhadného onemocnění. Předpokládalo se, že se jedná infekční činidlo a v roce 1983 byl jako etiologický původce izolován nový lidský retrovirus. Tento virus byl nakonec označen jako virus lidské imunodeficiency neboli HIV (Teixeira *at al.*, 2011). Bylo vynaloženo mimořádné úsilí, aby byl nalezen původ viru HIV jako významného patogenu pro člověka. Vycházelo se při tom z porovnání různých izolátů viru HIV-1, HIV-2, které se od sebe odlišovaly jak geografickým původem, tak různými časovými intervaly, ve kterých byly získávány. Podařilo se získat genetické informace o zatím nejstarším vzorku lidského séra pozitivním na HIV-1, který pocházel z Konga a byl odebrán v roce 1959. Porovnáním tohoto izolátu s různými izoláty viru opičí imunodeficiency (Simian Immunodeficiency Virus) bylo za nejpravděpodobnější scénář vzniku viru HIV-1 považováno oddělení se HIV-1, který mohl infikovat člověka (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Více než 90 % pacientů nakažených virem HIV bylo ve věku od 20 do 49 let. Více než 93 % ze všech pacientů byli muži. Sexuální aktivita byla považována za nejčastější způsob přenosu. Mezi uživateli drog bylo používání nesterilních injekčních stříkaček jedním ze zásadních způsobů přenosu viru HIV-1. V té době byla preventivní doporučení založena převážně na přerušení sexuálního kontaktu s infikovanými osobami. Dále byla vydána specifická doporučení pro bezpečné pracovní postupy pro

zdravotnický personál, laboratoře a další pracovníky, kteří pracují přímo s infikovanými pacienty (Gallin *et* Fauci,1985). Následná reakce zahrnovala kontrolu a výzkum epidemiologie HIV. Postupně se počet intervencí zvyšoval, až k objevu trojitě antiretrovirové terapie (ART), která vedla k rychlému poklesu morbidity (Kagaayi *et* Serwadda, 2016).

### **3.2 Epidemiologie**

První případy byly diagnostikovány ve Spojených státech v roce 1981 (Gallin *et* Fauci,1985). Jednalo se o americká města jako Los Angeles, New Yorku a později také San Francisco (Kagaayi *et* Serwadda, 2016). V roce 2000 bylo na světě infikováno kolem 36 milionů lidí virem HIV-1 a zhruba 20 milionů již zemřelo. Z epidemiologického pohledu lze odlišit rozdílné vzory šíření nákazy ve vyspělých zemích západní Evropy a severní Ameriky od rozvojových zemí, zvláště subsaharské Afriky. Ve vyspělých zemích dochází k přenosu především homosexuálním stykem, poté heterosexuálním stykem, ale také prostřednictvím intravenózního užívání drog.

Za problematickou oblast s ohledem na šíření viru HIV-1 je považována Karibská oblast a země jižní Ameriky, zvláště Brazílie (Krejsek *et* Kopecký, 2004). Odhady rozšíření a výskytu infekce HIV-1 v mnoha rozvojových zemích, včetně subsaharské Afriky, jsou odvozeny za pomoci statistických modelů založených především na průzkumech mezi těhotnými ženami nebo na průzkumech v domácnostech (Fettig *et al.*, 2014). Globálně nejvýznamnější zátěží výskytu infekce HIV-1 je subsaharská Afrika, kde za hlavní přenos je považován heterosexuální přenos a přenos z matky na dítě (Krejsek *et* Kopecký, 2004). Jedná se hlavně o nechráněný heterosexuální styk a riziko se zvyšuje, se stoupajícím počtem pohlavních partnerů. Mezi páry subsaharské Afriky, kde je alespoň jedna osoba infikována HIV-1, jsou dvě třetiny v polygammích vztazích. Celkový trend epidemiologie HIV ukazuje méně nových infekcí a snížení úmrtnosti související s AIDS v subsaharské Africe. Od roku 2000 do roku 2012 se výskyt HIV-1 snížil o více než polovinu, což odpovídalo přibližně o 1 milion nových infekcí méně, než v roce 2000 (Fettig *et al.*, 2014).

Tři desetiletí od prvního popisu HIV se odhadovalo kolem 34 miliónů infikovaných HIV a zhruba 2/3 pocházely ze subsaharské Afriky. S nástupem čtvrtého desetiletí pandemie, biomedicínské přístupy k prevenci se ukazují jako slibnější než současná masová komunikace a behaviorální intervence. Prevence přenosu z matky na dítě ve Spojených státech probíhala pomocí univerzálního testování těhotných žen,

poskytováním vhodné antivirové léčby a vyhýbáním se kojení infikovanými matkami. Tato opatření prakticky eliminovala nové pediatrické infekce HIV. Nejdůležitějším zásahem prevence přenosu HIV z matky na dítě je identifikace a léčba těhotných žen. Největší výzvou v prevenci rozšiřování viru HIV-1 je skupina MSM (men who have sex with men). Při tomto druhu přenosu existuje málo důkazů o úspěšnosti prevence. Pokud se v této populaci zkoumá epidemiologie HIV, vždy se zjistí vysoká míra infekce, obvykle vyšší než u obecné populace. Celosvětově se odhaduje, že přibližně 3 miliony uživatelů drog injekčně je infikováno HIV. Největší počet těchto uživatelů je ve východní Evropě a Asii. Spolu s HIV trpí i vysokou mírou infekcí hepatitidy B a C a tuberkulózou (De Cock *et al.*, 2012).

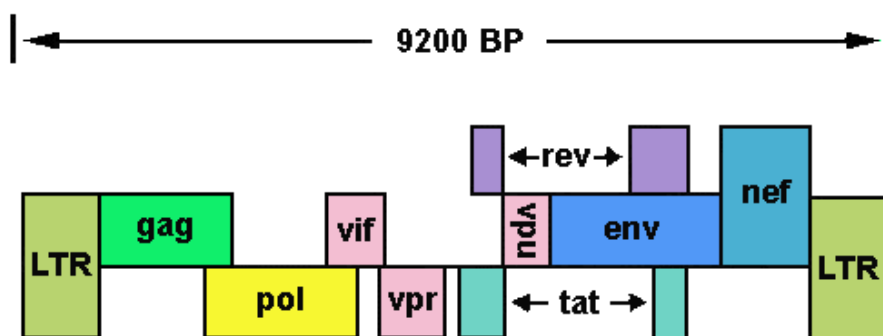
### 3.3 Struktura viru HIV

Virus lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus, HIV) patří do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Lentivirus*. Virus lidské imunodeficiency vyvolává poruchy obranyschopnosti organismu a způsobuje onemocnění AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Dosud byly identifikovány dva odlišné typy HIV, a to jak antigenně, tak i biologicky (Bednář *et al.*, 1996). Dělí se podle jejich zeměpisného původu a organizace genomu. Celosvětově je převládajícím virem HIV-1 (Teixeira *at al.*, 2011). Typ HIV-1 se vyskytuje v centrální Africe a na všech dalších kontinentech (Bednář *et al.*, 1996). Relativně neobvyklý typ HIV-2 je soustředěn v západní Africe a je zřídka nalezen jinde (Teixeira *at al.*, 2011).

Vyvolává podobné symptomy jako HIV-1, ale rozvoj onemocnění je pomalejší (Bednář *et al.*, 1996). Fylogenetické analýzy mnoha kmenů HIV-1 izolovaných z různých geografických oblastí ukázaly, že virus lze rozdělit na skupiny, podtypy a cirkulující rekombinantní formy. HIV-1 byl dále rozdělen do tří skupin: převládající skupina M, poté N a O. Skupina M je rozdělena do jedenácti podtypů (tzv. clades). Podtyp typu B infikuje většinu lidí v Americe, Evropě, Asii a Austrálii, zatímco v Africe se nacházejí podtypy A, C, D, a E (Teixeira *at al.*, 2011).

Z hlediska morfologie viru se jedná o obalený vir o průměru 100 až 200 nm (Bednář *et al.*, 1996). Vstup HIV do hostitelských buněk je zprostředkován glykoproteiny virového obalu, které jsou uspořádány na hrotech, jež se na povrchu virionu projevují. Tyto obalové komplexy jsou zakotveny ve virové membráně. Povrch hrotu je složen primárně z vnějšího obalového glykoproteinu, gp120, spojeného nekovalentními interakcemi s každou podjednotkou trimerního glykoproteinového

komplexu gp41 (Kwong *et al.*, 1998). Gp120 vyčnívá z povrchu a interaguje s receptorem CD4 na povrchu hostitelské buňky. Gp41 je uložen v obalu a zprostředkovává fúzi virové obálky s buněčnou stěnou hostitelské buňky v době infekce (Levinson, 2010). Pod obalem je membránový protein P18. Nukleoid ohraničený zevní kapsidou (tvořenou proteinem P24) má asymetrický, kónický tvar (Bednář *et al.*, 1996). Genom HIV se skládá ze 2 identických molekul jednořetězcové RNA s pozitivní polaritou (Levinson, 2010), polypeptidy P7 a P9, které se váží na genom a tvoří vnitřní, helikoidální kapsidu, a enzymy reverzní transkriptázu, integrázu a další (Bednář *et al.*, 1996).

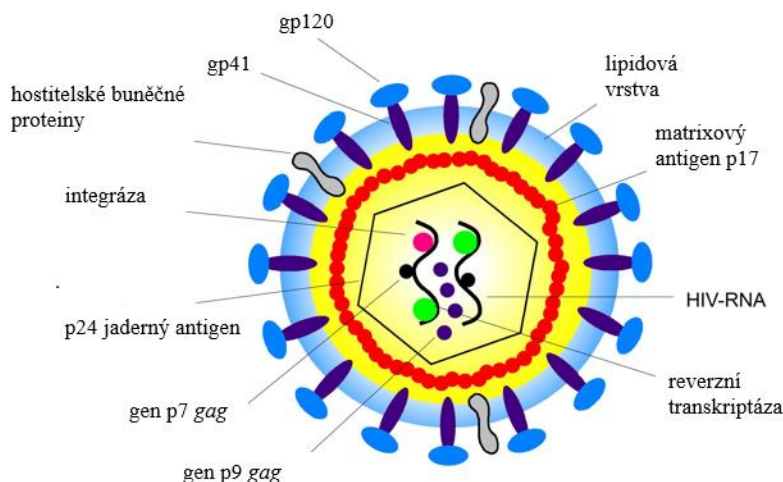


## HIV-1

Obrázek 1: Schéma virového genomu – Kompletní genom HIV s hlavními geny *gag*, *pol* a *env* a přídatnými geny *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* a *nef*. Ohraničení genomu tvoří tzv. LTR (long terminal repeat). (převzato z <https://library.med.utah.edu/>)

Gen *gag* kóduje interní jaderné proteiny, z nichž nejdůležitější je protein P24. Gen *pol* kóduje několik proteinů, včetně virionové reverzní transkriptázy (protein P66), integrázy (protein P32) a proteázy (protein P12). Gen *env* kóduje gp160, prekurzorový glykoprotein, který se štěpí za vzniku dvou obalových glykoproteinů, gp120 a gp41. Jedním z nezbytných regulačních genů je gen *tat* (transactivating protein), kódující protein, který zesiluje transkripci virového genu. Gen *tat* spolu s genem *nef* (negative regulatory factor) potlačují syntézu MHC proteinů, čímž se snižuje schopnost cytotoxických T-lymfocytů (CD8+) rozpoznat a zabít buňky infikované HIV. Gen *rev* (regulator of expression of virion protein) produkuje protein, který řídí kontrolu transportu zralé virové mRNA z jadra do cytoplazmy. Gen *vif* (viral infectivity factor) inhibuje apolipoprotein B RNA-editujícího enzymu (APOBEC3G), jehož úkolem je

deaminace virových, nukleových kyselin a tím zesiluje infekčnost HIV (Levinson, 2010).



Obrázek 2: Struktura viru HIV (převzato z <https://hivbook.com/tag/structure-of-hiv-1/>)  
**Legenda:** gp41: obalový glykoprotein 41, gp120: obalový glykoprotein gp120

Připojení HIV-1 k povrchu hostitelské buňky je zprostředkováno prostřednictvím glykoproteinu (gp120) na povrchu virionu, který se váže na CD4 receptor na hostitelské buňce (Teixeira *at al.*, 2011). Receptor CD4 se nachází na povrchu T-lymfocytů, monocytů a makrofágů. Gp120 se váže na tento receptor s vysokou afinitou, a to vede k fúzi virového obalu s membránou hostitelské buňky (Bednář *et al.*, 1996). Tento komplex gp120 a CD4 interaguje s ko-receptorem na povrchu buněk, typicky s chemkinem CXCR4 nebo CCR5. Transmembránový glykoprotein gp41 zprostředkovává membránovou fúzi k úplnému vniknutí do hostitelské buňky (Teixeira *at al.*, 2011). V průběhu desintegrace kapsidových proteinů je pomocí reverzní transkriptázy přepsán genom do dvouvláknové DNA, která migruje do buněčného jádra a pomocí integrázy je začleněn do hostitelské DNA jako tzv. provirus a virový genom se tak stává trvalou součástí genetické výbavy hostitelské buňky (Bednář *et al.*, 1996). Poté může HIV přetrvávat v latentním, provirálním stavu po mnoho let v nestimulovaných buňkách (Teixeira *at al.*, 2011). Při replikaci vznikají četné mutanty, které způsobují vysokou proměnlivost genetických, antigenních a biologických vlastností viru. Povrchové glykoproteiny patří mezi ty, které se mění nejvíce, protože podléhají antigennímu driftu pod selekčním tlakem protilátek (Bednář *et al.*, 1996).



### 3.4 Terapie

Na počátku 90. let byly první HIV-1 specifické antivirové léky podávány jako monoterapie. Později se standard péče vyvinul tak, aby zahrnoval podávání kombinací antiretrovirových látek (ARV). Příchod kombinované terapie, známé jako HAART („highly active antiretroviral therapy“), pro léčbu infekce HIV-1 byl klíčový pro snížení morbidity a mortality spojené s infekcí HIV-1. Kombinovaná antiretrovirová terapie dramaticky potlačuje replikaci viru a snižuje virovou zátěž HIV-1, což vede k významné rekonstrukci imunitního systému zvýšením počtu cirkulujících CD4+ T-lymfocytů. Kombinovaná léčba s použitím 3 antiretrovirových léků je důležitá pro předcházení vývoje rezistence.

Nejvýznamnějším pokrokem v léčbě infekce HIV-1 byla léčba antivirovými léky, které mohou potlačit replikaci HIV-1. Objevení HIV-1 jako příčinného faktoru AIDS společně s pochopením replikačního cyklu, poskytlo vědcům znalosti a nástroje k objevování léků zaměřených na cílenou inhibici, se specifickými farmakologickými činidly (Arts *et* Hazuda, 2012). Od objevu viru HIV bylo schváleno již 26 sloučenin působících proti viru HIV (Wang *et al.*, 2015). Tyto léky jsou rozděleny do šesti odlišných tříd na základě molekulárního mechanismu a profilu rezistence: (1) inhibitory reverzní transkriptázy analogových nukleosidů, (2) ne-nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, (3) inhibitory integrázy, (4) inhibitory proteázy, (5) inhibitory fúze a (6) antagonisté koreceptoru.

Na počátku 90. let byly první HIV-1 specifické antivirové léky podávány jako monoterapie. Později se standard péče vyvinul tak, aby zahrnoval podávání kombinací antiretrovirových látek (ARV). Příchod kombinované terapie, známé jako HAART („highly active antiretroviral therapy“), pro léčbu infekce HIV-1 byl klíčový pro snížení morbidity a mortality spojené s infekcí HIV-1. Kombinovaná antiretrovirová terapie dramaticky potlačuje replikaci viru a snižuje virovou zátěž HIV-1, což vede k významné rekonstrukci imunitního systému zvýšením počtu cirkulujících CD4+ T-lymfocytů. Kombinovaná léčba s použitím 3 antiretrovirových léků je důležitá pro předcházení vývoje rezistence.

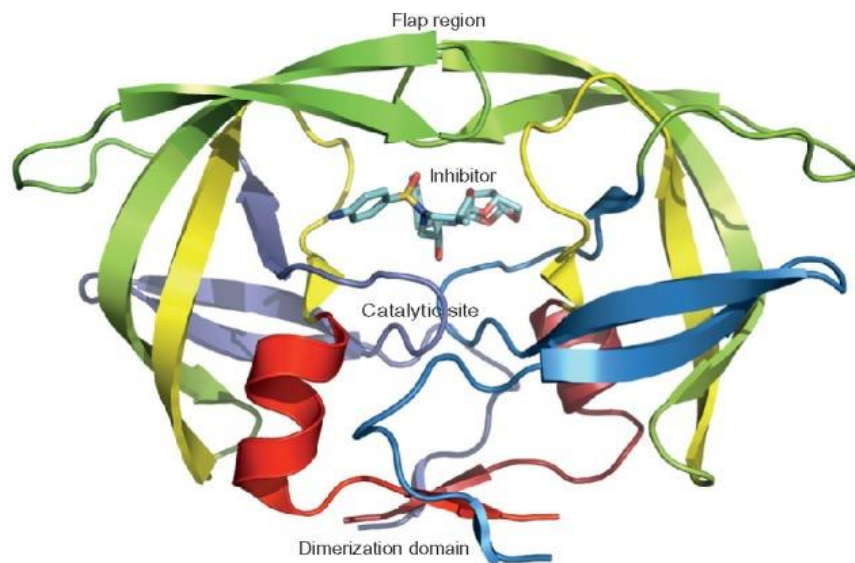
V klinickém používání je několik inhibitorů reverzní transkriptázy HIV-1. Tyto preparáty lze rozdělit na nukleosidové a non-nukleosidové inhibitory.

Nukleosid/nukleotid inhibitory reverzní transkriptázy byly první třídou schválených léků. Prostřednictvím virové reverzní transkriptázy je jednovláknová RNA

převědena do dvoušroubovicové DNA. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy po zabudování do řetězce DNA brání připojení dalších nukleosidů a ukončují jeho syntézu. Tyto inhibitory jsou podávány jako prekurzory, které vyžadují vstup do hostitelské buňky a fosforylaci buněčnými kinázami předtím, než nastane antivirový účinek. Nedostatek 3' hydroxylové skupiny na cukerné (2'-deoxyribosilové) skupině inhibitoru brání tvorbě 3'-5'-fosfodiesterové vazby, což vede k ukončení rostoucího virového řetězce DNA. Jako první nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy byl použit zidovudin. V současnosti jsou používány další nukleosidové inhibitory např. zalcitabin, lamivudin a didanosine.

Non-nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy představují chemicky rozmanité polycyklické sloučeniny, které se váží přímo na reverzní transkriptázu, omezují její mobilitu, a tak znemožňují její fungování. Z non-nukleosidových inhibitorů se používají nevirapin a efavirenz.

Inhibitory HIV proteináz je jednou z nejdůležitějších složek v kombinované terapii. Terapie založená na inhibitorech, v předem stanovených kombinacích, vrátila nižší úroveň rezistence ve srovnání s terapií založenou na inhibitorech ne-nukleosidové reverzní transkriptázy. Nicméně, potřeba celoživotní léčby a časté spojení vedlejších účinků inhibitorů HIV proteináz, vážně ubližují pacientům, což je jedna z překážek v léčbě HIV. V životním cyklu viru HIV je proteináza důležitá pro virovou mutaci. HIV proteináza je homodimerní aspartyl proteináza a každý monomer je složen z 99 aminokyselinových zbytků a kyseliny asparagové v poloze 25. Proteináza HIV-1 štěpí polyprotein gag/pol mezi aminokyselinami na pozicích 167 (phe) a 168 (pro). Následuje štěpení polyproteinů gag na proteiny p24, p17, a p7. Polyprotein Pol se nejprve odštěpí od polyproteinů gag/pol, a poté se štěpí na proteázu, reverzní transkriptázu, RNázu H a integrázu. Aktivní místo není zcela odkryté a je pokryto dvěma pružnými  $\beta$ -vlásečnými klapkami. Aktivita enzymu HIV-1 proteázy může být inhibována blokováním aktivního místa proteázy (Arts *et* Hazuda, 2012; Krejsek *et* Kopecký, 2004). Inhibitory virových proteináz napodobují aminokyselinové sekvence virového peptidu v místě působení virové proteinázy. Nejsou však účinkem virových proteináz rozložitelné a po navázání na virovou proteinázu blokují i její funkční aktivitu. Aplikací kombinace dvou inhibitorů virové transkriptázy a inhibitoru virové proteinázy je možné dosáhnout tak výrazné omezení replikace viru HIV-1, že počet molekul virové RNA v periferní krvi klesá pod detekční limity (Lv *et al.*, 2015).



Obrázek 3: Struktura HIV-1 proteázy v komplexu s inhibítorom (převzato z Lv et al., 2015)

V současné době existující schválené inhibitory: Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Lopinavir, Amprenavir, Fosamprenavir, Atazanavir, Tipranavir a Darunavir (Lv *et al.*, 2015).

Léčba kterýmkoliv z těchto činidel často vede ke vzniku kmenů HIV-1 se sníženou citlivostí na tyto léky. Rezistence na tyto inhibitory je zprostředkována dvěma mechanismy: ATP-dependentní pyrofosforolýzou a zvýšeným rozlišením mezi nativním deoxyribonukleotidovým substrátem a inhibítorom (Krejsek *et Kopecký*, 2004).

Bohužel většina inhibitorů je doprovázena vedlejšími účinky při dlouhodobé léčbě. Nejběžnějšími vedlejšími účinky jsou metabolické syndromy, jako je dyslipidémie, inzulínová rezistence, lipodystrofie/lipoatrofie, kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění. Hlavní snahou o vývoj inhibitorů je modifikovat dostupné inhibitory HIV proteázy. Stanovení potenciálních toxických nebo benigních chemických skupin inhibitorů HIV proteázy, pomáhá při navrhování novějších inhibitorů (Lv *et al.*, 2015).

### 3.5 Mutace delta 32

Cystein-cysteinový chemkinový receptor 5 (CCR5) patří do velké skupiny chemkinových receptorů, které jsou exprimovány na povrchu lymfocytů a jiných buněčných typů, kde se podílejí na signalizaci a koordinaci imunitních odpovědí (Lopalco, 2010).

Jsou známy různé mutace genu CCR5, které vedou k poškození exprimovaného receptoru. Jednou z mutantních forem genu je CCR5-delta32, která je výsledkem delece určité sekvence 32 páru bází (Lamb, 2003). Tato delece způsobí, že vzniká proteinový řetězec receptoru CCR5, který zůstává v cytoplazmě a není exportován na povrch leukocytů (Krejsek *et* Kopecký, 2004). Tato mutantní forma genu vede k poškození receptoru tak, že již není funkční. Nicméně tato mutace může být výhodná pro ty, kteří ji nesou. V počáteční fázi infikování, vstupuje virus HIV-1 do buňky právě prostřednictvím CCR5 receptorů. U lidí s receptory, které nesou mutaci CCR5-delta32, je vstup HIV-1 tímto způsobem zablokován, což poskytuje imunitu pro homozygotní nosiče a zpomaluje vývoj onemocnění u heterozygotních nosičů (Lamb, 2003). Delece 32 byla prokázána pouze v bílé populaci a v homozygotní formě se vyskytuje zhruba u 1 % lidí (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

### **3.6 Berlínský pacient**

Timothy Ray Brown, neboli Berlínský pacient, byl prvním člověkem, který byl z infekce HIV-1 vyléčen. Timothyho byla diagnostikována infekce virem HIV během studia v Berlíně v roce 1995. Začal užívat nízké dávky zidovudinu a poté inhibitory proteáz. Po 10 letech se začal cítit velmi vyčerpaně a po následném vyšetření mu byla diagnostikována anémie. Po následné transfuzi červených krvinek byl poslán na vyšetření k onkologovi, který provedl biopsii kostní dřeně. Poté bylo zjištěno, že Timothy trpí akutní myeloidní leukémií a je potřeba transplantace kmenových buněk. Ošetřujícího lékaře napadlo hledat dárce, který by měl mutaci delta32 na receptoru C-CCR5, která by Timothyho učinila imunním vůči HIV. V den transplantace přestal užívat léky proti HIV a po třech měsících se virus HIV v jeho krvi již nenacházel. (Brown, 2015)

### **3.7 Vakcinace**

V roce 1983, kdy byl virus HIV-1 izolován a potvrzen jako příčina syndromu získané imunodeficiency (AIDS), převažoval optimismus při vývoji vakcíny proti HIV-1. Riziko integrace provirální DNA v hostitelském chromozomu zakazovalo tradiční přístupy použití živých atenuovaných nebo zcela inaktivovaných virů při vývoji vakcíny proti HIV. S novými technologiemi rekombinantní DNA a rychlým pokrokem v molekulární biologii se dva produkty gp120 objevily jako potenciální kandidáti na studii (Schin, 2016). Vývoj bezpečné a účinné vakcíny proti viru HIV-1 je kriticky

důležitou globální prioritou v oblasti zdravotnictví. Během 25 let bylo již více než 60 milionů lidí na celém světě nakaženo virem HIV-1, většinou v rozvojevém světě a téměř polovina těchto osob zemřela. Vývoj bezpečné a účinné vakcíny by byl nepochybně nejlepším řešením pro konečnou kontrolu celosvětové pandemie, ale bohužel úsilí o vývoj vakcíny proti HIV-1 dosud nebylo úspěšné. Cílem vakcíny proti HIV-1 by bylo zabránit infekci nebo snížit virovou zátěž a klinickou progresi po infekci. Ideální vakcína by měla zcela zablokovat infekci a poskytnout imunitu (Barouch, 2008). Vakcína by měla působit na všechny genotypy viru HIV-1, měla by odrazet rychlou proměnlivost jednotlivých kmenů viru HIV-1 a měla by být dostupná pro všechny ohrožené osoby. Problémy doprovázející vývoj vakcíny zahrnují genetickou proměnlivost jednotlivých kmenů HIV-1 i v čase, použití aktivní imunizaci z důvodu bezpečnosti, a především absence jiného zvířecího experimentálního modelu, než jsou primáti.

Terčem pro neutralizační protilátky jsou obalové glykoproteiny gp120 a obalový polyprotein gp160. Problémem tvorby neutralizačních protilátek proti gp120 je vysoká glykosylace tohoto glykoproteinu (Krejsek *et* Kopecký, 2004). Dosud byly dokončeny pouze dvě koncepce očkovacích látek. První koncepce vakcíny použila monomerní kandidáty na vakcínu proti obalovému proteinu HIV-1 gp120 (Env). Cílem této strategie bylo vyvolat Env-specifické humorální imunitní odpovědi. Druhá koncepce vakcíny zahrnovala replikačně nekompetentní rekombinantní adenovirový sérotypové vektory 5 exprimující HIV-1 *gag*, *pol* a *nef*. Ve dvou studiích účinnosti fáze 3 podporovaných biotechnologickou společností VaxGen, kandidáti na vakcíny neposkytly žádnou detekovatelnou ochrannou účinnost, což naznačuje, že tyto typově specifické protilátkové odpovědi nebyly dostatečné pro ochranu před infekcí HIV-1 u lidí. V současnosti je strategie vývoje vakcíny proti viru HIV-1 zaměřena na tvorbu preventivní vakcíny na základě široce neutralizujících protilátek (Barouch, 2008).

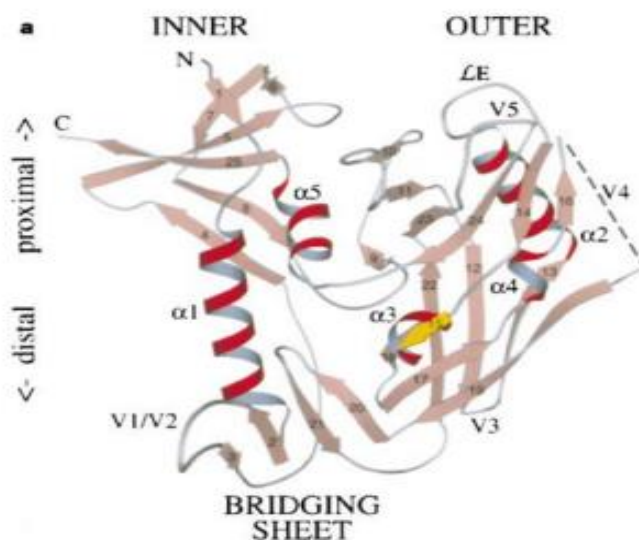
### **3.8 GP120 – význam glykosylace**

Průnik viru HIV-1 do hostitelské buňky závisí na obalovém glykoproteinu (Env), který se skládá ze dvou nekovalentně vázaných podjednotek, vnějšího gp120 a transmembránového gp41 (Raska *et al.*, 2010). Glykoprotein gp120, který je tvořen 484-543 aminokyselinami, lze rozdělit na pět evolučně konzervovaných (C1-C5) a pět variabilních (V1-V5) proteinových domén (Wyatt *et* Sodroski, 1998). Konzervovaná

doména je zodpovědná za stavbu jádra gp120, zatímco variabilní doména vyčnívá ven a vytváří smyčky. Variabilní i konzervované oblasti gp120 jsou silně glykosylovány (Leonard *et al.*, 1990). Molekula gp120 je tvořena vnitřní a vnější doménou. Vnitřní doména interaguje s gp41 a je zodpovědná za vytváření trimerních obalových struktur. Vnější doména se vyznačuje silnou glykosylací (Rizzuto *et al.*, 1998). Komplexní struktura gp120 je tvořena z 5 helixů, 25  $\beta$ -vláken a 10 smyček, označených jako LA-LE a V1-V5 (Kwong *et al.*, 1998).

Oligosacharidové složky gp120 byly popsány brzy po objevu HIV-1, ale jejich význam v životním cyklu viru a jeho vyhýbání se imunitnímu systému byl prozkoumán až později. Obalové glykoproteiny se podílí na vazbě viru na hostitelský receptor, což je počáteční krok v buněčném vstupu. Primárním buněčným receptorem pro HIV-1 je povrchový glykoprotein CD4, který řadíme do imunoglobulinové super-rodiny. Vazba CD4 na gp120 indukuje významné konformační změny, které vedou k vytvoření třetí domény tzv. „bridging sheet“. Tato doména se skládá ze dvou párů antiparalelních listů, které spojují vnitřní a vnější domény a hrají hlavní roli při interakci s virovými komponenty (Teixeira *et al.*, 2011). CD4 přichází do styku s molekulou gp120, a to v oblasti mezi vnější, vnitřní doménou a „bridging sheet“ (Kwong *et al.*, 1998). Výsledkem je, že vazba na CD4 indukuje nejen domény přemostujících listů, ale také zvyšuje expozici této oblasti spolu s V3 smyčkou k membráně cílových buněk, kde je může zachytit ko-receptor (Teixeira *et al.*, 2011).

Jednou z nejdůležitějších posttranslačních modifikací proteinů je glykosylace. Glykosylace je důležitá jak ve strukturní organizaci, tak i v rozpoznávacích a signalizačních procesech (An *et al.*, 2009). Glykany částečně chrání Env před rozpoznáním hostitelského imunitního systému a také je nezbytný pro správné skládání gp120 a také pro virovou infekčnost. Předchozí pokusy o změnu glykosylačních míst v *Env* typicky zahrnovaly mutaci glykosylovaných asparaginových zbytků na strukturně podobné glutaminy nebo na alaniny. Takové mutace na různých místech glykosylace výrazně snižují virovou infekčnost a vedou k významnému snížení vazby na neutralizační i ne-neutralizující protilátky (Rathore *et al.*, 2017).



Obrázek 4: Struktura glykoproteinu gp120 (převzato z Kwong et al., 1998)

V živých systémech jsou dva základní typy glykosylace: N-glykosylace a O-glykosylace (An *et al.*, 2009). Podjednotka gp120 proteinu s obalem HIV-1 (Env) je silně glykosylována v přibližně 25 glykosylačních místech, z nichž ~ 7 je umístěno v proměnných smyčkách V1 / V2 a V3 a další v zbývajících jádrové oblasti gp120 (Rathore *et al.*, 2017). Zhruba polovinu molekulové hmotnosti glykoproteinu gp120 tvoří N-vázané glykany a malý obsah O-vázaných glykanů (Zhu *et al.*, 2000). Potenciální úlohou N-vázaných glykanů HIV-1 Env je usnadnit akumulaci tichých mutací v oblasti povrchu gp120, která je uzavřena glykany. Glykanové pole tudíž tvoří neimunogenní plášť chránící základní povrch proteinu (Rathore *et al.*, 2017). Jádro N-glykanů se skládá ze dvou molekul acetylglukosaminu, tří molekul manózy a variabilního počtu přídatných glykanů (manóza, fukóza, galaktóza, kyselina sialová, acetylglukosamin) (Zhu *et al.*, 2000). V případě N-glykanů je sacharidová složka vázána na asparaginové reziduum v aminokyselinovém motivu Asn-X-Ser/Thr, přičemž X může být libovolná aminokyselina kromě prolinu (An *et al.*, 2009). Potenciální N-glykosylační místa (PNGS) představují právě tyto aminokyselinové motivy. Obsazenost N-glykosylačních motivů není vždy kompletní, proto jsou často nazývány jako potenciální N-glykosylační místa. PNGS jsou kódovány virovým genomem. Na HIV-1 Env trimeru se nachází nejméně 24 N-glykosylačních míst, která jsou variabilně obsazena cukry (Raska *et al.*, 2010, Go *et al.*, 2008). Distribuce PNGS mezi HIV-1

izoláty není náhodná. Zatímco jsou některé PGNS jsou vysoce variabilní, jiné můžou být konzervovaná (Leonard *et al.*, 1990).

O-vázané glykany mají proměnlivý výskyt na rozdíl od N-vázaných glykanů, které mají přesně určené místo výskytu. Oproti N-glykanům se připojují postupně tzn. jeden za druhým. O-glykany vznikají primárně v Golgiho aparátu (Julenius *et al.*, 2005).

Pro všechny glykoproteiny, včetně Env, jejich struktury, složení a jejich heterogenita připojených glykanů, závisí na buněčném systému použitým pro jejich expresi. Tato skutečnost se ne vždy odráží na produkci rekombinantních antigenů HIV-1 gp120 při imunizaci nebo detekci protilátek. Pro úspěšnou tvorbu rekombinantních antigenů je důležitá volba buněčné linie, která slouží k expresi proteinu. Mezi tyto linie patří buňky vaječníků čínského křečka (CHO), lidské embryonální ledvinové buňky (293T) a buňky hmyzu (Sf9). Ty se běžně používají spíše než T-lymfocyty a monocyty (Raska *et al.*, 2010).

### **3.9 Možnosti produkce a purifikace rekombinantních proteinů za využití savčích buněčných linií a chromatografických metod**

Rekombinantní proteiny představují proteiny kódované rekombinantní DNA, která je schopna exprese v hostitelském organismu. Od udělení Nobelovy ceny v roce 1980 za studium rekombinantní DNA jsou rekombinantní proteiny dodnes široce využívány (Krupka, 2011). Byly zaznamenány různé oblasti využití a pokroky právě díky možnosti produkce velkého množství rekombinantních proteinů díky rostoucí dostupnosti manipulovaných organismů.

Nutnou podmínkou pro adekvátní produkci rekombinantních proteinů je exprese genu (Palomares *et al.*, 2004). Větší proteiny (kolem 100 kDa) jsou lépe exprimovány eukaryotickými liniemi, zatímco ty menší jsou lépe exprimovány prokaryotickým systémem (Demain *et Vaishnav*, 2009). Nicméně se může stát, že se exprese může být ztracena kvůli změně rekombinantního genu nebo jeho vymizení. Plazmidy jsou extrachromozomální samo-reprodukující se cytoplazmatické DNA elementy, které můžeme najít jak u prokaryot, tak u eukaryot. Byly používány jako molekulární prostředky od počátku genového inženýrství. Plazmidy ukládají hostiteli metabolickou zátěž, protože využívají zdroje hostitelské buňky pro replikaci, expresi genů kódovaných plazmidem a produkci rekombinantního proteinu. Takové metabolické



zatížení často vede k poklesu rychlosti růstu buněk nesoucí plazmid. Ztráta plazmidu je hlavní příčinou snížené produktivity rekombinantních proteinů v buňkách.

Důležitějším procesem pro produkci rekombinantních proteinů viru HIV-1 je N-vázaná glykosylace. Glykosylace v mnoha případech určuje stabilitu proteinu, rozpustnost, antigenitu, složení, lokalizaci a biologickou aktivitu (Palomares *et al.*, 2004). Pro proteiny, které vyžadují glykosylaci, jsou nejvhodnější savčí buňky nebo bakulovirový systém (Demain *et Vaishnav*, 2009). Neglykosylované proteiny se obvykle vyrábějí v bakterii *Escherichia coli* nebo v kvasinkách. N-glykosylované proteiny se obvykle vyrábějí v savčích buňkách, které napodobují lidskou glykosylaci (Terpe, 2006).

Prvním krokem k produkci rekombinantních proteinů je získání požadované klonované DNA, poté je protein ve zvoleném expresním systému amplifikován. Existuje široká škála proteinových expresních systémů. Proteiny mohou být exprimovány v bakteriích, kvasinkách, v savčích, rostlinných a hmyzích buňkách. Kvalita bílkovin, funkčnost, rychlost výroby a výtěžek jsou nejdůležitějšími faktory, které je třeba vzít v úvahu při výběru správného systému pro produkci rekombinantních proteinů (Walsh, 2003).

Nejlevnější, nejjednodušší a nejrychlejší exprese proteinů může být provedena v bakterii *E. coli* (Palomares *et al.*, 2004). Tato bakterie je jedním z nejpoužívanějších hostitelů pro produkci heterologních proteinů (Terpe, 2006). Mezi výhody patří rychlý růst, rychlá exprese, snadnost kultivace a vysoké výtěžky produktu (Swartz, 2001). Expresní systém *E. coli* je v první řadě vynikající pro funkční expresi neglykosylovaných proteinů (Jenkins *et Cruling*, 1994).

Další užitečné bakteriální systémy jsou gram-pozitivní bacily. Jsou převážně preferovány pro homologní expresi enzymů, jako jsou proteázy a amylázy. Nejčastěji používané druhy jsou *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. brevis* a *B. licheniformis* (He *et al.*, 1991).

Také kvasinky, jednobuněčné eukaryotické houbové organismy, jsou často používány k produkci rekombinantních proteinů. Jsou geneticky dobře charakterizovány a je známo, že provádějí mnoho posttranslačních modifikací. Dva nejvíce používané kvasinkové kmeny jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris* (Gellisen *et al.*, 1992). Filamentózní houby jsou atraktivní hostitelé kvůli své schopnosti vylučovat vysoké množství bioaktivních proteinů s posttranslačním zpracováním jako je například glykosylace (Ward *et al.*, 2001).

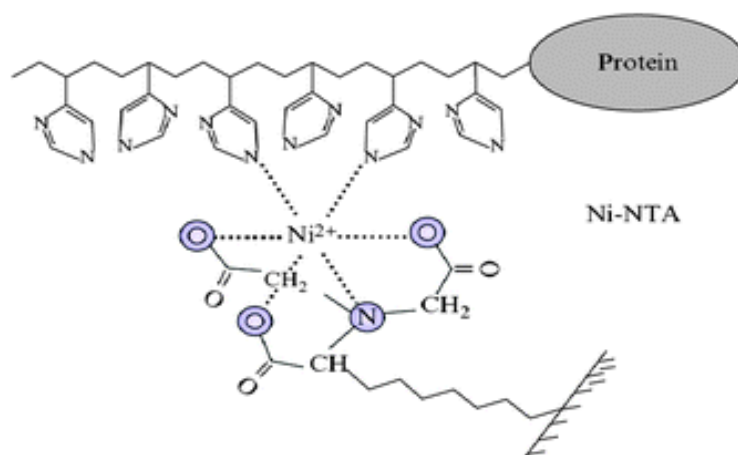
Hmyzí buňky jsou schopny provést komplexnější posttranslační modifikace, než je možné dosáhnout u hub. Mají také nejlepší zařízení pro skládání savčích proteinů a jsou proto vhodné pro jejich přípravu (Agathos, 1991). Nejčastějším systémem používaným pro expresi rekombinantních proteinů je bakulovirální expresní systém. Infikovaná hmyzí buňka nabízí výhody jako například fosforylaci, N- a O-glykosylaci, správné štěpení signálního peptidu, vhodné proteolytické zpracování nebo acetylaci (Knight, 1991).

Savčí expresní systémy se často používají pro produkci proteinů vyžadujících posttranslační modifikace (Swartz, 2001). Savčí buněčné kultury jsou obzvláště užitečné, protože proteiny jsou vyrobeny ve správně složené glykosylované formě, čímž se eliminuje nutnost jejich renaturace, ale také díky své schopnosti přidávat řetězce mastných kyselin (Demain *et Vaishnav*). Avšak tyto expresní systémy mají i některé nevýhody, a to nízkou sekreci rekombinantních proteinů, finanční nákladnost a potenciální kontaminaci virem (Bisbee, 1993). Pro výrobu rekombinantních proteinů tímto způsobem se používají dvě hlavní formy buněčných kultur, a to buď suspenzní anebo adherentní (Wurm *et Bernard*, 1999). Klasickým způsobem produkce rekombinantních proteinů v savčích buňkách je transfekce a poté izolace buněčných linií, které stabilně exprimují požadovaný gen (Pham *et al.*, 2006). Farmaceutické společnosti rutinně vytvářejí rekombinantní buněčné linie, které konstitutivně produkují rekombinantní proteiny s prodlouženými kultivačními časy. Tato stabilní exprese genu se dosahuje uložením rekombinantního genu do hostitelského genomu. Nicméně, někdy jsou upřednostňovány rychlejší přístupy k produkci rekombinantních proteinů, když je třeba rychle vyhodnotit mnoho kandidátních proteinů. Ke splnění této potřeby je vhodná přechodná exprese genu (transient gene expression=TGE). Na rozdíl od stabilní genové exprese, TGE zahrnuje krátkodobou produkci proteinů obvykle už 10 dní po transfekci za nepřítomnosti genetické selekce plazmidové DNA. Různé expresní vektory byly navrženy tak, aby přenášely cizí geny do savčích buněk. Nejčastěji používanou buněčnou linií pro přechodnou transfekci ve velkém měřítku je linie HEK 293T (Baldi *et al.*, 2007). Pro zvětšení výtěžku byly vyvinuty suspenzní HEK-293F. Tyto buňky rostou jako malé agregáty v suspenzi (Wurm *et Bernard*, 1999).

K purifikaci rekombinantních proteinů slouží afinitní chromatografie, která je založena na vysoce specifické interakci mezi dvěma molekulami, například mezi aminokyselinou a kovem. Dalším příkladem takové interakce může být reakce mezi enzymy a substráty, receptory a ligandy nebo protilátky a antigenu. Tyto interakce jsou

typicky reverzibilní, se používají k čištění přidáním jedné z interakčních molekul, označované jako afinitní ligand, na pevnou matici pro vytvoření stacionární fáze, zatímco cílová molekula je v mobilní fázi. Zachycovací krok je obecně následován promytím a elucí, což vede k získání vysoce čistého proteinu. Další použití afinitní chromatografie zahrnuje schopnost koncentrovat látky přítomné v nízké koncentraci a schopnost oddělit proteiny na základě jejich biologické funkce (Urh *et al.*, 2009).

Široce používanou metodou je imobilizovaná kovově-afinitní chromatografie (IMAC), která slouží zejména k čištění rekombinantních proteinů obsahujících krátkou afinitní kotvu (tag) složenou ze zbytků histidinu. Tato metoda je založena na interakcích mezi iontem přechodného kovu ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) imobilizovanými na matici a specifických postranních řetězců aminokyselin. Histidin je aminokyselina, která vykazuje nejsilnější interakci s imobilizovanými maticemi kovových iontů, protože donorové elektrony na imidazolovém kruhu histidinu snadno tvoří koordinační vazby s imobilizovaným přechodným kovem. Po promytí maticového materiálu mohou být peptidy snadno eluovány buď úpravou pH kolonového pufru, nebo přidáním volného imidazolu do kolonového pufru. Čištění proteinů značených afinitním polyhistidinem bylo usnadněno vývojem komerčně dostupných matic, a to nikl-nitriltriocetové kyseliny ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA) a kobalt-karboxymethylasparátu ( $\text{Co}^{2+}$ -CMA), které jsou připojeny k pevné nosné pryskyřici (Bornhorst *et Falke*, 2000).



Obrázek 5: Schéma vazby histidinové značky na Ni-NTA (převzato z <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/nj/c2nj40558j>)

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Biologický materiál

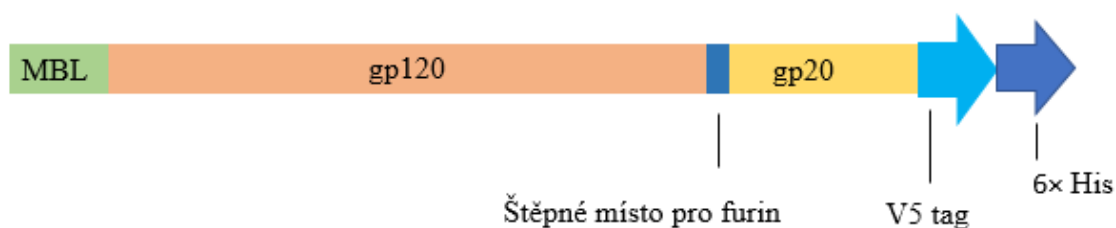
Pro expresi rekombinantních proteinů byly použity savčí expresní buňky linie **HEK 293 FreeStyle™ Expression System (ECACC 85120602, THERMO FISHER)**.

Pro kotransfekci byly použity dva plazmidy:

**Plazmid FURIN (NM\_001289823) cDNA ORF clone (cat.no: OHu16791D) pcDNA3.1+/C-(K)DYK.** Tento plazmid kóduje ORF (open reading frame) pro proteinázu furin. Po transfekci tohoto plazmidu do buněk je ORF transkribován a translatován a buňky následně produkují enzym furin intracelulárně.

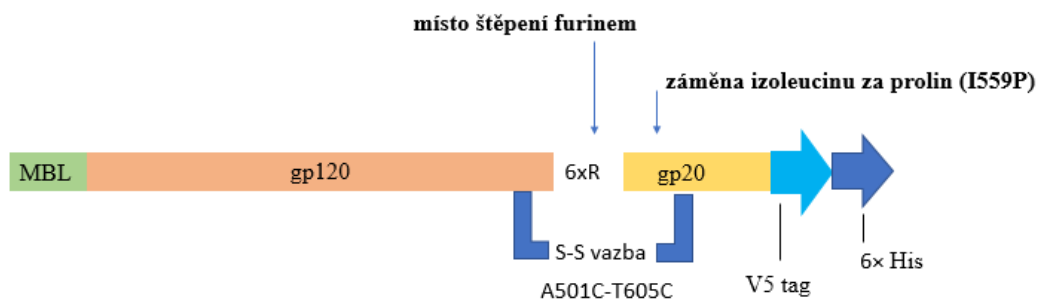
Plazmid **pcDNA3.1+C-6His** obsahující CMV promotor, který zajišťuje rezistenci na gentamicin (G418), a nosící konstrukt **env.MBL.gp140.SOSIP/clade C**. DNA vložená v plazmidu byla získána sekvenováním vzorku pacienta (číslo pacienta: 703010159) v různých časech sérokonverze, a to na počátku onemocnění (TF), po prvním roce (Y1) a po třech letech (Y3).

**Sérum pacienta:** Vzorky séra byly získány od jedinců infikovaných HIV-1 podtypem C, kteří nedostávali antiretrovirovou terapii v regionu Mbeya v jihozápadní Tanzanii.



Obrázek 6: Schéma plazmidu pcDNA3.1 env.MBL.gp140.SOSIP/C (TF)

**Legenda:** MBL-sekreční signál pro uvolnění proteinu z buňky, gp140.SOSIP – antigen napodobující nativní Env protein, obsahující sekvenci gp120 a zkrácenou sekvenci gp41 (gp20), tato vazba je stabilizována přidáním aminokyselin v okolí přechodu, které tvoří disulfidické můstky, V5 tag a 6xHIS – sloužící pro následnou detekci proteinu pomocí afinitní chromatografie.



Obrázek 7: Schéma gp140.SOSIP štěpeného proteinázou furinem  
 Legenda: MBL-sekreční signál pro uvolnění proteinu z buňky, 6xR= šest po sobě následujících argininů, S-S vazba= disulfidická vazba, A501C= záměna A za C v pozici 501, T605C= záměna T za C v pozici 605, I559P= záměna izoleucinu za prolin v pozici 559

## 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

### Použité chemikálie

- 2-merkaptoethanol (LACH-NER)
- antibiotikum ampicilin c = 100 mg/ml (SERVA)
- dodecylsírán sodný – SDS (MERCK)
- ethanol 96% (VWR)
- Fectin293 reagent (INVITROGEN)
- furin (NEW ENGLAND BIOLABS)
- glycerol (SIGMA ALDRICH)
- HEK293F FreeStyle Expression Medium (GIBCO)
- HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- hovězí sérový albumin – BSA (NEB)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (LACH-NER)
- hydroxid sodný (PENTA)
- chlorid draselný (LACH-NER)
- chlorid sodný (LACH-NER)
- chlorid vápenatý (LACH-NER)
- kyselina chlorovodíková (LACH-NER)
- kyselina octová 99,8% (LACH-NER)
- methanol (SIGMA ALDRICH)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (SERVA)
- n-butanol (LACH-NER)
- optiMEM Reduced Serum Medium (GIBCO)
- PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup>, low endotoxin (BIOCHROM GMBH)
- peroxodisírán amonný (SERVA)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

- Tris (OMNIPUR)
- Tween-20 0,05% (CALBIOCHEM)
- ustalovač Manul Fixing Bath G354 (AGFA)
- vývojka Developer G150 (AGFA)

#### **Použité soupravy**

- kit: QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
- kit: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- kit: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

#### **Použité roztoky**

- 10% roztok peroxidisíranu amonného – APS (1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + 10 ml ddH<sub>2</sub>O)
- 30% roztok akrylamid/bisakrylamidu (SERVA)
- 4× Tris pufr pH 6,8 (15,125 g Tris + 1 g SDS + 150 ml ddH<sub>2</sub>O + upravit pH na 6,8)
- 4× Tris pufr pH 8,8 (45,5 g Tris + 1 g SDS + 150 ml ddH<sub>2</sub>O + upravit pH na 8,8)
- barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue (45% methanol + 10% kyselina octová + 0,1% Coomassie Brilliant Blue)
- blokovací roztok SUPERBLOK (1% roztok BSA + zároveň 0,05% roztok Tweenu v 1× PBS)
- fixační roztok (750 ml izopropanolu + 300 ml kyselina octová + voda do 3 l)
- odbarvovací roztok (5% methanol + 7,5% kyselina octová)
- protilátka anti-pentaHIS konjugovaná s HRP – ředění 1:10 000 (QIAGEN)
- pufr „adapting“ (500mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0 + 1,5M NaCl + 100mM imidazol + 0,5% Tween 20)
- pufr „elution“ (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0 + 300mM NaCl + 200mM imidazol + 0,05% Tween 20)
- pufr „wash“ (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0 + 300mM NaCl + 10mM imidazol + 0,05% Tween 20)
- pufr, nanášecí neredukující pro proteiny 2× (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol + 2,3 g SDS + 37,5 ml ddH<sub>2</sub>O + upravit pH na 6,8)
- pufr, nanášecí redukující pro proteiny 2× (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol + 2,3 g SDS + 5 ml merkptoethanol + 37,5 ml ddH<sub>2</sub>O + upravit pH na 6,8)
- pufr, promývací PBS (240 g NaCl + 6 KCl + 40 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O + 6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + upravit pH na 7,4)
- Towbinův pufr (9,09 g Tris + 43,2 g glycin + 600 ml methanol)
- zásobní roztok SDS 5× (3 l ddH<sub>2</sub>O + 45,3 g SDS + 2,6 g glycin + 15 g SDS)

### **4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

- automatické mikropipety Finnpiquette 0,2–2; 2–20; 20–200; 100–1000 μl (THERMO SCIENTIFIC)
- automatické mikropipety 1–5 ml (THERMO SCIENTIFIC)
- blotovací zařízení TRANS-6 SEMIDRY TRANSFER CELL (BIO-RAD)
- centrifuga CR 312 (JOUAN)
- centrifuga MIKRO 22R (HETTICH ZENTRIFUGEN)

- elektrický zdroj pro blotovací zařízení 2197 POWER SUPPLY (LKB BROMMA)
- elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPack Basic (BIO-RAD)
- elektroforetická komora a příslušející víko s elektrodami (BIO-RAD)
- chlazený inkubátor (ELEKTROLUX)
- inkubátor s CO<sub>2</sub> MCO-15AC (SANYO CO<sub>2</sub> INCUBATOR)
- termostat BT 120 M (LABO MS)
- inverzní mikroskop DMIL (LEITZ)
- laminární box aura-VF48 (BIO AIR)
- mikrocentrifuga E-Centrifuge (WEALTEK)
- pipetor FASTPETTE (LABNET)
- sérologické pipety 25; 10; 5; 1 ml (SARSTEDT)
- termoblok block heater SBH130D (STUART)
- třepačka KS 260 basic (IKA)
- vortex MS2 Minishaker (IKA)
- PVDF membrána (BIO-RAD)
- fotografický papír CL-XPosure Film (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

#### 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

- **Příprava buněčné kultury**

Buňky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Těsně před rozmražením buněk byla dekontaminována vnější část lahvičky 70% ethanolem a poté byl celý obsah přenesen do 125ml sterilní jednorázové plastové Erlenmeyerovy baňky obsahující 30 ml předehřátého FreeStyle 293 Expression Medium. Toto médium není potřeba během transfekce měnit a umožňuje transfekci ve velkých objemech. Sterilní podmínky během práce zajišťoval laminární box. Kultivace buněčné kultury probíhala při 37 °C a udržovaném obsahu 8% CO<sub>2</sub> v termostátovém inkubátoru na orbitální třepačce, která se otáčela rychlostí 135 ot / min, dokud nenarostla do požadované hustoty (2-3 x 10<sup>6</sup> buněk/ml). Tato buněčná linie je charakteristická tím, že je suspenzní, a to znamená, že nevyžaduje přichycení k podkladu a buňky jsou volně dispergované v médiu. Při výměně média nebo pasážování je proto potřeba oddělit médium od buněk odstředěním. Následující den byl určen počet životaschopných buněk a jejich celkový počet. Optimální životaschopnost buněk pro transfekci je 100 %.

**Pasážování buněk:** buňky byly „zpasážovány“ vždy po 2-3 dnech, když buňky dosáhly hustoty 2-3 x 10<sup>6</sup> buněk/ml.

- **Určení životaschopnosti buněk**

Bylo pravidelně prováděno počítání buněk z důvodu kontroly růstu tkáňové kultury. Buňky byly barveny vitálním barvivem trypanovou modří. Z buněčné kultury byl vždy

po několika dnech odebrán vzorek o objemu 10  $\mu$ l, který byl smíchán s 10  $\mu$ l trypanové modři. Poté bylo přeneseno 10  $\mu$ l vzorku do Bürkerovy komůrky a byly spočítány živé i mrtvé buňky.

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>

Obrázek 8: Schéma Bürkerovy komůrky: Buněčná hustota byla určena ze čtverců, které jsou vyznačeny včetně jejich horních a levých označených hran.

Konečná hustota buněčné kultury byla vypočítána pomocí vzorce:

$$\frac{\text{počet živých buněk}}{\text{plocha čtverce [mm}^2\text{]} \times \text{počet čtverců} \times \text{hloubka čtverce [mm}^2\text{]} \times \text{faktor ředění}} = \text{počet živých buněk/}\mu\text{l}$$

Po dosazení počtu živých buněk ve 4 čtvercích:

$$\text{počet živých buněk} / (1 \times 4 \times 0,1 \times 0,5) = \text{počet živých buněk/}\mu\text{l}$$

- **Transfekce buněk 293F**

Transfekce je metoda, pomocí které je zavedena DNA do savčích buněk. Při přechodné transfekci se zavedená DNA nachází v buňce pouze po omezenou dobu a není integrována do genomu. Přechodně transfekovaný genetický materiál není předáván z generace na generaci a může být ztracen enviromentálními faktory, nebo zředěn během dělení buněk. Následuje pak ztráta exprese rekombinantního proteinu. Nicméně vysoké množství kopií transfekovaného materiálu vede k vysokým hladinám exprimovaného proteinu během přítomnosti v buňce. V závislosti na použitém konstruktu může být přechodně exprimovaný transgen obecně detekován 1 až 7 dnů, ale přechodně transfekované buňky se typicky sklízejí 24 až 96 hodin po transfekci.

Přechodná transfekce HEK293F ve velkém objemu vyřešila potřebu získání velkého množství rekombinantního proteinu, aniž bychom využili pracný proces stabilní transfekce. Mezi výhody exprese přechodných proteinů v savčích buňkách patří: rychlost produkce proteinů, proteiny jsou plně posttranslačně modifikované a snadná purifikace sekretovaných proteinů.



Obalový glykoprotein HIV-1 (Env)

- **Optimalizace kotransfekce eukaryotních buněk 293F s furínem**

Kotransfekce umožňuje paralelní transfekci jedné buněčné linie minimálně pomocí dvou různých samostatných molekul DNA. Furin je proteináza, působící v Golgiho aparátu, která má za následek štěpení gp140.SOSIP proteinu v místě aminokyselinové sekvence 6× R (Arg) na glykoproteiny gp120 a gp20. Buňky 293F mají ve své přirozené formě nízkou hladinu furinu, a proto je potřeba provést kotransfekci plazmidem FURIN.ORF.clone spolu s plazmidem env.gp140.SOSIP/clade C, TF, abychom zajistili celkové štěpení mezi glykoproteiny gp120 a gp20. Ke transfekci plazmidové DNA do buněčné kultury byla použita patentovaná kationtová formulace na bázi lipidů 293Fectin™.

1. Den před transfekcí bylo ověřeno, zda je hustota životaschopných buněk 80-90 %. K dispozici jsme měli 30 ml buněčné kultury o hustotě  $1 \times 10^6$  buněk/ml.
2. Transfekce byla provedena dle následující tabulky:

Kotransfekce	Poměr	Plazmid gp140.SOSIP [μg]	Plazmid furin [μg]	293Fectin™ [μl]	OptiMem® I [μl]	Objem buněčné kultury o hustotě $1 \times 10^6$ buněk/ml [ml]
1.	-	5	-	10	2× 500	10
2.	2:1	5	2,5	10	2× 500	10
3.	1:1	5	5	10	2× 500	10

**Tabulka 1: Příprava transfekčních reagensů**

3. V jedné zkumavce byl vždy smíchán plazmid TF s odpovídajícím množstvím plazmidu FURIN.ORF.clone a 500 μl OptiMemu® I a ve druhé zkumavce byl smícháno 10 μl 293Fectin™ s 500 μl OptiMemu® I.
4. Tyto reagensie se nechaly inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě.
5. Po 5 minutách byl obsah zkumavek smíchán dohromady a ponechán k inkubaci dalších 30 minut.
6. Poté byla transfekční směs přidána do buněčné kultury.
7. Transfekovaná buněčná kultura byla kultivována po dobu 3 dnů při 37 °C v inkubátoru s CO<sub>2</sub>.
8. Po 3 dnech byl 1 ml buněčné kultury centrifugován (10000 RPM/5 min/ 4 °C).

9. Vzniklý supernatant byl poté smíchán v poměru 1:1 s 2× SDS vzorkovým pufrem za redukujících i neredukujících podmínek.
10. Vzniklý buněčný lyzát byl poté rozsuspenderován v 1× PBS (500 μl) a poté smíchán s 2× SDS vzorkovým pufrem pouze za redukujících podmínek.
11. Se vzorky byla následně provedena SDS-PAGE elektroforéza, western blot a barvení Coomassie Brilliant Blue.

- **Příprava 10% polyakrylamidového gelu**

1. Skla pro SDS-PAGE byla očištěna ddH<sub>2</sub>O a odmaštěna ethanolem a osušena.
2. Zaostrovací a dělicí polyakrylamidový gel byl připraven do skleněných kádinek podle tabulky 2.

Druh gelu	TRIS pufr pH 8,8 [ml]	TRIS pufr pH 6,8 [ml]	30% akrylamid/bisakrylamid [ml]	Voda [ml]	⊖ APS [μl]	TEMED [μl]
dělicí	3,75	-	5,0	6,25	75	15
zaostrovací	-	2,5	1,3	6,2	50	10

**Tabulka 2: Příprava 10% polyakrylamidového gelu**

3. Před nalitím gelu mezi skla bylo přidáno do roztoku činidlo APS a TEMED.
4. Jako první byla nanášena dělicí vrstva gelu do 2/3 skla. Na ní byla nanášena vrstva n-butanolu pro zarovnání gelu a poté byl gel nechán polymerizovat přibližně 30 minut.
5. Následně byla vrstva n-butanolu ze ztuhlého gelu vymyta ddH<sub>2</sub>O.
6. Dělicí gel byl nanášen až po horní okraj skla a do něj byl hned po nanášení zasunutý elektroforetický hřeben pro vytvoření 15 jamek.

- **SDS-PAGE elektroforéza**

1. Do elektroforetické aparatury byly umístěn gel, který byl zalitý 5× zředěným zásobním roztokem SDS elektroforézního pufru.
2. Do první jamky bylo nanášeno 3 μl standardu molekulových hmotností (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa)

3. Vzorky supernatantu a buněčného lyzátu byly smíchány s 2× SDS v poměru 1:1 a před nanesením byly umístěny po dobu 5 minut v termobloku.
4. Následně bylo naneseno 8 µl vzorku do každé jamky v tomto pořadí: 1. supernatant/redukční podmínky/bez proteinázy furinu, 2. supernatant/redukční podmínky/poměr DNA: furin (2:1), 3. supernatant/redukční podmínky/poměr DNA: furin (1:1), 4. buněčný lyzát/redukční podmínky/bez proteinázy furinu, 5. buněčný lyzát/redukční podmínky/poměr DNA: furin (2:1), 6. buněčný lyzát/redukční podmínky/ poměr DNA: furin (2:1).
5. Na dva gely byly vzorky supernatantu naneseny za redukujících i neredukujících podmínek a buněčný lyzát pouze za redukujících podmínek.
6. Vzorky byly separovány při konstantním napětí 150 V po dobu 1 hod a 15 min.

- **Western blotting**

1. Během probíhající elektroforézy byla PVDF membrána namočena na několik sekund v methanolu.
2. Následně byla přenesena na 5 minut do nádoby s ddH<sub>2</sub>O a ponechána 50 minut v Towbinově pufru.
3. Dva kusy filtračního papíru byly také namočeny do Towbinově pufru po dobu 50 minut.
4. Po ukončení elektroforézy byl sestaven „sendvič“, který se skládal z filtračního papíru, PVDF membrány, gelu a filtračního papíru v tomto pořadí.
5. Blotování přes membránu probíhalo při konstantním proudu 250 mA po dobu 2 hodin.
6. Když blotování skončilo, membrána byla přenesena do druhé misky, ve které se nacházelo 12 ml blokovacího roztoku SUPERBLOK + Tween 20. Membrána byla blokována před noc při 4 °C na třepačce.
7. Na druhý den bylo ke 12 ml blokovacího roztoku přidáno 1,2 µl protilátky anti-V5 konjugované s HRP (v poměru 1:10000) a inkubováno 2 hod při laboratorní teplotě.
8. Po inkubaci byla membrána promyta 3× v 0,05% roztoku Tweenu 20 v 1× PBS, vždy po dobu 20 minut na třepačce.
9. Poté byla 2× promyta v roztoku 1× PBS po dobu 30 minut na třepačce.
10. Nakonec bylo na membránu naneseno 2 ml reagentů z kitu SuperSignal West Pico Chemiluminiscenst Substrate v poměru 1:1 po dobu 5 minut.

11. Chemiluminiscenční signál byl detekován pomocí fotografického papíru, kdy byl film přiložen na membránu a uzavřen v expoziční fotokomoře a expozice probíhala v intervalech 2/5/10 minut.
12. Následně byl fotografický papír umístěn na 2-3 minuty do vývojky, poté opláchnut destilovanou vodou s 1% kyselinou octovou a následně ponořen do ustalovače na 2 min.
13. Tímto způsobem byl vytvořen snímek, na kterém byla zobrazena intenzita a umístění proužků odpovídajících proteinu štěpeného a neštěpeného furínem (viz výsledky).

- **Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue**

1. Po elektroforéze byl druhý gel přenesen do nádoby s fixačním roztokem (750 ml izopropanolu + 300 ml kyselina octová + voda do 3 l), který zafixoval proteiny na gelu, přibližně na 20 minut na třepačce.
2. Poté byl gel přenesen do nádoby obsahující barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue (45% methanol + 10% kyselina octová + 0,1% Coomassie Brilliant Blue) po dobu 60 minut na třepačce.
3. Následně gel byl přesunut do nádoby s odbarvovacím roztokem (5% methanol + 7,5% kyselina octová). Nádoba byla uložena znovu na třepačku, která byla nastavena na jemné třepání, aby se gel nepřetrhl.
4. Odbarvovací roztok se měnil do té doby, než se objevily modré zóny proteinů na průhledném pozadí gelu.
5. Na závěr byl gel vyfocen a vyhodnocen programem ImageJ. (viz výsledky)

- **Kotransfekce buněk 293F plazmidy pomocí činidla 293Fectin™**

Při této transfekci byly použity plazmidy MBL.env.gp140.SOSIP/cladeC/(TF./Y1/Y3) a plazmid kódující proteinázu furin (FURIN.ORF.clone). S buněčnou kulturou bylo potřeba opatrně zacházet, bylo nutné dodržovat sterilní podmínky a práce probíhala výhradně v laminárním boxu.

1. Den před transfekcí bylo ověřeno, zda je hustota životaschopných buněk 80-90 %. K dispozici jsme měli 3×85 ml buněčné kultury o hustotě  $1 \times 10^6$  buněk/ml.
2. Na 85 ml buněčné kultury bylo použito 50 µg plazmidové DNA (MBL-gp140.SOSIP-TF), 25 µg plazmidu FURIN.ORF.clone a 2 ml média Opti-MEM® I. Vznikla tak reakční směs č. 1.

3. 150  $\mu\text{l}$  293Fectinu<sup>TM</sup> bylo zředěno ve 2 ml média Opti-MEM® I a vznikla tak reakční směs č. 2.
4. Všechny směsi byly mírně promíchány a inkubovány odděleně 5 minut při pokojové teplotě.
5. Po inkubaci byly reakční směsi smíchány a inkubovány dalších 20 minut při pokojové teplotě, aby se mohl vytvořit komplex. Vzniklá transfekční směs byla přidána k buněčné kultuře. Transfekované buněčné kultury byly kultivovány po dobu 7 dní při teplotě 37 °C v inkubátoru s CO<sub>2</sub>, přičemž po třech dnech byl odebrán supernatant, který byl použitý pro purifikaci rekombinantních proteinů, a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium. Po dalších čtyřech dnech byl znovu odebrán supernatant, který byl také použitý k purifikaci rekombinantních proteinů.

- **Purifikace syntetizovaného proteinu pomocí afinitní chromatografie**

1. Do centrifugačních zkumavek bylo přeneseno 3× 85 ml transfekované buněčné kultury a centrifugováno 5 minut (1500 RPM).
2. Získané supernatanty byly odebrány a ke každému bylo přidáno 8,5 ml „adapting“ pufru a 200  $\mu\text{l}$  Ni-NTA agarózy. Supernatanty byly přes noc uloženy na rotátoru do chladu (4 °C).
3. Ze supernatantu byly purifikovány proteiny MBL.gp140.SOSIPve variantách TF/Y1/Y3, clade C + Furín pomocí afinitní chromatografie, díky připojenému HIS tagu na jejich konci.
4. V nádobě se supernatantem byla agaróza ponechána ve vertikální poloze 30 až 60 minut, aby se usadila na dno.
5. Supernatant bez Ni-NTA byl přenesen do čisté zkumavky.
6. Zbýlý supernatant s Ni-NTA byl přenesen na kolonku a přetečená frakce byla označena jako „flow through“.
7. Následně bylo na každou kolonu nanášeno 20ml „binding pufru“.
8. Nanášením 5× 400 $\mu\text{l}$  elučního pufru byla provedena eluce. (eluční frakce E1-E5)
9. Purifikace probíhala v kelvinátoru při teplotě 4 °C.

- **Zakoncentrování proteinu**

1. Všechny eluční frakce byly postupně přeneseny do speciálních filtračních kolonek propouštějící molekuly menší než 30 kDa.
2. Kolonky byly následně vyváženy a centrifugovány (2800 RPM, 10 min, 4 °C).

3. Poté byly kolonky promyty 4× nanesením 2 ml 1×PBS a byla provedena opětovná centrifugace.

4. Do čistých zkumavek byl přenesen protein rozpuštěný v 1×PBS.

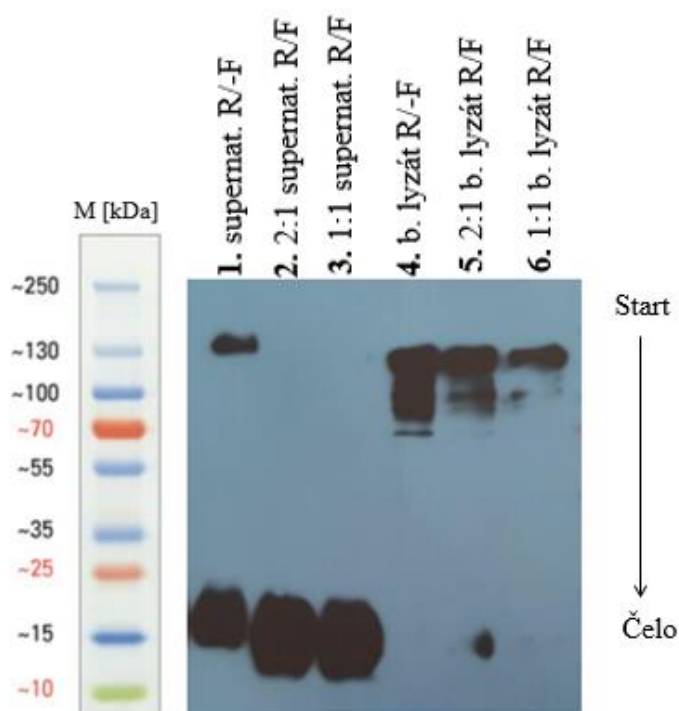
- **Detekce nově syntetizovaných proteinů (SDS-PAGE, WB)**

Zakoncentrované proteiny MBL-env.gp140.SOSIP ve variantách TF/Y1/Y3 byly detekovány metodou western blot za pomoci tzv. „séra získaného od pacienta infikovaného HIV“. Toto sérum od pacienta nakaženého HIV sloužilo jako primární protilátka. Jako sekundární protilátka vůči patientskému séru byla použita anti-IgG ( $\gamma$ -chian-HRP). Postup při SDS-PAGE a WB byl stejný, jako je popsáno v předcházející kapitole, s tím rozdílem, že na gelu určeném pro WB byly naneseny vzorky zakoncentrovaných proteinů gp140.SOSIP získané z kotransfekovaných buněk s furinem (varianty TF, Y1, Y3) a bez furinu (varianta Y3). Byly tak získány snímky zobrazující pozici a intenzitu proužků jednotlivých detekovaných proteinů gp140.SOSIP s furinem (varianty TF, Y1, Y3) a bez furinu (varianta Y3) (*viz* výsledky). Při barvení Coomassie Brilliant Blue byla ke vzorkům zakoncentrovaných proteinů přidána koncentrační řada BSA (albumin bovinního séra) s obsahem 0,125/0,25/0,5/1/2  $\mu$ g na jamku. Výstupem byl elektroforetogram (*viz* výsledky) zobrazující pozici a intenzitu proužků. Pomocí programu ImageJ byla určena koncentrace proteinů (*viz* výsledky).

## 5 Výsledky

### 5.1 Optimalizace kotransfekce eukaryotních buněk 293F

Byla provedena optimalizace kotransfekce eukaryotních buněk 293F plazmidem kódující sekretující se formu env.gp140.SOSIP proteinu (pcDNA3.1.env.MBL.gp140.SOSIP/cladeC/TF) a plazmidem kódujícím proteinázu furin (FURIN.ORFclone) v různých poměrech. Buňkou exprimovaná sekreční forma proteinu env.gp140.SOSIP byla štěpena proteinázou furinem v Golgiho aparátu na podjednotky gp120 a zkrácenou podjednotku gp41 (gp20). Následně byl v supernatantu a buněčném lyzátu kotransfekovaných buněk sledovaný poměr štěpeného a neštěpeného proteinu env.gp140.SOSIP v závislosti od množství kotransfekované DNA kódující proteinázu furin. Výsledek byl vizualizován pomocí SDS-PAGE elektroforózy a následného Western blotu, kdy byly proteiny detekovány pomocí protilátky anti-V5-HRP.



Obrázek 9: Optimalizace kotransfekce buněk 293F pomocí plazmidů gp140.SOSIP/cladeC/TF a FURIN.ORF.clone (detekce anti-V5) za denaturačních podmínek

**Legenda:** R= denaturační/redukující podmínky, (F)= kotransfekce s furinem, (-F)= kotransfekce bez furinu, M= marker molekulových hmotností

Dráha	Poměr DNA: furin	Vzorek/denaturační podmínky	Identifikace proužků	Molekulová hmotnost
1	-	supernatant/ redukující	1= gp120 + gp20+ HIS 2= gp120 3= gp20 + HIS	1= 140-145 kDa 2= 120 kDa 3= 25 kDa
2	2:1	supernatant/ redukující	1= gp120 2= gp20 + HIS	1= 120 kDa 2= 25 kDa
3	1:1	supernatant/ redukující	1= gp120 2= gp20 + HIS	1= 120 kDa 2= 25 kDa
4	-	buněčný lyzát/redukující	1= gp120 + gp20+ HIS	1= 140-145 kDa
5	2:1	buněčný lyzát/redukující	1= gp120 + gp20+ HIS 2= gp120 3= gp20 + HIS	1=140-145 kDa 2= 120 k 3= 25 kDa
6	1:1	buněčný lyzát/redukující	1= gp120 2= gp20 + HIS	1= 120 kDa 2= 25 kDa

**Tabulka 3: Vyhodnocení Western blotu gp140.SOSIP/clade C/TF štěpený proteinázou furinem, detekovaný pomocí protilátky anti-V5**

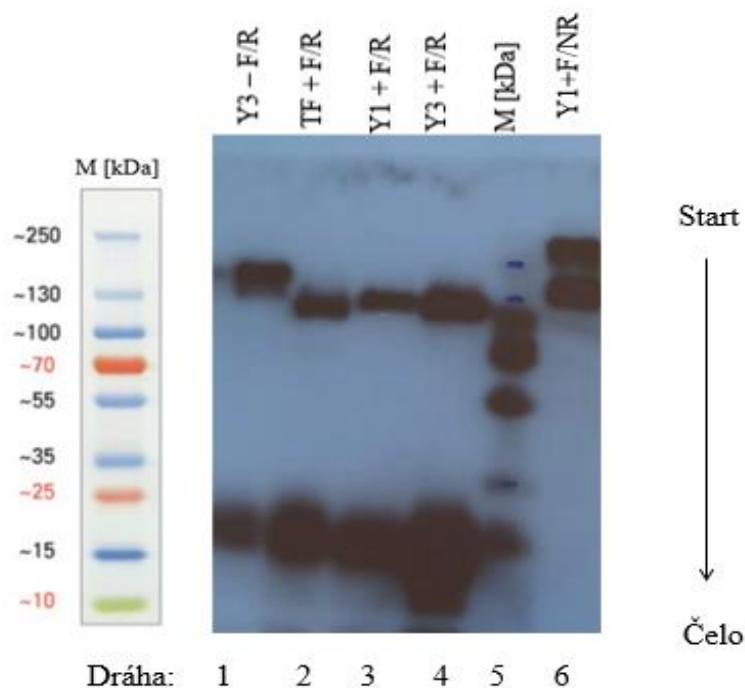
**Legenda:** NR= denaturační/neredukující podmínky, R= denaturační/redukující podmínky, supernat.= supernatant, b. lyzát= buněčný lyzát

Na elektroforetogramu bylo průkazné, že optimální poměr gp140.SOSIP: furin byl 2:1. Právě tento poměr byl dostačující, aby byl glykoprotein gp140 štěpen na podjednotku gp120, která odpovídala hmotnosti 120 kDa a podjednotku gp20, která odpovídala 25 kDa.

## 5.2 Kotransfekce eukaryotních buněk 293F

Do buněčné linie HEK293 Free Style, která byla určena pro biosyntézu proteinu, byly transfekovány dva plazmidy: gp140.SOSIP/clade C s DNA sekvenovanou ve fázích sérokonverze TF/Y1/Y3 a plazmidem FURIN.cDNA.ORF.clone v poměru 2:1. Tři dny po transfekci a sedm dní po transfekci byly izolovány proteiny, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a WB s pomocí tzv. „séra získaného od pacienta infikovaného HIV“ (viz obr.6).





Obrázek 10: Western blot vypurifikovaných proteinů získaných kotransfekcí buněk 293F s furinem a gp140.SOSIP (TF/Y1/Y3) detekované pomocí tzv. „séra pacienta“

**Legenda:** R= denaturační/redukující podmínky, NR= denaturační/neredukující podmínky, (+F)= kotransfekce s furinem, (-F)= kotransfekce bez furinu (kontrola), M= marker molekulových hmotností

Popis jednotlivých proužků detekovaných pomocí protilátky tzv. „patientského séra“ byl uveden do tabulky.

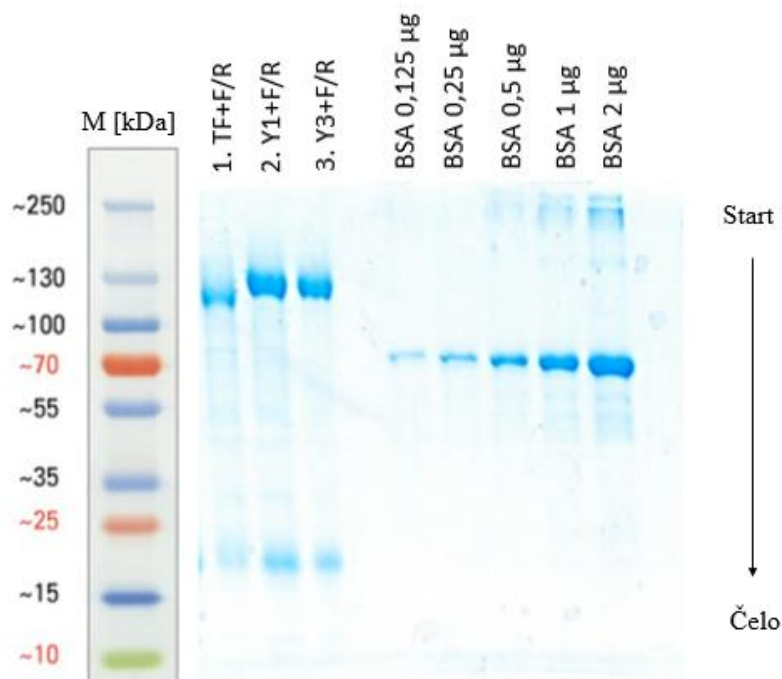
Dráha	Vzorek proteinu	Denaturační podmínky	Identifikace proužků	Molekulová hmotnost
1	Y3-F	redukující	1= gp120 + gp20 2= gp120 3= gp20	1= 140 kDa 2= 120 kDa 3= 25 kDa
2	TF+F	redukující	1= gp120 2= gp20	1= 120 kDa 2= 25 kDa
3	Y1+F	redukující	1= gp120 2= gp20	1= 120 kDa 2= 25 kDa
4	Y3+F	redukující	1= gp120 2= gp20	1= 120 kDa 2= 25 kDa
5	Y1+F	neredukující	1= gp120 + gp20	1= 140 kDa

Tabulka 4: Vyhodnocení western blotu kotransfekce buněk 293F plazmidem s furinem a plazmidem gp140.SOSIP (TF/Y1/Y3) detekovaného pomocí patientského séra

V první dráze byl nanesen vzorek proteinu získaný po kotransfekci buněk bez furinu za redukujících podmínek. Proužky v této oblasti odpovídaly hmotnosti (1) 140-145 kDa,

(2) 120 kDa a (3) 25 kDa. Během syntézy nebyly tyto proteiny v úplně rozštěpeny v místě přechodu mezi gp120 a gp20. Syntetizované proteiny získané po kotransfekci s plazmidem furinem (dráha 2, 3 a 4) za redukujících podmínek měly proužky dva (1. odpovídal oblasti 120 kDa a 2. oblasti 25 kDa), takže proteiny byly v místě přechodu štěpeny úplně. První proužek obsahoval odštěpenou podjednotku gp120 s odhadovanou hmotností 120 kDa. Ke správnému štěpení nasvědčoval i druhý proužek, který obsahoval podjednotku gp20 a odhadovanou hmotností 20 kDa. Tato podjednotka se odděluje od podjednotky gp120 za redukujících podmínek. V poslední dráze se nacházel protein obsahující furin, ale za neredukujících podmínek. V této dráze se nacházela směs proteinů štěpených a neštěpených proteinázou furinem v místě přechodu, ale to se na elektroforetogramu neprojeví, protože neredukující podmínky zajistily, aby se sulfidové můstky mezi glykoproteiny gp120 a gp20 nerozštěpily. Tím pádem se nám tato směs proteinů jevila jako jeden proužek o velikosti kolem 140 kDa.

K vizualizaci proteinů a určení jejich výtěžku bylo použito porovnání metodou SDS-PAGE a barvení v Coomassie Brilliant Blue. Koncentrace jednotlivých proteinů byla určena na základě intenzity odpovídajících proužků v porovnání s koncentrační řadou BSA proužků na elektroforetogramu pomocí programu ImageJ.



Obrázek 11: Detekce a určení koncentrace syntetizovaných proteinů po obarvení Coomassie Brilliant Blue za použití standardu BSA

Legenda: M= marker molekulových hmotností, R= redukující podmínky, BSA= albumin bovinního séra, F= proteináza furin

Na elektroforetogramu lze pozorovat intenzitu proužků syntetizovaných proteinů. V dráhách 1, 2 a 3 měl první proužek přibližnou molekulovou hmotnost kolem 120 kDa, takže odpovídal glykoproteinu gp120. Druhý proužek měl molekulovou hmotnost přibližně 20 kDa, což odpovídá glykoproteinu gp20. Koncentrace proteinů určeny pomocí programu ImageJ jsou shrnuty v tabulce 5.

<b>Protein</b>	<b>Koncentrace [<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>]</b>
<b>TF</b>	0,649
<b>Y1</b>	1,137
<b>Y3</b>	0,881

**Tabulka 5: Výsledné koncentrace zakoncentrovaných rekombinantních proteinů**

## 6 Diskuze

Tato bakalářská práce představila metodu kotransfekce, pomocí které je možno zavést dvě samostatné molekuly DNA do buňky. Jelikož je tento druh transfekce přechodný, zavedená DNA se nachází v buňce jenom na omezenou dobu, protože není integrována do genomu. Nejčastěji využívanou buněčnou linií pro tuto metodu je linie HEK 293F. Jedná se o lidské embryonální ledvinové buňky. Pomocí kotransfekce této buněčné linie je možno biosyntetizovat rekombinantní proteiny, které mohou být následně využity pro imunizaci.

V této práci byly nejdříve shrnuty nejdůležitější informace v teoretické části, a poté proběhly experimenty, které si kladly za cíl optimalizovat poměr plazmidové DNA při kotransfekci buněk HEK 293F a následně kotransfekcí vyprodukovat rekombinantní protein, který byl následně vypurifikován, zakoncentrován a byla změřena jeho koncentrace.

Vysoce glykosylovaný trimerní obalový protein (Env) zprostředkovává vstup viru HIV-1 do hostitelských buněk. Vysoký obsah glykanů chrání Env před imunitním systémem, ale mnoho široce neutralizujících látek (bNAbs) rozpoznává epitopy, které mají tento štít. Aby bylo možné co nejpřesněji napodobit povrch virionu přirozeně se vyskytujícího HIV obalového proteinu Env, byl vytvořen glykoprotein gp140.SOSIP. Tento rekombinantní trimer je úzce strukturní a antigenní mimikou přirozeného Env. Obsahuje podjednotku gp120 a zkrácenou podjednotku gp41 (gp20). Velké, nezpracované struktury oligomannózového typu jsou zřetelně převládající na gp120 trimery, naproti tomu podjednotky gp41 nesou více vysoce zpracovaných glykanů. Homogenní glykanový profil, kterému dominuje oligomannóza, je proto charakteristickým znakem přirozené konformace Env a potenciální Achillovy paty, která může být využita k rozpoznání bNAb a návrhu vakcíny. Bez ohledu na to, zda je protein SOSIP.gp140 štěpený či nikoliv, a tedy zda má nebo nemá nativní konformaci, je nejdůležitějším faktorem toho, zda většina glykanů podjednotky gp120 zůstává v oligomannózové formě nebo, zda jsou zpracovány. Toto zpracování spočívá v tom, že skládání a oligomerizace trimerů štěpených furinem se musí objevit dostatečně rychle v Golgiho aparátu, aby se zabránilo významnému zpracování  $\alpha$ -mannosidázy. Celkově je lokalizace furinové aktivity a působení Golgiho  $\alpha$ -mannosidáz kritickým faktorem, který ovlivňuje, jak jsou trimery glykosylované (Pritchard *et al.*, 2015).

Optimalizace kotransfekce byla důležitá pro správné štěpení glykoproteinu gp140 proteinázou furinem na podjednotky gp120 a gp20 (Sanders,2013).

Prvním cílem experimentální části bylo zjistit optimální poměr mezi dvěma plazmidy, které byly určeny pro kotransfekci buněk 293F. Ze snímku optimalizace kotransfekce (viz obrázek 9) bylo patrné, že k tomu, aby se protein v místě přechodu mezi glykoproteiny gp120 a gp20 úplně rozštěpil stačil poměr 2:1. Ten byl následně použit ke kotransfekci buněk 293F. Následně proběhla vlastní kotransfekce za účelem produkce rekombinantních proteinů a to TF, Y1 a Y3. Po kotransfekci buněk, izolaci proteinů, jejich purifikaci a zakoncentrování bylo provedeno jejich ověření a analýza pomocí SDS-PAGE, western blotu a barvením Coomassie Brilliant Blue. Na druhém snímku (viz obrázek 10) se vzorek prvního proteinu neobsahujícího proteinázu furin pocházející z plazmidu dělil na tři proužky. Dolní proužek v oblasti 20-25 kDa odpovídal fragmentu gp20 + HIS. Horní proužek představoval kompletní glykoprotein (gp120 + gp20 + HIS) a proto odpovídal hmotnosti kolem 140 kDa. Prostřední proužek představoval druhý fragment gp120, který odpovídal hmotnosti 120 kDa. Nepřítomnost dostatečného množství furinu v buňce nasvědčuje nekompletnímu štěpení na přechodu mezi gp120 a gp20. Vzorky proteinů obsahující proteinázu furin pocházející z plazmidu se naopak na snímku kompletně rozštěpily na podjednotku gp120 a podjednotku gp20 a tím byla umožněna správná prostorová orientace.

Nakonec bylo provedeno barvení gelu Coomassie Brilliant Blue. Takto obarvený gel byl oskenován a pomocí programu ImageJ byla určena koncentrace jednotlivých proteinů. Nejvyšší koncentraci měl protein Y1, poté Y3 a nejmenší koncentraci měl protein TF (viz tabulka 5).

## 7 Závěr

Tato bakalářské práce se zabývala produkcí rekombinantních antigenů viru HIV za využití savčích expresních systémů. Literární část se s ohledem na aktuálně dostupnou odbornou literaturu věnovala tématům historie objevu HIV, epidemiologii, terapii, vakcinací, strukturou a morfologií viru HIV, významem glykosylace gp120 a možnostmi produkce a purifikace rekombinantních proteinů.

V rámci experimentální části byla nejprve provedena optimalizace kotransfekce buněk 293F plazmidem kódující sekretující se formu env.gp140.SOSIP proteinu a plazmidem kódujícím proteinázu furin v různých poměrech. Po určení optimálního poměru mezi plazmidem env.gp140.SOSIP a plazmidem kódujícím proteinázu furin, byla provedena kotransfekce eukaryotických buněk 293F. Tato buněčná linie byla kotransfekována za cílem exprimovat rekombinantní proteiny. Na kotransfekci byl použit plazmidy nesoucí sekvenci pro tři env. gp140.SOSIP proteiny, tyto sekvence byly sekvenovány v různých časových úsecích sérokonverze, a to hned po nakažení tzv. transmitted founder (TF), rok po sérokonverzi (Y1) a tři roky po sérokonverzi (Y3). Spolu s tímto plazmidem byl také použit v poměru 2:1 plazmid kódující proteinázu furin.

Rekombinantní proteiny byly úspěšně exprimovány a následně purifikovány pomocí afinitní chromatografie pomocí Ni-NTA agarózy. Tyto proteiny byly poté analyzovány a charakterizovány pomocí Western blot techniky a barvením Coomassie Brilliant Blue.

Z této práce byly vyvozeny následující závěry. Jako optimální poměr pro kotransfekci byl zjištěn poměr 2:1 (env. gp140.SOSIP: FURIN.ORF.clone). Právě tento poměr byl dostačující k tomu, aby byl glykoprotein gp140 úplně procesován v místě přechodu na podjednotky gp120 a gp20. Po následné kotransfekci buněk, izolaci, purifikaci a zakoncentrování proteinů byla provedena jejich detekce, analýza a určení koncentrace. Tyto proteiny mohou následně sloužit k imunizaci a vývoji vakcín proti HIV-1.

## 8 Literatura

Agathos, S. N. (1991). Production scale insect cell culture. *Biotechnology advances*, 9(1), 51-68.

An, H. J., Froehlich, J. W., Lebrilla, C. B. (2009). Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Current opinion in chemical biology*, 13(4), 421-426.

Arts, E. J., Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(4), a007161.

Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology letters*, 29(5), 677-684.

Barouch, D. H. (2008). Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*, 455(7213), 613.0

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (1996): Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha. ISBN-10: 80-2380-297-6

Bisbee, C. A. (1993). Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. *Gen Eng News*, 13, 8-10.

Bornhorst, J. A., Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in enzymology* (Vol. 326, pp. 245-254). Academic Press.

Brown, T. R. (2015). I am the Berlin patient: a personal reflection. *AIDS research and human retroviruses*, 31(1), 2-3.

De Cock, K. M., Jaffe, H. W., Curran, J. W. (2012). The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *Aids*, 26(10), 1205-1213.

Demain, A. L., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.

Haynes, B. F., Shaw, G. M., Korber, B., Kelsoe, G., Sodroski, J., Hahn, B. H., Borrow P., McMichael, A. J. (2016). HIV-host interactions: implications for vaccine design. *Cell host & microbe*, 19(3), 292-303.

- Fettig, J., Swaminathan, M., Murrill, C. S., Kaplan, J. E. (2014). Global epidemiology of HIV. *Infectious Disease Clinics*, 28(3), 323-337.
- Gallin, J. I., Fauci, A. S. (Eds.). (1985). *Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)* (Vol. 5). Raven Pr.
- Go, E. P., Irungu, J., Zhang, Y., Dalpathado, D. S., Liao, H., Sutherland, L. L., Alam, S. M., Haynes, B. F., Desaire, H. (2008): Glycosylation Site-Specific Analysis of HIV Envelope Proteins (JR-FL and CON-S) Reveals Major Differences in Glycosylation Site Occupancy, Glycoform Profiles, and Antigenic Epitopes' Accessibility. *Journal of proteome research*, 7(4), 1660-1674.
- Gellissen, G., Janowicz, Z. A., Weydemann, U., Melber, K., Strasser, A. W., Hollenberg, C. P. (1992). High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology advances*, 10(2), 179-189.
- He, X. S., Brückner, R., Doi, R. H. (1991). The protease genes of *Bacillus subtilis*. *Research in microbiology*, 142(7-8), 797-803.
- Jenkins, N., Curling, E. M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme and microbial technology*, 16(5), 354-364
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15(2), 153-164.
- Kagaayi, J., Serwadda, D. (2016). The History of the HIV/AIDS Epidemic in Africa. *Current HIV/AIDS Reports*, 13(4), 187-193.
- Knight, P. (1991). Baculovirus vectors for making proteins in insect cells. *ASM News*, 57(11), 567-570.
- Krejsek J., Kopecký O. (2004): *Klinická imunologie*; 1. vydání, Nucleus HK, ISBN 80-86225-50-X.
- Krupka M. (2011): *Příprava a purifikace rekombinantních proteinů*. Disertační práce. Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- 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(6686), 648.
- Lamb, A. (2003). CCR5–delta32: a very beneficial mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100(14), 8401-8406.



- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10373-10382.
- Levinson, W. (2006): Review of Medical Microbiology and Immunology, ninth edition. The McGraw-Hill Companies. ISBN: 0-07-110438-0
- Lopalco, L. (2010). CCR5: from natural resistance to a new anti-HIV strategy. *Viruses*, 2(2), 574-600.
- Lv, Z., Chu, Y., Wang, Y. (2015). HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*, 7, 95.
- Pham, P. L., Kamen, A., Durocher, Y. (2006). Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular biotechnology*, 34(2), 225-237.
- Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S., Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins. In *Recombinant gene expression* (pp. 15-51). Humana press.
- Pritchard, L. K., Vasiljevic, S., Ozorowski, G., Seabright, G. E., Cupo, A., Ringe, R., Wilson, I. A. (2015). Structural constraints determine the glycosylation of HIV-1 envelope trimers. *Cell reports*, 11(10), 1604-1613.
- Raska, M., Takahashi, K., Czernekova, L., Zachova, K., Hall, S., Moldoveanu, Z., Elliott, M. C., Wilson, L., Brown, R., Jancova, D., Barnes, S. (2010). Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20860-20869.
- Rathore, U., Saha, P., Kesavardhana, S., Kumar, A. A., Datta, R., Devanarayanan, S., Das R., Mascola J., Varadarajan, R. (2017). Glycosylation of the core of the HIV-1 envelope subunit protein gp120 is not required for native trimer formation or viral infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(24), 10197-10219.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernández-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*, 280(5371), 1949-1953.
- Sanders, R. W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J. P., Yasmeeen, A., de Val, N., ... & Golabek, M. (2013). A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP. 664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003618.

- Shin, S. Y. (2016). Recent update in HIV vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, 5(1), 6-11
- Swartz, J. R. (2001). Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*, 12(2), 195-201.
- Teixeira, C., Gomes, J. R., 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(4), 979-992.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211.\
- Urh, M., Simpson, D., Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. In *Methods in enzymology* (Vol. 463, pp. 417-438). Academic Press.
- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks — 2003. *Nat Biotechnol* 2003;21:865–70.
- Wang Y., Lv, Z., Chu, Y. (2015). HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*, 7, 95.
- Ward, A., Hoyle, C., Palmer, S., O'Reilly, J., Griffith, J., Pos, M., Morrison S., Poolman B., Gwynne M., and Henderson, P. (2001). Prokaryote multidrug efflux proteins of the major facilitator superfamily: amplified expression, purification and characterisation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2), 193-200.
- Wurm, F., Bernard, A. (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 156-159.
- Wyatt, R., Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 280(5371), 1884-1888.
- Zhu, X., Borchers, C., Bienstock, R. J., Tomer, K. B. (2000). Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry*, 39(37), 11194-11204.