

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

OLOMOUC 2016

Ondřej Chaloupka

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Moderní postupy při tvorbě
vakcíny vůči viru HIV-1**

Bakalářská práce

ONDŘEJ CHALOUPKA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016 Vedoucí práce: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Čestně prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci s názvem „Moderní postupy při tvorbě vakcíny vůči viru HIV-1“ zpracoval samostatně pod vedením pana doc. MUDr. Mgr. Milana Rašky, 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 soustřeďuje na studium současných přístupů k přípravě vakcíny vůči viru lidské imunodeficiency. Teoretická část této práce se zabývá biologickou klasifikací viru, morfologií virové částice, virovým proteomem a genomem, životním cyklem viru, přípravou potenciální vakcíny vůči HIV-1, neutralizačními protilátkami a jejich testovacími modely, a rekombinantním glykoproteinem gp140 SOSIP P4M, který obsahuje samosestřížný modul (angl. *self-processing module*, zkr. SPM) umožňující neenzymatické odštěpení purifikačních a detekčních kotev od gp140 SOSIP glykoproteinu po jeho *in vitro* expresi. Navíc, SPM obecně zvyšuje solubilitu a stabilitu asociovaného proteinu.

Experimentální část bakalářské práce se věnuje molekulárnímu klonování umožňujícímu odstranit SPM sekvenci z DNA plazmidu kódujícího glykoprotein gp140 SOSIP, a následné expresi obou variant gp140 SOSIP glykoproteinu v eukaryotické buněčné linii HEK-293F a jeho charakterizaci. Gp140 SOSIP je buněčnými proteázami částečně štěpen na podjednotky gp120 a gp20. V závěru experimentální práce jsou oba glykoproteiny (s a bez SPM) štěpeny proteinázou furinem specifickou pro rozhraní gp120 a gp20 a následně porovnány. Bylo potvrzeno, že gp140 SOSIP P4M je rezistentní ke štěpení furinem a přítomnost SPM tuto rezistenci neovlivňuje. Dále bylo potvrzeno, že přítomnost SPM sekvence snižuje míru exprese glykoproteinu gp140 SOSIP v expresní linii HEK-293F. Pro aplikace, kde není třeba odstranit purifikační a detekční značky z gp140 SOSIP je z pohledu výtěžku výhodnější varianta gp140 SOSIP bez SPM.

SUMMARY

This bachelor's thesis reviews recent approaches for designing the vaccine that could be used to prevent *human immunodeficiency virus* infection. Theoretical part is focused on biological classification of HIV virus, morphology of a viral particle, viral proteome and genome, viral life cycle, preparation of a potential vaccine against HIV-1, neutralizing antibodies and their testing models, and finally on glycoprotein gp140 SOSIP P4M, which contains the prokaryotic *self-processing module* (SPM) sequence allowing enzyme-less cleavage of recombinant gp140 SOSIP glycoprotein in order to remove purification and detection tags from this glycoprotein after its *in vitro* expression. Furthermore, in general, SPM enhances associated glycoprotein's solubility and stability.

Experimental part describes molecular cloning approach for removal of SPM sequence from DNA plasmid that encodes gp140 SOSIP P4M SPM+ and following expression of both variants of gp140 SOSIP P4M using the eukaryotic *human embryonic kidney* HEK-293F cells and its characterization. Both variants of gp140 glycoproteins (with and without SPM) were digested by proteinase furin, which participates in cleavage of gp140 to gp120 and gp20 moieties. It was confirmed that gp140 SOSIP P4M is resistant to furin digestion and that the presence of SPM has no influence over this resistance. Furthermore, both SPM-free and SPM-containing gp140 SOSIP P4M variants exhibit similar rate of furin resistance. It was detected, that SPM presence lowers the rate of proteosynthesis in HEK-293F cells. Therefore, if the presence of purification and detection tags does not hamper the employing of recombinant gp140 SOSIP, the variant without SPM is preferred.

Rád bych poděkoval svému školiteli, panu doc. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při zpracování této bakalářské práce. Můj dík dále patří také všem pracovníkům Ústavu imunologie LF UP v Olomouci za pomoc zejména při zpracování experimentální části této práce.

OBSAH

1 ÚVOD	07
2 CÍL PRÁCE	09
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1 Biologická klasifikace viru – typy, skupiny, subtypy a subsubtypy	10
3.2 Morfologie virionu a přehled virového proteomu	12
3.3 Anatomie virového genomu	14
3.4 Životní cyklus viru	15
3.5 Vývoj vakcíny k prevenci HIV-1 infekce	17
3.6 Neutralizační protilátky anti-HIV-1 a jejich testovací modely	21
3.7 Glykoproteiny gp140 SOSIP	23
4 MATERIÁL A METODIKA	25
4.1 Restrikční odštěpení DNA sekvence kódující SPM z plazmidu gp140 SOSIP P4M.	25
4.2 Klonování upraveného plazmidu.....	26
4.3 Transformace prokaryot – amplifikace plazmidové DNA	27
4.4 Transfekce eukaryot – biosyntéza proteinů	29
4.5 Porovnání štěpení gp140 SOSIP SPM+ a SPM– furinem	32
5 VÝSLEDKY	34
5.1 Restrikční odštěpení DNA sekvence kódující SPM z plazmidu gp140 SOSIP P4M.	34
5.2 Klonování upraveného plazmidu.....	35
5.3 Transformace prokaryot – amplifikace plazmidové DNA	35
5.4 Transfekce eukaryot – biosyntéza proteinů	36
5.5 Porovnání štěpení gp140 SOSIP SPM+ a SPM– furinem	38
6 DISKUZE	39
7 ZÁVĚR	42
8 SEZNAMY	43
8.1 Seznam použitých zkratk a symbolů	43
8.2 Seznam uvedených vyobrazení, tabulek a grafů	44
8.3 Seznam využitých laboratorních přístrojů, chemikálií a dalších pomůcek	45
9 LITERATURA	47

1 ÚVOD

Virus lidské imunodeficiency (angl. *human immunodeficiency virus*, zkr. HIV) od svého objevu v roce 1980 stále zůstává jednou z nejdůležitějších nezodpovězených otázek moderní imunologie. Dle aktuálních údajů světové zdravotnické organizace způsobuje HIV ročně po celém světě až 2 milióny nových infekcí. Vážný problém nastává tehdy, kdy infekce přejde do terminálního stádia, kdy dochází u nakaženého jedince k rozvoji syndromu získané imunodeficiency (angl. *acquired immunodeficiency virus*, zkr. AIDS), který i přes mnohé terapeutické pokusy nadále zůstává nevyлéčitelnou smrtelnou nemocí.

Podobně jako u mnoha jiných infekčních patogenů, velmi brzy po objevení HIV započal vývoj protektivní vakcíny. Výzkum v tomto případě ale narazil na klíčovou vlastnost HIV-1 viru, kterou je jeho enormní genetická variabilita, která umožňuje obměňovat sekvenci povrchových antigenů identifikovaných u jednotlivých HIV izolátů. Tím dochází ke značnému ztížení, ne-li úplnému znemožnění navození protektivních protilátek, které by byly schopny bránit infekci napříč širokým spektrem HIV-1 variant identifikovaných v populaci HIV nakažených.

V poslední době se ovšem objevila naděje vycházející ze studia HIV-1 infikovaných pacientů, kteří se označují jako *long-term nonprogressors* (zkr. LTNPs). Tito pacienti se vyznačují částečnou kontrolou nad množením viru v jejich těle, což jim přirozeně umožňuje mírnit důsledky virové infekce a oddálit její terminální stádium i bez antiretrovirové terapie. Fenomén rezistence je spojen s tvorbou protilátek schopných neutralizovat široké spektrum HIV-1 variant pomocí *broadly neutralizing antibodies* (zkr. bnAbs).

Široce neutralizující anti-HIV protilátky se liší od běžných anti-HIV neutralizačních protilátek, které efektivně neutralizují jen omezené spektrum HIV-1 variant – většinou těch, které se u daného pacienta vyskytly před více než jedním až třemi měsíci. Navození tvorby protilátek neutralizujících široké spektrum HIV-1 virů se stalo jedním z hlavních směrů, kterým se vědci při konstrukci vakcíny vůči HIV začali ubírat.

Otázkou však zůstává, jaký imunogen by se měl pro takovou vakcínu použít. Nejčastěji se jedná o virový obalový protein Env. Env je složen z nekovalentně spojených trimerních podjednotek gp120 a gp41, které vznikají štěpením prekurzorového proteinu gp160 v Golgiho komplexu. Stále se avšak nepodařilo připravit rekombinantní antigen, který by věrohodně imitoval konformaci Env na povrchu virionu, a který by navodil bnAbs. Z mnoha testovaných modifikací Env proteinu se pro konstrukci vakcín nejčastěji používá solubilní varianta Env

označovaná jako gp140, složená z přirozené podjednotky Env označované gp120 a zkrácené podjednotky gp20 odvozené od gp41, která je zodpovědná za multimerizaci proteinu. V zásadě existují dvě cesty přípravy gp140.

První z nich je založena na eliminaci štěpného místa mezi gp120 a gp41 se zachováním multimerizační schopnosti gp20, kdy podjednotka gp120 a gp20 jsou kovalentně spojeny. Druhá cesta je založena na zachování štěpného místa mezi gp120 a gp20 a současném vnesení aminokyselin, které stabilizují vazbu podjednotek gp120 a gp20. Příkladem druhé varianty je verze gp140 SOSIP, která se zdá být z pohledu výsledné konformace trimeru gp140 více podobná konformaci nativního Env se zachováním klíčových epitopů. Obě gp140 verze představují významný pokrok v designu vakcinačního antigenu, nicméně volba konkrétní sekvenční varianty Env s vhodnou posttranslační modifikací, která by efektivně navozovala bnAbs zůstává otevřená.

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části, která zahrnuje kapitolu 3. *Současný stav řešené problematiky*, bylo s pomocí aktuálně dostupné literatury zpracování literární rešerše zahrnující dosavadní poznatky spojených s těmito tématy:

- biologická klasifikace viru HIV
- morfologie virionu, anatomie virového proteomu a genomu
- životní cyklus viru v hostitelském organismu
- směry vývoje efektivní vakcíny vůči HIV-1
- charakteristika protilátek neutralizujících HIV-1 a jejich průkaz a biologická charakterizace
- glykoproteiny gp140 SOSIP a jejich teoretické využití pro budoucí vakcínu

Cílem experimentální části, která zahrnuje kapitoly 4. *Materiál a metodika*, 5. *Výsledky* a 6. *Diskuze*, bylo praktické provedení modifikace plazmidu kódujícího gp140 s SPM na plazmid kódující gp140 bez SPM metodami molekulárního klonování, dále exprese a izolace P4M varianty glykoproteinu gp140 SOSIP s SPM a bez SPM pro vakcinační a detekční účely. Dalším cílem bylo zjistit, zdali má přítomnost SPM sekvence vliv na proteolytickou maturaci gp140 glykoproteinu v buňce a na vnímavost či rezistenci ke štěpení proteázou furinem. Experimentální část byla realizována experimenty umožňujícími:

- odstranit SPM sekvenci z proteinu gp140 SOSIP P4M pomocí modifikace kódujícího plazmidu metodami molekulárního klonování; připravený plazmid je označen gp140 SOSIP P4M SPM⁻
- amplifikovat plazmid replikací v bakteriálním hostiteli (*Escherichia coli*)
- exprimovat proteiny gp140 SOSIP P4M SPM⁺ a gp140 SOSIP P4M SPM⁻ v savčím expresním systému (HEK-293F)
- srovnat citlivost gp140 SOSIP P4M proteinů s SPM a bez SPM ke štěpení proteázou furin

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Biologická klasifikace viru – typy, skupiny, subtypy, subsubtypy

Virus lidské imunodeficiencie (angl. *human immunodeficiency virus*, zkr. HIV), objevený v roce 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983), je původcem onemocnění **syndromu získané imunodeficiencie** (angl. *acquired immunodeficiency syndrome*, zkr. AIDS) dle Gallo et al., 1984; Montagnier et al., 1984. Patří do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae* a do virového rodu *Lentivirus*. Jeho příslušnost k jednomu z ustanovených virových řádů avšak nebyla mezinárodním výborem pro klasifikaci virů (angl. *international committee for taxonomy of viruses*, zkr. ICTV) stále rozhodnuta (King et al., 2012).

Mezi jednu z nejvýznačnějších vlastností HIV patří jeho vysoká variabilita, která vzniká v důsledku nepřesnosti virové reverzní transkriptázy nebo rekombinací dvou virových částic (Boyer, Bebenek, & Kunkel, 1992; Burke, 1997; Temin, 1993). Vznik nových variant HIV-1 je ovlivněn imunitním systémem hostitele, který se vůči HIV chová velmi individuálně (Michael, 1999).

To, jakým virovými izolátem byl pacient infikován, má vliv na klinický průběh infekce a progresi do stádia AIDS (Baeten et al., 2007). Z epidemiologických, imunologických, klinických a dalších důvodů byl zaveden klasifikační systém HIV, který rozděluje jednotlivé viriony na základě sekvence virové RNA do **typů, skupin, subtypů** a dokonce **subsubtypů** (Buonaguro, Tornesello, & Buonaguro, 2007).

Základní rozdělení HIV je na **typ jedna** (HIV-1) a **typ dvě** (HIV-2). Mezitím, co HIV-1 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983) sdílí určitou míru příbuznosti s virem opičí imunodeficiencie (angl. *simian immunodeficiency virus*, zkr. SIV) šířícím se v populacích šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) a gorily obecné (*Gorilla gorilla*), HIV-2 (Clavel et al., 1986) je naopak příbuznější se SIV šířícím se v populaci ohroženého primáta *Cercocebus atys*, jehož přirozeným biotopem je západní Afrika (Lemey et al., 2003). Celosvětově rozšířenou variantou je HIV-1, HIV-2 mimo západ Afriky patří spíše k výjimečným případům.

V rámci HIV-1 jsou mezinárodně uznávány čtyři základní skupiny: **hlavní skupina M** (angl. *major*), **vedlejší skupina O** (angl. *outlier*) a **vzácné skupiny N a P**.

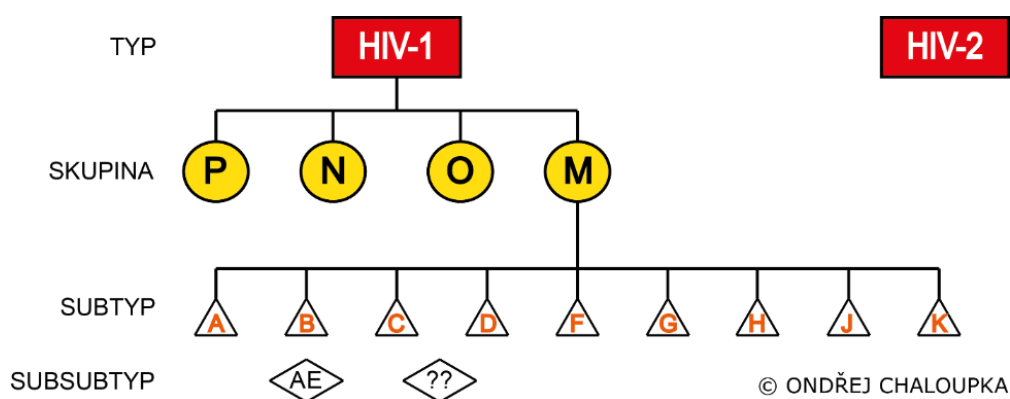
Virové kmeny spadající do **skupiny N** jsou velmi vzácné a infekce těmito kmeny zůstávají stále soustředěny do oblasti Kamerunu ve Středozápadní Africe (Mourez, Simon, & Plantier, 2013). Podobně jsou na tom kmeny ze **skupiny P** (Plantier et al., 2009).

Viriony ze **skupiny O** jsou strukturně a chováním podobné skupině M, ale vykazují značnou genetickou diverzitu, a to zejména v sekvencích virového genu *env* (asi 50% rozdíl) a genu *pol* (asi 30% rozdíl). Někteří pacienti nakažení skupinou O mohou vykazují značnou rezistenci vůči některým používaným antiretrovirálním lékům, např. vůči nenukleosidovým inhibitorům reverzní transkriptázy (Bush & Tebit, 2015).

Ve **skupině M** rozlišujeme několik dalších tzv. **subtypů** (někdy také označovaných jako **virové obalové subtypy – clades**). Mezi rozšířenější patří subtypy A, B, C a D, naopak mezi méně rozšířené řadíme subtypy F, G, H, J a K.

Poslední úroveň biologické klasifikace viru HIV představují tzv. **sub-subtypy**, které se označují jako **cirkulující rekombinantní formy** (angl. *circulating recombinant forms*, zkr. CRFs). Jedná se o kmeny, které vznikly rekombinací při vzájemné koinfekci jedné buňky dvěma či vícero virovými subtypy (Lau & Wong, 2013). Příkladem může být např. CRF01_AE (objevitelem sekvence je J. K. Carr), tedy subsubtyp vzniklý rekombinací subtypu A a dosud nepozorovaného subtypu E.

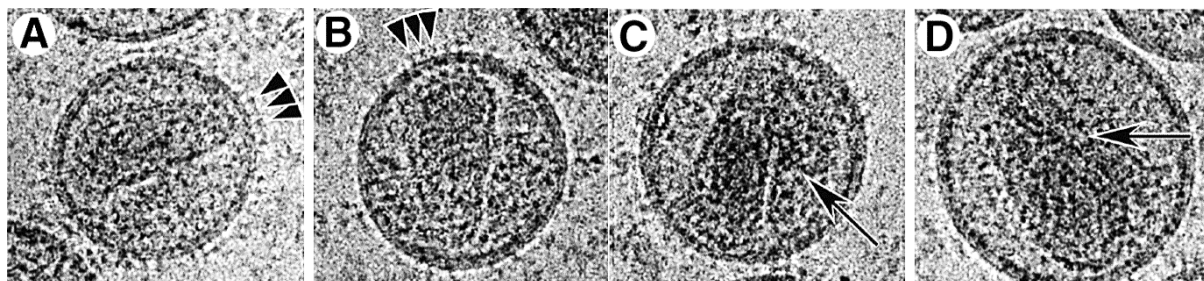
Unikátní rekombinantní formy (angl. *unique circulating forms*, zkr. URFs) patří taktéž mezi HIV-1 sub-subtypy, ovšem od CRFs se liší epidemiologickými aspekty. O CRF viru HIV-1 mluvíme tehdy, jestliže byl daný sub-subtyp nalezen alespoň u tří pacientů, kteří nejsou v epidemiologické vazbě. Naopak jako URF klasifikujeme virus tehdy, pakliže podmínku tří nezávislých epidemiologicky neprovázaných hostitelů nesplňuje (Lau & Wong, 2013). Celkové shrnutí biologické klasifikace HIV uvádím na schématu níže (viz **obr. 1**).



Obr. 1 – Schéma biologické klasifikace HIV: HIV se základně dělí tzv. na typ HIV-1 a HIV-2, přičemž rozsáhlejší HIV-1 podléhá dalšímu dělení na tzv. M, O, N a P. Majoritní z těchto skupin (M) dále rozlišuje velké množství tzv. subtypů, mezi které patří A až K, vyjma dosud nepozorovaných E a I. Rekombinací mezi dvěma různými virovými izoláty vznikají tzv. subsubtypy, např. běžně se šířící AE. *Ilustrace: Ondřej CHALOUPKA.*

3.2 Morfologie virionu a přehled virového proteomu

Virion HIV je sférická struktura o průměru asi 110–130 nm, která se skládá ze dvou částí: vnějšího obalu (*coat*) a vnitřního jádra (*core*), které má specifický kónický tvar. Zajímavostí je, že jader může být v rámci jednoho virionu více (viz obr. 2).



Obr. 2 – Srovnání jedno- a vícejaderných HIV virionů: Obrázky A a B vyobrazují viriony HIV s jedním jádrem typického kónického vzhledu vč. přítomných obalových proteinů (▶). Naopak obrázky C a D zobrazují viriony s dvěma jádry, které mohou mít i atypický tubulární tvar (→). *Upraveno podle: Briggs, Wilk, Welker, Kräusslich, & Fuller (2003).*

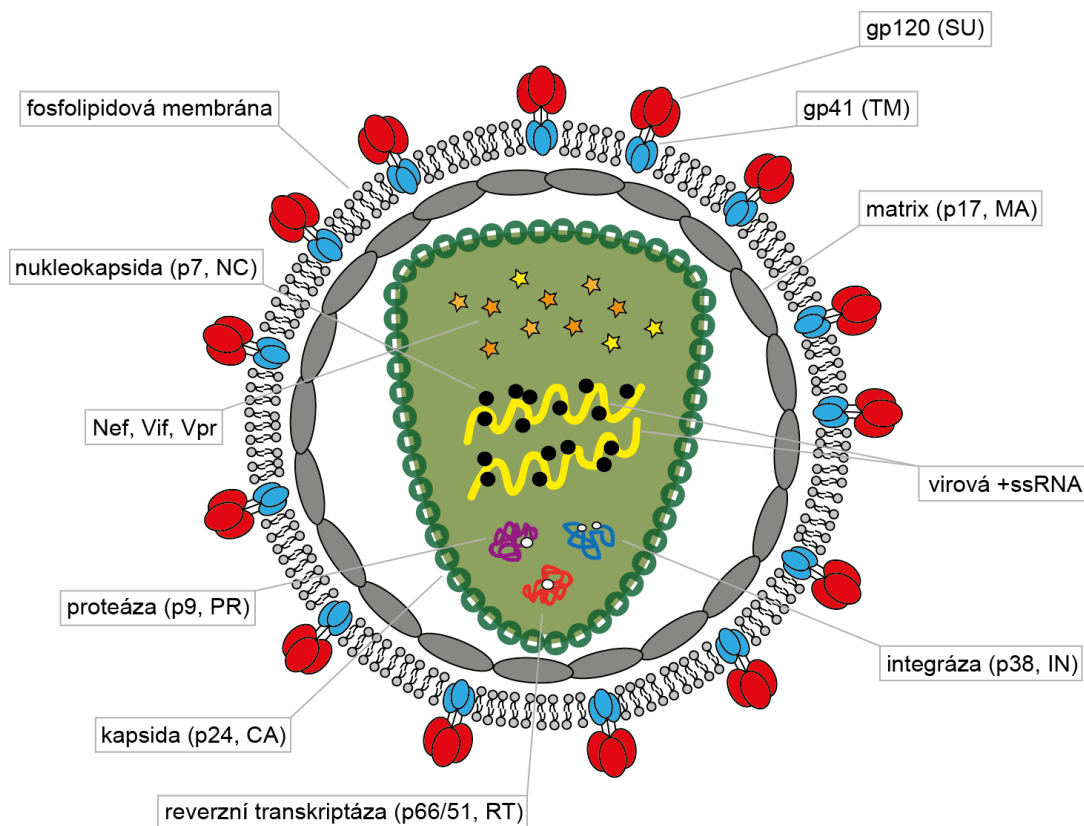
Dle Turner & Summers (1999) můžeme jednotlivé proteiny proteomu HIV rozdělit do těchto skupin: čtyři strukturní proteiny, dva obalové proteiny, tři virové enzymy a šest doplňkových proteinů. Schematické shrnutí výskytu těchto proteinů v rámci virionu uvádím na schématu na další straně (viz obr. 3).

Mezi strukturní proteiny patří matricový, kapsidový a nukleokapsidový protein. **Matricové proteiny** (znač. p17 nebo MA) utvářejí virovou matrix, která slouží k zachování integrity virionu a k udržení jeho sférického tvaru. **Kapsidové proteiny** (znač. p24 nebo CA) vytvářejí virovou kapsidu typického kónického tvaru, která obaluje vnitřní virové jádro. Kapsida a matricový obal jsou spojeny pomocí **spojovacího proteinu** (znač. p6 nebo LI). **Nukleokapsidové proteiny** (znač. p7 nebo NC) asociují s virovou RNA a plní mnoho funkcí, např. zahajují reverzní transkripci virové RNA nebo stabilizují provirovou DNA. V případě, že dojde k mutaci NC, nedochází k vývoji plně infekčního virionu (Zhang & Barklis, 1997).

Obalové proteiny nalezneme v rámci fosfolipidové dvojvrstvy, která představuje nejsvrchnější vrstvu virové částice. Tuto vrstvu nedozrálý virion získává při jeho uvolnění z hostitelské buňky. Mimo virem kódovaných obalových proteinů zde tak také nalezneme řadu proteinů pocházejících od hostitele, např. antigeny MHC, aktin či ubikvitin (Arthur et al., 1992). Obalový protein Env vzniká spojením tří podjednotek, z nichž každá je tvořena **povrchovým glykoproteinem** (znač. gp120 nebo SU) a nekovalentně připojeným **transmembránovým glykoproteinem** (znač. gp41 nebo TM). Env je důležitý pro vazbu virionu na cílovou buňku a vstup virionu do hostitelské buňky.

Virové enzymy, které katalyzují jednotlivé procesy v rámci replikačního cyklu viru, jsou uskladněny uvnitř kapsidy. Patří mezi ně: **reverzní transkriptáza** (znač. p66/p51 nebo RT), která zprostředkovává reverzní transkripci virové RNA do provirové DNA, **integráza** (znač. p38 nebo IN), jež je zodpovědná za správné vložení (integraci) provirové DNA do genomu hostitele a **proteáza** (znač. p9 nebo PR), jejímž úkolem je posttranslační štěpení nově syntetizovaných virových polyproteinových řetězců do formy funkčních virových proteinů.

Šest doplňkových proteinů můžeme dále rozdělit na tři, které se balí do nově vznikající virové částice a tři, které si s sebou nový virion z buňky neodnáší. Mezi první tři patří **negative regulatory factor** (znač. Nef), **viral infectivity factor** (znač. Vif) a **viral protein R** (znač. Vpr). Mezi další tři potom patří **regulator of viral protein expression** (znač. Rev), **trans-activator of transcription** (znač. Tat) a **unique viral protein** (znač. Vpu). Obecně se všechny doplňkové proteiny podílejí na zneužívání biochemické mašinerie hostitelské buňky a řada z nich má také imunosupresivní funkci, např. Vif slouží k inhibici hostitelské antiretroviróvé imunitní obrany (Stanley et al., 2008), popř. regulační funkci, např. Rev slouží také jako molekulární přepínač mezi ranou a pozdní syntézou virových mRNA transkriptů (Emerman & Malim, 1998).



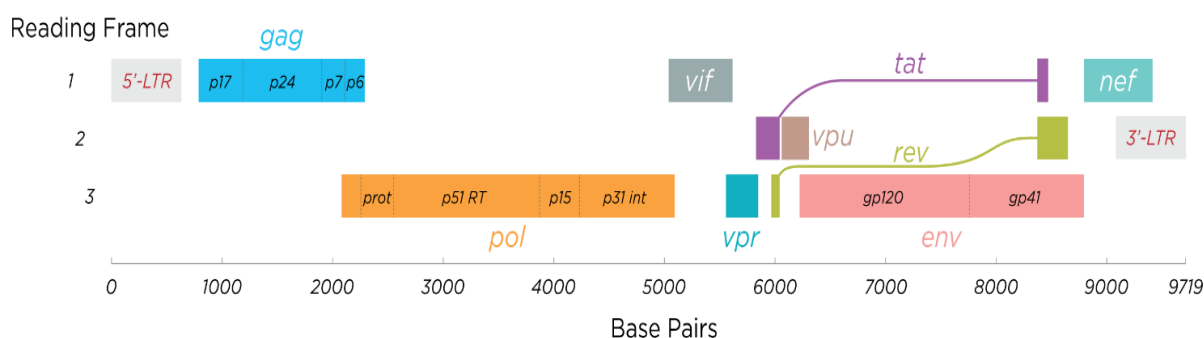
© ONDŘEJ CHALOUPKA

Obr. 3 – Schéma virové částice HIV: Šedivou barvou je vyobrazen virový obal (*coat*) a zeleně naopak virové vnitřní jádro (*core*). Zobrazeny jsou také všechny základní komponenty, ze kterých se virion HIV skládá. Proteiny Rev, Tat a Vpu nejsou baleny do nového virionu, a proto nejsou vyobrazeny. *Ilustrace:* Ondřej CHALOUPKA.

3.3 Anatomie virového genomu

Genoforem zralého virionu HIV jsou **dvě identické sense jednovláčkové molekuly RNA**. Mluvíme tedy o genomové RNA. V infikované hostitelské buňce se potom genom HIV vyskytuje ve formě provirové DNA, tj. **dvouvláčková molekula DNA**, integrovaná do genomu hostitelské buňky. Geny jsou na vlákně této virové RNA, resp. provirové DNA uspořádány v orientaci 5' → 3' v rámci tří otevřených čtecích rámců.

Třemi základními geny viru HIV (a také dalších retrovirů) jsou geny *gag*, *pol* a *env*. Mimo to genom HIV nese také další přídatné geny *nef*, *vif*, *vpr*, *rev*, *tat* a *vpu*, které kódují virové regulační proteiny (Rosypal, 2000). Lokalizaci jednotlivých genů uvádím na schématu níže (viz obr. 4).



Obr. 4 – Schéma virového genomu HIV: Vyobrazen je kompletní genom HIV se třemi základními geny *gag*, *pol* a *env* včetně naznačení jejich konkrétních produktů ve formě polyproteinů anebo jednotlivých funkčních proteinů. Zobrazeny jsou také přídatné geny *vif*, *tat*, *vpr*, *vpu*, *rev* a *nef*. Genom HIV je ohraničen na obou koncích tzv. LTR (*long terminal repeat*). Ilustrace: Thomas SPLETTSTOESSER (URL viz kap. 8.2).

O genomu HIV dále můžeme říci, že se jedná o malý genom, protože má velikost přibližně 9,7 tisíc kb (Ratner et al., 1985). Ovšem i přes tuto skutečnost u HIV pozorujeme širokou škálu různých genových produktů. To je umožněno díky tzv. alternativnímu sestřihu HIV genomu (Purcell & Martin, 1993), při kterém speciálními molekulárními mechanismy dochází k produkci mRNA transkriptů z nakombinovaných exonů, kódujících právě ony různé genové produkty.

Vzájemná stejnorodost obou přítomných genomových RNA daného virionu avšak nemusí být vždy pravdou. Výjimku představuje homologní rekombinace, která nastává v buňce v případě, že se v ní vyskytnou RNA od odlišných HIV izolátů. Tato homologní rekombinace je jedním ze zdrojů velké variability viru HIV (Burke, 1997).

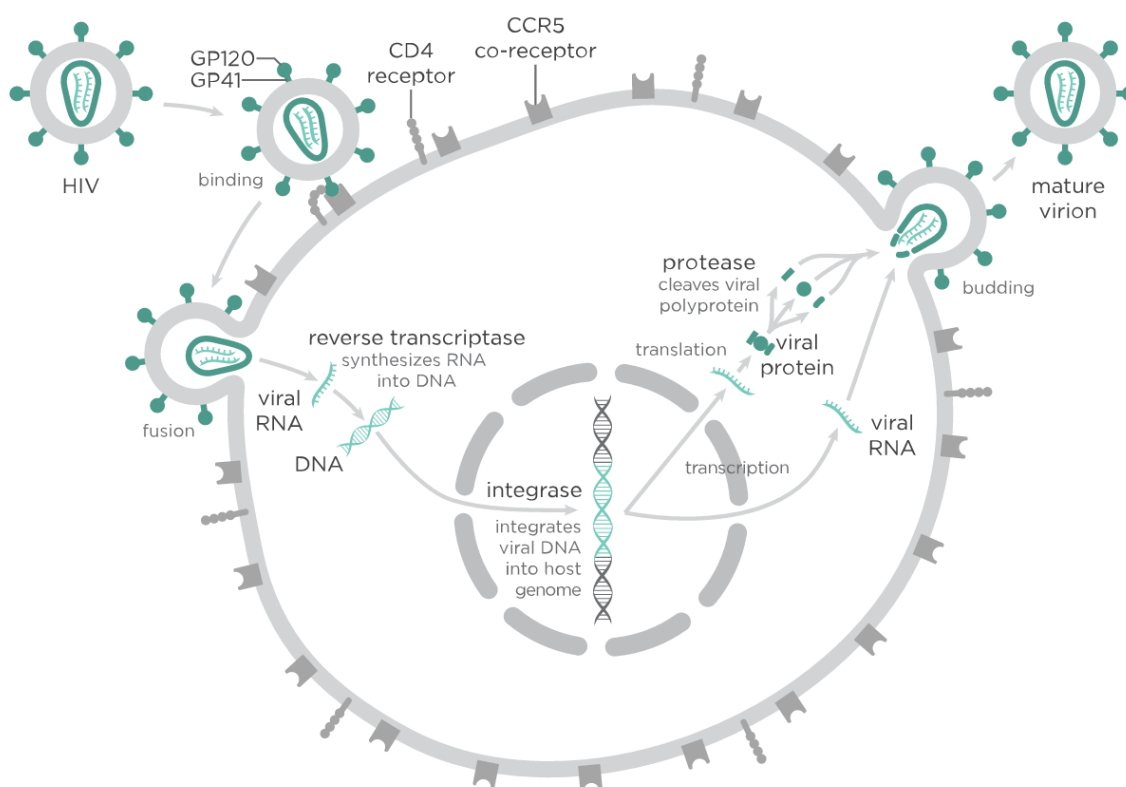
3.4 Životní cyklus viru

HIV, stejně jako ostatní viry, patří mezi sub-buněčné organismy, jejichž jakýkoliv biologický význam je evidentní pouze při jejich asociaci s živou buňkou, která poslouží jako hostitel. Pomocí různých virových mechanismů dochází k manipulaci s biochemickou mašinerií hostitelské buňky s cílem reprodukovat, popř. rekombinovat virovou dědičnou informaci a zajistit její přenos do další generace nových virových částic. Můžeme tedy říci, že „život“, lépe řečeno aktivní fáze životního cyklu HIV začíná infekcí hostitelské buňky.

HIV-senzitivní hostitelské buňky: Vstup viru do buňky je umožněn prostřednictvím interakce virových obalových glykoproteinů gp120 a gp41 s molekulami CD4 a chemokinovými koreceptory CCR5 a CXCR4, které se nacházejí na plazmatické membráně HIV-senzitivních buněk (Broder & Collman, 1997). Jestliže je virový izolát HIV schopen infikovat buňky s CCR5, mezi které patří makrofágy, označujeme jej jako M-tropní (R5) virus. Naopak pokud je virový izolát HIV schopný infikovat buňky pouze interakcí s CXCR4, mezi které patří CD4+ T-lymfocyty, označujeme jej jako T-tropní (R4) virus. Mezi buňky vnímavé k HIV patří tedy zejm. CD4+ T-lymfocyty anebo makrofágy. Zvláštností je infekce dendritických buněk, které exprimují tzv. DC-SIGN a jiné lektinové receptory jejichž prostřednictvím vážou Env nebo další povrchové struktury (Geijtenbeek et al., 2000). Tato infekce není produktivní, tedy virus se v dendritické buňce nemnoží (označujeme jako trans infekce). Dendritické buňky pohltní kompletní virion do svých buněčných kompartmentů, ve kterých ale nedochází k inaktivaci virionu nebo virion pouze obalí částí cytoplazmatické membrány. Takto je virus chráněn před neutralizačními protilátkami. Poté dendritické buňky s HIV virem vstupují jako „trojský kůň“ do lymfatických uzlin, ve kterých v rámci imunologické synapse s T lymfocyty efektivně předávají infekci (Kwon, Gregorio, Bitton, Hendrickson, & Littman, 2002).

Infekce hostitelské buňky: Povrchový glykoprotein gp120 se nejprve pomocí CD4-binding domény nekovalentně váže na CD4 molekulu hostitelské buňky. Tímto je v gp120 vyvolána konformační změna a dochází k interakci s chemokinovými koreceptory CCR5 nebo CXCR4, díky čemuž dojde k dalším konformačním změnám ve struktuře gp120 a následuje interakce gp120 s transmembránovým gp41. Další konformační změny v komplexu gp120-gp41 nakonec vyústí v odkrytí a uvolnění fúzního peptidu z gp41, který slouží jako „kotva“ virionu v plazmatické membráně buňky. Ukotvením virionu a funkcí fúzního proteinu postupně dojde ke splynutí fosfolipidové membrány virionu s buněčnou plazmalemou a výsledným uvolněním virové kapsidy do cytosolu hostitelské buňky (Chan & Kim, 1998).

Rozbalení kapsidy, reverzní transkripce a integrace do buněčného genomu: Virová kapsida se v cytosolu rozpadá a uvolněná virová RNA zároveň s tRNA^{Lys} primerem a proteiny NC, MA, Vpr, RT a IN vytváří tzv. preintegrační komplex (Miller, Farnet, & Bushman, 1997), ve kterém dochází vlivem RT ke zpětnému přepisu genomové virové ssRNA do provirové dsDNA pomocí reverzní transkripce (Rosypal, 2000). Takto vzniklá provirová DNA je stále v rámci preintegračního komplexu transportována do jádra, v němž funkcí integrázy dojde k vložení provirové DNA na náhodné místo genomu infikované buňky (Greene & Peterlin, 2002). Výsledkem integrace je poté buď latentní, nebo transkripčně-aktivní forma infekce HIV.



Obr. 5 – Schéma životního cyklu HIV: Šedé šipky naznačují průběh jednoho životního cyklu HIV. Ten začíná infekcí hostitelské buňky, pokračuje rozbalením virové kapsidy a reverzní transkripcí virové genomové ssRNA do provirové dsDNA. Ta je následně integrována do genomu hostitele a dále přepisována buďto do mRNA kódující virové proteiny, anebo do nových kopií genomické ssRNA. Cyklus je ukončen vytvořením nových virionů, které se dostávají do extracelulárního prostředí. *Ilustrace: Thomas SPLETTSTOESSER (URL viz kap. 8.2).*

Expres virových proteinů, tvorba nových virionů: Při latentní infekci dochází pouze k omezené nebo žádné tvorbě nových virionů (Karn, 2011), ale jsou transkribovány a translatovány některé virové proteiny, zejm. Nef a Vpr, přispívající k obraně buňky před antivirovým imunitním dozorem hostitele. Při produktivní aktivní infekci dochází naopak k intenzivní transkripci virových RNA a syntéze nových virových proteinů, což vede ke vzniku mnoha nových virionů. Tato fáze je podmíněna virem aktivovanou změnou procesivity

hostitelské RNA polymerázy II, což je podmínka, která umožňuje transkribovat virovou RNA plné délky. Zvýšení procesivity je iniciováno působením virového Tat proteinu, který po vazbě na cyklin T1 a cdk9 vytváří komplex, který fosforyluje RNA polymerázu II (Greene & Peterlin, 2002). Řada virových proteinů, např. Env nebo Gag, jsou nejprve syntetizovány ve formě dlouhých polyproteinů, které jsou posléze funkcí buněčných, ale i virových proteáz štěpeny na funkční proteiny (Morrow, Park, & Wakefield, 1994).

Jeden životní cyklus viru může být ukončen v okamžiku, kdy nahromaděním virionů dochází k lýze buňky a uvolnění nových virionů do extracelulárního prostředí. K cytopatickému efektu ale zároveň nemusí dojít vždy, jelikož virus HIV může v hostitelské buňce po dlouhá období perzistovat i v latentním stavu (Rosypal, 2000).

3.5 Vývoj vakcíny k prevenci HIV-1 infekce

Při přípravě vakcíny vůči HIV-1 máme na výběr několik přístupů. Jak píše Ahn & Sung, 2009, můžeme zvolit cestu kompletní inaktivované (Murphey-Corb et al., 1989), oslabené aktivní (Daniel, Kirchhoff, Czajak, Sehgal, & Desrosiers, 1992), rekombinantní podjednotkové (Berman et al., 1990), vektorem zprostředkované (Shiver et al., 2002) nebo DNA vakcíny (Kalams et al., 2013, Raška et al., 2008). Každý z těchto typů již byl na zvířecích modelech ozkoušen, avšak žádný z nich neposkytl uspokojivé výsledky, které by zahrnovaly jak přijatelnou bezpečnost, tak dostatečné navození protektivního účinku (viz Tab. I).

Tab. I – Srovnání potenciálu jednotlivých přístupů k vakcině vůči HIV-1 (dle Ahn & Sung, 2009)

Vakcína	Imunitní odpověď	Bezpečnost	Účinnost
kompletní inaktivovaná	humorální i buněčná	nejistá	nízká
oslabená aktivní	humorální i buněčná	nebezpečná	vysoká
rekombinantní podjednotková	humorální	bezpečná	nízká
vektorem zprostředkovaná	humorální i buněčná	nejistá	nízká
DNA vakcína	humorální i buněčná	bezpečná	nízká

Problém výše citovaných pokusů o tvorbu preventivní vakcíny spočíval v tom, že žádný z nich nevedl ke tvorbě široce neutralizačních protilátek (zkr. bnAbs, podrobněji viz kap. 3.6) v těle imunizovaného jedince. V současnosti právě indukce bnAbs je nejdůležitější strategií při konstrukci vakcíny proti HIV-1. Jednotlivé způsoby, jakým by tohoto mohlo být docíleno, shrnuje ve své práci Burton et al., 2012.

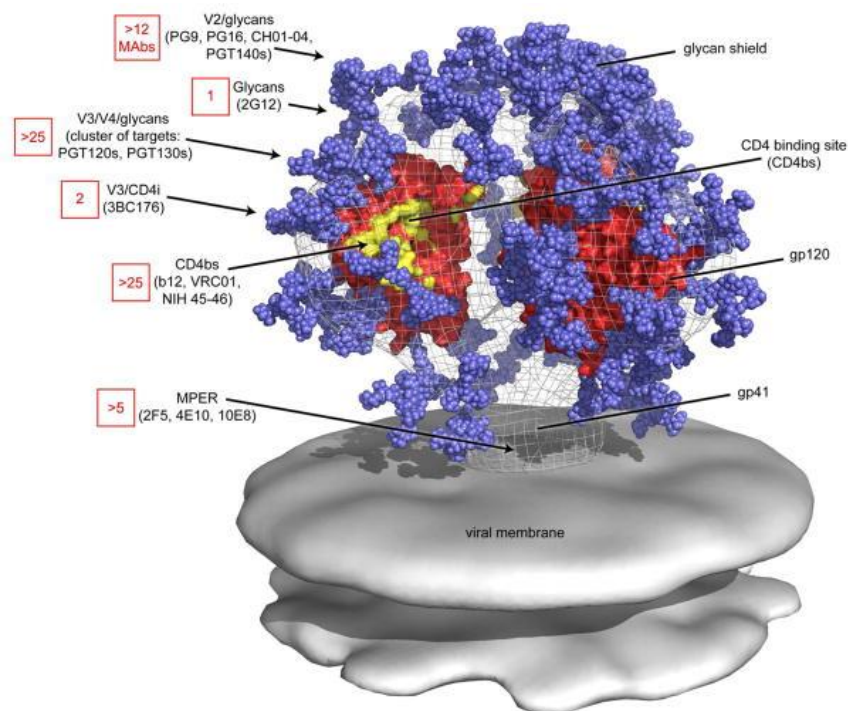
Základní otázkou spojenou se zavedením funkční vakcíny je to, jaký imunogen by bylo vhodné zvolit. Zde se opět můžeme vrátit ke shrnutí od [Ahn & Sung, 2009](#) (viz **Tab. I**) a porovnat předchozí pokusy s nově zavedeným cílem nastolením tvorby bnAbs. Vzhledem k tomu, že bnAbs jsou namířeny pouze proti antigenním epitopům na **HIV Env-výběžku** (angl. *HIV Env spike*, viz **obr. 6**), tvořeným glykoproteiny gp120 a gp41, je evidentní, že bude nutné vydat se cestou rekombinantní vakcíny založené na glykoproteinové podjednotce.

Kromě neutralizačních protilátek blokujících přímo interakci Env s CD4 nebo CCR5 či CXCR4 je nutno uvažovat i neutralizační protilátky, které jsou namířeny na povrchově exponované a od CD4 vazebného místa (zkr. CD4BS) vzdálené N-glykany, které jsou součástí glykosylačního štítu HIV Env. Mezitím, co některé N-glykany na HIV Env slouží k okluzi významných epitopů pro neutralizační protilátky, jiné N-glykany, které se podílejí na správném skládání gp120 se mohou samy stát cílem neutralizačních protilátek. Vazba neutralizačních protilátek na takové N-glykany vyvolá změnu konformace celého Env, a tím nepřímo blokuje interakci Env s CD4, CCR5 nebo CXCR4 ([Raška & Novák, 2010](#)).

Nejslibnější vlastností bnAbs je právě N-glykanová specifita některých neutralizačních protilátek. N-glykany jsou připojeny ke značně variabilní virem kódované proteinové páteři Env, ale samotná glykosylace probíhá podle metabolického nastavení hostitelské buňky. Připojené N-glykany jsou tedy co do struktury a povrchové hustoty na Env **konzervované**, a tudíž vhodné pro konstrukci univerzální vakcíny. Ovšem způsob, jakým navodit tvorbu N-glykan specifických bnAbs stále zůstává neobjasněn, přičemž největší naději pro jeho objevení můžeme nalézt u LTNPs ([Liao et al., 2013](#)).

Problémem však zůstává, že struktura HIV Env-výběžku, která jako jediná ve své nativní konformaci je schopna indukce bnAbs, je **velmi variabilní mezi jednotlivými izoláty HIV-1** ([Phogat & Wyatt, 2007](#)). Navíc, vakcíny založené pouze na monomerní formě gp120 se ukázaly být neúčinné ([Flynn et al., 2005](#)). Je tedy zapotřebí připravit konstrukt, který by co nejméně imitoval nativní strukturu HIV Env-výběžku, tj., trimerní molekula složená z gp120 a části gp41. V dnešní době bylo takových molekul zkonstruováno již velké množství, žádné z nich se však nepodařilo vyvolat tvorbu bnAbs ([Grundner et al., 2005](#); [Kang et al., 2009](#); [Li et al., 2005](#)). Nadějným imunogenem by mohl být i nedávno popsán **gp140 SOSIP**, který je jedním z dosud nejlepších solubilních antigenů napodobujících nativní Env protein (podrobněji viz kap. 3.7), jehož příprava je demonstrována v experimentální části této práce.

Další výzvu pro navození bnAbs specifických pro CD4BS, CCR5 nebo CXCR4 představuje i dostatečné „odkrytí“ antigenních epitopů. Tyto epitopy, jak je možno pozorovat na schématu níže (viz **obr. 6**), jsou stericky lokalizovány do nevýhodných pozic i v nativní formě HIV Env-výběžků (Poignard et al., 2003). Kontraproduktivně proti imunogenicitě těchto epitopů působí okolní **imunodominantní** antigenové epitopy na HIV Env, které jsou dominantním cílem imunitní protilátkové odpovědi hostitele ovšem bez neutralizační a zejména široce neutralizační aktivity (Crooks et al., 2007).



Obr. 6 – Schéma detailní struktury HIV Env-výběžku: Na virové fosfolipidové membráně (šedě) se nachází heterotrimerní struktura zvaná HIV Env-výběžek, složená z trimerního transmembránového glykoproteinu gp41 a trimerního povrchového glykoproteinu gp120 (zobrazeny jako průhledná 3D síť). Monomerní oblast gp120 jádra (červeně) obsahuje i CD4-binding doménu (žlutě). Jednotlivé glykanové výběžky (modře) kryjí povrch celé struktury. Šipky (→) poukazují na antigenové epitopy, proti kterým jsou mířeny bnAbs. Jednotlivé epitopy jsou popsány, včetně uvedení přibližného počtu bnAbs specifických pro dané místo (červený rámeček) a vyjmenování některých konkrétních bnAbs pro dané místo (info v závorce). Mimo epitopy proteinové páteře Env CD4BS a CD4i (CCR5 a CXCR4) můžeme pozorovat i epitopy založené na N-glykanech gp120 v oblastech smyček V2, V3 nebo V4 ad., které jsou konzervované a představují vhodná místa pro zacílení bnAbs. *Upraveno podle: Burton et al., 2012.*

Mimo prvního způsobu nastolení protektivního účinku pomocí bnAbs (**humorální** imunitní odpověď) se uvažuje i o zkombinování tohoto způsobu s dalším mechanismem, tj. navození protektivního účinku pomocí cytotoxických CD8+ T-lymfocytů (**buněčná** imunitní odpověď). Mezitím, co bnAbs v těle hostitele brání šíření virionů mezi buňkami, CD8+ T-lymfocyty jsou potenciálně efektivní při zničení nově vznikajícího buněčného virového rezervoáru (Hansen et al., 2011). Taková vakcína by tedy oplývala vynikajícím **fail-safe**

mechanismem, pomocí něhož by mohlo být nové infekci zabráněno hned na dvou frontách (Burton et al., 2012).

Mezi klíčové otázky, které by měly být výzkumem na poli anti-HIV vakcín zodpovězeny patří několik dalších souborných témat. Burton et al., 2012 je shrnuje takto:

- **definovat co nejvíce různých typů bnAbs** a podrobně charakterizovat všechny možné epitopy neutralizace, proti kterým jsou bnAbs namířeny
- z těchto bnAbs **vybrat takové, které poskytují nejlepší ochranu** – testováním těchto bnAbs v rámci *non-human primates* (zkr. NHP) modelů, ale i dalších (podrobněji viz kap. 3.6.)
- **navrhnout, připravit a purifikovat stabilní proteinovou vakcinační podjednotku**, která by byla co nejpodobnější přirozené formě HIV env-výběžku
- **sestavit hierarchii dominance antigenových epitopů** a následně ji využít k tomu, aby bylo možné vakcínou indukovat pouze bnAbs proti neutralizačním epitopům
- **popsat glykosylaci env heterotrimeru** a charakterizovat glykosylační profily vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že různé běžně používané buněčné expresní linie glykosylují stejný protein různým způsobem (Raška et al., 2010), v porovnání s přirozeně se vyskytujícími Env heterotrimery na povrchu HIV-1 virionů (Bonomelli et al., 2011)
- **vysvětlit vztah mezi antigenovými epitopy a B-lymfocyty** pro zajištění optimální indukce tvorby bnAbs pomocí vakcíny
- **pochopt immunologii long-term nonprogressorů**, a to, jakým způsobem umějí efektivně a přirozeně tvořit bnAbs

I přes vysokou komplexitu anti-HIV-1 vakcinační problematiky a to, jakým sofistikovaným způsobem dokáže HIV-1 v těle infikovaného časem převzít kontrolu nad imunitním systémem (Mcmichael, Borrow, Tomaras, Goonetilleke, & Haynes, 2010) se v současné době **jedna vakcína projevila jako částečně funkční v klinické studii v Thajsku – RV144** (Rerks-Ngarm et al., 2009).

V tomto případě sestával imunizační program z aplikace čtyř dávek rekombinantního kanarypox viru ALVAC-HIV kódujícího *pol* a *gag* proteiny subtypu B a Env protein subtypu CRF_AE následovaných dvěma dávkami rekombinantního proteinu gp120 subtypů B a CRF_AE AIDSVAX B/E (v rámci Global Solutions in Infectious Diseases). Tato vakcína tedy měla za cíl pokrýt varianty viru podtřídy B, dominující v Evropě a USA a CRF_AE,

dominující v oblastech jihovýchodní Asie (viz kap. 3.1). U zhruba 12 000 vakcinovaných dobrovolníků bylo pozorováno navození částečného protektivního účinku vakcínou přibližně ve 26 % případů (Rerks-Ngarm et al., 2009).

3.6 Neutralizační protilátky anti-HIV-1 a jejich testovací modely

Neutralizační protilátky (angl. *neutralizing antibodies*, zkr. nAbs) představují typ protilátek, schopných přímo zastavit (neutralizovat) vazbu patogenu na cílovou buňku a zabránit tak šíření infekce (Shibata et al., 1999). Extrémním případem mezi nimi jsou poté tzv. **široce neutralizující protilátky** (angl. *broadly neutralizing antibodies*, zkr. bnAbs), které jsou v kontextu HIV-1 problematiky schopny neutralizovat virové izoláty HIV-1 někdy až napříč různými virovými subtypy (Doria-Rose et al., 2009).

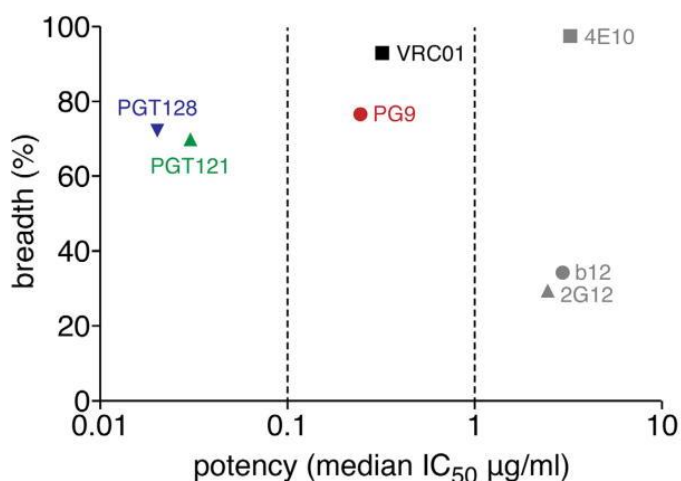
První neutralizační protilátky se začínají tvořit asi po 3. měsíci probíhající infekce (Richman, Wrin, Little, & Petropoulos, 2003). Tyto protilátky většinou ovšem neutralizují viriony, které se vyskytovaly během přenosu infekce – tzv. **founder virus** (Keele et al., 2008). Touto dobou se v těle infikovaného jedince vyskytují již nové varianty, které jsou působením těchto neutralizačních protilátek nepřímo selektovány – tzv. **escape variants**. Časový rozdíl mezi aktuálně cirkulující variantou HIV a neutralizačními protilátkami reagujícími s variantami, které cirkulovaly před několika měsíci, se v průběhu času rozšiřuje v důsledku postupně se prohlubujícího selhávání CD4⁺ T lymfocytárního poolu. Imunitní systém zjednodušeně „prodlévá“ ve tvorbě nAbs proti aktuálním variantám HIV.

Rozdílná situace ovšem nastává u asi 20 % nakažených (Liao et al., 2013), tzv. **long-term nonprogressors** (zkr. LTNPs), pacientů s dlouhodobě se neprojevujícími známkami progresu HIV infekce do pokročilých stádií (Simek et al., 2009). Z těchto se dále vyčleňuje skupina asi 1 % pacientů, tzv. **elite neutralizers**, jejichž neutralizační protilátky mají velmi široké spektrum HIV-1 variant, které efektivně neutralizují (Walker et al., 2011). U těchto pacientů zatím nepříliš pochopenými biochemickými dráhami dochází k časnému rozvoji bnAbs, a tedy ke kontrole a omezení virové infekce na minimum.

Navzdory vysoké naději, kterou pro anti-HIV-1 preventivní vakcínu bnAbs dozajista představují, čelí neutralizační protilátky i svým vlastním problémům. Jedním z těchto problémů je fakt, že mezi HIV-1 a imunitním systémem v těle infikovaného jedince od začátku infekce probíhá jakási „válka ve zbrojení“ a po nějakém čase virus v těle nakaženého mutuje a získává oproti neutralizačním protilátkám rezistenci (Liao et al., 2013, Doria-Rose et al., 2009).

Rezistenci vůči neutralizačním protilátkám získávají různé mutantní formy HIV tím způsobem, že u nich dochází k mutacím ve vysoce variabilních oblastech tzv. **flexibilních smyček HIV Env-výběžku** (Pantophlet & Burton, 2006), ale také tím, že gp120 je značnou měrou **glykosylován** a jsou to právě glykanové řetězce, které často mohou způsobovat okluzi důležitých neutralizačních epitopů na HIV Env-výběžku (Doria-Rose et al., 2009). Na druhou stranu ale mnoho bnAbs rozlišuje právě glykany, kdy neutralizace je mediována zřejmě alosterickými mechanismy.

Doposud bylo pozorováno mnoho typů bnMabs (angl. *broadly neutralizing monoclonal antibodies*) s různou neutralizační aktivitou zaměřenou proti různým virovým izolátům. Některé z nich jsou uvedeny níže (viz **graf 1**).



Graf 1 – Srovnání širokosáhlé neutralizační aktivity bnMabs a jejich testované koncentrace: Z grafu vyplývá, že bnMabs VRC01 (Wu et al., 2010) a PG9 (Walker et al., 2009) oplývají nejširší neutralizační aktivitou, ale co se týče jejich potřebné účinné koncentrace, již zaostávají za bnMabs PGT121 a PGT128 (Walker et al., 2011). Zbylé bnMabs jako např. 4E10 vykazují také velmi širokosáhlou neutralizační aktivitu, ovšem jejich účinná požadovaná koncentrace je příliš vysoká na to, aby bylo možno uvažovat o vyvolání tvorby těchto protilátek pomocí vakcíny. *Upraveno podle: Burton et al., 2012.*

Z výše uvedeného grafu vyplývá další cíl, kterého bychom se měli snažit pomocí vakcíny dosáhnout, tj. indukovat takové bnAbs, které v co nejnížší účinné koncentraci neutralizují co největší spektrum HIV-1 izolátů (Burton et al., 2012).

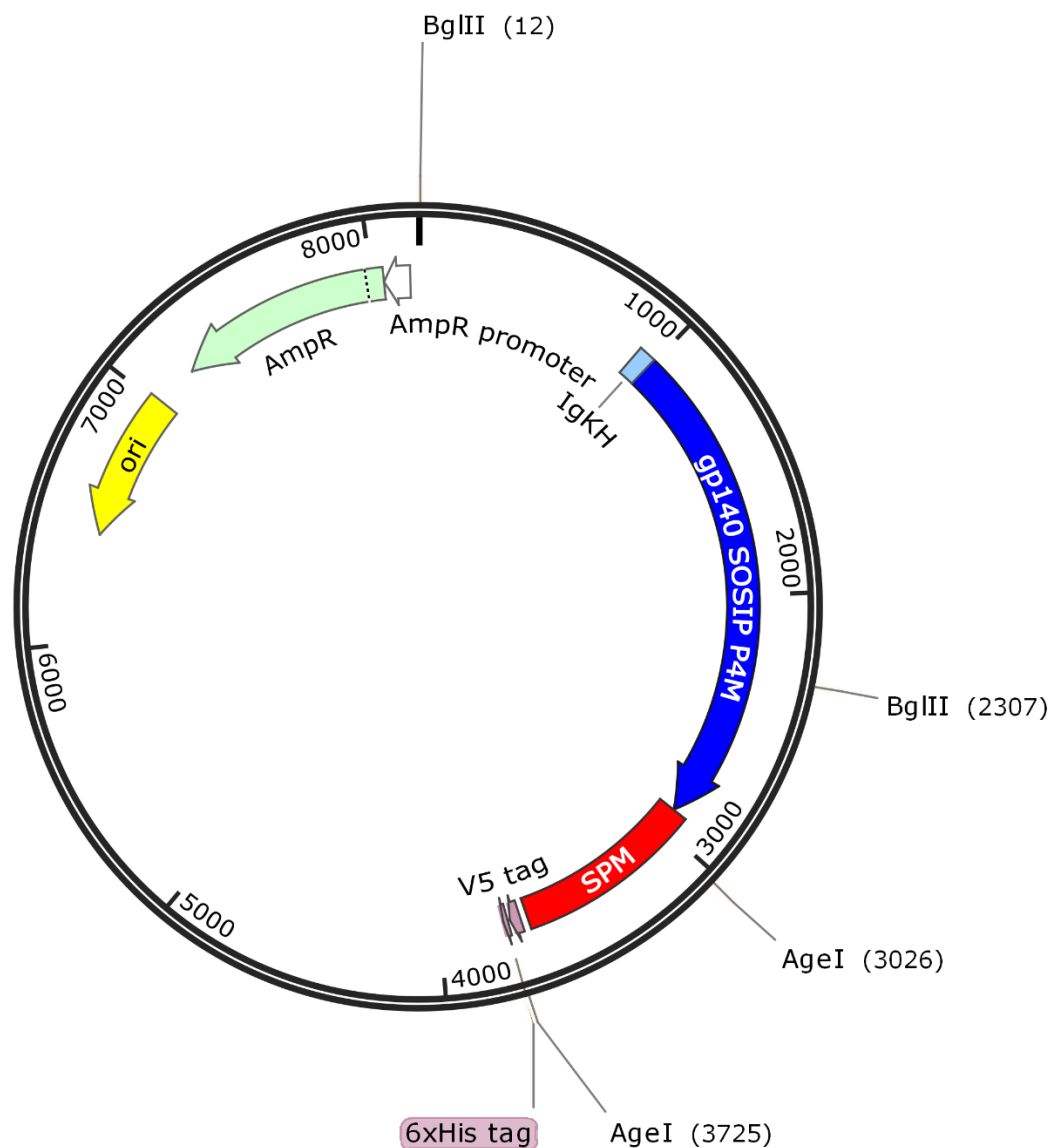
A jakým způsobem tedy vyvolat tvorbu bnAbs pomocí vakcíny? Nejvhodnější cestou se jeví zaměřit imunogeny (zejm. pak upravené HIV env-výběžky) na tzv. **unmutated common ancestors** (UCAs), což jsou naivní zárodečné linie B-lymfocytů, které by po interakci s těmito imunogeny teoreticky měly mít potenciál nastolit tvorbu bnAbs v infikovaném organismu (Xiao et al., 2009).

Jako nejvhodnější modely pro testování imunogenicity rekombinantních proteinových podjednotek pro vakcínu a vyvolání tvorby bnAbs se jeví testování založené na modelu SHIV infekci **NHP** (Burton et al., 2012). Zájem by se měl směřovat na výzkum a hodnocení protektivního účinku zejm. v oblasti nejvíce ohrožených sliznic (např. vaginální sliznice – viz Městecký et al., 2014). Široké spektrum neutralizačních protilátek a jejich expresi je možno studovat na tzv. **humanizovaných BLT modelech** (Brainard et al., 2009), což jsou modifikované buňky imunologicky významných orgánů, mezi které patří kostní dřeň (angl. *bone marrow*), játra (angl. *liver*) a brzlík (angl. *thymus*).

3.7 Glykoproteiny gp140 SOSIP

Glykoprotein gp140 je rekombinantní sekreční a solubilní konstrukt určený k co nejpřesnějšímu napodobení přirozeně se vyskytujícího HIV Env na povrchu virionu. Obsahuje **sekvenci gp120** a **zkrácenou sekvenci gp41 (gp20)**. Glykoprotein gp41 je v tomto zkrácený o hydrofobní část aminokyselinové sekvence, která jej za přirozených podmínek ukotvuje ve virové fosfolipidové membráně a dělá z něj transmembránový protein *sensu stricto* (Sanders et al., 2013).

Odstranění gp41 hydrofobní části společně s N-terminálně připojeným sekrečním signálem dochází k sekreci rekombinantního proteinu do kultury exprimujících buněk. Odstraněním transmembránové domény v gp41 však dochází ke snížení stability konstruktů gp140, což vede k rozpadu na individuální gp140 podjednotky, které jsou imunologicky málo významné. První gp140 byly koncipovány tak, že spojení gp120 a gp20 podjednotek normálně rozštěpených během procesování tvořícího se Env proteinu v Golgiho komplexu bylo zajištěno odstraněním aminokyselin v zóně přechodu gp120 v gp41, které jsou cílem zodpovědných proteáz (Sanders et al., 2013). Varianta SOSIP se liší tím, že štěpné místo je zachováno ale vazba gp120 a gp20 je stabilizována přidáním aminokyselin v okolí přechodu gp120 a gp20, které tvoří disulfidové můstky. Gp140 SOSIP má konformaci heterotrimery odpovídající více nativnímu Env na povrchu viru oproti původním gp140 (Phogat & Wyatt, 2007).



gp140 SOSIP P4M SPM+ v pcDNA3.1
8183 bp

Obr. 7 – Mapa plazmidu kódujícího gp140 SOSIP P4M SPM+: Vyobrazen je inzert gp140 SOSIP P4M SPM+, zahrnující sekvenci rekombinantního *env* konstruktů gp140 založeného na gp120 a zkráceném gp41 se SOSIP modifikací (červeně), dále sekvenci kódující SPM (tmavě modře) a také IgKH sekreční signál (světle modře). Tento inzert je klonován do vektoru pcDNA3.1 a celkově má plazmid 8183 bp. Na mapě plazmidu jsou mimo výše zmíněných sekvencí zobrazeny také restriční místa pro restriční endonukleázy *AgeI* a *BglII*, se kterými jsem pracoval v experimentální části této práce. Zobrazen je taky počátek bakteriální replikace *ori* (žlutě) a oblast genu rezistence vůči ampicilinu *AmpR* (zeleně).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Restrikční odštěpení DNA sekvence kódující SPM z plazmidu gp140 SOSIP P4M

➤ Příprava vzorků

Pro restrikční reakci bylo třeba jednotlivé reagenty naředit. Vzorky pro tento experiment byly připraveny za sterilních podmínek v laminárním boxu smícháním pracovních roztoků a neředěných speciálních pufrů pro restrikční endonukleázy v daném poměru, který je uveden v tabulce níže (viz **tab. II**). Celkový objem jednoho vzorku, a tedy i celé jedné restrikční reakce byl vždy 20 μl .

Tab. II – Příprava vzorků pro restrikční štěpení

Číslo vzorku	Objem \odot DNA (50 ng/ μl) [μl]	Objem \odot DNA (100 ng/ μl) [μl]	Objem \odot AgeI (1 U/ μl) [μl]	Objem Pufr NEB1 [μl]	Objem dH ₂ O [μl]
1.	1	-	1	2	16
2.	-	1	1	2	16

➤ Průběh restrikční reakce

Vzorky byly inkubovány v termostátovaném inkubátoru při 37 °C po dobu 1 hod 30 min.

➤ Příprava 1% agarózového gelu

Na laboratorních předvážkách bylo odváženo 0,7 g agarózového prášku. Tato navážka byla rozpuštěna v 70 ml dH₂O a ke směsi bylo přidáno 1,4 ml TAE pufru. Takto připravený 1% roztok agarózy byl v mikrovlnné troubě přiveden do varu, a po povaření 20 s bylo zkontrolováno kompletní rozpuštění agarózového prášku. Vaření bylo opakováno, dokud roztok nebyl zcela čirý. Poté byl roztok ještě krátce třikrát povařen. Ihned poté byl gel nalit do elektroforetické komory a byl do něj ihned zasunut elektroforetický hřeben pro vytvoření nanášecích jamek. Gel tuhl asi 40–60 min při laboratorní teplotě.

➤ Nanášení vzorků na gel a elektroforetické dělení DNA fragmentů

Po dokončení inkubace byly restrikční směsi smíchány v poměru 5:1 s nanášecím pufrem (20 μl směsi a 4 μl nanášecího pufru – složení: 300 μl 100% glycerol + 700 μl dH₂O + 50 μl 1% bromfenolová modř). Do první jamky gelu byly nanášeny 4 μl standardu molekulové hmotnosti (2-Log DNA Ladder 0,1–10 kb) a do dalších jamek bylo nanášeno vždy po 10 μl vzorku. Vzorky byly separovány po dobu 70 min při intenzitě elektrického pole 10 V/cm.

➤ **Barvení DNA fragmentů pomocí GelRed barviva**

Po ukončení elektroforézy byl gel obarven třepáním na laboratorní třepače v roztoku fluorescenčního interkalačního barviva GelRed po dobu 30 min.

➤ **Vyvolání výsledků pomocí UV-transiluminátoru**

Obarvený gel byl umístěn do UV-transiluminátoru a pomocí laboratorního software Carestream MI Standard Edition™ byl pořízen snímek (elektroforetogram zobrazující rozdělené fragmenty DNA, viz výsledky – obr. 9).

4.2 Klonování upraveného plazmidu

➤ **Extrakce DNA fragmentu z agarózového gelu**

Experiment č. 4.1 byl zopakován s větším množstvím DNA za identických podmínek pouze s tím rozdílem, že agarózový gel byl před obarvením rozříznut na dvě části. První část gelu v rámci své první dráhy nesla rozdělený marker molekulové hmotnosti a v rámci své druhé dráhy nesla rozdělenou DNA odpovídající linearizovanému plazmidu s odstraněnou SPM sekvencí. První část gelu byla obarvena v GelRed. Druhá část gelu měla obsazenou pouze jednu dráhu, a to také rozdělenou DNA, která odpovídala linearizovanému plazmidu s odstraněnou SPM sekvencí. Po přiložení obou částí gelu k sobě byla nepřímou pozorována pozice separovaného DNA fragmentu na druhé části gelu pomocí „svítící“ pozice DNA fragmentu na první části gelu. Z gelu byl následně pomocí skalpelu odříznut kousek, který na sobě nesl identifikovanou DNA bez SPM sekvence, která nebyla obarvena GelRed ani vystavena UV záření.

➤ **Izolace a purifikace DNA z gelového fragmentu**

Následující postup byl proveden na základě protokolu **QIAquick® Gel Extraction Kit**. Do termobloku byl umístěn eluční pufr k předehřátí na cca 50 °C. Následně byl kousek agarózového gelu s DNA upraven tak, aby vážil 400 mg. K agarózovému gelu bylo přidáno 1,2 ml komerčního pufru QG. Gel s pufrem QG byl přibližně 10 min při teplotě 50 °C inkubován v termobloku s přerušovaným vortexováním mikrozkuhavky každé 2–3 min, aby se agarózový gel úplně rozpustil a do pufru se uvolnila DNA. K roztoku rozpuštěné agarózy s DNA bylo přidáno 400 µl izopropanolu. Následně byla připravena kolonka QIAquick spin column a umístěna do speciální sběrné mikrozkuhavky. Na tuto kolonku bylo nanášeno vždy max. 800 µl roztoku DNA a provedena centrifugace (1 min; 13 000 RPM). Objem, který kolonkou protekl do sběrné mikrozkuhavky byl odstraněn. Na membráně kolonky tak zůstal

precipitát DNA. Poté bylo na kolonku naneseno 500 μl pufru QG a znovu centrifugováno (1 min; 13 000 RPM). Objem, který kolonkou protekl, byl opět odstraněn. Dále bylo na kolonku naneseno 750 μl promývacího pufru PE a znovu dvakrát centrifugováno (1 min; 13 000 RPM). Veškerý promývací pufr PE membránou protekl. Následně byla kolonka nechána 5 min stát při laboratorní teplotě, aby došlo k úplnému odpaření zbytkového ethanolu z pufru PE. Nakonec byla kolonka s DNA umístěna do nové čisté sběrné mikroskopické misky, a na ni naneseno 30 μl elučňívacího pufru EB a centrifugováno (1 min; 13 000 RPM). Do sběrné mikroskopické misky byla tímto způsobem vyizolována purifikovaná DNA.

➤ Ligace DNA fragmentu

Následující postup byl prováděn na základě protokolu **Invitrogen™ T4 DNA Ligase**. Nejprve byl do sterilní mikroskopické misky připraven roztok ligázy (viz **tab. III**), který byl posléze použit pro přípravu kompletní ligační směsi (viz **tab. IV**). Ligace probíhala v mikroskopické misce za sterilních podmínek při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Poté byla nově ligovaná plazmidová DNA ihned použita k transformaci bakterií za účelem amplifikace této DNA.

Tab. III – Příprava roztoku ligázy

Reagencie	Objem [μl]
T4 DNA ligáza	0,5
5 \times ligační pufr	1
dH ₂ O	4

Tab. IV – Příprava ligační směsi

Reagencie	Objem [μl]
DNA	0,6
roztok ligázy	1
5 \times ligační pufr	4,0
dH ₂ O	14,4



4.3 Transformace prokaryot – amplifikace plazmidové DNA

➤ Příprava růstového média pro bakterie

Do velké autoklávovatelné nádoby byl odměřen 1 l destilované vody, a k tomuto objemu přidáno 20 g růstového média Luria Bertani. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Dále v laminárním boxu byl k médiu přidán 1 ml antibiotika amplicinu (100 mg/ml). Médium bylo nalito na Petriho misky zhruba do poloviny její celkové výše a ponecháno utuhnout.

➤ Transformace kompetentních bakterií pomocí heat shocku

Následující postup byl proveden na základě protokolu **Invitrogen™ Basic Transformation Procedure, Continued**. Do sterilní mikroskopické misky bylo napipetováno 25 μl bakteriální suspenze **One Shot® TOP10** smíchané s 5 μl ligační směsí z předchozího experimentu, která 4 ng DNA. Poté byla suspenze inkubována na ledu po dobu 30 min. Následovala samotná

transformace pomocí heat shocku v termostátovém inkubátoru (42 °C; 30 s). K bakteriální suspenzi bylo následovně přidáno 250 µl SOC média a suspenzi byla znovu inkubována (37 °C; 1 hod). Na růstové médium bylo nanášeno jednou 50 a podruhé 150 µl transformované bakteriální suspenze. Kultivace probíhala přes noc.

➤ Kultivace bakteriální suspenze

Do předem přichystaných 10 sterilních zkumavek bylo napipetováno 7 ml tekutého kultivačního LB média. V laminárním boxu bylo poté z každé Petriho misky odebráno 5 vybraných transformovaných kolonií a pomocí sterilní špičky jimi proběhla inokulace tekutého kultivačního média. Těchto 10 suspenzí bylo kultivováno (37 °C; 10 hod) za mírného třepání v inkubátoru.

➤ Izolace plazmidové DNA z bakteriální suspenze

3,5 ml z každé z 10 rozrostlých bakteriálních suspenzí bylo centrifugováno (10 000 RPM; 10 min). Tento krok byl opakován ještě 2×, aby bylo získáno co nejvíce bakteriálního sedimentu na dně mikrozkušavky. DNA byla z bakterií vyizolována využitím protokolu **QIAprep Spin Miniprep Kit**.

➤ Ověření izolovaného plazmidu pomocí restrikční analýzy

Izolovaný plazmid byl ověřen restrikční analýzou s restrikční endonukleázou *Bgl*III (příprava vzorku viz **tab. V**). Postup byl identický jako v prvním experimentu (viz kapitola 4.2). Výstupem byl elektroforetogram zobrazující předpokládané rozdělení plazmidové DNA na 2 fragmenty (viz výsledky – **obr. 10**).

Tab. V – Příprava vzorku pro restrikční analýzu

Reagencie	Objem [µl]
⊙ DNA	0,5
⊙ <i>Bgl</i> III	0,2
⊙ BSA	0,1
Pufr NEB 3	2
dH ₂ O	17,2

4.4 Transfekce eukaryot – biosyntéza proteinů

➤ Rozmražení buněk, založení nové buněčné kultury

Savčí expresní buňky linie **HEK 293 FreeStyle™ Expression System**; 7. pasáž; zamraženy 18. 11. 2013, byly rozmraženy a za sterilních podmínek v laminárním boxu přeneseny do sterilní kultivační nádoby s přídavkem 30 ml kultivačního média (Gibco® Opti-MEM™). Buněčná kultura byla kultivována v termostatovaném inkubátoru při 37 °C do té doby, než dosáhla požadované hustoty.

➤ Počítání buněk a pasážování tkáňové kultury

Pro kontrolu růstu tkáňové kultury bylo pravidelně prováděno počítání buněk při vitálním barvení buněk. Z buněčné kultury bylo vždy po několika dnech do mikrozkušavky odebráno 10 µl a smícháno s 10 µl trypanové modři. Do Bürkerovy komůrky bylo nanášeno 10 µl tohoto vzorku a počítány byly pouze živé buňky (ve čtvercích 1, 3, 7, 9 včetně jejich horní a levé hrany – viz **obr. 8**).

1	2	3
4	5	6
7	8	9

Obr. 8 – Schéma počítání buněk v Bürkerově komůrce: Čísla představují jednotlivé čtverce v rámci Bürkerovy komůrky. V mém postupu bylo počítáno pouze s buňkami, které se nacházely v prostoru tučně vyznačených čtverců a jejich horních a levých označených hran. *Ilustrace:* ONDŘEJ CHALOUPKA.

Výsledné hodnoty počítání buněk byly získány pomocí obecného vzorce:

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

Po dosažení spočítaného počtu živých buněk v rámci 4 čtverců:

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

Tímto způsobem bylo zjištěno, že v aktuální pasáži s pořadovým číslem 8 se nacházely asi 2 milióny buněk na ml. Kultury byly naředěny („zpasážovány“) tak, aby byl získán optimální počet buněk pro umožnění transfekce plazmidy gp140 SOSIP P4M s a bez SPM sekvence (asi 1 milión buněk na ml v rámci 30 ml média – smícháno bylo 15 ml původní kultury s 15 ml čerstvého kultivačního média).

➤ **Transfekce eukaryotních buněk**

Byla připravena směs 160 µl 293fektinu s 2 ml kultivačního média. Dále byla připravena směs 80 µl daného plazmidu s 2 ml kultivačního média. Obě směsi byly nejprve odděleně inkubovány za laboratorní teploty po dobu 5 min a posléze byly smíchány dohromady a znovu inkubovány při laboratorní teplotě, tentokrát po dobu 15 min. Vznikla tak kompletní transfekční směs, která byla po 2 ml přidána k jednotlivým buněčným kulturám. Transfekované buněčné kultury byly kultivovány po dobu 3 dní.

➤ **Purifikace syntetizovaného proteinu ze supernatantu pomocí Ni-NTA**

30 ml transfekované buněčné kultury bylo přeneseno do centrifugační zkumavky a centrifugováno (1500 RPM; 8 min). Získaný supernatant byl odebrán a byly k němu přidány 3 ml „adapting“ pufru a následně 0,8 ml Ni-NTA. Supernatant byl přes noc umístěn na rotátor do chladu. Ze supernatantu byly purifikovány glykoproteiny gp140 SOSIP P4M s a bez SPM modulu pomocí metalochelatační chromatografie v kolonovém uspořádání. Nejprve byla v nádobě se supernatantem smíchaným s Ni-NTA agaróza ponechána se usadit na dno (30 až 60 min). Supernatant bez Ni-NTA byl poté přenesen do čisté nádoby. Zbytek supernatantu s Ni-NTA byl nanesen na kolonu (proteklá frakce označena jako „flow-through“). Na kolonu bylo dále nanesen 2× 5 ml „binding“ pufru (frakce „binding 1“ a „binding 2“). Eluce probíhala nanesením 5× 2 ml elučního pufru (eluční frakce 1 až 5). Purifikace probíhala při 4 °C.

➤ **Zakoncentrování proteinu a převod do PBS**

Do speciálních centrifugačních filtračních kolonek (*centrifugal filter units*; < 20 kDa) byly přeneseny postupně všechny eluční frakce. Po vyvážení a centrifugaci (3800 RPM; 8 min; 4 °C) následovalo promytí kolonek 3× nanesením 2 ml PBS a opětovnou centrifugací. Poté byl zbytek PBS s rozpuštěným proteinem přenesen do čistých mikrozkušavek. Mgr. Lucia Barkocziová v tomto bodě také porovnávala proteiny z hlediska výtěžku (viz **obr. 14**).

➤ **Ověření nově syntetizovaných proteinů pomocí SDS-PAGE a WB**

Vzorky zakoncentrovaných proteinů gp140 SOSIP P4M SPM+ a gp140 SOSIP P4M SPM- byly detekovány použitím western blot techniky pomocí protilátek anti-HIS.

➤ **Příprava 10% polyakrylamidového gelu**

Vnitřní a vnější sklo pro SDS-PAGE bylo důkladně očištěno dH₂O a odmaštěno ethanolem a osušeno. Do skleněných kádinek byly připraveny roztoky pro přípravu dělicího a zaostřovacího polyakrylamidového gelu smícháním daných reagensů (viz **tab. VII**).

Tab. VII – Příprava 10% polyakrylamidového gelu

Vrstva PAA 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
zaostřovací	-	2,5	1,3	6,2	50	10

Polymerizační činidlo APS a TEMED bylo přidáváno do roztoku vždy až těsně před nalitím dané vrstvy gelu mezi skla. Nejprve byla mezi skla napipetována dělicí vrstva gelu tak, aby zbyl dostatek místa pro zaostřovací vrstvu. Na hladinu dělicího gelu byl nanesen n-butanol a gel byl ponechán polymerizovat přibližně 20–30 min. Následně byla vrstva n-butanolu ze ztuhlého gelu vymyta ddH₂O. Po namíchání roztoku pro zaostřovací gel byl i tento nanesen na dělicí gel mezi skla až po jejich horní okraj, načež do této vrstvy byl také ihned zasunutý elektroforetický hřeben pro vytvoření potřebného počtu jamek.

➤ Nanášení vzorků na gel

Gel byl umístěn do sestaveného elektroforetického tanku (Miniprotean II), který byl naplněn roztokem SDS (1 g / 100 ml). Do první jamky bylo pipetováno 4 μl standardu molekulových hmotností (Precision Plus Protein TM Dual Xtra Standards), do dalších potom vždy 1,5, 2,5 nebo 5 μl vzorku proteinu s SPM a bez SPM jak za redukujících, tak neredukujících podmínek. Vzorky byly separovány při konstantním napětí 150 V po dobu 1 hod 5 min.

➤ Western blotting

PVDF membrána a nastříhané kousky filtračního papíru byly zvlhčeny pár vteřin v methanolu, následně dalších 5 min v dH₂O a potom zhruba 50 min v Tobwinově pufru. Poté byl sestaven „sendvič“ typický pro western blotting (filtrační papíry, membrána, gel, filtrační papíry v uvedeném pořadí). Blotování probíhalo při konstantním proudu 250 mA na jeden gel (Miniprotean II) po dobu 2 hod.

➤ Zablokování membrány, inkubace s protilátkou a promývání

Po ukončení blotování byla membrána vyjmuta z blotovacího zařízení a vložena do misky s 12 ml 1× PBS a po 5 min přenesena do druhé misky s 12 ml blokovacího roztoku SUPERBLOK (1% roztok BSA + (v/v) 0,05% roztok Tweenu 20 v 1× PBS). Membrána byla blokována přes noc při ±4 °C. Ke 12 ml blokovacího roztoku s membránou bylo přidáno 1,2 μl protilátky anti-HIS konjugované s HRP (ředění v poměru 1:10000) a inkubováno po dobu

2 hod při laboratorní teplotě. Poté byla membrána 3× promyta v 0,05% roztoku Tweenu 20 v 1× PBS vždy po dobu 30 min, a poté 2× promyta v roztoku 1× PBS po dobu 15 min. Na závěr bylo na membránu nanášeno 2 ml luminolu a 2 ml příslušné reagentie z kitu SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate.

➤ Výsledky WB

Chemiluminiscenční signál byl zaznamenán na fotografický papír (CL-XPosure Film). Nejprve byl film přiložen na membránu v průhledné fólii umístěné v expoziční fotokazetě (doba expozice cca 1 min). Dále byl fotografický papír na 2 min umístěn do vývojky, opláchnut destilovanou vodou s 1% CH₃COOH a následně umístěn do ustalovače. Byly tak získány elektroforetogramy (viz výsledky – obr. 10, 11) zobrazující intenzitu a pozici proužků odpovídajících gp140 proteinů bez a s SPM modulem. Molekulová hmotnost proužků zjištěná z elektroforetogramu byla porovnána s teoretickou molekulovou hmotností podle programu Protein Molecular Weight (http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

4.5 Porovnání štěpení gp140 SOSIP SPM+ a SPM– furinem

➤ Příprava vzorků pro štěpení proteinu gp140 SOSIP SPM+ a SPM– pomocí furinu

Do čtyř mikrozkuvek byly postupně napipetovány proteiny a reagentie (viz tab. VI). Byly tak připraveny 4 vzorky a každý měl celkový objem 10 µl. Vzorky byly následně umístěny do inkubátoru a reakce probíhala přibližně 16 hod při teplotě 37 °C.

Tab. VI – Příprava vzorků pro porovnání štěpení glykoproteinů furinem

Vzorek	Protein [µl]	HEPES [µl]	Ca ²⁺ [µl]	TRITON [µl]	Furin [µl]	Voda [µl]	Celkový objem [µl]
SPM+ (furin)	5	1	1	1	0,5	1,5	10
SPM+ (kontrola)	5	1	1	1	-	2	10
SPM– (furin)	2	1	1	1	0,5	1,5	10
SPM– (kontrola)	2	1	1	1	-	2	10

Po uběhnutí inkubační doby byl objem každého vzorku rozdělen na půl, tj. došlo k přípravě 4 párů vzorků o objemu 5 µl. Dále bylo ke každému z těchto nyní 8 vzorků přidáno 5 µl nanášecího pufru – 4 vzorky byly smíchány s 2× redukujícím nanášecím pufrům (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol + 2,3 g SDS + 5 ml merkptoethanol + 37,5 ml dH₂O + upravit pH na 6,8) a stejné 4 vzorky poté s neredukujícím nanášecím pufrům (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol +

2,3 g SDS + 37,5 ml dH₂O + upravit pH na 6,8). Před samotným nanesením vzorků na polyakrylamidový gel byly vzorky zdenaturovány při 97 °C v termostatovaném inkubátoru.

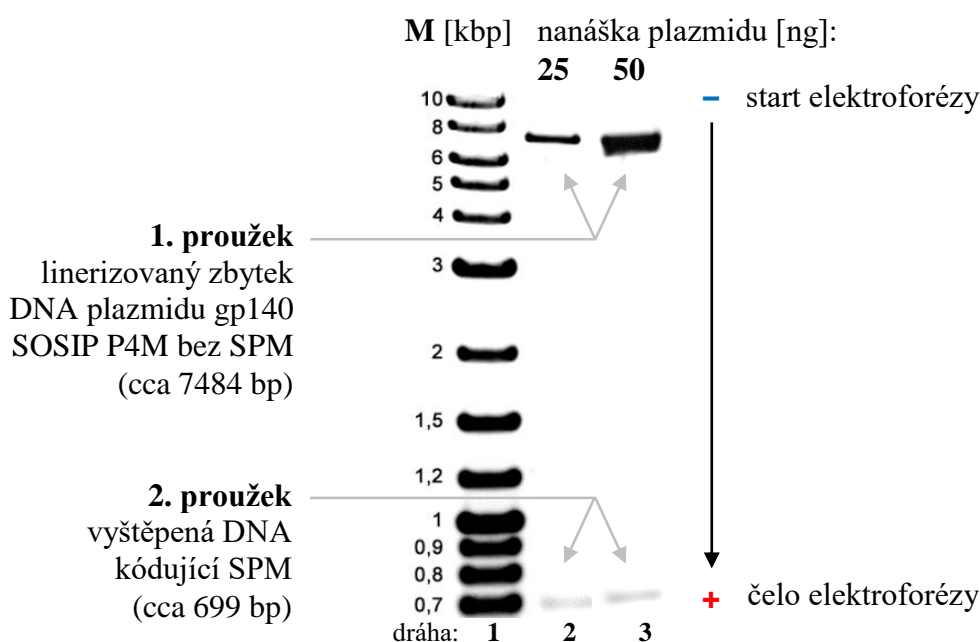
➤ **SDS-PAGE a průběh WB**

Postup byl stejný, jako je popsáno v předcházející kapitole s tím rozdílem, že proteiny byly ošetřeny proteinázou furinem a po ostripování membrány detekovány kromě protilátky anti-HRP, také protilátkou anti-gp120. Výstupem byl elektroforetogram (viz výsledky – **obr. 12**) zobrazující intenzitu a pozici proužků odpovídajících gp140 proteinů štěpených furinem.

5 VÝSLEDKY

5.1 Restrikční odštěpení DNA sekvence kódující SPM z plazmidu gp140 SOSIP P4M

Byla provedena restrikce DNA gp140 SOSIP P4M SPM+ v pcDNA3.1 pomocí enzymu *AgeI* s cílem odstranit z plazmidu DNA sekvenci kódující SPM (viz obr. 8).



Obr. 9 – Odstranění SPM sekvence z gp140 SOSIP P4M pomocí restrikční endonukleázy *AgeI*: Do první jamky byl nanesen standard molekulové hmotnosti (M), do druhé a třetí jamky byly naneseny 25 a 50 ng nanášky plazmidu gp140 SOSIP P4M štěpených odpovídajícím množstvím enzymu *AgeI*. Na druhé a třetí dráze se nacházely vždy dva bandy – horní, který korespondoval s teoretickou délkou 7484 bp (zbývající část sekvence DNA plazmidu gp140 SOSIP P4M) a dolní, který odpovídal teoretické délce 699 bp (DNA kódující SPM).

Na elektroforetogramu restrikční reakce s enzymem *AgeI* (viz obr. 9) bylo průkazné zkrácení plazmidu gp140 SOSIP P4M SPM+ o DNA úsek kódující SPM. Hodnocení elektroforetogramu je shrnuto níže (viz tab. VIII).

Tab. VIII – Hodnocení elektroforetogramu restrikčního štěpení s *AgeI*

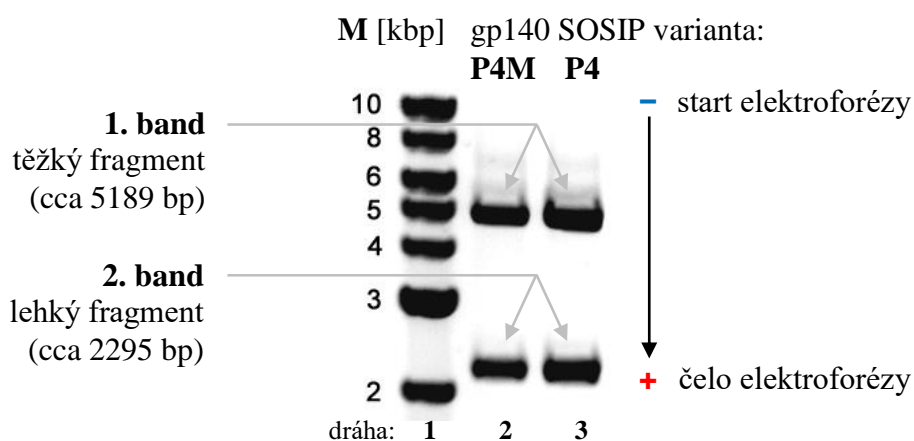
Dráha	Množství pDNA [ng]	Použitý enzym	Poměr enzym:pDNA	Identifikace bandů
1	-	-	-	standard molekulové hmotnosti
2	25	<i>AgeI</i>	1 U:25 ng	(1.) plazmid zkrácený o SPM (2.) DNA kódující SPM
3	50	<i>AgeI</i>	1 U:50 ng	(1.) plazmid zkrácený o SPM (2.) DNA kódující SPM

5.2 Klonování upraveného plazmidu

Restrikcí plazmidu gp140 SOSIP P4M v pcDNA3.1 enzymem *AgeI*, separací v gelu a následnou izolací z gelu bylo získáno 3,6 µg zkráceného plazmidu o čistotě 1,89.

5.3 Transformace prokaryot – amplifikace plazmidové DNA

Zachování správné integrity plazmidové DNA bylo ověřeno pomocí restriční analýzy s restriční endonukleázou *BgIII* (viz obr. 10).



Obr. 10 – Restriční analýza plazmidu gp140 SOSIP P4M a P4 bez SPM: Do první jamky byl nanesen standard molekulové hmotnosti (M), do druhé jamky byl nanesen gp140 SOSIP P4M bez SPM štěpený *BgIII* a do třetí jamky byl nanesen gp140 SOSIP P4 bez SPM štěpený *BgIII* (uvedený pro srovnání mé práce s prací Mgr. Lucie Barkocziové, která paralelně se mnou připravovala odlišnou variantu plazmidu). Na druhé a třetí dráze se nacházely dle očekávání dva bandy – horní, který korespondoval s teoretickou délkou 5189 bp a dolní, který odpovídal teoretické délce 2295 bp.

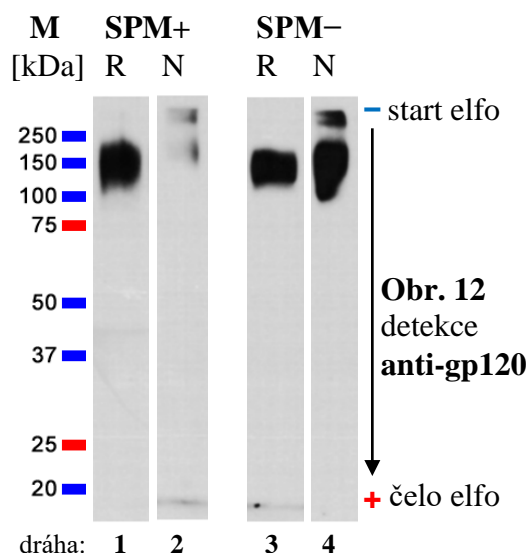
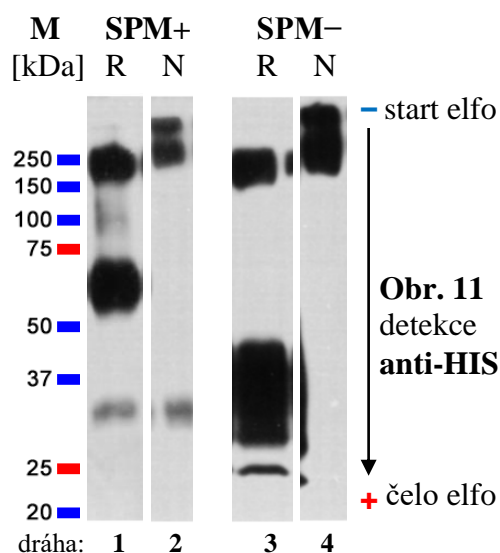
Podle *in silico* predikce štěpí enzym *BgIII* zaligovanou DNA plazmidů gp140 SOSIP P4M a P4 v pcDNA3.1 zkrácenou o SPM za vzniku fragmentů o velikostech 5189 a 2295 párů bazí. Restriční analýza připraveného plazmidu (viz obr. 10) odpovídá predikci a potvrdila tak zachování správné integrity připraveného konstruktu. Hodnocení elektroforetogramu je shrnuto níže (viz tab. IX).

Tab. IX – Hodnocení elektroforetogramu restričního štěpení s *BgIII*

Dráha	Množství pDNA [ng]	Použitý enzym	Poměr enzym:pDNA	Identifikace proužků
1	-	-	-	standard molekulové hmotnosti
2	50	<i>BgIII</i>	1 U:50 ng	(1.) těžký fragment (2.) lehký fragment
3	50	<i>BgIII</i>	1 U:50 ng	(1.) těžký fragment (2.) lehký fragment

5.4 Transfekce eukaryot – biosyntéza proteinů

Pro biosyntézu proteinu byla vybrána buněčná linie **HEK 293 FreeStyle**, do které byly transfekovány dva plazmidy: gp140 SOSIP P4M SPM+ anebo gp140 SOSIP P4M SPM-. Proteiny byly izolovány tři dny po transfekci a purifikované proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a WB s pomocí protilátek anti-HIS a anti-gp120 (viz obr. 11 a 12).



Obr. 11 a 12 – Western blot gp140 SOSIP P4M s a bez SPM, detekce anti-HIS a anti-gp120: Do první jamky byl nanesen standard molekulové hmotnosti (M), do druhé a třetí jamky bylo naneseno 2,5 μ l proteinu s SPM (SPM+) za redukujících (R), resp. neredukujících (N) podmínek. Do čtvrté a páté jamky bylo naneseno 2,5 μ l proteinu bez SPM (SPM-) taktéž jednou za redukujících (R) a podruhé za neredukujících (N) podmínek. Proteiny byly nejprve detekovány pomocí protilátky anti-HIS a po ostriřování membrány i pomocí protilátky anti-gp120.

Popis jednotlivých proužků detekovaných pomocí protilátky anti-HIS (viz obr. 11) shrnut do tabulky níže (viz tab. X).

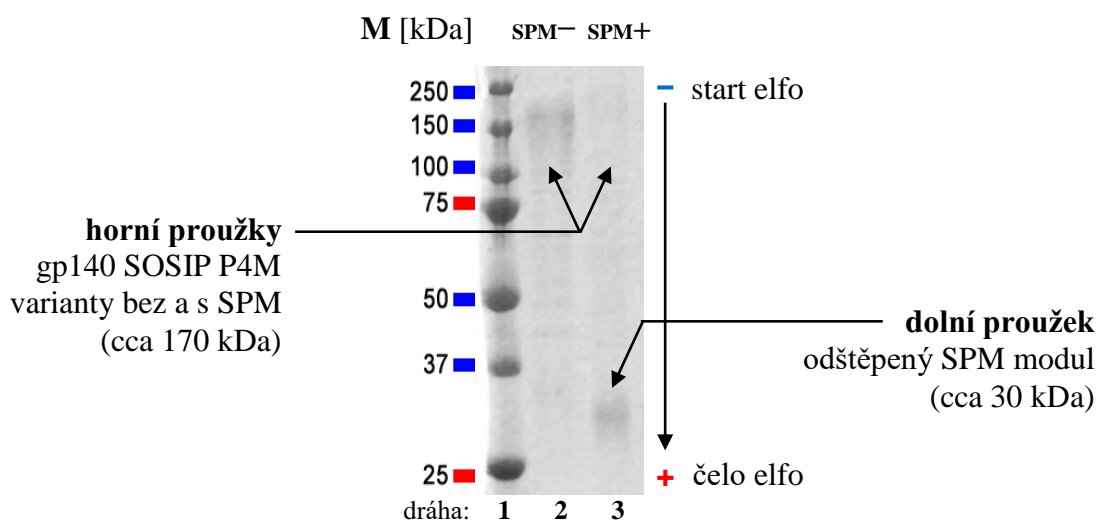
Tab. X – Hodnocení WB gp140 SOSIP P4M SPM \pm detekovaných pomocí anti-HIS

Dráha	Vzorek	Podmínky	Identifikace proužků	Molekulová hmotnost
1	protein SPM+	redukující	(1.) gp120 + gp20 + SPM + HIS (2.) gp20 + SPM + HIS (3.) SPM + HIS	(1.) cca 170 kDa (2.) cca 50 kDa (3.) cca 30 kDa
2	protein SPM+	neredukující	(1.) gp120 + gp20 + SPM + HIS (2.) SPM + HIS	(1.) cca 170 kDa (2.) cca 30 kDa
3	protein SPM-	redukující	(1.) gp120 + gp20 + HIS (2.) gp20 + HIS (glykosyl.) (3.) gp20 + HIS (deglykosyl.)	(1.) cca 140 kDa (2.) cca 25–45 kDa (3.) cca 25 kDa
4	protein SPM-	neredukující	(1.) gp120 + gp20 + HIS	(1.) cca 140 kDa

Proužek o hmotnosti okolo 170 kDa detekovaný protilátkou anti-HIS (rozlišující C'-terminálně umístěnou HIS značku) odpovídá monomeru gp140 SOSIP P4M s SPM. Tento monomer nebyl během syntézy buňkou rozštěpen v místě přechodu mezi gp120 a gp20 (viz **obr. 11**). Detekce protilátkou anti-gp120 však ukazuje přítomnost obou forem, což můžeme pozorovat jakožto mírný posun proužku směrem níže (viz **obr. 12**). Tento proužek obsahuje neštěpený gp140 SOSIP s SPM s odhadovanou hmotností 180kDa a odštěpený gp120 (bez 6× HIS značky) s odhadovanou hmotností 120 kDa. Přítomnost gp120 odpovídá zpracování proteinu buňkou tak, jak bylo při designu SOSIP verze předpokládáno. Správnému štěpení SOSIP nasvědčuje i proužek o hmotnosti 60 kDa při detekci anti-HIS, který odpovídá podjednotce gp20 s SPM, která se od podjednotky gp120 odděluje za redukujících podmínek. Závěr je potvrzen i tím, že tento proužek není detekován protilátkou proti gp120.

Pomocí WB byl tedy identifikován jak rekombinantní protein gp140 SOSIP P4M s SPM modulem, tak protein bez SPM modulu. Přítomnost více proužků za redukujících i neredukujících podmínek adekvátně odpovídá několika molekulárním formám, ve kterých se tyto rekombinantní proteiny po izolaci z expresního systému přirozeně vyskytují. Charakter jednotlivých proužků je podrobně rozebrán v diskuzi (viz kap. 6).

Výtěžky obou variant glykoproteinu gp140 SOSIP P4M (s SPM a bez SPM) byly porovnány metodou SDS-PAGE a barvením v Coomassie Brilliant Blue (tento krok provedla kolegyně Mgr. Lucia Barkocziová). Jak je patrné z elektroforetogramu níže (viz **obr. 14**), výtěžek varianty bez SPM byl významně vyšší nežli výtěžek varianty s SPM.

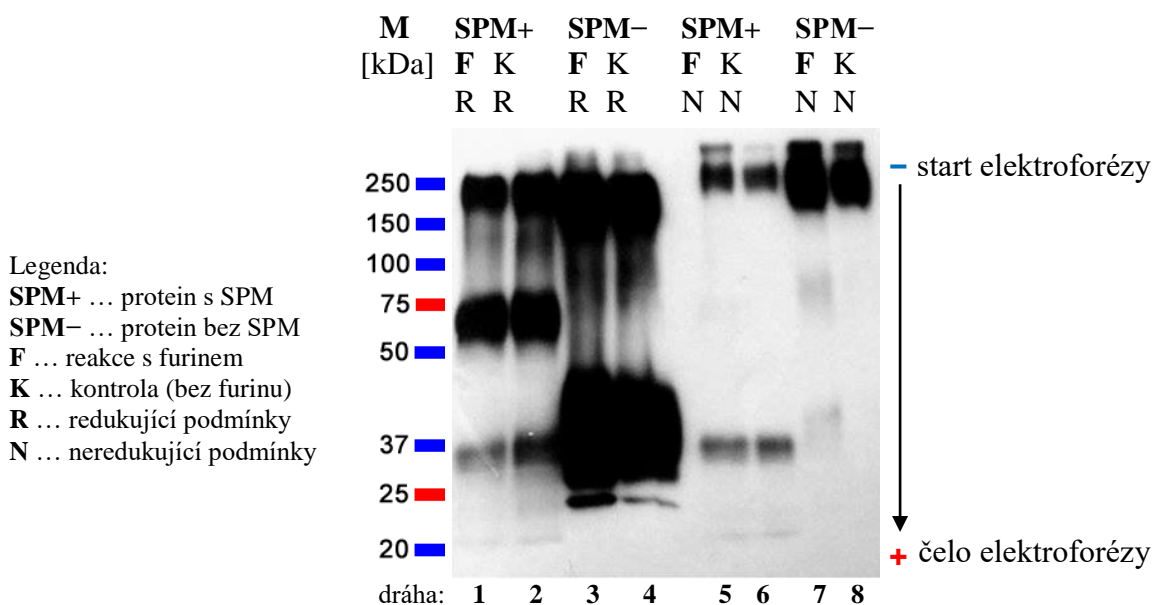


Obr. 14 – Porovnání výtěžků gp140 SOSIP P4M s SPM a bez SPM: Do první jamky byl nanesen standard molekulové hmotnosti, do druhé jamky nanáška 5 μ l zakoncentrovaného proteinu gp140 SOSIP P4M bez SPM (SPM-) a do třetí jamky stejná nanáška 5 μ l zakoncentrovaného proteinu gp140 SOSIP P4M s SPM (SPM+). Z porovnání denzity horních proužků zobrazujících gp140 je jasné patrné, že výtěžek varianty proteinu bez SPM byl značně vyšší, přestože podmínky exprese a následné izolace byly identické. Přítomnost fragmentu SPM+HIS

na dráze 3 je zdůvodněna stejným způsobem jako např. jeho přítomnost na obr. 11, tedy že dochází k částečnému rozštěpení rekombinantního proteinu gp140 SOSIP P4M s SPM v buňce a vzniká nejenom kompletní glykoprotein (170 kDa), ale i fragment SPM+HIS (30 kDa).

5.5 Porovnání štěpení gp140 SOSIP SPM+ a SPM– furinem

S nasynthetizovanými proteiny z předchozího experimentu bylo provedeno porovnání štěpení těchto proteinů pomocí proteinázy furinu. Výsledek štěpení byl vizualizován pomocí SDS-PAGE a WB, kdy byly proteiny detekovány protilátkou anti-HIS (viz **obr. 13**). Popis proužků je analogický s výsledky předcházejícího experimentu (viz **tab. X**).



Obr. 13 – Western blot, srovnání štěpení gp140 SOSIP P4M SPM± furinem: Do první jamky byl nanesen standard molekulové hmotnosti (M), do druhé a třetí jamky byl nanesen protein s SPM jednou s furinem, podruhé bez furinu. Do čtvrté a páté jamky byl nanesen protein bez SPM taktéž jednou s furinem a podruhé bez furinu. Druhé až páté jamce příslušely redukující podmínky. Do šesté až deváté jamky byly nanesen stejné vzorky jako do druhé až páté, s tím rozdílem, že šesté až deváté jamce příslušely neredukující podmínky. Proteiny byly detekovány protilátkou anti-HIS.

Na základě minimálního rozdílu mezi proteiny ošetřenými furinem a kontrolami bylo zjištěno, že obě varianty proteinu gp140 SOSIP P4M s SPM i bez SPM jsou rezistentní ke štěpení furinem. Podrobněji v diskuzi (viz kap. 6).

6 DISKUZE

Tato práce se zabývala studiem moderních přístupů ke tvorbě vakcíny vůči viru HIV-1 se zaměřením na potenciální imunogen, totiž glykoprotein gp140 SOSIP P4M. Po shrnutí nejdůležitějších souvisejících informací v teoretické části této práce proběhly experimenty, které si kladly za cíl upravit plazmid kódující výše uvedený glykoprotein a odstranit z něj DNA sekvenci kódující SPM prostřednictvím molekulárního klonování. Původní (s SPM) a nové (bez SPM) plazmidy byly dále namnoženy v bakteriální kultuře TOP10 a rekombinantní proteiny byly exprimovány v eukaryotické buněčné linii HEK-293F. Došlo tak k úspěšné přípravě jak původního, tak nově upraveného glykoproteinu gp140 SOSIP P4M.

Rozdíl mezi původním a upraveným glykoproteinem gp140 SOSIP P4M spočíval v přítomnosti, resp. absenci tzv. SPM modulu, což je prokaryotická sekvence odvozená z bakterie *Neisseria meningitidis*, využívaná pro usnadněnou purifikaci proteinů (Osička, Kalmusová, Křížová, & Šebo, 2001). Tento rozdíl je dobře pozorovatelný na **obr. 11**, který ukazuje obě varianty glykoproteinu za redukujících i neredukujících podmínek.

Protein gp140 SOSIP P4M s SPM se na tomto elektroforetogramu (viz **obr. 11**) za redukujících podmínek jevil jako tři rozdílné proužky. Velikost dolního proužku byla srovnáním se standardem molekulové hmotnosti odhadnuta asi na 30 kDa, což odpovídá teoretické molekulové hmotnosti fragmentu SPM+HIS. Prostřední proužek odpovídal zhruba 60 kDa, což odpovídá fragmentu gp20+SPM+HIS o hmotnosti 62 kDa včetně N glykosylace. Horní proužek se poté nacházel v rozmezí 150–250 kDa, což odpovídá neštěpenému proteinu gp120+gp41+SPM+HIS o hmotnosti 170 kDa. U všech detekovaných glykoproteinů byla uvažována glykosylace, která u gp120 podjednotky představuje okolo poloviny hmotnosti (60 kDa) a u gp20 podjednotky okolo 10 kDa (Pritchard et al., 2015, Raška & Novák, 2010).

Dolní proužek představuje SPM+HIS fragment, který se odštěpil již v tkáňové kultuře. Dle literatury totiž k autokatalytickému odštěpení SPM postačuje koncentrace vápníku 1 mmol/l, což odpovídá 78% aktivitě autokatalyzační schopnosti SPM. Dolní proužek je však velmi nízké intenzity, což nasvědčuje pouze minimální aktivitě SPM během exprese a purifikace proteinu. Proužek o hmotnosti 62 kDa odpovídá dle předpokladu podjednotce gp20+SPM+HIS, která se za redukujících podmínek odštěpí a je detekovatelná protilátkou anti-HIS. Proužek v rozmezí 150–250 kDa odpovídá gp120+gp20+SPM+HIS (o hmotnosti 170 kDa), který nebyl v místě přechodu gp120 a gp20 rozštěpen v Golgiho komplexu. Pozitivita tohoto proužku při detekci anti-HIS protilátkou potvrzuje dále minimální aktivitu SPM uvnitř

buňky a během purifikace. Nekompletní štěpení gp120+gp20+SPM+HIS v oblasti přechodu gp120 a gp20 může být vysvětleno i inhibičním působením gp120 (Pritchard et al., 2015). Literatura tento fakt vysvětluje tak, že při přípravě Env glykoproteinů přirozeně dochází k produkci mixu, zahrnujícího různé molekulární formy Env glykoproteinů (Binley et al., 2002). Separace gp120+gp20+SPM+HIS za neredukujících podmínek nevede k průkazu proužku odpovídajícímu gp20+SPM+HIS, což ve shodě s návrhem proteinu gp140 SOSIP potvrzuje, že disulfidová vazba mezi gp120 a gp20+SPM+HIS opravdu spojuje obě podjednotky. Za neredukujících podmínek představuje horní proužek kompletní glykoprotein (gp120+gp20+SPM+HIS) a jeho dimery (340) a trimery (510).

Protein gp140 SOSIP P4M SPM⁻ se na stejném elektroforetogramu (viz obr. 11) za redukujících podmínek dělí jako dva dominantní proužky. Dolní široký proužek v rozmezí 25–40 kDa při uvážení výrazně heterogenní glykosylace gp41 ektodomény odpovídá fragmentu gp20+HIS. Podobným způsobem si povahu tohoto proužku vysvětluje i Sanders et al., 2013. Horním proužkem odpovídá kompletnímu glykoproteinu (gp120+gp41+HIS), který váží přibližně 140 kDa, což odpovídá teoretickému předpokladu. Pozitivita tohoto proužku při detekci anti-HIS protilátkou za redukujících podmínek nasvědčuje i u této varianty gp140 SOSIP na nekompletní štěpení na přechodu mezi gp120 a gp20.

Na elektroforetogramu (viz obr. 11 a 12) se také vyskytly proužky, jejichž molekulová hmotnost byla mimo oblast porovnatelnou se standardem molekulové hmotnosti. Tyto proužky představují glykoprotein gp140 SOSIP P4M v jeho nezdenaturované, dimerní případně trimerní podobě. Jejich přítomnosti by se pro potřeby příštích experimentů dalo zabránit delší denurací vzorků při teplotě okolo 97 °C těsně před nanesením vzorků na polyakrylamidový gel v rámci metody SDS-PAGE, nicméně z biologického hlediska představují právě tyto formy správně multimerizovaný gp140 SOSIP protein, což je forma optimální pro vakcinační účely.

To, že glykoproteiny gp140 SOSIP P4M SPM⁺/SPM⁻ byly exprimovány pouze v částečně štěpené podobě je běžně se vyskytující problém biosyntézy HIV Env glykoproteinů (Inocencio, Sucic, Moehring, Spence, & Moehring, 1997).

Po izolaci SPM⁺ a SPM⁻ variant glykoproteinu gp140 SOSIP P4M byly oba glykoproteiny experimentálně štěpeny proteinázou furinem, což je jeden z enzymů zapojených do proteolytické maturace Env proteinu v infikované buňce (Moulard & Decroly, 2000). Výstupem ze závěrečného experimentu byl elektroforetogram (viz obr. 13), zobrazující štěpení glykoproteinů gp140 SOSIP P4M s a bez SPM furinem.

Tento elektroforetogram potvrdil, že **glykoproteiny gp140 SOSIP P4M s i bez SPM jsou rezistentní ke kompletnímu rozštěpení furinem v přechodu mezi podjednotkami gp120 a gp20+SPM+HIS nebo gp120 a gp20+HIS**. V opačném případě by totiž na WB detekovaném anti-HIS protilátkou nemohly být pozorovatelné horní proužky představující fragment gp140, který by po odstranění zbytku glykoproteinu nenesl detekční značku HIS.

Z kvantitativního porovnání výtěžků gp140 SOSIP P4M s SPM a gp140 SOSIP P4M bez SPM plyne fakt, že **přítomnost, resp. absence SPM neovlivňuje významně aktivitu furinu při štěpení gp140 prekurzoru**. Na druhou stranu **přítomnost SPM modulu snižuje výtěžek exprese gp140 glykoproteinu v eukaryotickém expresním systému** (*viz obr. 14*).

Na základě výše uvedených pozorování neplánujeme využívat SPM pro přípravu rekombinantního gp140 SOSIP glykoproteinu, i přesto, že literatura uvádí, že pro řadu prokaryotických proteinů se tato technologie jeví jako výhodná ([Sadílková et al., 2008](#)).

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala aktuálními trendy při tvorbě vakcín vůči HIV-1. Literární rešerše se s ohledem na aktuálně dostupnou odbornou literaturu věnovala tématům biologická klasifikace viru, morfologie virionu, anatomie virového proteomu a genomu, životní cyklus viru, příprava potenciální vakcíny vůči HIV-1, anti-HIV-1 neutralizační protilátky a jejich testovací modely, glykoproteiny gp140 SOSIP a jejich využití pro potenciální vakcínu.

V rámci experimentální části byla nejprve provedena úprava plazmidu gp140 SOSIP P4M s SPM na variantu bez SPM odstraněním DNA sekvence kódující SPM pomocí molekulárního klonování. Kromě původního byl tedy i úspěšně připraven nově upravený plazmid bez SPM. Oba plazmidy byly dále klonovány a amplifikovány v bakteriích. Po namnožení variant plazmidu s a bez SPM byla jimi transfekována eukaryotická buněčná linie za cílem exprimovat obě varianty glykoproteinu gp140 SOSIP P4M s SPM i bez SPM. Rekombinantní proteiny byly úspěšně exprimovány a purifikovány pomocí metalochelatační chromatografie s využitím Ni-NTA agarózy a následně charakterizovány pomocí Western blot techniky. S takto připravenými glykoproteiny bylo provedeno experimentální *in vitro* štěpení proteinázou furinem s cílem zjistit, zdali přítomnost SPM ovlivňuje míru štěpení gp140, neboť to je důležité pro proteolytickou maturaci gp140 glykoproteinů a vytvoření správné konformace.

Z této práce byly vyvozeny následující závěry: Glykoproteiny gp140 SOSIP P4M s SPM i bez SPM jsou rezistentní k *in vitro* enzymatické digesci furinem. Experimentální práce také prokázala, že přítomnost, resp. absence SPM sekvence s největší pravděpodobností nehraje roli při digesci gp140 SOSIP P4M s i bez SPM *in vitro*, na druhou stranu přítomnost SPM snížila expresivitu daného glykoproteinu v eukaryotickém expresním buněčném systému HEK-293F.

Z těchto závěrů tedy vyplynula otázka, jestli je vhodné SPM používat pro přípravu gp140 SOSIP glykoproteinů. V případě, kdy je ovšem nutné pracovat s gp140 SOSIP proteinem bez jakýchkoli přídatných sekvencí, jako je např. 6× HIS značka, nabízí SPM možnost afinitně purifikovat protein právě pomocí HIS značky, která je po purifikaci odštěpena autokatalytickou aktivitou SPM modulu a SPM+HIS je následně odstraněn z proteinového preparátu afinitní purifikací pomocí 6× HIS tag specifické Ni-NTA kolony.

8 SEZNAMY

8.1 Seznam použitých zkratek a symbolů

⊙	roztok
(6×) HIS	hexa-histidinová sekvence, molekulární marker
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
nAb	<i>neutralizing antibody</i>
bnAb	<i>broadly neutralizing antibody</i>
bnMAb	<i>broadly neutralizing monoclonal antibody</i>
BLT	humanizované buňky kostní dřeně (<i>bone marrow</i>), jater (<i>liver</i>) nebo brzlíku (<i>thymus</i>)
CD4BS	vazebné místo (<i>binding site</i>) pro HIV env na CD4 molekule hostitelské buňky
CRF	<i>circulating recombinant form</i>
env/Env	<i>envelope gene</i> nebo <i>envelope glycoprotein</i>
gag	<i>group specific antigen gene</i>
gp120 = SU	glykoprotein 120 = povrchový glykoprotein
gp140	glykoprotein 140
gp160	glykoprotein 160
gp41 = TM	glykoprotein 41 = transmembránový glykoprotein
HEK-293F	buněčná linie <i>human embryonic kidney 293 freestyle</i>
HIV-1, HIV-2	virus lidské imunodeficiency typ 1, typ 2
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
ICTV	<i>international committee for taxonomy of viruses</i>
LTNP	<i>long-term nonprogressor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
NHP	<i>non-human primates</i> (zvířecí experimentální modely biologicky nejpodobnější člověku)
p15 = Vpr	<i>viral protein R</i>
p16 = Vpu	<i>unique viral protein</i>
p17 = MA	protein 17 = matricový protein
p19 = Rev	<i>regulator of viral proteins expression</i>
p23 = Vif	<i>viral infectivity factor</i>
p24 = CA	protein 24 = kapsidový protein
p27 = Nef	<i>negative regulatory factor</i> nebo <i>negative effector</i>
p28 = Tat	<i>trans-activator of transcription</i>
p38 = IN	protein 38 = virová integráza
P4M	mutovaná sekvence v oblasti P4 glykoproteinu
p6 = LI	protein 6 = spojovací protein
p66/p51 = RT	protein 66/51 = virová reverzní transkriptáza
p7 = NC	protein 7 = nukleokapsidový protein
p9 = PR	protein 9 = virová proteáza
pol	<i>DNA polymerase gene</i>
SDS-PAGE	polyakrylamid-gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
SHIV	<i>simian-human immunodeficiency virus</i> (artificiální hybridní konstrukt)
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SOSIP	SOS a IP modifikace glykoproteinu
SPM(+/-)	<i>self-processing module</i> (sekvence přítomna/nepřítomna)
UCA	<i>unmutated common ancestor</i>
URF	<i>unique recombinant form</i>
WB	<i>Western blotting</i>

8.2 Seznam uvedených vyobrazení, tabulek a grafů

Vyobrazení

- **Obr. 1** Schéma biologické klasifikace HIV
- **Obr. 2** Srovnání jedno- a vícejaderných HIV virionů
- **Obr. 3** Schéma virové částice HIV
- **Obr. 4** Schéma virového genomu HIV
zdroj: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV-genome.png>
- **Obr. 5** Schéma životního cyklu HIV
zdroj: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV-replication-cycle-de.svg>
- **Obr. 6** Schéma detailní struktury HIV Env-výběžku
- **Obr. 7** Mapa plazmidu kódujícího gp140 SOSIP P4M SPM+
- **Obr. 8** Schéma počítání buněk v Bürkerově komůrce
- **Obr. 9** Odstranění SPM sekvence z gp140 SOSIP P4M pomocí *AgeI*
- **Obr. 10** Restrikční analýza plazmidu gp140 SOSIP P4M a P4 bez SPM s *BglII*
- **Obr. 11** Western blot, glykoproteiny detekovány pomocí anti-HIS
- **Obr. 12** Western blot, glykoproteiny detekovány pomocí anti-gp120
- **Obr. 13** Western blot, závěrečné srovnání štěpení glykoproteinů furinem
- **Obr. 14** Porovnání výtěžků gp140 SOSIP P4M s SPM a bez SPM

Tabulky

- **Tab. I** Srovnání potenciálu jednotlivých přístupů k vakcíně vůči HIV-1
- **Tab. II** Příprava vzorků pro restrikční štěpení
- **Tab. III** Příprava roztoku ligázy
- **Tab. IV** Příprava ligační směsi
- **Tab. V** Příprava vzorku pro restrikční analýzu
- **Tab. VI** Příprava vzorků pro porovnání štěpení glykoproteinů furinem
- **Tab. VII** Příprava 10% polyakrylamidového gelu
- **Tab. VIII** Hodnocení elektroforetogramu restrikčního štěpení s *AgeI*
- **Tab. IX** Hodnocení elektroforetogramu restrikčního štěpení s *BglII*
- **Tab. X** Hodnocení WB gp140 SOSIP P4M SPM± detekovaných pomocí anti-HIS

Grafy

- **Graf 1** Srovnání širokosáhlé neutralizační aktivity a jejich testované koncentrace

8.3 Seznam využitých laboratorních přístrojů, chemikálií a dalších pomůcek

Přístroje

- automatické mikropipety 0,2–2; 2–20; 20–200; 100–1000 μ l (THERMO SCIENTIFIC)
- automatické mikropipety 1–5 ml (THERMO)
- blotovací zařízení TRANS-6 SEMIDRY TRANSFER CELL (BIO-RAD)
- centrifuga CR 312 (JOUAN)
- centrifuga MIKRO 22R (HETTICH ZENTRIFUGEN)
- centrifuga UNIVERSAL 32R (HETTICH ZENTRIFUGEN)
- elektrický zdroj pro blotovací zařízení 2197 POWER SUPPLY (LKB BROMMA)
- elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPack Basic (BIO-RAD)
- elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPack Universal (BIO-RAD)
- elektroforetická komora a příslušející víko s elektrodami (BIO-RAD)
- elektroforetická komora Owl Easycast B1 (THERMO SCIENTIFIC)
- inkubátor MIR-153 (SANYO INCUBATOR)
- inkubátor s CO₂ MCO-15AC (SANYO CO₂ INCUBATOR)
- inkubátor termostat BT 120 M (LABO MS)
- inverzní mikroskop DMIL (LEITZ)
- laboratorní váhy 440-33N (KERN)
- laminární box aura-VF48 (BIO AIR)
- laminární box IC 212 (JOUAN)
- mikrocentrifuga E-Centrifuge (WEALTEK)
- pipetor FASTPETTE (LABNET)
- sérologické pipety 25; 10; 5; 1 ml (SARSTEDT)
- hybridizační zařízení RPN2510 (AMERSHAM LIFE SCIENCE)
- termoblok block heater SBH130D (STUART)
- třepačka KS 260 basic (IKA)
- třepačka rolovací roller mixer STR6D (STUART)
- třepačka TITRAMAX 101 (HEIDOLPH INSTRUMENTS)
- UV transiluminátor GelLogic 212PRO (CARESTREAM HEALTH)
- vortex MS2 Minishaker (IKA)
- PVDF membrána (BIO-RAD)
- fotografický papír CL-XPosure Film (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Chemikálie

- 10% roztok peroxodisíranu amonného – APS (1 g (NH₄)₂S₂O₈ + 10 ml dH₂O)
- 293Fectin reagent (INVITROGEN)
- 2-Log DNA Ladder 0,1–10 kb (NEW ENGLAND BIOLABS)
- 2-merkapt ethanol (LACH-NER)
- 30% roztok akrylamid/bisakrylamid (SERVA)
- 4× Tris pufr pH 6,8 (15,125 g Tris + 1 g SDS + 150 ml d H₂O + upravit pH na 6,8)
- 4× Tris pufr pH 8,8 (45,5 g Tris + 1 g SDS + 150 ml dH₂O + upravit pH na 8,8)
- 5× ligační pufr (INVITROGEN)
- agaróza (SERVA)
- antibiotikum ampicilin c = 100 mg/ml
- blokovací roztok SUPERBLOK (1% roztok BSA + zároveň 0,05% roztok Tweenu v 1× PBS)
- dihydrofosforečnan draselný (LACH-NER)
- dihydrogenfosforečnan draselný (LACH-NER)
- dodecylsírán sodný – SDS (MERCK)
- ethanol 96% (VWR)
- furin (NEW ENGLAND BIOLABS)
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (BIOTIUM)
- glycerol (SIGMA ALDRICH)
- glycin (LACH-NER)
- HEK293F FreeStyle Expression Medium (GIBCO)

- hepes (SIGMA ALDRICH)
- 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)
- imidazol (SIGMA)
- izopropanol (LACH-NER)
- kit: QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
- kit: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- kit: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (THERMO FISHER SCIENTIFIC)
- kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (SIGMA)
- kyselina chlorovodíková (LACH-NER)
- kyselina octová 99,8% (LACH-NER)
- Luria-Bertani Powdered Medium (SERVA)
- methanol (SIGMA ALDRICH)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (SERVA)
- n-butanol (LACH-NER)
- NEBuffer 1.1 (NEW ENGLAND BIOLABS)
- NEBuffer 3.1 (NEW ENGLAND BIOLABS)
- optiMEM Reduced Serum Medium (GIBCO)
- PBS Dulbecco w/o Ca⁺, w/o Mg²⁺, low endotoxin (BIOCHROM GMBH)
- peroxodisíran amonný (OMNIPUR)
- pracovní roztok GelRed: 300 ml dH₂O + 17,6 g NaCl + 60 µl GelRed Nucleic Acid Gel Stain)
- Precision Plus Protein TM Dual Xtra Standards (BIO-RAD)
- protilátka anti-gp120 konjugovaná s HRP – ředění 1:10 000 (home-made)
- protilátka anti-pentaHIS konjugovaná s HRP – ředění 1:10 000 (QIAGEN)
- pufr „adapting“ (500mM NaH₂PO₄, pH 8,0 + 1,5M NaCl + 100mM imidazol + 0,5% Tween 20)
- pufr „elution“ (50mM NaH₂PO₄, pH 8,0 + 300mM NaCl + 200mM imidazol + 0,05% Tween 20)
- pufr „wash“ (50mM NaH₂PO₄, 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 dH₂O + upravit pH na 6,8)
- pufr, nanášecí pro DNA (300 µl 100% glycerol + 700 µl dH₂O + 50 µl 1% bromfenolová modř)
- pufr, nanášecí redukující pro proteiny 2× (0,755 g Tris + 7,97 ml glycerol + 2,3 g SDS + 5 ml merkaptoethanol + 37,5 ml dH₂O + upravit pH na 6,8)
- pufr, promývací PBS (240 g NaCl + 6 KCl + 40 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O + 6 KH₂PO₄ + upravit pH na 7,4)
- restriční endonukleáza *AgeI* (NEW ENGLAND BIOLABS)
- restriční endonukleáza *BglIII* (NEW ENGLAND BIOLABS)
- SOC médium (INVITROGEN)
- T4 DNA ligáza (INVITROGEN)
- TEA pufr 50× (242 g Tris + 57,1 ml kys. octové + 37,2 g Na₂EDTA · 2 H₂O + doplnit do 1 l dH₂O)
- Tobwinův pufr (9,09 g Tris + 43,2 g glycin + 600 ml methanol)
- Tris (OMNIPUR)
- Triton X-100 (SIGMA)
- Tween-20 0,05% (CALBIOCHEM)
- ustalovač Manul Fixing Bath G354 (AGFA)
- vývojka Developer G150 (AGFA)
- zásobní roztok SDS 5× (3 l dH₂O + 45,3 g SDS + 2,6 g glycin + 15 g SDS)
- β-merkaptoethanol (CALBIOCHEM)

Biologický materiál

- HEK-293F Cells – eukaryotický expresní systém (SIGMA ALDRICH)
- One-Shot TOP10 Cells – bakteriální klonovací systém (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

9 LITERATURA

Odborné publikace z vědeckých časopisů

- Ahn, S., & Sung, Y. (2009). AIDS Vaccine Development: the Past , the Present , and the Future. *Immune Network*, 9, 1–3.
- Arthur, L. O., Bess, J. W., Sowder, R. C., Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J. C., & Henderson, L. E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science*, 258, 1935–8.
- Baeten, J. M., Chohan, B., Lavreys, L., Chohan, V., McClelland, R. S., Certain, L., ... Overbaugh, J. (2007). HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *The Journal of Infectious Diseases*, 195, 1177–80.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., ... Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 868–71.
- Berman, P. W., Gregory, T. J., Riddle, L., Nakamura, G. R., Champe, M. A., Porter, J. P., ... Eichberg, J. W. (1990). Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature*, 345, 622–5.
- Binley, J. M., Sanders, R. W., Master, a., Cayanan, C. S., Wiley, C. L., Schiffner, L., ... Moore, J. P. (2002). Enhancing the Proteolytic Maturation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, 76, 2606–2616.
- Bonomelli, C., Doores, K. J., Dunlop, D. C., Thaney, V., Dwek, R. A., Burton, D. R., ... Scanlan, C. N. (2011). The glycan shield of HIV is predominantly oligomannose independently of production system or viral clade. *PLoS One*, 6, e23521.
- Boyer, J. C., Bebenek, K., & Kunkel, T. a. (1992). Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 6919–6923.
- Brainard, D. M., Seung, E., Frahm, N., Cariappa, A., Bailey, C. C., Hart, W. K., ... Tager, A. M. (2009). Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *Journal of Virology*, 83, 7305–21.
- Briggs, J. A. G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H. G., & Fuller, S. D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO Journal*, 22, 1707–1715.
- Broder, C. C., & Collman, R. G. (1997). Chemokine receptors and HIV. *Journal of Leukocyte Biology*, 62, 20–9.
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of Virology*, 81, 10209–10219.
- Burke, D. S. (1997). Recombination in HIV: An Important Viral Evolutionary Strategy. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 253–259.
- Burton, D. R., Ahmed, R., Barouch, D. H., Butera, S. T., Crotty, S., Godzik, A., ... Wyatt, R. (2012). A blueprint for HIV vaccine discovery. *Cell Host and Microbe*, 12, 396–407.
- Bush, S., & Tebit, D. M. (2015). HIV-1 group O origin, evolution, pathogenesis, and treatment: Unraveling the complexity of an outlier 25 years later. *AIDS Reviews*, 17, 147–158.
- Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., & Alizon, M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*, 324, 691–5.
- Crooks, E. T., Moore, P. L., Franti, M., Cayanan, C. S., Zhu, P., Jiang, P., ... Binley, J. M. (2007). A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology*, 366, 245–62.

- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., & Desrosiers, R. C. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science*, *258*, 1938–41.
- Doria-Rose, N. A., Klein, R. M., Manion, M. M., O'Dell, S., Phogat, A., Chakrabarti, B., ... Connors, M. (2009). Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, *83*, 188–99.
- Emerman, M., & Malim, M. H. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, *280*, 1880–4.
- Flynn, N. M., Forthal, D. N., Harro, C. D., Judson, F. N., Mayer, K. H., Para, M. F., & rgp120 HIV Vaccine Study Group. (2005). Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *191*, 654–65.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., ... Safai, B. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, *224*, 500–3.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., ... Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*, 865–7.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., ... van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, *100*, 587–597.
- Greene, W. C., & Peterlin, B. M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*, *8*, 673–680.
- Grundner, C., Li, Y., Louder, M., Mascola, J., Yang, X., Sodroski, J., & Wyatt, R. (2005). Analysis of the neutralizing antibody response elicited in rabbits by repeated inoculation with trimeric HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology*, *331*, 33–46.
- Hansen, S. G., Ford, J. C., Lewis, M. S., Ventura, A. B., Hughes, C. M., Coyne-Johnson, L., ... Picker, L. J. (2011). Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*, *473*, 523–7.
- Chan, D. C., & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell*, *93*, 681–684.
- Inocencio, N. M., Sucic, J. F., Moehring, J. M., Spence, M. J., & Moehring, T. J. (1997). Endoprotease activities other than furin and PACE4 with a role in processing of HIV-1 gp160 glycoproteins in CHO-K1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 1344–8.
- Kalams, S. A., Parker, S. D., Elizaga, M., Metch, B., Edupuganti, S., Hural, J., ... (2013). Safety and comparative immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine in combination with plasmid interleukin 12 and impact of intramuscular electroporation for delivery. *The Journal of Infectious Diseases*, *208*, 818–29.
- Kang, Y. K., Andjelic, S., Binley, J. M., Crooks, E. T., Franti, M., Iyer, S. P. N., ... Olson, W. C. (2009). Structural and immunogenicity studies of a cleaved, stabilized envelope trimer derived from subtype A HIV-1. *Vaccine*, *27*, 5120–32.
- Karn, J. (2011). The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *6*, 4–11.
- Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., ... Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 7552–7.
- Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., & Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, *16*, 135–144.
- Lau, K. A., & Wong, J. J. L. (2013). Current trends of HIV recombination worldwide. *Infectious Disease Reports*, *5*, 15–20.
- Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin

- and history of the HIV-2 epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*, 6588–6592.
- Li, M., Gao, F., Mascola, J. R., Stamatatos, L., Polonis, V. R., Koutsoukos, M., ... 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. *Journal of Virology*, *79*, 10108–25.
- Liao, H.-X., Lynch, R., Zhou, T., Gao, F., Alam, S. M., Boyd, S. D., ... Haynes, B. F. (2013). Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature*, *496*, 469–76.
- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.*, *10*, 11–23.
- Městecký, J., Wei, Q., Alexander, R., Raška, M., Novák, J., & Moldoveanu, Z. (2014). Humoral Immune Responses to HIV in the Mucosal Secretions and Sera of HIV-Infected Women. *American Journal of Reproductive Immunology*, *71*, 600–7.
- Michael, N. L. (1999). Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology*, *11*, 466–474.
- Miller, M. D., Farnet, C. M., & Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology*, *71*, 5382–5390.
- Montagnier, L., Chermann, J. C., Barré-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., ... Rouzioux, C. (1984). Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symposia*, *15*, 319–31.
- Morrow, C. D., Park, J., & Wakefield, J. K. (1994). Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *The American Journal of Physiology*, *266*, C1135–56.
- Moulard, M., & Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Biomembranes*, *1469*, 121–132.
- Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J.-C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*, 448–61.
- Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R. C., Miller, M., West, M., ... Putney, S. D. (1989). A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science*, *246*, 1293–7.
- Osička, R., Kalmusová, J., Křížová, P., & Šebo, P. (2001). Neisseria meningitidis RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease: Polymorphism of frpC alleles and purification of recombinant FrpC. *Infection and Immunity*, *69*, 5509–5519.
- Pantophlet, R., & Burton, D. R. (2006). GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annual Review of Immunology*, *24*, 739–69.
- Phogat, S., & Wyatt, R. (2007). Rational modifications of HIV-1 envelope glycoproteins for immunogen design. *Current Pharmaceutical Design*, *13*, 213–27.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., ... Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, *15*, 871–2.
- Poignard, P., Moulard, M., Golez, E., Vivona, V., Franti, M., Venturini, S., ... Burton, D. R. (2003). Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies. *Journal of Virology*, *77*, 353–65.
- Pritchard, L. K., Vasiljevic, S., Ozorowski, G., Seabright, G. E., Cupo, A., Ringe, R., ... Crispin, M. (2015). Structural Constraints Determine the Glycosylation of HIV-1 Envelope Trimers. *Cell Reports*, *11*, 1604–13.
- Purcell, D. F., & Martin, M. A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of Virology*, *67*, 6365–78.
- Raška, M., & Novák, J. (2010). Involvement of envelope-glycoprotein glycans in HIV-1 biology and infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *58*, 191–208.
- Raška, M., Takahashi, K., Czernekova, L., Zachová, K., Hall, S., Moldoveanu, Z., ... Novák, J. (2010). Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody

- recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 20860–20869.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., ... Baumeister, K. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, 313, 277–84.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., ... MOPH-TAVEG Investigators. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine*, 361, 2209–20.
- Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J., & Petropoulos, C. J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 4144–9.
- Sadílková, L., Osička, R., Šulc, M., Linhartová, I., Novák, P., & Šebo, P. (2008). Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC. *Protein Science*, 17, 1834–1843.
- Sanders, R. W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J. P., Yasmeeen, A., de Val, N., ... Moore, J. P. (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*.
- Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., ... Martin, M. A. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nature Medicine*, 5, 204–10.
- Shiver, J. W., Fu, T.-M., Chen, L., Casimiro, D. R., Davies, M.-E., Evans, R. K., ... Emini, E. A. (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, 415, 331–5.
- Simek, M. D., Rida, W., Priddy, F. H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D. S., ... Koff, W. C. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *Journal of Virology*, 83, 7337–7348.
- Stanley, B. J., Ehrlich, E. S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X.-F., & Xiong, Y. (2008). Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *Journal of Virology*, 82, 8656–63.
- Temin, H. M. (1993). Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 6900–6903.
- Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 1–32.
- Walker, L. M., Huber, M., Doores, K. J., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J.-P., ... Poignard, P. (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*, 477, 466–70.
- Walker, L. M., Phogat, S. K., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J. L., ... Burton, D. R. (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*, 326, 285–9.
- Wu, X., Yang, Z.-Y., Li, Y., Hogerkorp, C.-M., Schief, W. R., Seaman, M. S., ... Mascola, J. R. (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*, 329, 856–61.
- Xiao, X., Chen, W., Feng, Y., Zhu, Z., Prabakaran, P., Wang, Y., ... Dimitrov, D. S. (2009). Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390, 404–9.
- Zhang, Y., & Barklis, E. (1997). Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *Journal of Virology*, 71, 6765–6776.

Doplňující materiály z odborných knih

King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press.

Rosypal, S. (2000). *Úvod do molekulární biologie*. Brno.

Konvalinka, J., & Machala, L. (2013). *Viry pro 21. století*. Praha: Academia.

Jilich, D., & Kulířová, V. (2014). *HIV infekce; Současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetrovatelství*. Praha: Mladá fronta.

Internetové zdroje a odkazy na interaktivní materiály

- **Virtuální 3D model virionu HIV**

URL: <<http://visual-science.com/projects/hiv/illustrations/>>

[cit. 25. 1. 2016]

- **HIV statistika od světové zdravotnické organizace**

URL: <<http://www.who.int/hiv/data/en/>>

[cit. 4. 3. 2016]

- **Program Protein Molecular Weight pro výpočet teoretické molekulární hmotnosti proteinů**

URL: <http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html>

[cit. 26. 4. 2016]