

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



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

Diplomová práce

Hana Synková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013 Vedoucí práce: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama a že uvádím veškerou
použitou literaturu.

Dne

Podpis.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli a vedoucímu diplomové práce Doc. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi při vypracování této práce poskytl. Rovněž bych chtěla poděkovat celému kolektivu oddělení imunologie za všestrannou pomoc a umožnění vypracování této diplomové práce.

Díky patří i Studentské grantové soutěži na Univerzitě Palackého v Olomouci (2012 - 2013, i.č.: LF_2012_011) za finanční podporu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Hana Synková

Název práce: Průtokově cytometrická analýza reaktivity sérových protilátek s rekombinantními gp120 proteiny navázanými na fluorescenční mikropartikule

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Ústav imunologie LF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: Diplomová práce se zabývá technologií přípravy mikrosférického fluorescenčního nosiče pro rekombinantní protein gp120 prostřednictvím kovalentně připojené vazné protilátky Penta-His namířené proti peptidové značce na gp120. Práce spočívá v následné analýze reaktivity sérových protilátek osob infikovaných HIV-1 virem s nativními rekombinantními proteiny gp120 a jejich deglykosylovanými formami. Významem práce je zavedení nové metody umožňující charakterizovat vazbu sérových protilátek na antigen gp120 v maximálně nativním stavu s možností souběžné multiplexní analýzy.

Klíčová slova: HIV-1, rekombinantní gp120, glykosylace, sérové protilátky, fluorescenční mikropartikule, průtoková cytometrie

Počet stran: 59

Počet příloh: 1 (CD)

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Hana Synková

Title: The flow cytometry analysis of the reactivity of serum antibodies with recombinant gp120 proteins adsorbed on fluorescent microparticles.

Type of thesis: Diploma

Department: Department of immunology, medical faculty of University Palacky in Olomouc

Supervisor: Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

The year of the presentation: 2013

Abstract: The thesis is focused on development and optimization of fluorescence microsphere-based assay for the analysis of reactivity of serum antibodies from HIV-positive subjects with recombinant gp120 using flow cytometry. The gp120 protein is adsorbed on microspheres through covalently bonded capture antibody specific to Penta-His tag presented on the N' terminus of the protein. The significance of this thesis is the introduction of new method for antibody-antigen binding studies under native conditions. This new method is optimal for simultaneous multiplex analyses.

Keywords: HIV-1, recombinant gp120, glycosylation, serum antibodies, fluorescent microparticles, flow cytometry

Number of pages: 59

Number of appendices: 1 (CD)

Language: Czech

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	Virus HIV.....	9
2.1.1	Obecná charakteristika HIV	9
2.1.2	Struktura a vlastnosti virionu HIV-1	10
2.1.3	Genom viru HIV-1	11
2.1.4	Infekce virem HIV-1	12
2.1.4.1	Vstup viru do buňky.....	13
2.1.4.2	Mechanismy úniku viru HIV-1 imunitnímu systému	13
2.1.5	Životní cyklus viru HIV-1	14
2.2	Glykoprotein gp120	15
2.2.1	Obecná charakteristika	15
2.2.2	Struktura glykoproteinu gp120.....	16
2.2.3	Interakce gp120 s buněčnými receptory.....	17
2.2.4	Vazba protilátek na glykoprotein gp120	18
2.2.5	Glykosylace gp120	20
2.3	Průtoková cytometrie	24
2.3.1	Princip.....	24
2.3.2	Základní charakteristiky průtokově cytometrické analýzy.....	25
2.3.3	Analýza a interpretace dat	27
2.3.4	Výhody a nevýhody průtokové cytometrie	27
2.3.5	Využití průtokové cytometrie.....	28
3	Cíle práce	29
4	Materiál a metody	30
4.1	Přístrojové vybavení a reagensie	30
4.2	Biologický materiál.....	31
4.3	Konjugace fluorescenčně značených mikropartikulí s protilátkou Penta-His .	32
4.3.1	Příprava mikropartikulí	32
4.3.2	Modifikace protilátky	33
4.3.3	Výměna pufru pro odstranění nezreagovaných komponent.....	33
4.3.4	Vlastní konjugace	34

4.4	Vazba proteinu gp120 na mikropartikule s aktivovanou protilátkou Penta-His	34
4.5	Vazba sérových protilátek na rekombinantní gp120 na mikrosférách s protilátkou Penta-His	35
4.6	Deglykosylace rekombinantních proteinů gp120 na mikropartikulích s adsorbovanou vaznou protilátkou	37
5	Výsledky	38
5.1	Ověření vazby rekombinantních proteinů gp120 na značené mikropartikule .	38
5.2	Analýza reaktivity sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120 na mikropartikulích	39
5.3	Analýza reaktivity sérových protilátek s deglykosylovanými rekombinantními proteiny gp120.....	43
6	Diskuze.....	48
7	Závěr	51
8	Seznam použité literatury.....	52
9	Seznam použitých zkratk.....	58

1 Úvod

Gp120 je bohatě glykosylovaný protein tvořící jednu ze dvou podjednotek obalového proteinu Env HIV viru. Env je klíčový pro vstup viru do buňky a zahájení produktivní infekce. Proto je poznání struktury a vlastností gp120 zásadní pro koncipování nových terapeutických a profylaktických strategií (Kwong a kol., 1998). Vzhledem k tomu, že infekce virem HIV-1 i přes výrazné pokroky v antiretrovirové terapii vede v naprosté většině případů k smrti infikovaného, výzkum účinné preventivní vakcíny proti HIV/AIDS má vysokou prioritu. Při vývoji a testování vakcín je obalový protein Env (nebo jeho podjednotka gp120) považován za klíčovou komponentu vakcíny, neboť bylo opakovaně demonstrováno, že zamezení vazby HIV viru na receptory cílových buněk pomocí Env specifických neutralizačních protilátek představuje jeden z nejdůležitějších imunitních mechanismů obrany (Kwong a kol., 2012).

Gp120 je významně glykosylovaný protein, neboť zhruba polovinu molekulové hmotnosti tvoří N-vázané glykany (Zhu a kol., 2000), které přispívají ke správnému skládání proteinu gp120, mohou jej chránit před vazbou hostitelských protilátek, ale současně mohou sloužit jako cíl některých velmi účinných neutralizačních protilátek (Wei a kol., 2003). Pro vakcinační účely bývá protein gp120 připravován rekombinantní technologií s použitím různých buněčných linií. Rekombinantní gp120 však není identický s proteinem gp120 na povrchu virionu neboť, jak ukázalo několik studií, se obě varianty liší strukturou a variabilitou N-glykanů připojených na páteřní aminokyselinovou sekvenci. Struktura a uspořádání N-glykanů ovlivňuje reaktivitu gp120 se séry pacientů infikovaných virem HIV-1 jak bylo demonstrováno pomocí ELISA a Western blot technik (Raška a kol., 2010). Problém uvedených metod spočívá v úplné (Western blot) či částečné (ELISA) denaturaci gp120, což je spojeno se změnami konformačních epitopů gp120 a tedy s omezením biologické relevance naměřených reaktivit testovaných sér. Navázání proteinu gp120 na polystyrenové kuličky s kovalentně připojenou protilátkou proti HIS značce na konci rekombinantního proteinu gp120 umožňuje vyhodnocovat reaktivitu sér HIV pacientů s gp120 za podmínek minimální denaturace proteinu pomocí fluorescenčně značeného detektoru lidských imunoglobulinů a průtokové cytometrie.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Virus HIV

První informace o syndromu získané imunitní nedostatečnosti (AIDS) se v odborném tisku objevily v roce 1981. Choroba byla charakterizována zvýšenou citlivostí k oportunním infekcím a některým nádorovým onemocněním (agresivní forma Kaposiho sarkomu, B-lymfom). První práce popisovaly výskyt AIDS u homosexuálů, hemofiliků a pacientů, kterým byly aplikovány krevní preparáty. Nedlouho poté byl prokázán přenos i heterosexuálním pohlavním stykem. Nezávislé vědecké týmy ve Francii a USA v roce 1983 odhalily virového původce této choroby, který byl pojmenován virus lidské imunodeficiency (HIV), (Krejsek a Kopecký, 2004). V současnosti jsou známy tři základní způsoby přenosu HIV z člověka na člověka - sexuálním kontaktem, z matky na dítě přes placentu nebo prostřednictvím mateřského mléka a krevní cestou (Roitt a kol., 1996). Ačkoliv bylo zavedeno rutinní testování dárců krve na přítomnost HIV a postupně objevena řada léků schopných zpomalit progresi onemocnění, AIDS nadále zůstává kompletně nevyléčitelnou smrtelnou hrozbou.

2.1.1 Obecná charakteristika HIV

Virus HIV je řazen do početné čeledi *Retroviridae*. Tato čeleď se dále dělí na tři podčeledi - *Spumavirinae*, *Oncovirinae*, kam patří retroviry, které hostitelskou buňku transformují na buňku nádorovou a *Lentivirinae*, do které jsou řazeny i HIV-1 a HIV-2. Infekce lentiviry vede po dlouhé latentní fázi k lýzi infikované buňky. HIV-1 a HIV-2 se od sebe liší antigenně i geneticky. Genetická analýza prokázala, že virus HIV-2 se vyvinul z jiných opičích retrovirů než HIV-1. Homologie mezi těmito viry na genetické i proteinové úrovni je pouze 40 - 60 %. Infekce HIV-2 je typická pro země západní Afriky, v ostatních částech světa je infekce virem HIV-2 spíše vzácná. HIV-2 je méně virulentní než HIV-1 a má nižší afinitu k molekule CD4. Výsledky epidemiologických studií uvádí, že infekce virem HIV-2 poskytuje určitou míru ochrany před infekcí virem HIV-1 (Krejsek a Kopecký, 2004).

2.1.2 Struktura a vlastnosti virionu HIV-1

Virion HIV-1 je částice zhruba kulovitého tvaru o průměru asi 100 nm obalená lipoproteinovým obalem. Skládá se z kapsidy, kterou tvoří virový dřeňový protein p24 využívaný v sérologických testech při diagnostice HIV infekce. Uvnitř kapsidy se nachází dvě molekuly jednořetězcové RNA, které asociují s nukleokapsidovým proteinem p9. Ve zralém virionu je přítomna virová protéza uplatňující se při zrání virionu a jeho přechodu na infekční formu, reverzní transkriptáza nezbytná pro replikaci genetické informace viru a virová integráza, která zodpovídá za vložení genetické informace HIV-1 viru do chromozómu hostitelské buňky. Mezi dřeňové proteiny je řazen i protein p17, který je důležitý při inkorporaci obalových glykoproteinů gp120 a gp41. Obalové glykoproteiny ve formě trimerů prostupují dvouvrstevnou lipidovou membránou, kterou HIV-1 získává, když pučením opouští hostitelskou buňku (Teixeira a kol., 2011).

Virová částice velmi snadno podléhá mutacím, zejména ve složení obalových glykoproteinů, což je jednou z příčin dosavadních neúspěchů při konstrukci účinných vakcín (Kwong a kol., 2012). Na základě fylogenetických analýz lze kmeny HIV-1 rozdělit do tří hlavních skupin – M, O a N. Nejrozšířenější skupinu M způsobující globální pandemii tvoří jedenáct genetických subtypů označovaných A – K (Korber a kol., 2001). Rozdíly mezi jednotlivými kmeny HIV-1 virů podmiňují jejich rozdílné imunopatogenetické vlastnosti, včetně agresivity kmenů a účinnosti přenosu. Ke značným genetickým změnám dochází v průběhu infekce i u konkrétního HIV-1 viru, který infikuje konkrétního jedince. Zjednodušeným vysvětlením výrazné proměnlivosti je způsob zpracování a přenosu genetické informace. Tyto mechanismy jsou u viru HIV-1 spojené s aktivitou RNA dependentní DNA polymerázy, pro kterou je typické značné chybování bez možnosti opravy běžnými reparačními mechanismy (Krejsek a Kopecký, 2004).

2.1.3 Genom viru HIV-1

Genom retrovirů je charakteristický dvěma kopiemi jednovláknové RNA, která je v infikovaných buňkách prostřednictvím RNA dependentní DNA polymerázy přepisována do podoby dvojšroubovicové DNA a následně zabudována do hostitelského genomu ve formě proviru. Provirus se tak stává součástí genomu hostitelské buňky a zůstává v latentní podobě, dokud není buňka aktivována. K aktivaci dochází většinou antigenní stimulací (Levinson, 2006).

Genom HIV-1 sestává z devíti genů z obou stran ohraničených nukleotidovými sekvencemi LTR (long terminal repeats), (Obr. 1), které se podílejí na replikaci viru a nacházejí se zde vazebná místa pro regulační proteiny, které kontrolují expresi virových genů. V genomu HIV-1 se stejně jako v genomech ostatních retrovirů nacházejí tři hlavní strukturní geny - *gag*, *pol* a *env* (Janeway a kol., 1999).

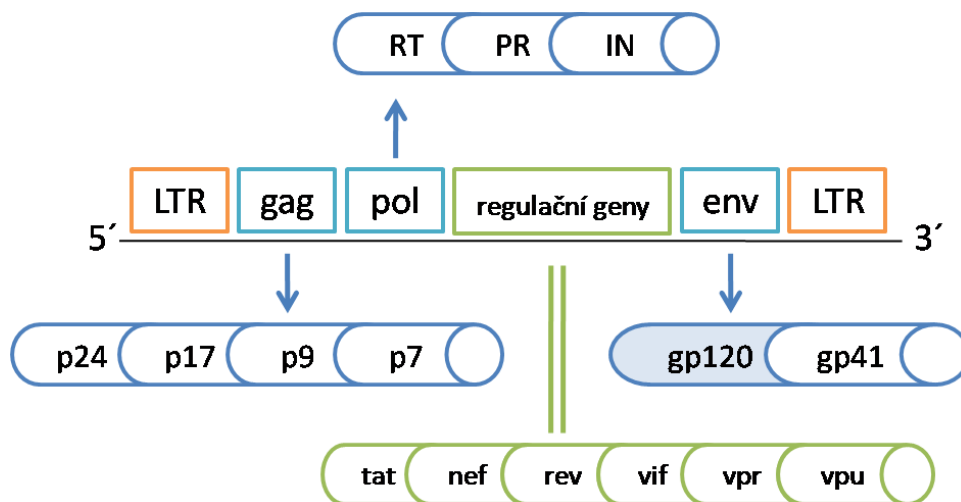
- Gen *gag* kóduje 53 kDa prekurzor p53, který je posttranslačně štěpen na proteiny p24, p17, p9 a p7 (Roitt a kol., 1996).
- Gen *pol* kóduje enzymy zapojené v replikaci a integraci viru - reverzní transkriptázu, proteázu a integrázu.
- Gen *env* kóduje glykoprotein gp160, který je posttranslačně štěpen na transmembránový protein gp41 a povrchový glykoprotein gp120 (Huang a kol., 1997).

Transkripty genů *gag* a *pol* jsou translatovány do podoby dlouhých polypeptidových řetězců, které jsou dále štěpeny na jednotlivé funkční proteiny virovou proteázou, která je rovněž kódována genem *pol*. Naproti tomu produkt genu *env*, gp160, je štěpen na proteiny gp120 a gp41 proteázou hostitelské buňky (Janeway a kol., 1999). Kromě uvedených tří strukturních genů se v genomu HIV-1 nacházejí regulační geny *tat*, *nef*, *rev*, *vif* a *vpr*.

- Gen *tat* kóduje protein, který zesiluje transkripci virového a pravděpodobně i buněčného genomu a společně s dalším regulačním proteinem Nef potlačuje syntézu MHC molekul I. třídy a tím omezuje schopnost cytotoxických T-buněk rozpoznávat a následně likvidovat buňky napadené virem HIV-1.

- Gen *rev* kóduje protein, který se podílí na transportu nesestřížených transkriptů z jádra do cytoplazmy.
- Protein kódovaný genem *vif* zvyšuje infekčnost HIV tím, že inhibuje APOBEC3G. APOBEC3G je enzym, který deaminuje cytosiny v nukleové kyselině, inaktivuje je tak a tím snižuje infekčnost retrovirů (Levinson, 2006).
- V případě viru HIV-1 je v genomu obsazen ještě gen *vpr* kódující protein, který pomáhá uvolňování virionů a degraduje povrchový glykoprotein CD4 T-lymfocytů (Bour a kol., 2003).

Na základě experimentů prováděných *in vitro* podmínkách bylo zjištěno, že ztráta některých regulačních genů může vést ke vzniku méně patogenních kmenů HIV-1. V *in vivo* podmínkách však tato skutečnost byla prokázána pouze v případě delece v genu *nef* (Krejsek a Kopecký, 2004).



Obr. 1: Uspořádání genomu viru HIV-1

2.1.4 Infekce virem HIV-1

Virus HIV-1 má schopnost napadat různé typy buněk. Mezi vnímavé buňky patří zejména CD4⁺ T-lymfocyty, makrofág a buňky CNS (Hořejší a Bartůňková, 2002). Infekce virem HIV-1 vede k postupné ztrátě buněčné imunity a vystavuje hostitele vysokému riziku potenciálně smrtelných oportunních infekcí.

2.1.4.1 Vstup viru do buňky

Za vstup viru HIV-1 do hostitelské buňky jsou zodpovědné interakce mezi virovými proteiny gp 120/gp 41 a dvěma hlavními typy receptorů exprimovanými na povrchu buňky: jedná se o receptory CD4 a receptory pro chemokiny sloužící jako koreceptory (Doranz a kol., 1997). Kmeny HIV-1 lze rozdělit na kmeny se zvýšeným tropismem k makrofágům (R5 kmeny) a kmeny infikující T-lymfocyty (X4 kmeny). Existují také kmeny s tropismem k oběma buněčným typům. R5 kmeny HIV-1 se odlišují od X4 kmenů využitím různých chemokinových receptorů pro vstup do buňky. Kmeny s tropismem pro makrofágy (R5) ke vstupu využívají receptor CCR5 a převládají během primární infekce. Lymfotropní kmeny (X4) vstupují do buňky pomocí chemokinového receptoru CXCR4 a jsou asociovány s pozdějším stádiem infekce (Moore a kol., 1997). Mutace v genu pro receptor CCR5 poskytují ochranu před infekcí virem HIV-1. Homozygotní mutace v tomto genu navozují kompletní ochranu před infekcí, v případě heterozygotů dochází k pomalejší progresi onemocnění (Levinson, 2006).

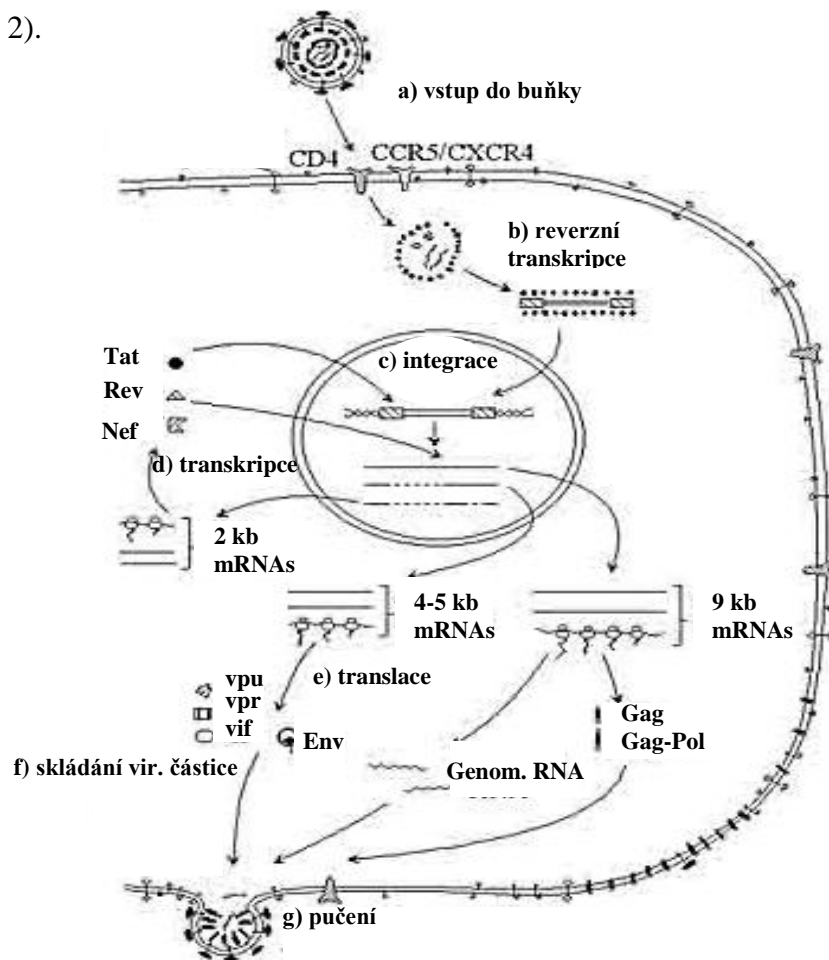
2.1.4.2 Mechanismy úniku viru HIV-1 imunitnímu systému

Podle Levinsona (2006) má virus HIV-1 tři základní mechanismy, pomocí kterých dokáže unikat imunitnímu systému člověka:

- (1) Integraci virové DNA do DNA hostitelské buňky. Ve fázi proviru nejsou exprimovány virové proteiny a infikovaná buňka se tak stává pro imunitní systém nedosažitelnou.
- (2) Vysokou četnost mutací genu *env* kódujícího klíčové obalové glykoproteiny gp120 a gp41.
- (3) Syntézu Tat a Nef proteinů, které omezují tvorbu MHC molekul I. třídy důležitých pro rozpoznání a následnou likvidaci buněk infikovaných virem HIV-1 cytotoxickými T-buňkami.

2.1.5 Životní cyklus viru HIV-1

Po interakci virového obalového glykoproteinu gp120 s membránovým receptorem CD4 dochází ke glykoproteinem gp41 zprostředkované fúzi membrán (Kwong a kol., 1998). Po vstupu do buňky a rozbalení virové částice je pomocí enzymu reverzní transkriptázy zahájen přepis virové RNA do dvouvláknové DNA. Ta je pomocí virové integrázy (p32, produkt genu *pol*) zabudována do hostitelského genomu. Ve formě proviru může HIV-1 setrvávat měsíce až roky. Pokud dojde k aktivaci infikované buňky, indukibilní a konstitutivní hostitelské transkripční faktory začnou interagovat se specifickými vazebnými místy LTR. Tato stimulace vede k expresi genomu HIV-1 a vzniku různých virových mRNA. Jako první vznikají mRNA o velikosti přibližně 2 kb, které kódují regulační proteiny Tat, Rev a Nef. Následně jsou tvořeny virové strukturní proteiny, které umožňují sestavení virionu, do kterého se zasunou dvě kopie virové jednovláknové RNA. Komplettní virové částice opouštějí hostitelskou buňku pučením, které má za následek lýzi buňky. Uvolněné virové částice mohou následně infikovat jiné CD4+ buňky a celý cyklus se opakuje (Roitt a kol., 1996), (Obr. 2).



Obr. 2: Životní cyklus viru HIV-1 (upraveno dle Lamothe a Joshi, 2000)

Intenzivní studium životního cyklu HIV-1 vedlo k objevení řady potencionálních cílů v protivirové terapii. V r. 1985 byl jako první zaveden do klinické praxe nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy AZT (azidothymidin, zidovudin), (Teixeira a kol., 2011). V současnosti se v anti-HIV-1 terapii používají zejména tři důležité skupiny léčiv: inhibitory reverzní transkriptázy (nukleosidové/nukleotidové a nenukleosidové) a inhibitory proteázy. Kombinace těchto inhibitorů je označována jako HAART (highly active antiretroviral therapy) a dosahuje zatím nejlepších výsledků v tlumení replikace HIV-1 (Levinson, 2006). V průběhu podávání HAART však průběžně vznikají rezistentní kmeny HIV-1 a vyskytuje se řada nepříjemných vedlejších účinků spojených s toxicitou léčiv (Yerly a kol., 1999). Velké naděje jsou proto vkládány do nových antiretrovirových léčiv schopných blokovat již vstup viru do buňky – v současné době prochází testováním několik látek schopných inhibovat virové glykoproteiny gp120 a gp41 (Teixeira a kol., 2011).

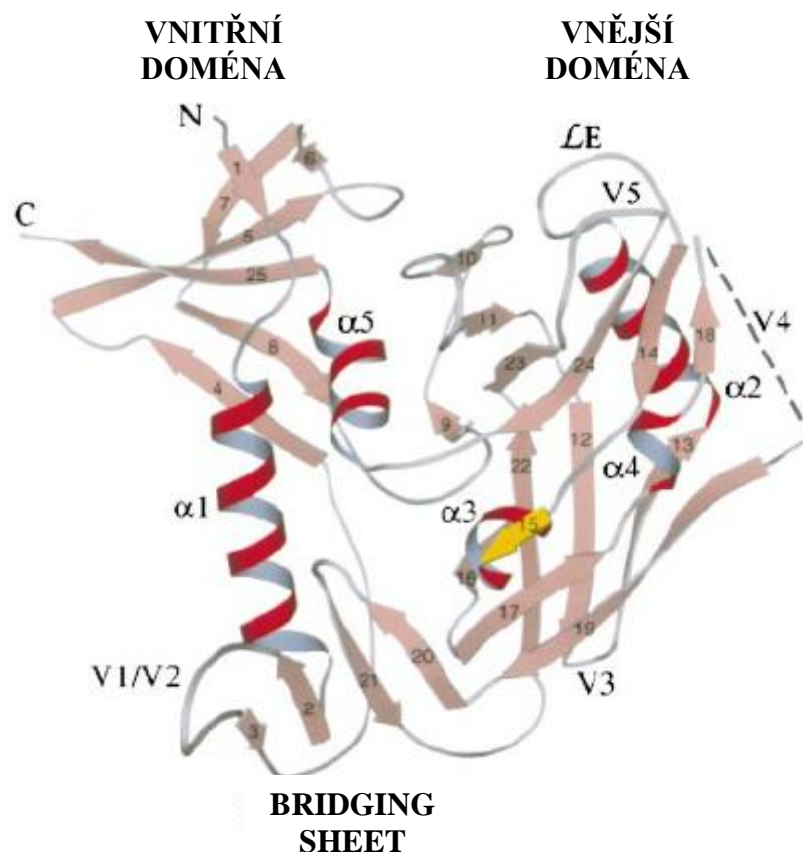
2.2 Glykoprotein gp120

2.2.1 Obecná charakteristika

Infekce buňky virem HIV-1 je závislá na bohatě a variabilně glykosylovaném 160 kDa virovém obalovém glykoproteinu Env (Huang a kol., 1997). Env se skládá ze dvou nekovalentně vázaných podjednotek - povrchového glykoproteinu gp120 a transmembránové podjednotky gp41 (Kwong a kol., 1998). Glykoproteiny gp120 a gp41 vznikají štěpením prekurzorové molekuly gp160 hostitelskými enzymy v Golgiho aparátu (Helenius a Aebi, 2001). HIV-1 Env je na povrchu virionu reprezentován trimerem gp120/gp41 komplexů prostřednictvím kterých interaguje s buněčnými receptory a umožňuje tak vstup HIV-1 do buňky. Glykany tvoří asi polovinu molekulové hmotnosti Env a hrají významnou roli během humorální imunitní odpovědi hostitele. Vytváří tzv. „glykanový štít“, který brání virus před neutralizujícími protilátkami. Současně však tytéž glykany mohou sloužit jako cíle pro některé glykan-specifické neutralizující protilátky (Wei a kol., 2003; Raška a Novák, 2010).

2.2.2 Struktura glykoproteinů gp120

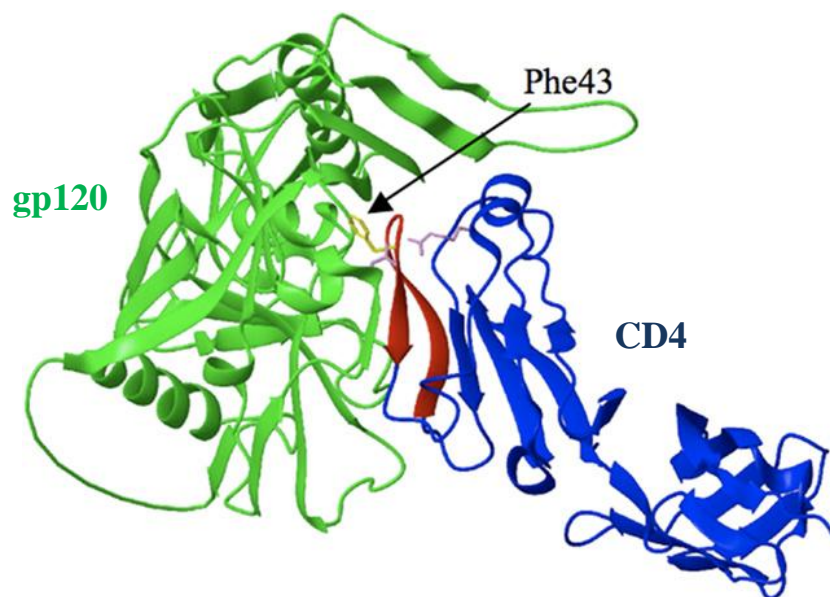
HIV-1 protein gp120 je tvořen 484 – 543 aminokyselinami (Korber a kol., 2001). Skládá se z pěti evolučně konzervovaných (C1 – C5) a pěti variabilních (V1 – V5) proteinových domén (Modrow a kol., 1987). Oblasti C1 – C5 tvoří jádro molekuly, zatímco variabilní domény V1 – V5 vyčnívají ven a vytváří smyčky, jejichž báze jsou ukotveny pomocí disulfidických vazeb (Leonard a kol., 1990). Glykoprotein gp120 lze rozdělit na tři části – vnitřní a vnější doménu a tzv. „bridging sheet“ (spojovací β -skládaný list), (Obr. 3). Vnitřní doména je zapojena do interakcí s glykoproteinem gp41 a formace trimerních Env komplexů. Na rozdíl od vnější domény většinou není pokryta glykany. Po navázání receptoru CD4 na gp120 se indukují významné konformační změny, které ústí v tvorbu bridging sheet – domény strukturálně složené ze dvou párů antiparalelních β -skládaných listů, která spojuje vnitřní a vnější doménu (Rizzuto, 1998).



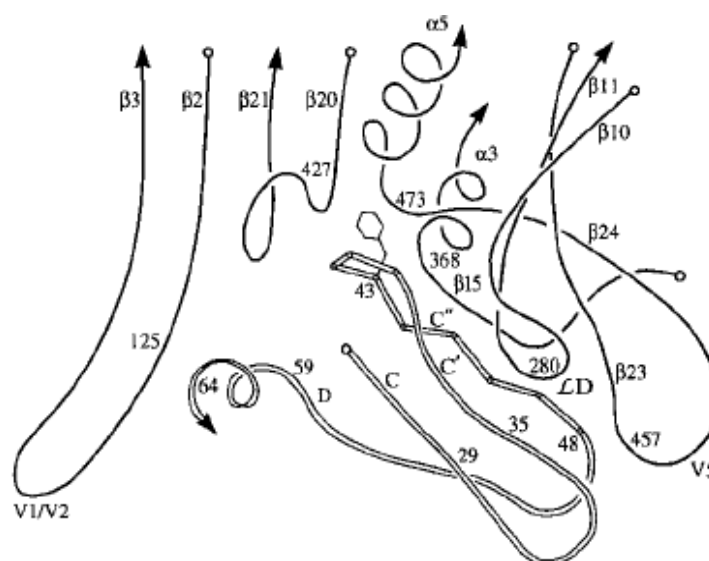
Obr. 3: Struktura glykoproteinů gp120 (upraveno dle Kwong a kol., 1998)

2.2.3 Interakce gp120 s buněčnými receptory

Primárním buněčným receptorem pro HIV-1 je povrchový glykoprotein CD4 patřící do strukturní rodiny imunoglobulinů (Celer a Celer, 2010). Molekula CD4 se na evolučně konzervované vazebné místo glykoproteinu gp120 váže v oblasti mezi vnitřní, vnější doménou a „bridging sheet“. Nejdůležitější aminokyseliny CD4 zapojené v interakcích s gp120 jsou Phe43 a Arg59 (Obr. 4). K přímému meziatomovému kontaktu dochází mezi 26 aminokyselinami glykoproteinu gp120 a 22 aminokyselinami CD4 (Obr. 5). Z interakcí se uplatňuje 219 van der Waalsových vazeb a 12 vodíkových můstků (Kwong a kol., 1998).

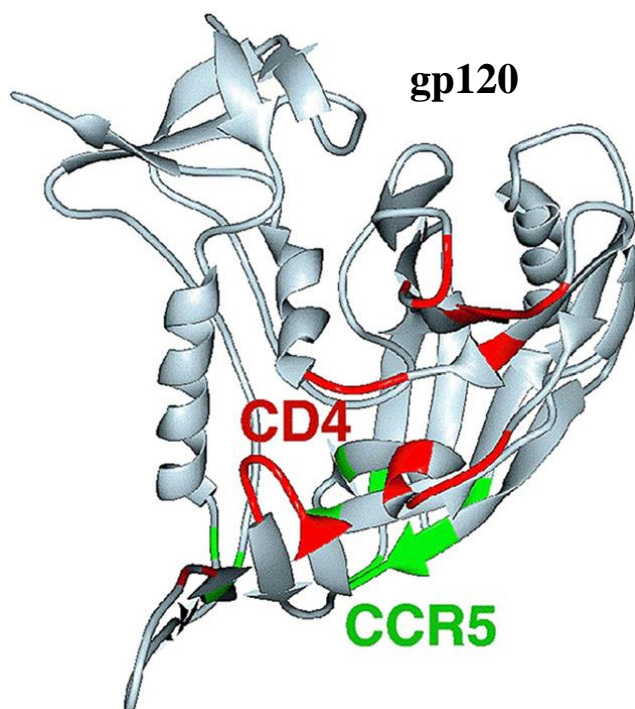


Obr. 4: Struktura gp120 (zeleně) ve vazbě s CD4 receptorem (modře). Červeně je vyznačena oblast CD4 interagující s gp120, žlutě klíčové reziduum CD4 Phe43 (upraveno dle Teixeira a kol., 2011)



Obr. 5: Meziatomový kontakt mezi gp120 a CD4 (převzato z Kwong a kol., 1998)

Po vytvoření komplexu gp120 - CD4 jsou indukovány změny gp120 vedoucí k odmaskování vazebného místa pro buněčné koreceptory (Obr. 6), kterými jsou některé receptory pro chemokiny (CCR5, CXCR4). Tyto změny zahrnují vytvoření „bridging sheet“, který se skládá ze dvou řetězců patřící do vnější domény a řetězců V1/V2 z vnitřní domény. Pro interakci s chemkinovým receptorem je důležitá variabilní oblast V3 glykoproteinu gp120 (Guttman a kol., 2012). V závislosti na konformaci V1/V2 a V3 smyčky je determinován buněčný tropismus HIV-1 (Ogert a kol., 2001).



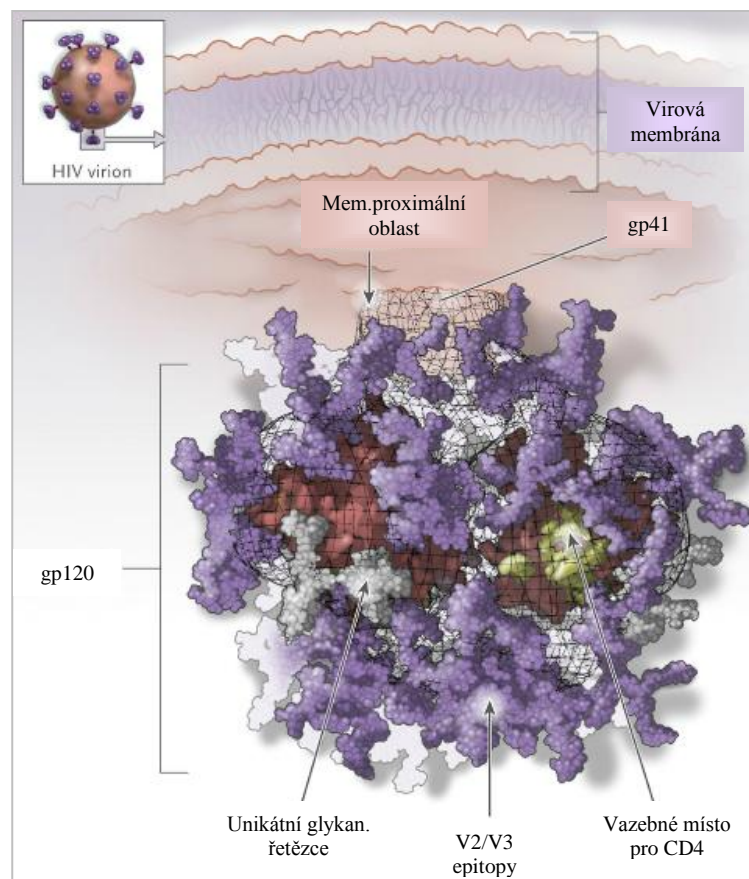
Obr. 6: Struktura gp120 se zeleně vyznačeným vazebným místem pro koreceptor CCR5 (upraveno dle Wyatt a kol., 1998)

2.2.4 Vazba protilátek na glykoprotein gp120

Vazebná místa protilátek tvoří s antigeny nekovalentní komplexy. Kontakty mezi nimi zajišťují iontové, hydrofobní a van der Waalsovy síly a vodíkové můstky (Hořejší a Bartůňková, 2002).

Neutralizující protilátky jsou důležitou součástí efektivní imunitní odpovědi organismu. Protilátky zjištěné v rané fázi infekce virem HIV-1 specificky působí proti kmenu, který infekci vyvolal, ale který se současně rychle mění, aby unikl rozpoznání imunitním systémem (Johnston a Fauci, 2011). Původně senzitivní forma

viru je tak postupně nahrazena kompletně rezistentní formou HIV-1. Neutralizující protilátky jsou zaměřeny převážně vůči exponovaným, vysoce proměnlivým oblastem obalového proteinu Env. Genetickou analýzou byly odhaleny četné mutace v *env* genu, primárně v N-vázaných glykanech (Wei a kol., 2003). Naopak protilátky neutralizující široké spektrum kmenů HIV-1 jsou zaměřeny spíše vůči konzervovaným oblastem. Tyto málo se měnící úseky jsou však špatně přístupné, překryté N-glykany, částečně vnořeny do obalu viru nebo i jinak chráněny před odhalením imunitním systémem (Mikell a kol., 2011). Na základě studia monoklonálních protilátek schopných neutralizovat široké spektrum virových kmenů HIV-1, bylo popsáno 5 oblastí Env představující cíle pro tyto protilátky (Obr. 7). Jedná se o oblast glykoproteinu gp41, membránovou proximální vnější oblast a 3 úseky gp120: vazebné místo pro receptor CD4, specifické glykany na vnější části gp120 a oblast, do které se váže chemokinový receptor a kterou tvoří části domén V1/V2, V3 a C4 (Nabel, 2005).



Obr. 7: HIV-1 epitopy široce neutralizujících lidských monoklonálních protilátek (upraveno dle Johnston a Fauci, 2011)

2.2.5 Glykosylace gp120

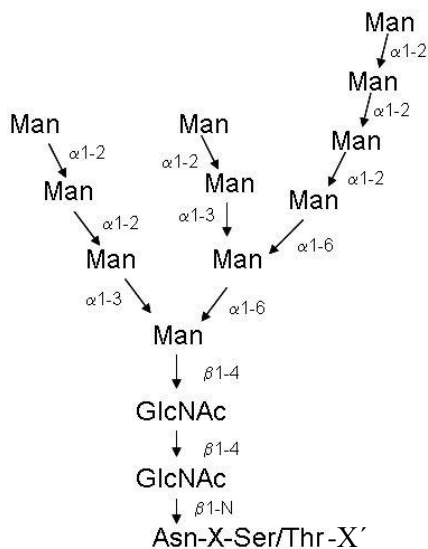
Glykosylace patří mezi nejvýznamnější posttranslační modifikace proteinů. Probíhá v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Podle typu vazby, kterou jsou sacharidy vázány na proteiny, rozlišujeme N- a O-glykosylaci. Glykosylace vykazuje druhovou a tkáňovou specifičnost (Varki a kol., 2009). Přibližně polovinu molekulové hmotnosti glykoproteinu gp120 představují glykany, převážně N-vázané, s malým a proměnlivým příspěvkem O-vázaných glykanů (Zhu a kol., 2000). K funkčním a strukturním analýzám či imunizačním experimentům se používají glykoproteiny gp120 produkované různými stabilně transfekovanými buněčnými liniemi. Buňky rozdílného tkáňového původu produkují proteiny gp120, které se liší počtem, typem a složením připojených N-glykanů (Raška a kol., 2010). Mezi expresní buněčné linie používané pro izolaci a následnou analýzu rekombinantních oligomerních proteinů gp120 patří např.:

- T- buněčná linie (Jurkat) reprezentující přirozený cíl pro HIV-1 virus
- buněčná linie ováří čínského křečka (CHO) používaná pro biotechnologickou produkci rekombinantních vakcinačních imunogenů
- buněčná linie lidského rhabdomyosarkomu (RD) běžně využívaná pro DNA vakcinační experimenty
- buněčná linie lidské embryonální ledviny (293T) používaná pro produkci vakcinačních antigenů, které jsou v současnosti testovány již i v klinických studiích
- buněčná linie hepatocelulárního karcinomu (HepG2)
- buněčná linie fibrosarkomu (HT1080)
- B-buněčná linie (Dakiki), (Raška a kol., nepublikovaný článek).

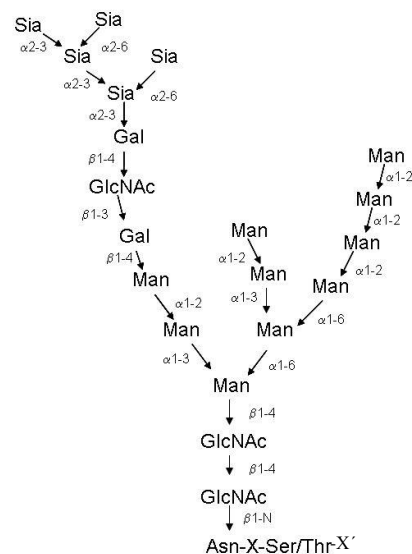
N-vázané glykany

N-glykan je na protein přenášený en bloc (v kuse) jako lipid-vázaný prekurzor. Pro glykosylaci je vyžadována přítomnost signální sekvence Asn-X-Ser/Thr-X', přičemž X a X' reprezentují jakoukoliv aminokyselinu s následujícími výjimkami: pro Asn-X-Ser-X' motiv se v pozici X nevyskytuje: Trp, Asp, Glu nebo Leu a pro oba motivy nemůže být v pozici X a X': Pro (Gavel a von Heijne, 1990; Kasturi, 1997).

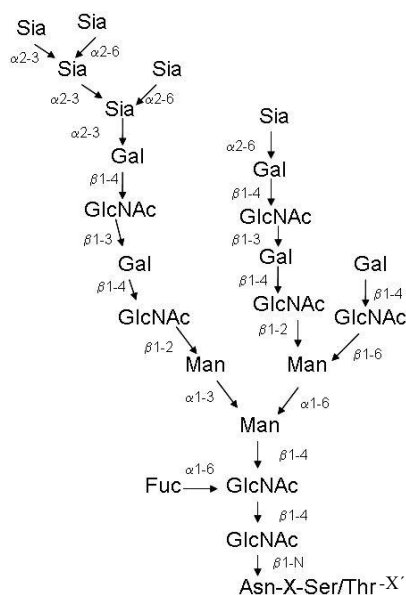
N-glykany se skládají z jádra, které tvoří dva N-acetylglukosaminové (GlcNAc) zbytky a tři mannosové (Man) zbytky s variabilním obsahem dalších glykanů, Man, GlcNAc, galaktosy (Gal), fukosy (Fuc) nebo kyseliny sialové (Sia). N-glykany lze rozdělit do tří základních skupin dle struktury: s vysokým obsahem mannosy (Obr. 8), hybridní (Obr. 9) a komplexní glykany (Obr. 10). Všechny tři typy byly detekovány v Env glykoproteinu HIV-1 (Zhu a kol., 2000; Raška a Novák, 2010).



Obr. 8: Mannosový typ N-glykanu
(upraveno dle <http://www.genome.jp/>)



Obr. 9: Hybridní typ N-glykanu
(upraveno dle <http://www.genome.jp/>)

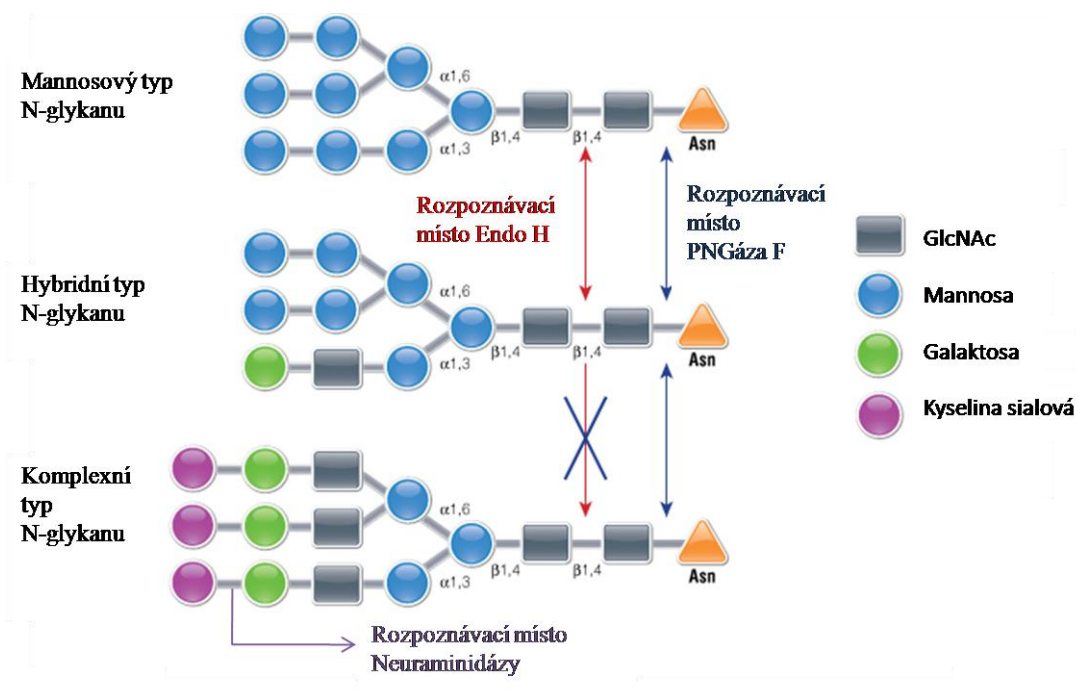


Obr. 10: Komplexní typ N-glykanu
(upraveno dle <http://www.genome.jp/>)

Na HIV-1 Env trimeru se nachází nejméně 24 N-glykosylačních míst, která jsou variabilně obsazena cukry (Quiñones-Kochs a kol., 2002; Go a kol., 2008). Recentní analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie odhalily, že ne všechny N-glykosylační motivy jsou obsazeny glykany, proto je přesnější označovat tyto motivy jako potenciální N-glykosylační místa (PNGS), (Go a kol., 2008; Raška a Novák, 2010). Distribuce PNGS v Env mezi různými HIV-1 izoláty není náhodná. Některá PNGS jsou ve většině HIV-1 kmenů konzervována, zatímco jiná PNGS jsou vysoce variabilní. Přesun PNGS a je typický pro variabilní smyčky V1/V2, V4 a V5, nikoli však pro V3 (Bunnik a kol., 2008; Zolla-Pazner, 2005). Mechanismus přesunu PNGS je asociován s HIV-1 reverzní transkriptázou, která ve virovém genomu generuje mutace. V důsledku toho se objevují nová PNGS a původní PNGS mizí (Zhang a kol., 2004). Dlouhodobá studie prováděná na pacientech infikovaných subtypem B HIV-1 viru uvádí nárůst PNGS během akutní a na počátku chronické fáze infekce. V pozdějších fázích infekce došlo k výraznému poklesu počtu PNGS, který koreluje se slábnoucí odpovědí neutralizujících protilátek. (Bunnik a kol., 2008).

V rámci strukturálně-funkčních analýz rekombinantních proteinů gp120 exprimovaných *in vitro* stabilně transfekovanými buněčnými liniemi různého tkáňového původu jsou používány deglykosylační enzymy lišící se specificitou. Mezi nejčastěji používané enzymy pro sudium diferenciální glykosylace gp120 patří:

- PNGáza F (Peptid N-glykosidáza F) - enzym, který katalyzuje kompletní odstranění N-glykanových řetězců z glykoproteinů. Jedná se o glykosylasaparaginasu, která štěpí amidovou vazbu mezi asparaginem a cukrem (Norris a kol., 1994).
- Endo H (Endo N-glykosidáza H) - glykosidasa, která odštěpuje N-glykanové řetězce s vysokým obsahem mannosy a N-glykany hybridního typu, ale neodstraňuje komplexní N-glykany.
- Neuraminidáza (Acetyl-neuraminyl hydroláza) - enzym, který odštěpuje kyselinu sialovou přítomnou v komplexních N-glykanech, (Obr. 11).



Obr. 11: Rozpoznávací místa deglykosylačních enzymů (upraveno dle <http://is.promega.com/>)

Popis rozdílů mezi jednotlivými rekombinantními proteiny gp120 má obrovský význam při výběru buněčné linie vhodné pro expresi proteinu gp120 jako vakcinačního antigenu. Cílem je vybrat gp120, jehož struktura se bude co nejvíce podobat proteinu gp120, který se přirozeně vyskytuje na povrchu HIV-1 viru.

O-vázané glykany

Na rozdíl od přesně definovaných PNGS, O-glykosylační místa je těžké předvídat. O-glykany jsou připojovány postupně, k aminokyselinám Ser nebo Thr v Ser/Thr/Pro bohatých doménách. Předpověď výskytu O-glykosylačních míst je založena na modelování přístupnosti povrchu, odhadu sekundárních struktur a vzdálenostních omezeních. Přesnost předpovědi O-glykosylačního místa je 76 % (Julenius a kol., 2005).

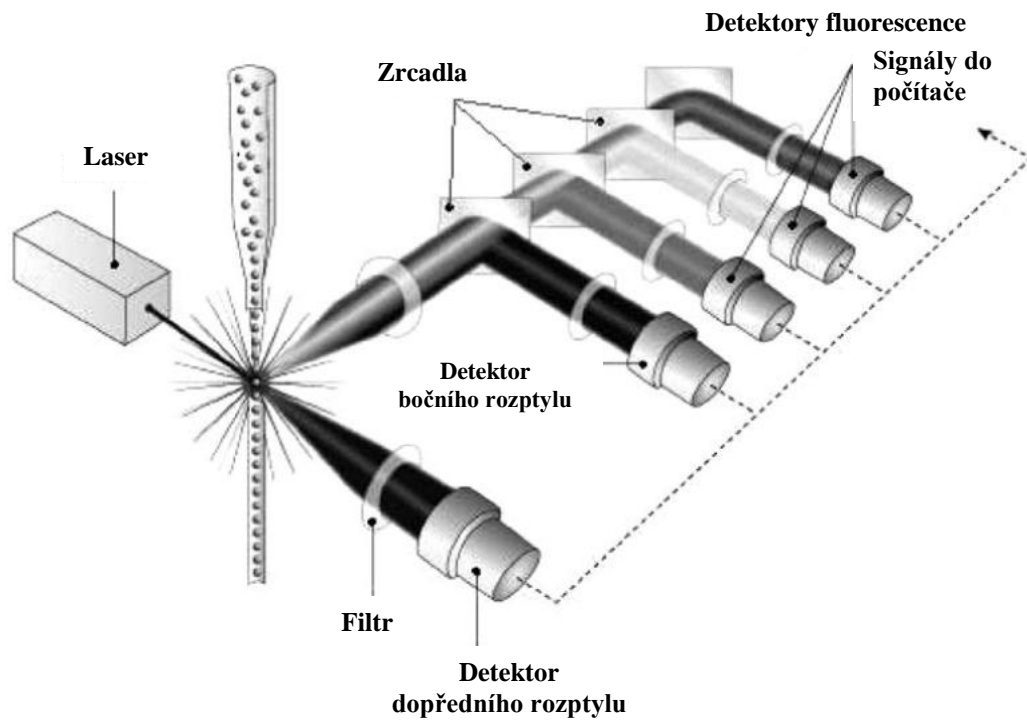
2.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je rychle se rozvíjející přístrojová metoda umožňující simultánní analýzu fyzikálně chemických vlastností buněk, případně jiných částic v suspenzi (Shapiro, 2003). Základem metody je měření rozptylu světla a fluorescence emitované částicemi, které jedna za druhou procházejí měřícím zařízením. Průtoková cytometrie může být dále využita k tzv. sortování – výběru definovaných populací z jejich heterogenní směsi (Ormerod, 2008). Historie prvních průtokových cytometrů spadá do 70. – 80. let 20. stol. V r. 1965 Mack J. Fulwyler navrhl a sestrojil průtokový cytometr s prvním elektrostatickým sorterem, který umožňoval třídit jednotlivé typy krevních částic. Díky novým poznatkům v oblastech využívání fluorescenčních barviv a monoklonálních protilátek zaznamenala průtoková cytometrie v následujících letech prudký rozvoj (Shapiro, 2003). Původní průtokové cytometry s omezenými možnostmi byly s vývojem počítačových a laserových technologií postupně vylepšovány a upravovány, takže dnes se stávají lépe dostupnými a použitelnými v běžné laboratorní praxi.

2.3.1 Princip

Základním principem průtokové cytometrie je plynulý průchod jednotlivých částic v suspenzi přes měřící zařízení. Vzorek je pod tlakem vstříkván do středu proudu nosné kapaliny - vody nebo pufu (Ormerod, 2008). Laminární proud nosné kapaliny zajišťuje tzv. hydrodynamickou fokusaci – částice se usměrní do tenkého proudu a jednotlivě postupují průtokovou komůrkou, ve které jsou protínány světelným paprskem (Eckschlager a kol., 1999). Interakcí částic s nejčastěji laserovým paprskem vzniká signál (rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence), který je zachycován detektory dopředního rozptylu (forward scatter channel, FSC), bočního rozptylu (side scatter channel, SSC) a detektory fluorescence (Obr. 12). Poté je rozdělen systémem hranolů, optických filtrů a zrcadel podle vlnové délky a emitované fluorescence. Jednotlivé světelné signály jsou převáděny na elektrické impulzy a zesilovány pomocí fotonásobiče a dále počítačově zpracovávány. Zjednodušeně lze tedy průtokový cytometr rozdělit na tři základní, vzájemně propojené systémy – fluidiku, optiku

a elektroniku. Zásadní význam pro průtokovou cytometrii má také informatika (Robinson a Grégori, 2007).



Obr. 12: Optika průtokového cytometru (upraveno dle Roubalová, 2012)

2.3.2 Základní charakteristiky průtokově cytometrické analýzy

A) Dopřední rozptyl (forward scatter channel - FSC)

Detektor dopředního rozptylu zachycuje signál v úhlu 20° od osy laserového paprsku. Intenzita FSC informuje o velikosti částic - čím větší je rozptyl, tím větší je velikost částice. Pomocí FCS lze odlišit intaktní buňky od buněčné drti a posoudit velikostní homogenitu částic.

B) Boční rozptyl (side scatter channel - SSC)

Fotonka s násobičem (PMT) zachycuje boční rozptyl v úhlu 90° od osy laserového paprsku. Intenzita SSC signálu poskytuje informaci o vnitřní struktuře (granularitě) buněk. SSC společně s FSC představují unikátní hodnoty pro každou

částici a umožňují tak jejich identifikaci a charakterizaci v heterogenním vzorku. Vynesem signálu FSC a SSC do dvourozměrného grafu získáme záznam rozdělení částic dle jejich velikosti a granularity.

C) Fluorescence

Fluorescence je zachycována fotonkou s násobičem pro každý fluorochrom zvlášť v úhlu 90° od osy laserového paprsku. Měření fluorescence poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o membránových či cytoplazmatických receptorech značených fluorochromy. Fluorochromy jsou barviva, která po osvětlení světlem o určité vlnové délce absorbují energii tohoto záření a následně ji ztratí emisí záření o delší vlnové délce (Marinov, 2008). V moderní průtokové cytometrii lze provádět současné značení více fluorochromy (multibarevná analýza) a tím detekovat více znaků najednou. Při multibarevné analýze se často překrývají části emisních spekter jednotlivých fluorochromů. Tento překryv (spectral overlap) je nutné matematicky kompenzovat odečtením určitého menšího procenta (zpravidla 5 - 10 %) jedné fluorescence od fluorescence druhé. Kompenzace je prováděna analytickými softwary cytometrů automaticky v průběhu snímání dat nebo při analýze již uložených dat (Keren a kol., 1994).

Průtoková cytometrie umožňuje přepočítat množství antigenu na jednotlivých částicích podle množství navázané značené protilátky. Podstata kvantifikace spočívá ve srovnání intenzity fluorescence měřených částic s kalibrační křivkou, která je sestrojena z údajů získaných měřením částic o známém množství fluorochromu (Eckschlager a kol., 1999). Fluorescence se kvantitativně hodnotí v absolutních jednotkách ABC (specific antibody binding capacity) nebo MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome), (Marinov, 2008).

D) Faktory ovlivňující průtokově cytometrickou analýzu

Mezi faktory, které mohou významným způsobem ovlivnit průtokově cytometrickou analýzu patří např. nespecifická vazba protilátek či fluorochromů, stabilita tandemových fluorochromů (obzvláště u tandemové kombinace APC-Cy7), sterické bránění při souběžném užívání většího množství reagensů k detekci stejného komplexu nebo vzájemné interakce protilátek (Shapiro, 2003).

2.3.3 Analýza a interpretace dat

Signály převedené na elektrické impulsy jsou uživateli zobrazovány pomocí počítačového softwaru, který je nedílnou součástí průtokového cytometru. Jeden impuls je označován jako event (událost). Jednotlivé události jsou ukládány do datového souboru, kde jsou připraveny pro další analýzu (Ormerod, 2008). Události jsou graficky zobrazovány jako jednoparametrové histogramy, kde osa x představuje intenzitu signálu a osa y množství částic nebo dvouparametrové histogramy, u kterých je na ose x znázorněna intenzita jednoho signálu a na ose y intenzita druhého signálu. Množství částic (třetí rozměr) je u dvouparametrového histogramu zobrazeno hustotou bodů (dot-plot histogram) nebo tzv. vrstevnicemi (contour-plot histogram). Pro vymezení populace buněk/částic, kterou chceme dále studovat se používá tzv. „gatování“ - ohraničení vybrané populace na základě snímaných dat (Eckschlager a kol., 1999).

2.3.4 Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

K největším výhodám analýzy pomocí průtokové cytometrie patří vysoká rychlost, která u moderních přístrojů dosahuje až 100 000 částic/s. Další výhodou je možnost provádět multiparametrickou analýzu, tj. souběžnou analýzu až 13 parametrů (FSC, SSC a 11 fluorescenčních signálů) na jednotlivé částici. Pomocí průtokové cytometrie lze provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu, třídít buňky s vybranými vlastnostmi a provádět selektivní analýzu cílových populací vybraných pomocí „gatingu“ (Marinov, 2008). Mezi nevýhody patří zejména pořizovací cena přístroje a potřeba zkušeností obsluhy při analýze a vyhodnocování naměřených dat.

2.3.5 Využití průtokové cytometrie

V současnosti je průtoková cytometrie široce využívána jak v základním, tak i aplikovaném výzkumu. Uplatňuje se např. v buněčné biologii, genetice, imunologii, molekulární biologii nebo mikrobiologii. Stále větší využití nachází v běžných klinických laboratořích v diagnostice, prognostice a při sledování průběhu onemocnění (Robinson a Grégori, 2007). Analýza obsahu DNA, imunofenotypizace leukémií a lymfomů, imunologické monitorování HIV infikovaných pacientů nebo analýza erytrocytů, leukocytů a krevních destiček jsou konkrétními příklady aplikací průtokové cytometrie v klinické praxi (Brown a Wittwer, 2000).

3 Cíle práce

- 1) Seznámení se s průtokovou cytometrií.
- 2) Optimalizace podmínek adsorpce protilátky vážící rekombinantní protein gp120 na mikropartikule.
- 3) Vazba proteinu gp120 na mikropartikule s adsorbovanou vaznou protilátkou.
- 4) Ověření efektivity vazby proteinu.
- 5) Charakteristika vazby sérových protilátek na rekombinantní proteiny gp120.

4 Materiál a metody

4.1 Přístrojové vybavení a reagensie

Přístrojové vybavení:

Analytické váhy: Mettler AE240

Biologický termostat: BT 120M

Centrifuga: Mikro 22R, Hettich zentrifugen

CR312, Jouan

Flowbox: LC 2.12, Jouan

Minitřepačka: IKA MS3 basic

Průtokový cytometr: BD FACS Canto II

Sonikační lázeň: Transsonic T460

Třepačka: Orbital Multi PSU-20i

Reagensie:

Pufry:

Coupling Buffer (konjugační pufr): 150 mL (BD Biosciences, Cat. No.: 51-9004756)

Storage Buffer (skladovací pufr): 90 mL (BD Biosciences, Cat. No.: 51-9004758)

Blokovací pufr 4% FBS v PBS - 4% fetální bovinní sérum v 1xPBS*

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

Protilátky:

Penta-His Antibody, Mouse monoclonal IgG₁ (Qiagen, Cat. No.: 34660)

Goat Anti-human IgG-PE (Santa Cruz Biotechnology sc-3736)

Mouse Anti-V5-FITC Antibody (AbD serotec, Cat. No.: MCA 2894F)

Enzymy:

PNGáza F (Peptid N-Glykosidáza F), (Prozyme, Cat. No.: PZGKE-5006B)

Chemikálie:

DMSO, Dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, Cat. No.: SD5879)

DTT, Dithiothreitol (Duchefa, Cat. No.: D1309)

NEM, N-Ethylmaleimide (Thermo Scientific, Cat. No.: 23030)

Sulfo-SMCC, Sulfosuccinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyclohexane 1-carboxylate
(Thermo Scientific, Cat. No.: 22322)

Ostatní:

Fluorescenčně značené mikropartikelule Functional Bead A6 (BD Biosciences, Cat. No.: 560032)

Kolony Bio-Rad Spin Columns (Bio-Rad, Cat. No.: 732-6231)

** Příprava blokovacího pufru 4% FBS v PBS:*

Do zkumavky o objemu 50 ml byly nepipetovány 2 ml FBS a 48 ml 1x PBS. Roztok byl zvortexován a přefiltrován do nové zkumavky. Práce byla prováděna ve sterilním flowboxu, aby se předešlo kontaminacím. Blokovací pufr byl skladován při $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

4.2 Biologický materiál

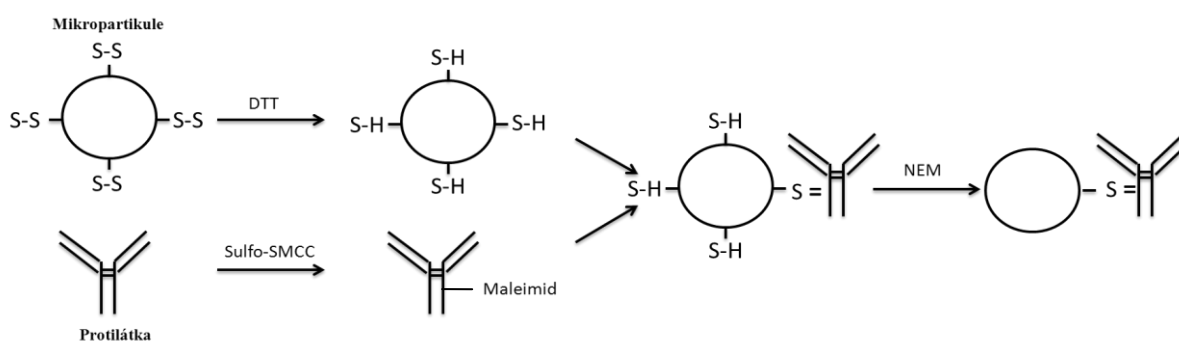
Pro průtokově cytometrickou analýzu reaktivity sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120 byla použita lidská séra HIV-1 infikovaných jedinců (subtypy A/C) z jihozápadní Tanzanie, oblasti Mbeya (Tab. I). Vzorky byly získány v rámci HIV Superinfection Study (HSIS) schválené místní a národní ERB (Ethical Review Board). Testované rekombinantní proteiny gp120 byly izolovány ze stabilně transfekovaných buněčných linií 293T (buněčná linie lidské embryonální ledviny) a RD (buněčná linie lidského rhabdomyosarkomu). Proteiny gp120 byly před použitím skladovány při -80°C . Jejich koncentrace byla orientačně stanovena srovnáním denzity proužku proteinu gp120 s denzitou proužků odpovídajících titrační řadě kalibračního proteinu po SDS-PAGE a obarvení proteinů Coomassie Brilliant Blue R-250. Při konjugaci gp120 na mikropartikelule bylo pracováno se zásobními roztoky o koncentraci 1 mg/ml.

Tab. I: Charakteristika sérových protilátek ve vzorcích HIV-1 pozitivních pacientů

Označení vzorku	Celkové IgG [mg/ml]	Celkové IgA [mg/ml]	Neutralizační titry
P40	22,127	2,629	180
P44	25,771	1,528	1000
P47	26,714	1,839	60
P69	34,453	2,038	500

4.3 Konjugace fluorescenčně značených mikropartikulí s protilátkou Penta-His

Konjugace spočívá v aktivaci vazby volné aminoskupiny protilátky Penta-His pomocí sulfo-SMCC chemie. Disulfidické vazby fluorescenčně značených mikropartikulí byly redukovány DTT a konjugace byla dokončena přidáním NEM - alkylačního činidla, které reaguje s -SH skupinami za tvorby stabilních thioesterových vazeb (Obr. 13).



Obr. 13: Konjugace protilátky na mikropartikule

Po celou dobu manipulace s fluorescenčně značenými mikropartikulemi byly mikropartikule chráněny před světlem překrytím mikrocentrifugačních zkumavek alobalovou fólií.

4.3.1 Příprava mikropartikulí

1. Mikropartikule Functional Bead A6 dodané firmou BD Biosciences byly před použitím vortexovány po dobu 30 s.
2. Do mikrocentrifugační zkumavky bylo přeneseno potřebné množství mikropartikulí.
Pro 1000 μ l suspenze: 150 μ l mikropartikulí
3. Mikropartikule byly sonikovány po dobu 1 min v sonikační lázni.
4. K mikropartikulím bylo přidáno 1M DTT.
Pro 1000 μ l suspenze: 3,8 μ l 1M DTT.

5. Mikrocentrifugační zkumavka byla vortexována po dobu 5 s, následně byly mikropartikelky inkubovány na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod.
6. K mikropartikelím byl přidán 1 ml konjugačního pufru dodaného firmou BD Biosciences jako součást kitu.
7. Mikrozkušavka byla centrifugována po dobu 3 min při 900 x g a následně byl odsán supernatant.
8. Kroky 6. a 7. byly 3x zopakovány.
9. Mikropartikelky byly resuspendovány v odpovídajícím množství konjugačního pufru a připraveny tak pro konjugaci s Penta-His protilátkou.
Pro 1000 µl suspenze: resuspendovat v 4 µl konjugačního pufru.

4.3.2 Modifikace protilátky

1. Do mikrocentrifugační zkumavky bylo odebráno odpovídající množství protilátky Penta-His o koncentraci 1 mg/ml v PBS, pH 7,2±0,2.
Pro 1000 µl suspenze: 180 µl protilátky Penta-His.
2. Bezprostředně před použitím byl připraven čerstvý sulfo-SMCC o koncentraci 2 mg/ml v deionizované vodě, který byl v odpovídajícím množství přidán k protilátce Penta-His.
Pro 1000 µl suspenze: 4 µl sulfo-SMCC.
3. Mikrocentrifugační zkumavka byla vortexována po dobu 5 s a následně byla protilátka inkubována na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod.

4.3.3 Výměna pufru pro odstranění nezreagovaných komponent

1. Bio-Rad Spin kolona byla 3x propláchnuta konjugačním puftrem, přenesena do čisté zkumavky a centrifugována po dobu 2 min při 1000 x g.
2. Bio-Rad Spin kolona byla přenesena do nové prázdné zkumavky. Na kolonu byla nanášena veškerá modifikovaná protilátka Penta-His.
3. Zkušavka s kolonou byla centrifugována po dobu 2 min 15 s při 1000 x g.
4. Po odstranění kolony bylo okamžitě přikročeno k vlastní konjugaci.

4.3.4 Vlastní konjugace

1. Veškerá modifikovaná protilátka Penta-His z předchozího kroku byla přenesena do mikrocentrifugační zkumavky obsahující již připravené funkční mikropartikule.
2. Mikrocentrifugační zkumavka byla vortexována po dobu 5 s a následně byly mikropartikule s protilátkou Penta-His inkubovány na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod.
3. Do mikrocentrifugační zkumavky bylo přeneseno odpovídající množství NEM o koncentraci 2 mg/ml v DMSO.
Pro 1000 μ l suspenze: 4 μ l NEM.
4. Mikrocentrifugační zkumavka byla vortexována po dobu 5 s a následně inkubována na třepačce při pokojové teplotě po dobu 15 min.
5. Do mikrocentrifugační zkumavky byl přidán 1 ml skladovacího pufru dodaného firmou BD Biosciences jako součást kitu.
6. Mikrozkumavka byla centrifugována po dobu 3 min při 900 x g a následně byl odsán supernatant.
7. Kroky 5. a 6. byly 3x zopakovány.
8. V tomto kroku byly mikropartikule s adsorbovanou vázící protilátkou připraveny pro konjugaci rekombinantního gp120 proteinu.

4.4 Vazba proteinu gp120 na mikropartikule s aktivovanou protilátkou Penta-His

1. K mikropartikulím s navázanou protilátkou Penta-His (viz kapitola 4.3 *Konjugace protilátky Penta-His na mikropartikule*) byl přidán 1 ml blokačního pufru 4% FBS v PBS a mikropartikule byly inkubovány na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod. Inkubační mikropartikulí v blokačním pufru došlo k zablokování nespecifických vazebných míst na aktivovaných mikropartikulích.
2. Mikrozkumavka byla centrifugována po dobu 5 min při 1000 x g a následně byl odsán supernatant.

- Do mikrocentrifugační zkumavky bylo přidáno odpovídající množství rekombinantního proteinu gp120 o koncentraci 1 mg/ml.
Pro 1000 μ l suspenze: 180 μ l proteinu gp120.
- Mikropartikule s navázanou protilátkou Penta-His byly společně s proteinem gp120 inkubovány na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1,5 hod.
- Mikrozkumavka byla centrifugována po dobu 5 min při 1000 x g a následně byl odsán supernatant.
- Pelet byl resuspendován v 1 ml skladovacího pufru. Finální koncentrace mikropartikulí byla 6×10^6 mikropartikulí/1 ml. Mikropartikule byly skladovány chráněné před světlem při $\pm 4^\circ\text{C}$.

4.5 Vazba sérových protilátek na rekombinantní gp120 na mikrosférách s protilátkou Penta-His

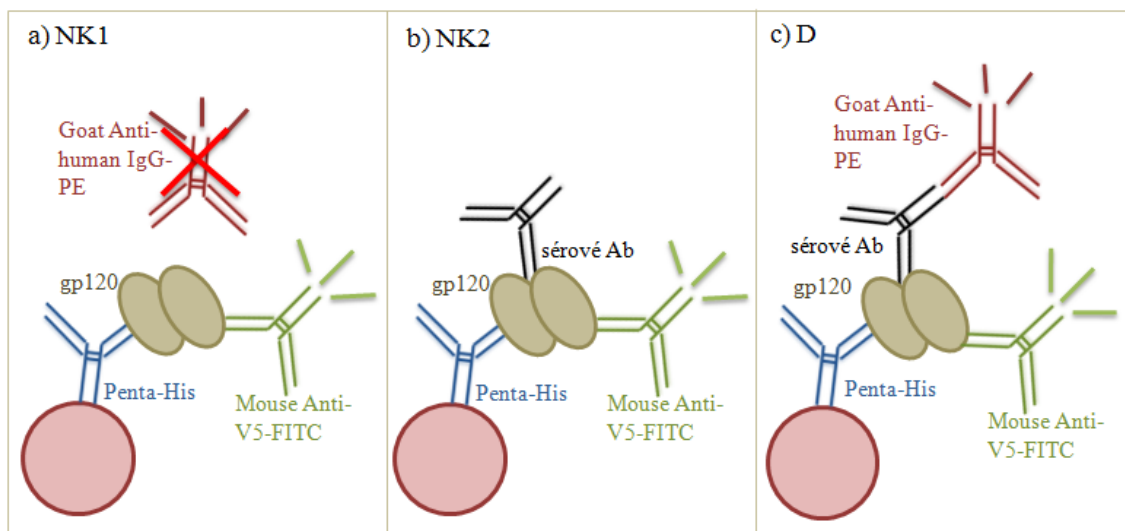
- Do mikrocentrifugačních zkumavek byly podle Tab. II napipetovány reakční směsi odpovídající různému ředění sérových protilátek ve vzorcích P40, P44, P47 a P69 s cílem najít optimální koncentraci pro efektivní vazbu na rekombinantní proteiny gp120.

Tab. II: Složení reakční směsi pro jednotlivá ředění sérových protilátek

Ředění sérových protilátek	1000x ředěný vzorek lidského séra [μ l]	Mikropartikule s navázaným gp120 přes Penta-His protilátku [μ l]	4% FBS [μ l]	Celkový objem [μ l]
30 000x	17	5	478	500
50 000x	10	5	485	
80 000x	6	5	489	
100 000x	5	5	490	

- Vzorky byly inkubovány na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1, 5 hod.
- Mikrozkumavky byly centrifugovány po dobu 5 min při 1000 x g a následně bylo odsáto 400 μ l supernatantu.
- Pelet byl resuspendován ve zbývajících 100 μ l supernatantu a z každé mikrozkumavky bylo odebráno do nové mikrocentrifugační zkumavky 50 μ l. Tyto vzorky byly označeny jako negativní kontroly (NK2).

5. Do zkumavek označených NK2 (Obr. 14b) bylo přidáno 0,5 μ l 10x ředěné protilátky Mouse Anti-V5-FITC. Do zbývajících mikrokumavek bylo přidáno 0,5 μ l 10x ředěné protilátky Mouse Anti-V5-FITC a současně 2 μ l sekundární značené protilátky Goat Anti-human IgG-PE. Tyto zkumavky byly označeny D („detektor“, Obr. 14c)
6. Zároveň byly připraveny negativní kontroly NK1 (Obr. 14a), které obsahovaly 2,5 μ l mikropartikulí s navázaným proteinem gp120 přes protilátku Penta-His a 47,5 μ l FBS pufru. K mikrozkuvkám označeným NK1 bylo přidáno 0,5 μ l 10x ředěné protilátky Mouse Anti-V5-FITC a 2 μ l sekundární značené protilátky Goat Anti-human IgG-PE.
7. Všechny vzorky byly inkubovány na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod.
8. Do mikrozkuvek byl přidán 1 ml 1x PBS pufru.
9. Mikrozkuvky byly centrifugovány po dobu 5 min při 1000 x g a následně byl odsán supernatant.
10. Pelety byly resuspendovány ve 150 μ l 1x PBS pufru a jednotlivé vzorky měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II.



Obr. 14: Schematické znázornění vazby protilátek na rekombinantní proteiny gp120 (a) NK1 - bez sérových protilátek, s Goat Anti-human IgG-PE, b) NK2 - sérové protilátky, bez Goat Anti-human IgG-PE, c) D - sérové protilátky detekovány pomocí Goat Anti-human IgG-PE)

4.6 Deglykosylace rekombinantních proteinů gp120 na mikropartikulích s adsorbovanou vaznou protilátkou

Deglykosylace rekombinantních proteinů gp120 navázaných na mikropartikule přes protilátku Penta-His byla provedena za nativních podmínek pomocí enzymu PNGáza F, který odstraňuje všechny typy N-glykanů.

1. Před provedením deglykosylace byly mikropartikule 4x promyty v PBS kvůli odstranění azidu sodného obsaženého ve skladovacím pufru.
2. Do mikrocentrifugačních zkumavek byly napipetovány reakční směsi podle Tab. III. Pufř použitý pro deglykosylaci proteinů gp120 byl dodán současně s enzymem PNGáza F (Cat. No.: PZGKE-5006B).

Tab. III: Složení reakční směsi pro deglykosylaci gp120

1x	ddH ₂ O [μl]	5x Reakční pufř [μl]	Mikropartikule s gp120 [μl]	PNGáza F [μl]	Celkový objem [μl]
S enzymem	15	6	5	4	30
Bez enzymu (negativní kontrola)	19	6	5	-	

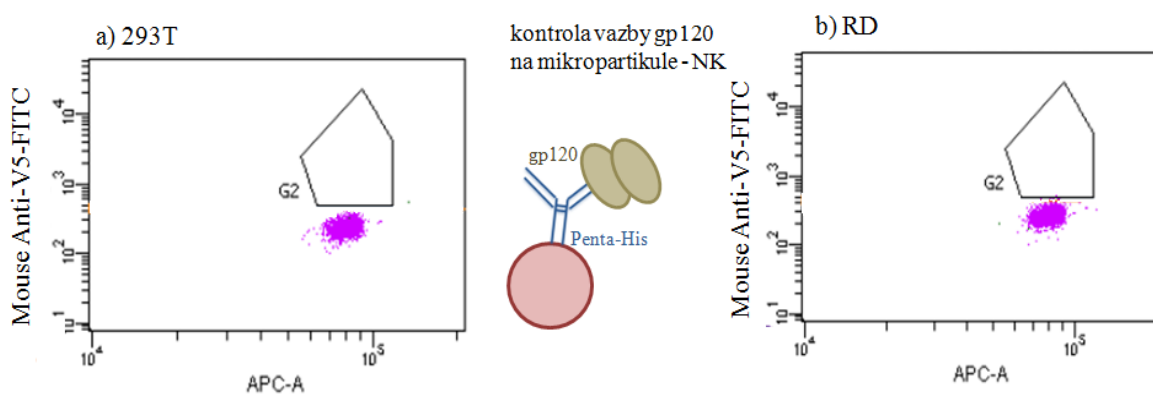
3. Vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 30 h.
4. Do mikrocentrifugačních zkumavek byl přidán 1 ml 1x PBS pufř.
5. Mikrozkušavky byly centrifugovány po dobu 6 min při 1000 x g a následně byl odsán supernatant.
6. Kroky 3. a 4. byly 4x zopakovány.
7. Deglykosylované proteiny gp120 byly v tomto kroku připraveny pro vazbu sérových protilátek v optimalizované koncentraci (viz kapitola 4.5 *Vazba sérových protilátek na rekombinantní gp120**).

* Postup se liší přípravou negativní kontroly, ke které byly stejně jako v případě ostatních vzorků přidány 2 μl sekundární značené protilátky Goat Anti-human IgG-PE. Negativní kontrolou se tedy v tomto případě rozumí nativní vzorky (bez enzymu).

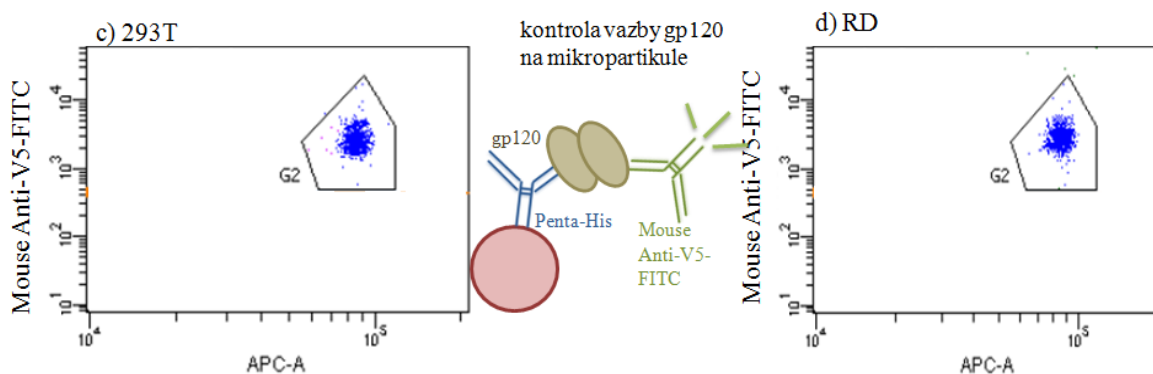
5 Výsledky

5.1 Ověření vazby rekombinantních proteinů gp120 na značené mikropartikule

Před analýzou vazby sérových protilátek na rekombinantní proteiny gp120 byla pomocí průtokové cytometrie kontrolována vazba proteinů gp120 na mikropartikule přes protilátku Penta-His. Na Obr. 15 - 16 jsou spolu se schematickým znázorněním reakcí histogramy sloužící jako kontrola vazby rekombinantních proteinů gp120 293T a RD na mikropartikule. Tato vazba byla detekována pomocí protilátky Mouse Anti-V5 značené FITC namířené proti V5 doméně rekombinantních proteinů gp120. Reaktivita rekombinantních proteinů gp120 s protilátkou Penta-His (% událostí v gatu G2) byla ve všech vzorcích > 98 % (viz Tab. V), což ukazuje na vysokou účinnost vazby gp120 na mikropartikule s adsorbovanou vaznou protilátkou.



Obr. 15: Kontrola vazby rekombinantních proteinů gp120 na mikropartikule - negativní kontrola



Obr. 16: Kontrola vazby rekombinantních proteinů gp120 pomocí protilátky Mouse Anti-V5-FITC

5.2 Analýza reaktivity sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120 na mikropartikulích

Protilátky z lidských sér HIV-1 infikovaných osob z Afriky byly v rozdílných koncentracích vázány na mikropartikule s rekombinantními proteiny gp120 293T a RD navázanými přes protilátku Penta-His. Efektivita vazby sérových protilátek byla hodnocena pomocí průtokově cytometrické analýzy. Tab. IV shrnuje účinnost vazby sérových protilátek detekovaných pomocí sekundární protilátky Goat Anti-Human IgG značené fykoerytrinem při 30 000 - 100 000 násobném ředění sérových protilátek. Optimální koncentrace sérových protilátek vázaných na proteiny gp120, které byly použity pro další analýzu byly shodné pro obě varianty (293T, RD) rekombinantního proteinu gp120.

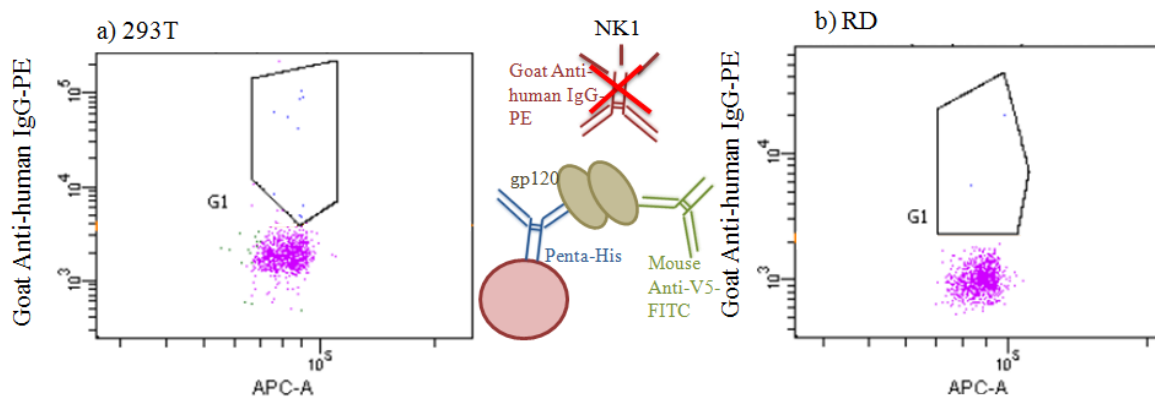
Tab. IV: Hodnocení vazby sérových protilátek na mikropartikule s gp120 proteiny

Označení vzorku	Ředění sérových protilátek			
	30 000x	50 000x	80 000x	100 000x
P40	++	++	++	+++
P44	+	+	+++	+
P47	++	+++	+	-
P69	++	+++	+	-

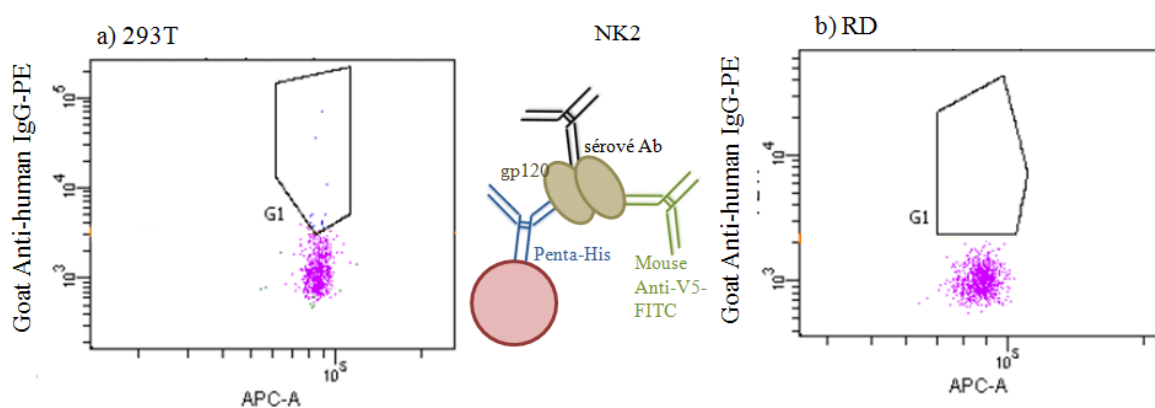
Legenda:

- žádná pozitivní vazba nedetekována
- + detekce slabě pozitivní vazby
- ++ detekce středně pozitivní vazby
- +++ detekce silně pozitivní (optimální) vazby

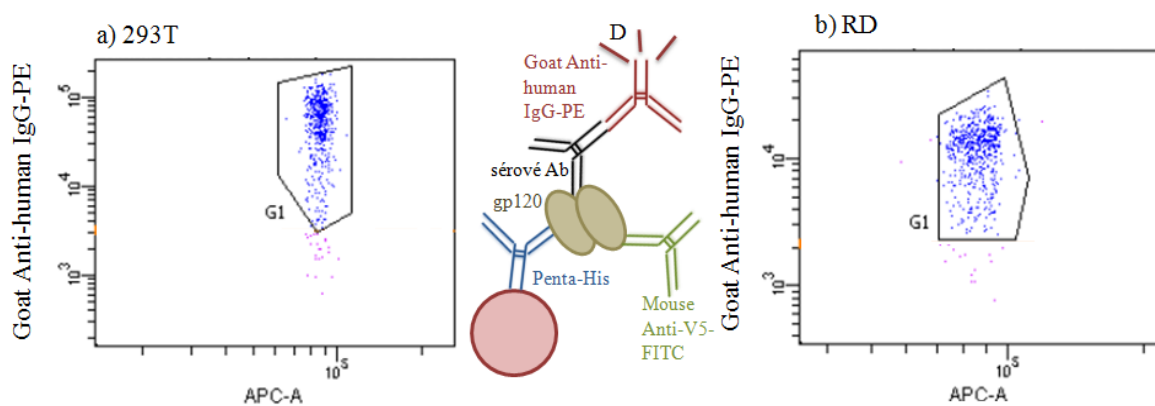
Na Obr. 19 jsou společně se schematickým znázorněním reakce histogramy pro sérové protilátky ze vzorku P40 získané při 100 000 násobném ředění, které bylo pro tento vzorek vyhodnoceno jako optimální (viz Tab. IV). Jako negativní kontroly byly použity vzorky NK1 (Obr. 17) a NK2 (Obr. 18). Na základě srovnání s negativními kontrolami byla v rámci histogramu stanovena oblast pozitivní reaktivity označená G1. Oblast G1 vymezuje populaci mikropartikulí s navázanými sérovými protilátkami detekovanými prostřednictvím protilátky Goat Anti-human IgG-PE.



Obr. 17: Vazba sérových protilátek P40 na rekombinantní proteiny gp120 - NK1 (bez sérových protilátek, s Goat Anti-human IgG-PE). V reakční směsi byla přítomna i protilátka proti V5 epitopu značená FITC, ale fluorescence v kanále FITC zde nebyla měřena.



Obr. 18: Vazba sérových protilátek P40 na rekombinantní proteiny gp120 - NK2 (sérové protilátky, bez Goat Anti-human IgG-PE). V reakční směsi byla přítomna i protilátka proti V5 epitopu značená FITC, ale fluorescence v kanále FITC zde nebyla měřena.



Obr. 19: Vazba sérových protilátek P40 na rekombinantní proteiny gp120 - D (sérové protilátky detekovány pomocí Goat Anti-human IgG-PE). V reakční směsi byla přítomna i protilátka proti V5 epitopu značená FITC, ale fluorescence v kanále FITC zde nebyla měřena.

Uvedená grafická zobrazení jsou společně s analogickými výsledky pro optimální koncentrace sérových protilátek ze vzorků P44, P47 a P69 zpracována ve formě Tab. V.

Tab. V: Reaktivita sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120

Označení vzorku	Gp120 protein	Typ vzorku	Reaktivita s Goat Anti-human IgG-PE Události v G1 [%]	Reaktivita s Mouse Anti-V5-FITC Události v G2 [%]
P40	293T	NK1	1,2	98,2
		NK2	2,4	98,3
		D	95,1	99,7
	RD	NK1	0,2	99,1
		NK2	0	99,7
		D	96,9	99,8
P44	293T	NK1	0,9	98,9
		NK2	1	99,2
		D	96,4	99,5
	RD	NK1	0,7	98,7
		NK2	0,3	100
		D	93,5	99,1
P47	293T	NK1	1,1	98,1
		NK2	0,1	99,9
		D	94,7	99,6
	RD	NK1	0,6	98,2
		NK2	0,7	99,5
		D	93,1	99,5
P69	293T	NK1	0,9	98,9
		NK2	0,7	99,1
		D	94,7	99,3
	RD	NK1	1	98,1
		NK2	2,4	98,6
		D	96,1	98,7

Legenda:

NK1 gp120 bez sérových protilátek, s Goat Anti-human IgG-PE

NK2 gp120 se sérovými protilátkami, bez Goat Anti-human IgG-PE

D gp120 se sérovými protilátkami detekovanými pomocí Goat Anti-human IgG-PE

- G1 gate G1 vytvořený na základě srovnání s negativními kontrolami vymezející populaci mikropartikulí s navázanými sérovými protilátkami detekovanými pomocí Goat Anti-human IgG-PE
- G2 gate G2 vytvořený na základě srovnání s negativní kontrolou vymezející populaci mikropartikulí s navázanými gp120 proteiny detekovanými pomocí Mouse Anti-V5-FITC

Výsledná reaktivita sérových protilátek byla vypočítána jako rozdíl hodnoty reaktivity získané měřením vlastního vzorku D (% událostí v gatu G1) a nejvyšší hodnoty pozadí u negativních kontrol - NK1 a NK2 (% událostí v gatu G1) získané v rámci jednoho experimentu (Tab. VI).

Tab. VI: Reaktivita sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120

Označení vzorku	Gp 120 protein	Výsledná reaktivita [%]
P40	293T	92,7
	RD	96,7
P44	293T	95,4
	RD	92,8
P47	293T	93,6
	RD	92,4
P69	293T	93,8
	RD	93,7

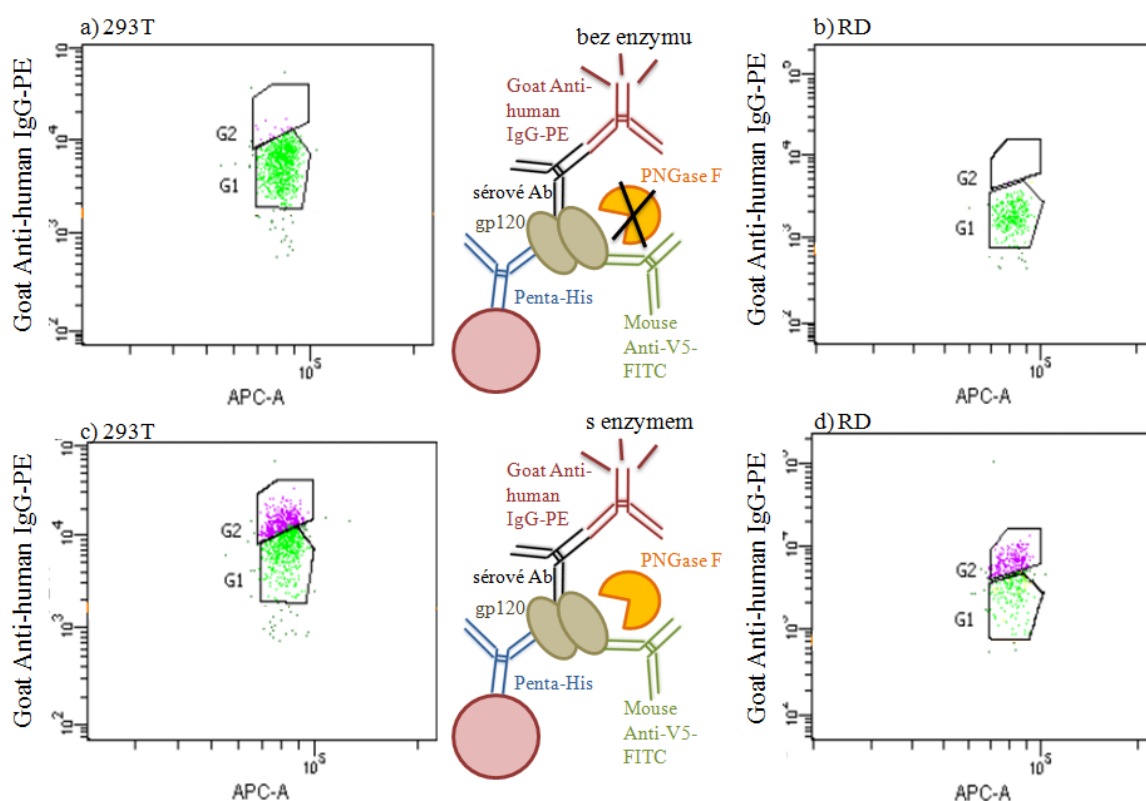
Reaktivita (% událostí v G1) u negativních kontrol se pohybovala v rozmezí 0 - 2,4 % s průměrnou hodnotou 0,9 %. U vlastních vzorků s Goat Anti-human IgG-PE byla naměřena výsledná reaktivita (% událostí v G1 po odečtení pozadí) 92,4 - 96,7 % s průměrnou hodnotou 93,9 %.

Při analýze reaktivity sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120 bylo dále zjištěno, že protilátky ve vzorcích P40 a P44 se vážou efektivněji na 293T gp120 proteiny, než na RD proteiny. Reaktivita protilátek ve vzorcích P47 a P69 s jednotlivými glykofomami gp120 se výrazně nelišila.

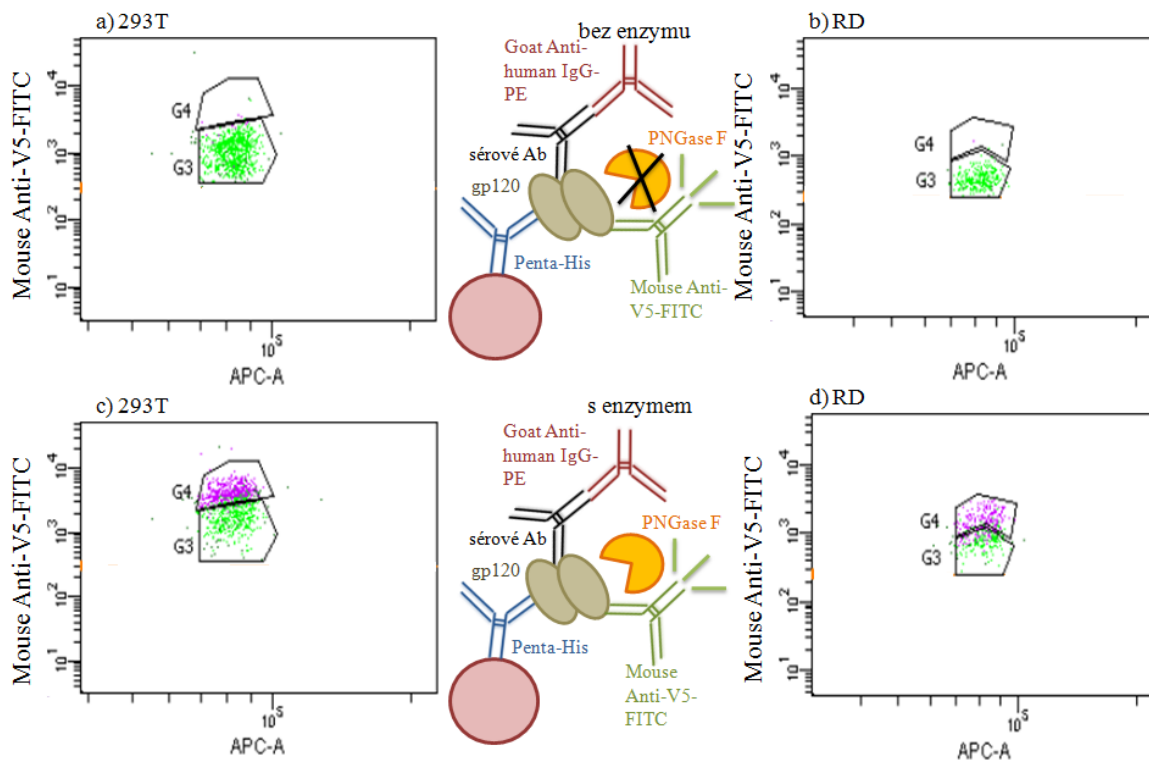
5.3 Analýza reaktivity sérových protilátek s deglykosylovanými rekombinantními proteiny gp120

Otestované optimální koncentrace sérových protilátek ze vzorků P40, P44, P47 a P69 (viz kapitola 5.2 *Analýza reaktivity sérových protilátek s proteiny gp120*) byly použity pro vazbu na deglykosylované proteiny gp120 a následnou analýzu rozdílů v reaktivitě sérových protilátek. Deglykosylace gp120 byla provedena pomocí enzymu PNGáza F, který odštěpuje všechny typy N-glykanů. Současně byly sledovány změny ve vazbě protilátky Mouse Anti-V5-FITC na deglykosylované proteiny gp120 293T a RD.

Na Obr. 20 jsou společně se schematickým znázorněním reakcí histogramy pro analýzu vazby sérových protilátek vzorku P40 na PNGázou F ošetřené a neošetřené proteiny gp120. Zároveň jsou ukázány změny v reaktivitě protilátky Mouse Anti-V5-FITC s deglykosylovanými proteiny gp120 (Obr. 21).



Obr. 20: Vazba sérových protilátek P40 na rekombinantní proteiny gp120 detekovaná protilátkou Goat Anti-human IgG-PE. V reakční směsi byla přítomna i protilátka proti V5 epitopu značená FITC, ale fluorescence v kanále FITC zde nebyla měřena



Obr. 21: Vazba protilátky Mouse Anti-V5-FITC na rekombinantní proteiny gp120. V reakční směsi bylo přítomno i sérum pacienta a detektor PE ale fluorescence v kanále PE nebyla měřena.

Grafická zobrazení jsou společně s analogickými výsledky pro sérové protilátky ze vzorků P44, P47 a P69 zpracována v Tab. VII. Jako kontroly (v Tab. VII uvedeny jako nativní vzorky) pro analýzu reaktivity sérových protilátek s deglykosylovanými rekombinantními proteiny gp120 navázanými na fluorescenčně značené mikropartikule byly použity mikropartikule s navázanými rekombinantními proteiny gp120, které nebyly ošetřeny PNGázou F.

Tab. VII: Reaktivita sérových protilátek a protilátky Mouse Anti-V5-FITC s rekombinantními proteiny gp120 nativními a ošetřenými PNGázou F

Označení vzorku	Gp120 protein	Typ vzorku	Reaktivita s Goat Anti-human IgG-PE		Reaktivita s Mouse Anti-V5-FITC	
			Události v G1 [%]	Události v G2 [%]	Události v G3 [%]	Události v G4 [%]
P40	293T	Nativní	93	1,8	96,6	0,6
		PNGáza F	57,2	40,6	42,1	52,7
	RD	Nativní	94,5	0,3	94,9	1
		PNGáza F	40,2	51,2	52,1	40,2
P44	293T	Nativní	95,6	1,4	98,4	0,5
		PNGáza F	40,7	60,9	55	48,9
	RD	Nativní	96,9	0,7	97,8	0,7
		PNGáza F	71,7	28,8	4,1	94,1
P47	293T	Nativní	93,3	1,1	97,6	0,1
		PNGáza F	92,8	4	51,4	46
	RD	Nativní	98,1	0,3	98,5	0
		PNGáza F	8,8	88,5	20,6	78,4
P69	293T	Nativní	95,2	1,8	96,3	0,9
		PNGáza F	31,6	69,9	9,6	88,2
	RD	Nativní	98,5	0,8	97,4	1,1
		PNGáza F	40,3	55,3	6,8	90,3

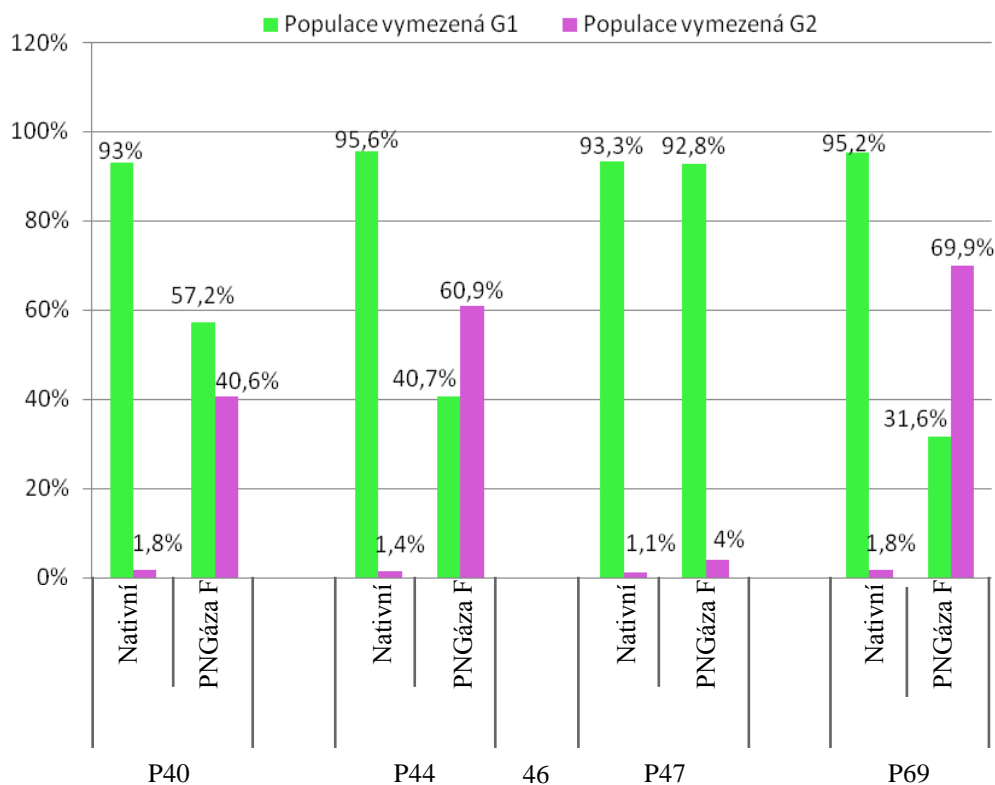
Legenda:

- G1 gate G1 vymežující populaci mikropartikulí s navázanými sérovými protilátkami detekovanými pomocí Goat Anti-human IgG-PE bez ošetření proteinů gp120 enzymem PNGáza F (příklad nastavení hranic G1 viz Obr. 20)
- G2 gate G2 vymežující populaci mikropartikulí s navázanými sérovými protilátkami detekovanými pomocí Goat Anti-human IgG-PE po ošetření proteinů gp120 enzymem PNGáza F (příklad nastavení hranic G2 viz Obr. 20)
- G3 gate G3 vymežující populaci mikropartikulí s navázanými nedeglykosylovanými proteiny gp120 detekovanými pomocí Mouse Anti-V5-FITC (příklad nastavení hranic G3 viz Obr. 21)
- G4 gate G4 vymežující populaci mikropartikulí s navázanými deglykosylovanými proteiny gp120 detekovanými pomocí Mouse Anti-V5-FITC (příklad nastavení hranic G4 viz Obr. 21)

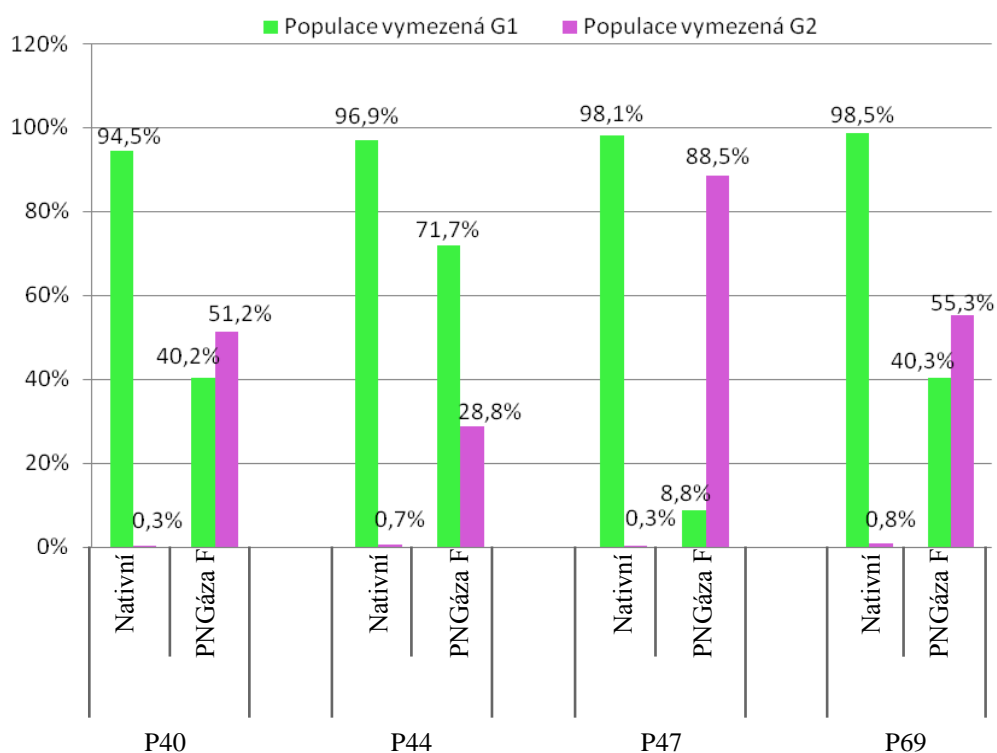
Po srovnání nativních vzorků s vzorky ošetřenými PNGázou F bylo zjištěno, že reaktivita sérových protilátek detekovaných pomocí Goat Anti-human IgG-PE s oběma glykoformami gp120 stoupá, tj. události z gatu G1 se částečně přesouvají do gatu G2. Jedinou výjimku představuje sérum P47, u něhož reaktivita s deglykosylovaným i nativním proteinem gp120 293T zůstala přibližně stejná. Naopak nejvyšší rozdíl v reaktivitě byl detekován u téhož vzorku s glykoformou RD. Současně s reaktivitou sérových protilátek byla kontrolována i reaktivita protilátky Mouse Anti-V5-FITC s enzymem ošetřenými a neošetřenými proteiny gp120. V případě všech testovaných vzorků byla detekována stoupající reaktivita, tj. události z gatu G3 se částečně přesunuly do gatu G4. Lze tedy konstatovat, že provedení deglykosylace nevedlo k odstranění gp120 z mikropartikulí a pravděpodobně vedlo k odkrytí dalších epitopů pro vazbu monoklonální protilátky (Mouse Anti-V5-FITC) i sérových protilátek.

Změny v reaktivitě sérových protilátek s rekombinantními proteiny gp120 ošetřenými PNGázou F ve srovnání s reaktivitou stejných protilátek s nativními gp120 jsou znázorněny v Grafech č. 1 a 2. Zeleně jsou vyznačeny populace mikropartikulí vymezené gatem G1, které představují oblast nižší fluorescence a fialově jsou označeny populace vymezené gatem G2 představující oblasti vyšší detekované fluorescence (viz Obr. 20).

Graf č. 1: Změny v reaktivitě sérových protilátek s deglykosylovanými proteiny gp120 293T



Graf č. 2: Změny v reaktivitě sérových protilátek s deglykosylovanými proteiny gp120 RD



Legenda:

- G1 gate G1 vymežující populaci mikropartikulí s navázanými sérovými protilátkami detekovanými pomocí Goat Anti-human IgG-PE bez ošetření proteinů gp120 enzymem PNGáza F (příklad nastavení hranic G1 viz Obr. 20)
- G2 gate G2 vymežující populaci mikropartikulí s navázanými sérovými protilátkami detekovanými pomocí Goat Anti-human IgG-PE po ošetření proteinů gp120 enzymem PNGáza F (příklad nastavení hranic G2 viz Obr. 20)

6 Diskuze

Diplomová práce představila metodu založenou na vazbě rekombinantních proteinů gp120 na fluorescenční mikropartikel, která umožňuje analyzovat antigen gp120 za nativních podmínek (ve srovnání s metodou Western blot). V případě úplné či částečné denaturace proteinů totiž dochází ke konformačním změnám, které vedou k vytvoření nových a zániku již existujících epitopů a tím může dojít ke změnám v reaktivitě s protilátkami. Současně při použití fluorescenčních mikroparticulí pro vazbu proteinu gp120 nedochází k výraznému sterickému bránění (ve srovnání s ELISA metodou), jelikož mikropartikel mají oproti ELISA jamkám relativně větší vazebný povrch. Další výhodou analýzy reaktivity protilátek s proteiny gp120 navázanými na fluorescenční mikropartikel je možnost používat pro ošetření antigenu (např. při deglykosylaci) neomezeně malý objem a současně provádět multiplexní analýzu, při které lze najednou hodnotit vazbu více protilátek na tentýž antigen.

V diplomové práci byla pomocí průtokově cytometrické analýzy sledována reaktivita sér izolovaných od pacientů infikovaných subtypem A/C HIV-1 viru s rekombinantními proteiny gp120 exprimovanými v buněčné linii 293T (lidská embryonální ledvina) a RD (lidský rhabdomyosarkom) navázanými na fluorescenční mikropartikel pomocí vazné protilátky rozlišující penta-HIS epitop připojený na konec gp120 proteinu. Bohatě glykosylovaný protein gp120 hraje významnou roli při vstupu HIV-1 viru do hostitelské buňky a přibližně polovinu jeho molekulové hmotnosti tvoří N-glykany sloužící jako potencionální epitopy pro neutralizující protilátky. Pro vakcinační pokusy se používají rekombinantní proteiny gp120 získané *in vitro* expresí v buněčných liniích různého tkáňového původu, což ovlivňuje glykosylaci produkovaných gp120 proteinů (Kong a kol., 2010; Raška a kol., 2010; Go a kol., 2013) a ta ovlivňuje jejich reaktivitu se séry pacientů infikovaných virem HIV-1 (Hu a kol., 2007; Li a kol., 2008; Raška a kol., 2010), což potvrzuje i tento experiment.

Koncentrace sérových protilátek pro analýzu reaktivity s rekombinantními proteiny gp120 byla pro každé použité sérum optimalizována zvlášť. To umožňuje testovat změny reaktivity sér například po deglykosylaci gp120 proteinu v oblastech optimální reaktivity. Ve srovnání s podobným experimentem prováděným ELISA

metodou byly optimální koncentrace sérových protilátek 6 - 30x nižší (dosud nepublikovaná studie). Optimální koncentrace sérových protilátek použité v obdobném experimentu prováděném ELISA metodou se sérovými protilátkami subtypem B HIV-1 infikovaných pacientů byla 5 - 10x nižší (Raška a kol., 2010). Výhodou použití fluorescenčních mikropartikulí pro analýzu reaktivity protilátek s rekombinantními proteiny gp120 je tedy mimo jiné i nižší spotřeba vzácných vzorků.

Vazba sérových protilátek subtypem A/C HIV-1 infikovaných jedinců na rekombinantní proteiny gp120 neprokázala v případě dvou ze čtyř testovaných vzorků žádné významné rozdíly mezi glykoformami produkovanými buňkami 293T a RD. V případě dalších dvou vzorků však byla detekována výrazně vyšší reaktivita u proteinu gp120 produkovaného linií 293T. Studie testující reaktivitu polyklonálních sérových protilátek subtypem B HIV-1 infikovaných pacientů s rekombinantními proteiny gp120 exprimovanými různými stabilně transferovanými buněčnými liniemi ELISA metodou potvrdila vyšší reaktivitu sérových protilátek s proteinem gp120 produkovaným v linii RD (Raška a kol., 2010). Vzhledem ke stejné aminokyselinové sekvenci obou glykoform gp120 je jediným vysvětlením odlišná glykosylace proteinů gp120 produkovaných v obou buněčných liniích, jak bylo prokázáno pomocí lektinových Western blotů a pomocí hmotnostní spektrometrie (Raška a kol., 2010). N-glykany přispívají ke správnému skládání proteinu gp120 (Waytt a kol., 1998) a rozdílná glykosylace gp120 může ovlivňovat formaci a přístupnost epitopů (Quiñones-Kochs a kol., 2002; Go a kol., 2008; Huang a kol., 1997, 2011).

V rámci dalšího studia efektu N-glykanů na reaktivitu protilátek s gp120 byla porovnávána reaktivita sérových protilátek HIV-1 infikovaných jedinců s nativními glykosylovanými a deglykosylovanými (po ošetření enzymem PNGáza F) proteiny gp120. Výsledky ukázaly, že reaktivita sér jedinců infikovaných subtypem A/C HIV-1 viru s rekombinantními gp120 se v případě tří ze čtyř testovaných vzorků výrazně zvyšuje po deglykosylaci u obou testovaných glykoform gp120. Zvýšení reaktivity sérových protilátek subtypem A/C HIV-1 infikovaných jedinců s deglykosylovanými gp120 bylo pozorováno i v podobném experimentu prováděném ELISA metodou (dosud nepublikovaná studie). Výsledky naznačují zpřístupnění epitopů pro vazbu protilátek po odstranění tzv. „glykanového štítu“ (Pantophlet, 2006). Toto pozorování podporuje hypotézu, že rozdílná glykosylace výrazně ovlivňuje formaci a/nebo

přístupnost některých epitopů. O změnách ve struktuře a přístupnosti epitopů po odstranění některých N-glykanových řetězců deglykosylací gp120 informovala také řada dalších prací (Koch a kol., 2003; Sanders a kol., 2002; Huang a kol., 1997). Vysvětlení pozorované minimální změny reaktivity posledního séra může být založeno na několika předpokladech. Jednak tento jedinec mohl přednostně rozlišovat epitopy, které nejsou konformační, a tudíž nejsou ovlivněné odstraněním části N-glykanů, jednak mohl převážně rozlišovat epitopy na vrcholku vysoce imunogenní V3 smyčky, který není významně krytý okolními N-glykany, jednak mohl tento jedinec rozlišovat relativně vysoké množství cukerných epitopů a malá změna reaktivity jeho séra byla dána kompenzací nárůstu reaktivity proteinově specifických protilátek poklesem cukerně specifických protilátek. Navržená vysvětlení však bude nutné experimentálně ověřit.

Na závěr je možné konstatovat, že zavedená metoda průtokově cytometrického vyhodnocení reaktivity sérových protilátek s antigenem navázaným na fluorescenčně značené mikrosféry dává výsledky, které odpovídají výsledkům publikovanými v literatuře získaným pomocí metody ELISA, která doposud představuje standard nedenaturační metody stanovení vazby antigen-protilátka. Vzhledem k nižší spotřebě testovaných protilátek a možnosti redukce reakčního objemu, například při enzymatické manipulaci navázaného antigenu (zde deglykosylace pomocí PNGázy F), můžeme tuto metodu s výhodou upřednostnit zejména tam, kde je množství testovaného materiálu omezené.

7 Závěr

V teoretické části práce byly shrnuty dosavadní poznatky o viru HIV-1 se zaměřením na virový glykoprotein gp120, jeho strukturu, roli v průběhu HIV-1 infekce a interakci s buněčnými receptory a koreceptory. Dále byla popsána důležitost glykosylace proteinu gp120 v souvislosti s vazbou neutralizujících protilátek. Závěrečná část literární rešerše se zabývala průtokovou cytometrií a základními charakteristikami průtokově cytometrické analýzy.

V experimentální části byla představena metoda založená na vazbě proteinu gp120 na fluorescenční mikropartikel, která umožňuje analyzovat protein gp120 pomocí průtokové cytometrie za nativních podmínek a bez rozsáhlého sterického bránění na rozdíl od ostatních, dosud běžně používaných metod (Western blotting, ELISA). Analýze byly podrobeny dvě glykoformy rekombinantního proteinu gp120 produkované buňkami 293T (lidská embryonální ledvina) a RD (lidský rhabdomyosarkom). Na glykosylované a nedeglykosylované proteiny gp120 byly vázány sérové protilátky z lidských sér subtypem A/C HIV-1 infikovaných žen z jihozápadní Tanzanie. Analýza reaktivity těchto protilátek s rekombinantními proteiny gp120 vázanými na fluorescenční mikropartikel ukázala signifikantní rozdíly mezi glykosylovanými a nedeglykosylovanými formami gp120. Rozdíly v reaktivitě sérových protilátek byly pozorovány i mezi jednotlivými glykoformami proteinu gp120 (293T, RD). Prováděné experimenty potvrdily výrazný vliv glykosylace na formaci a přístupnost některých epitopů, které mohou hrát důležitou roli při neutralizaci. Odlišné složení cukerné komponenty u jednotlivých rekombinantních proteinů gp120 produkovaných různými stabilně transfekovanými buněčnými liniemi by proto mělo být důležitým faktorem zohledněným při HIV-1 vakcinačních experimentech.

8 Seznam použité literatury

- Bour, S., Strebel, K. (2003) The HIV-1 Vpu protein: A multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* 5: 1029–1039.
- Brown, M., Wittwer, C. (2000): Flow Cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry* 46: 1221 - 1229.
- Bunnik, E. M., Pisas, L., van Nuenen, A. C., Schuitemaker, H. (2008): Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82: 7932 – 7941.
- Celer, V., Celer, V. ml. (2010): *Obecná virologie*, 143 s. Nucleus, HK, ISBN 978-80-87009-70-3.
- Doranz, B. J., Berson, J. F., Rucker, J., Doms, R. W. (1997): Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol. Res.* 16: 15 – 28.
- Eckschlager, T., Bartůňková, J., Vybíralová, H. (1999): *Průtoková cytometrie v klinické praxi*, 172 s. GradaPublishing, Praha, ISBN 80-7169-279-4.
- Gavel, Y., von Heijne, G. (1990): Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser akceptor sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng* 3: 433 – 442.
- Go, E. P., Irungu, J., Zhang, Y., Dalpathado, D. S., Liao, H. X. a kol. (2008): Glycosylation site-specific analysis of HIV envelope proteins (JR-FL and CON-S) reveals major differences in glycosylation site occupancy, glycoform profiles, and antigenic epitopes' accessibility. *J Proteome Res* 7: 1660 – 1674.
- Go, E. P., Liao, H. X., Alam, S. M., Hua, D., HAYnes, B. F., Desaire, H. (2013): Characterization of host-cell line specific glycosylation profiles of early transmitted/founder HIV-1 gp120 envelope proteins. *J Proteome Res.* 12: 1223 - 1234.

- Guttman, M., Kahn, M., Garcia, N. K., Hu, S., Lee, K. K. (2012): Solution structure, conformational dynamics, and CD4-induced activation in full-length, glycosylated, monomeric HIV gp120. *J. Virol.* 86: 8750 – 8764.
- Helenius, A., Aebi, M. (2001): Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science* 291: 2364 – 2369.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. (2002): *Základy imunologie* (2. vydání), 260 s. Triton, ISBN 80-7254-215-X.
- Hu, Q., Mahmood, N., Shattock, R. J. (2007): High-mannose-specific deglycosylation of HIV-1 gp120 induced by resistance to cyanovirin-N and the impact on antibody neutralization. *Virology* 368: 145 - 154.
- Huang, X., Barchi, J. J. Jr., Lung, F. T., Roller, P. P., Nara, P. L., Muschik, J., Garrity, R. R. (1997): Glycosylation affects both the three-dimensional structure and antibody binding properties of the HIV-1_{IIIB} gp120 peptide RP135. *Biochemistry* 36: 10846 – 10856.
- Huang, X., Jin, W., Griffin, G. E., Shattock, R. J., Hu, Q. (2011): Removal of two high-mannose *N*-linked glycans on gp120 renders human immunodeficiency virus 1 largely resistant to the carbohydrate-binding agent griffithsin. *J Gen Virol* 92: 2367 - 2373.
- Janeway, Ch. A. Jr., Travers, P., Walport, M., Capra, J. D. (1999): *Immunobiology: The immune system in health and disease* (4th Edition), 440 – 455. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, ISBN 0-8153-3217-3.
- Johnston, M. I., Fauci, A. S. (2011): HIV Vaccine Development — Improving on Natural Immunity. *N Engl J Med* 365: 873 - 875.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., Brunak, S. (2005): Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153 – 164.
- Kasturi, L., Chen, H., Shakin-Eshleman, S. H. (1997): Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-

- Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem J.* 323 (Pt. 2): 415 – 419.
- Keren, D. F., Hanson, C. A., Hurtubise, P. E. (1994): Flow cytometry and clinical diagnosis, 664 s. ASCP Press, Chicago. ISBN 0891893466.
- Koch, M., Pancera, M., Kwong, P. D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W. A., Sodroski, J., Wyatt, R. (2003): Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* 313: 387 - 400.
- Kong, L., Sheppard, N. C., Stewart-Jones, G. B., Robson, C. L., Chen, H., Xu, X. a kol. (2010): Expression-system-dependent modulation of HIV-1 envelope glycoprotein antigenicity and immunogenicity. *J Mol Biol.* 403: 131 - 147.
- Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., Detours, V. (2001): Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British Medical Bulletin* 58: 19 – 42.
- Krejsek, J., Kopecký, O. (2004): *Klinická imunologie*, 751 – 774. Nucleus, HK, ISBN 80-86225-50-X.
- Kwong, P. D., Mascola, J. R., Nabe, G. J. (2012): The changing face of HIV vaccine research. *Journal of the International AIDS Society* 15: 17407.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., Hendrickson, W. A. (1998): Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in komplex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648 – 659.
- Lamothe, B., Joshi, S. (2000): Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Frontiers in Bioscience* 5: 527 - 555.
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., Gregory, T. J. (1990): Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus

- envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10373 – 10382.
- Levinson, W. (2006): *Review of Medical Microbiology and Immunology (9th Edition)*, 321 – 329. The McGraw-Hill Companies, ISBN 0-07-146031-4.
- Li, Y., Cleveland, B., Klots, I., Travis, B., Richardson, B. A., Anderson, D., Montefiori, D., Polacino, P., Hu, S. L. (2008): Removal of a single N-linked glycan in human immunodeficiency virus type 1 gp120 results in an enhanced ability to induce neutralizing antibody responses. *J. Virol.* 82: 638 - 651.
- Marinov, I. (2008): *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*, 148 s. Triton, Praha, ISBN 978-80-7387-143-7.
- Mikell, I., Sather, D. N., Kalams, S. A., Altfeld, M. a kol. (2011): Characteristics of the Earliest Cross-Neutralizing Antibody Response to HIV-1. *PLoS Pathog* 7: e1001251.
- Modrow, S., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Gallo, R. C., Wong-Staal, F., Wolf, H. (1987): Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* 61: 570 – 578.
- Moore, J. P., Trkola, A., Dragic, T. (1997): Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 551 – 562.
- Nabel, G. J. (2005): Immunology. Close to the edge: neutralizing the HIV-1 envelope. *Science* 308: 1878 – 1879.
- Norris, G. E., Stillman, T. J., Anderson, B. F., Baker, E. N. (1994): The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure* 2: 1049 - 1059.
- Ogert, R. A., Lee, M. K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M. A., Cho, M. W. (2001): N-Linked Glycosylation Sites Adjacent to and within the V1/V2 and the V3 Loops of Dualtropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate DH12 gp120 Affect Coreceptor Usage and Cellular Tropism. *J. Virol.* 75: 5998 – 6006.

- Ormerod, M. G. (2008): FlowCytometry - A Basic Introduction. Los Angeles : De Novo Software. Dostupné na WWW: <http://flowbook.denovosoftware.com>
- Pantophlet, R., Burton, D. R. (2006): Gp120: Target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol.* 24: 739 - 769.
- Quiñones-Kochs, M. I., Buonocore, L., Rose, J. K. (2002): Role of N-Linked Glycans in a Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein: Effects on Protein Function and the Neutralizing Antibody Response. *J. Virol.* 76: 4199 – 4211.
- Raška, M., Novák, J. (2010): Involvement of Envelope-Glycoprotein Glycans in HIV-1 Biology and Infection. L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wrocław, Poland.
- Raška, M., Takahashi, K., Czernakova, L., Zachova, K., Hall, S. a kol. (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.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. (1998): A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949 – 1953.
- Robinson, J. P., Grégori, G. (2007): Principles of Flow cytometry. V: Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (ed): *Flow Cytometry with Plant Cells*, 19 – 40. Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN 978-3-527-31487-4.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1996): *Immunology* (4th Edition), 416 s. Mosby, ISBN 0-7234-2178-1.
- Roubalová, L. (2012): Průtoková cytometrie. FONS Bulletin. Dostupné na WWW: <http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/labo1.pdf>
- Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D., Moore, J. P. (2002): The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2g12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* 76: 7293-305.

- Shapiro, H. M. (2003): Practical flow cytometry (4thEdition). John Wiley and sons.
Dostupné na WWW: <http://www.coulterflow.com/bciflow/research01.php>
- Teixeira, C., Gomes, J. R. B., Gomes, P., Maurel, F. (2011): Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 979 – 992.
- Varki, A., Freeze, H. H., Manzi, A. E. (2009): *Current Protocols in Protein Science*, Supplement 57, Unit 12.1.1. Wiley: New York.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C. a kol. (2003): Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307 – 312.
- Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. G. (1998): The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glykoprotein. *Nature* 393: 705 - 711.
- Yerly, S, Kaiser, L., Race, E., Bru, J. P., Clavel, F., Perrin, L. (1999): Transmission of anti-retroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* 354: 729 – 733.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., Korber, B. (2004): Tracking global patterns of N-linked glycosylation side variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 14: 1229 - 1246.
- Zhu, X., Brochers, C, Bienstock, R. J., Tomer, K. B. (2000): Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* 39: 11194 – 11204.
- Zolla-Pazner, S. (2005): Improving on nature: Focusing the immune response on the V3 loop. *Human Antibodies* 14: 69 – 72.

9 Seznam použitých zkratek

293T - human embryonic kidney cell line, buněčná linie lidské embryonální ledviny

ABC - specific antibody binding capacity

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

APC-Cy7 - allophycocyanin-cyanine 7

AZT - azidothymidin, zidovudin

CNS - centrální nervová soustava

Dakiki - B-cell line, B-buněčná linie

DMSO - dimethylsulfoxide

DNA - deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

DTT - dithiothreitol

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

FBS - Fetal Bovine Serum

FITC - fluorescein isothiocyanate

FSC - forward scatter channel, dopřední rozptyl

Fuc - fukosa

Gal - galaktosa

GlcNAc - N-acetylglucosamin

HAART - highly active anti-retroviral therapy, vysokoúčinná antiretroviróvá terapie

HepG2 - hepatocellular carcinoma cell line, buněčná linie hepatocelulárního karcinomu

HIV-1, 2 - Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunodeficience

HT1080 - fibrosarcoma cell line

CHO - Chinese hamster ovary cell line, buněčná linie ovárií čínského křečka

Ig - imunoglobulin třídy G

Jurkat - T-cell line, T-buněčná linie

LTR - long terminal repeat, dlouhé terminální repetice

Man - mannososa

MESF - molecules of equivalent soluble fluorochrome

MHC - major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

mRNA - messenger RNA, informační/mediátorová RNA

NEM - N-ethylmaleimide

PBS - Phosphate Buffered Saline

PE - phycoerythrin

PNGS - potenciální N-glykosylační místa

RD - human muscle rhabdomyosarcoma cell line, buněčná linie lidského rhabdomyosarkomu

RNA - ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

Sia - kyselina sialová

SSC - side scatter channel, boční rozptyl

sulfo-SMCC - sulfosuccinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyclohexane 1-carboxylate