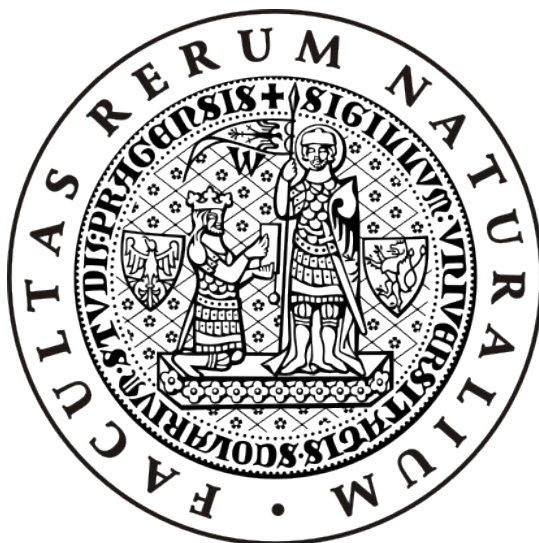


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. Michal Svoboda

Studium mechanismu účinku metallakarboranových inhibitorů HIV proteasy
Analysis of the mechanism of action of metallacarborane inhibitors of HIV PR

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Jan Konvalinka CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.9.2011

Podpis

Abstrakt

Krátce po identifikaci viru HIV jako původce onemocnění AIDS byla v genetické informaci viru objevena sekvence naznačující přítomnost aspartátové proteasy. Proteasa, která byla později u viru skutečně potvrzena, se posléze stala jedním z hlavních terapeutických cílů při boji proti onemocnění AIDS. Zavedení proteasových inhibitorů do antiretrovirové terapie vedlo k výraznému zkvalitnění a prodloužení života virem infikovaných pacientů. Virus, díky své genetické variabilitě, je však schopen se působení inhibitorů poměrně efektivně bránit tvorbou mutantních variant, jež jsou vůči inhibitorům resistantní. Existuje proto stálá potřeba nových inhibitorů, schopných efektivně blokovat i tyto resistantní varianty, a současně zpomalujících vznik nových resistantních variant. Cestou k takovým inhibitorům by mohlo být hledání sloučenin interagujících s enzymem jinde než v jeho aktivním místě, mechanismy nekompetitivní nebo akompetitivní inhibice. Skupinou látek, u nichž byla identifikována schopnost inhibovat HIV proteasu těmito netradičními mechanismy jsou metallakarborany, anorganické sloučeniny bóru, uhlíku, vodíku a iontu přechodného kovu. Pro další optimalizaci těchto inhibitorů je třeba strukturně a biofyzikálně charakterizovat jejich interakci s enzymem. Předkládaná práce je zaměřena na vývoj nástrojů pro strukturní charakterizaci interakce mezi GB-110, jedním z akompetitivních metallakarboranových inhibitorů, a HIV proteasou metodou EPR spektroskopie v kombinaci se specifickým spinovým značením. Popsána je příprava expresních konstruktů kódujících proteiny upravené pro spinové značení, exprese proteinů, jejich charakterizace a optimalizace specifického spinového značení.

English Abstract

Shortly after the identification of HIV as a causative agent of AIDS, an aspartic protease was identified in the viral genetic information. The very same time protease has become one of the dominant therapeutical targets in AIDS therapy. The introduction of protease inhibitors into the antiretroviral therapy has led to a significant improvement in the quality and length of life of HIV patients. However, the virus is still able to effectively prevent the impact of an inhibitor via generating inhibitor-resistant mutated protease variants. Thus, there is a constant need for novel types of inhibitors that would be capable of effectively blocking these resistant variants and simultaneously not supporting the development of novel resistant viral strains. One way to identify such inhibitors could be searching for compounds interacting with the enzyme at different sites than the active cavity, via the mechanisms of noncompetitive or uncompetitive inhibition. The group of compounds called metallacarboranes - inorganic compounds consisting of carbon, boron, hydrogen and metall ion - were shown to exhibit such an activity against HIV-1 protease. However, for further optimization of these inhibitors, detailed biophysical investigation of the enzyme-inhibitor complex is needed. This work focuses on the development of tools for structural characterization of the complex between GB-110 - one of the uncompetitive metallacarborane inhibitors - and HIV-1 protease using EPR spectroscopy linked with site-directed spin labeling as a method of choice. Preparation of the expression constructs encoding HIV proteases modified for spin labeling, protein expression, characterization and optimization of site-directed spin labeling are described in this thesis.

(In Czech)

Na tomto místě bych rád poděkoval několika lidem bez jejichž přispění by tato práce patrně nikdy nevznikla.

Na prvním místě patří mé poděkování mému školiteli Janu Konvalinkovi za ochotné a vstřícné vedení práce, za trpělivost jež se mnou má a zejména za to, že se před třemi lety rozhodl nechat mě naskočit do rozjetého vlaku svojí úžasné skupiny.

Velké poděkování patří též Milanu Kožíškovi a Kláře Grantz-Šaškové, kteří mi byli trpělivými průvodci při všech mých experimentálních nezdarech i úspěších. Kdyby mohla mít tato práce na deskách dvě další jména, byla by to ta jejich. Podíleli se na ní totiž pedagogickým úsilím minimálně stejně velkým, jako bylo moje snažení experimentální.

Ostatním členům našeho pozitivního HIV týmu a také celé skupiny "Konvalinkovců" bych pak chtěl poděkovat za vytvoření úžasné pracovní atmosféry, díky které byly mé dny strávené zpracováváním diplomové práce nekonečnou sérií cenných zkušeností nasbíraných v kolektivu báječných přátelských lidí.

Mnoha lidem též patří velký dík za praktické konzultace. Jmenovitě Pavlu Šáchovi a Františku Sedlákovu za rady při klonování, Petru Cíglrovi za konzultace chemických problémů všeho druhu, Václavu Šíchovi za syntézu metallakarboranů a cenné informace o nich a Janu Tarábkovi za zasvěcení do tajů elektronové paramagnetické resonance.

Poslední, ani zdaleka však ne nejmenší poděkování patří mé rodině, která mne vždy a za každé situace bezmezně podporovala a také Zuzce, která se mnou sdílí časy dobré i zlé a od níž sem v nejhorších chvílích slyšel větu "To zvládneš" snad vícekrát než kolik člověk najde částic v dvanácti gramech uhlíku ^{12}C .

Obsah

Abstrakt.....	3
English Abstract.....	4
1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 AIDS.....	9
2.2 Virus HIV.....	9
2.2.1. Struktura virové částice HIV-1.....	11
2.2.2. Životní cyklus HIV-1 viru.....	13
2.3. HIV-1 proteasa.....	15
2.3.1 Trojrozměrná struktura HIV-1 proteasy.....	15
2.3.2 Inhibitory HIV-1 proteasy.....	16
2.3.2.1 Klinicky používané inhibitory HIV-1 proteasy.....	16
2.3.2.2 Inhibitory vázající se mimo aktivní místo HIV-1 proteasy.....	17
2.3.3 Zkoumání strukturních a fyzikálních vlastností HIV-1 proteasy.....	18
2.3.3.1 Sedimentační techniky.....	19
2.3.3.2 Kalorimetrická analýza.....	21
2.3.3.3 Elektrochemické techniky.....	23
2.3.3.4 Resonance povrchového plasmonu.....	25
2.3.3.5 Rentgenostrukturní analýza.....	26
2.3.3.6 Fluorescenční spektroskopie.....	27
2.3.3.7 Metody nukleární magnetické resonance.....	29
2.3.3.8 Elektronová paramagnetická resonance.....	31
2.3.4. Metallakarborany jako inhibitory HIV-1 proteasy.....	37
3. Cíl práce.....	39
4. Experimentální část.....	40
4.1. Přístroje a materiál.....	40
4.1.1 Použité chemikálie.....	40
4.1.2 Laboratorní přístroje.....	41
4.1.3 Ostatní použitý materiál.....	42
4.1.4 Bakteriální kmeny, vektory, enzymy a média.....	43
4.2. Metody.....	43
4.2.1 Příprava expresních vektorů.....	43
4.2.1.1 Cílená mutagenese polymerasovou řetězovou reakcí.....	43
4.2.1.2 Transformace kompetentních bakterií Escherichia coli TOP10.....	44
4.2.1.3 Minipreparace plasmidové DNA.....	45
4.2.1.4 Kontrolní štěpení restrikčními endonukleasami.....	46
4.2.1.5 Horizontální agarosová elektroforesa.....	46
4.2.1.6 Amplifikace DNA oblasti kódující HIV-1 proteasu.....	46
4.2.1.7 Izolace DNA fragmentu z agarosového gelu.....	47
4.2.1.8 Ligace.....	48
4.2.2 Expres a izolace proteinu.....	48
4.2.2.1 Transformace Escherichia coli BL21(DE3)RIL plasmidovou DNA.....	48
4.2.2.2 Expres proteinů v Escherichia coli.....	49
4.2.2.3 Izolace inkluzních tělísek.....	49
4.2.2.4 Renaturace kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy.....	50
4.2.2.5 Iontově výměnná chromatografie na katexové koloně.....	50

4.2.3 Analýza proteinu	51
4.2.3.1 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	51
4.2.3.2 Elektroforesa v denaturujícím polyakrylamidovém gelu.....	51
4.2.3.3 Barvení polyakrylamidového gelu stříbrem.....	52
4.2.3.4 Elektropřenos proteinů na nitrocelulosoovou membránu.....	52
4.2.4 Kinetická měření	53
4.2.4.1 Stanovení kinetických parametrů enzymu.....	53
4.2.4.2 Stanovení IC50 inhibitoru	54
4.2.4.3 Určení mechanismu inhibice.....	54
4.2.5 Spinové značení a EPR spektroskopie.....	55
4.2.5.1 Specifické spinové značení.....	55
4.2.5.2 Spektroskopie EPR.....	55
4.2.5.3 Měření koncentrace spinové značky.....	56
5. Výsledky.....	57
5.1. Klonování	58
5.1.1 Příprava DNA pro monomerní jednotky cílenou mutagenézí.....	59
5.1.2 Klonování kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy.....	60
5.2. Expres a purifikace HIV proteas.....	61
5.2.1 Expres HIV-1 proteasy TWT-55.....	61
5.2.2 Chromatografické čištění TWT-55 HIV proteasy.....	62
5.2.3 Expres a purifikace HIV proteas TWT-CL, K55inCF-HIV-1 a CF-HIV-1 ...	64
5.2.4 Expres a purifikace HIV proteasy TWT-41.....	67
5.3. Kinetická charakterizace HIV proteas	68
5.4. Specifické spinové značení HIV proteasy.....	69
5.5. Spektroskopie EPR.....	70
5.5.1 Měření koncentrace spinové značky.	72
5.6. Ověření mechanismů inhibice	72
6. Diskuse.....	74
7. Závěr.....	78
8. Seznam zkratk.....	79
9. Literatura.....	82

1. Úvod

Na počátku osmdesátých let minulého století bylo v USA identifikováno zcela nové onemocnění, projevující se těžkou imunitní nedostatečností se současným výskytem vzácných infekcí a malignancí. Choroba byla pojmenována syndrom získaného selhání imunity (AIDS z angl. acquired immunodeficiency syndrome) a jako její původce byl později identifikován virus patřící do čeledi *retroviridae* - virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV z angl. human immunodeficiency virus). Virus HIV byl záhy po objevení detailně prozkoumán a intenzivní výzkum vedl k rychlému uvedení řady terapeutik cílících různé klíčové fáze jeho životního cyklu a umožňujících tak efektivní boj proti nové chorobě.

Jedním z enzymů v životním cyklu viru, jež je cílen antiretrovirotiky je i virová proteasa. Zavedení inhibitorů tohoto enzymu jako součásti vysoce aktivní antiretrovirové terapie do boje proti AIDS znamenalo velký krok kupředu pro kvalitu a délku života pacientů. Ačkoli však byly vyvinuty inhibitory velice efektivní, virus je díky vysoké genetické variabilitě schopen generovat varianty resistantní na užívané inhibitory. Existuje tedy stálá potřeba nových látek, schopných HIV proteasu efektivně inhibovat. Vzhledem k tomu, že všechny dosud užívané inhibitory proteasy HIV viru interagují se stejným místem enzymu, dutinou aktivního místa, nabízí se jako cesta úniku před vznikem resistance vývoj inhibitorů interagujících s enzymem zcela jiným mechanismem, prostřednictvím rozdílných interakčních míst.

Látky této povahy byly identifikovány v minulých letech v laboratoři Doc. Jana Konvalinky. Jedná se o molekuly patřící do skupiny metallakarboranů, z nichž některé inhibují HIV proteasu méně obvyklými mechanismy nekompetitivní či akompetitivní inhibice. Pro vývoj a optimalizaci těchto inhibitorů je však třeba detailní strukturní a biofyzikálně chemická charakterizace jejich interakce s enzymem.

Předkládaná práce se zaměřuje na přípravu nástrojů pro strukturní charakterizaci komplexu HIV proteasy s metallakarboranem GB-110 působícím jako akompetitivní inhibitor. Pro strukturní charakterizaci byla vybrána metoda spektroskopie elektronové paramagnetické resonance ve spojení se specifickým spinový značením.

2. Teoretická část

2.1 AIDS

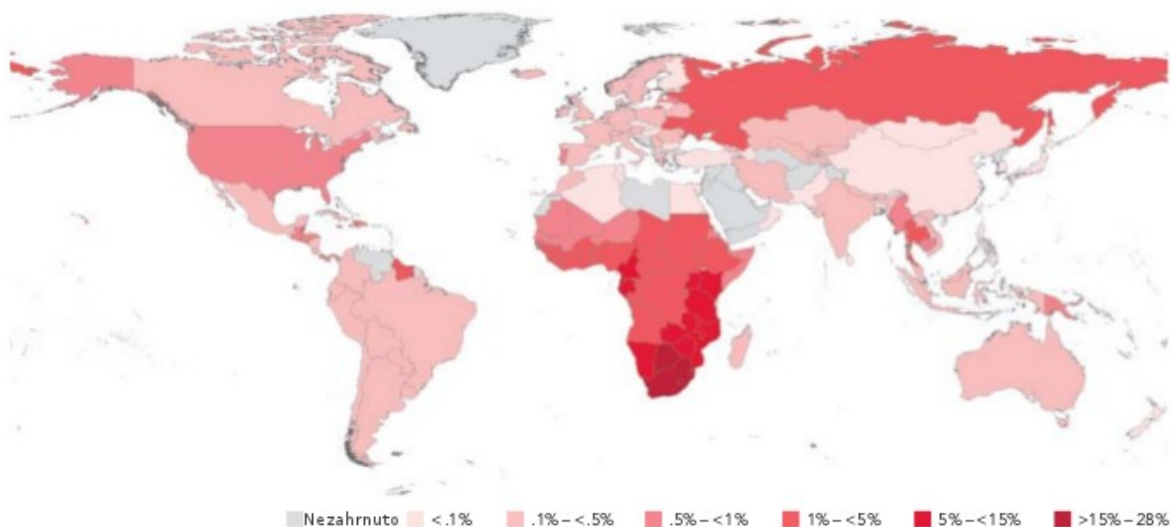
Na počátku osmdesátých let dvacátého století pozorovali lékaři v Kalifornii několik případů náhle závažné imunitní nedostatečnosti, vyskytující se u do té doby zcela zdravých jedinců, ve všech případech sexuálně aktivních homosexuálů, bez jakýchkoli předchozích potíží. Choroba se projevovala dramatickým snížením počtu CD4+ T lymfocytů v krvi, lymfadenopatií, horečkami a přítomností oportunních infekcí, typických pro imunosuprimované pacienty, konkrétně pneumonií způsobenou *Pneumocystis carinii*, cytomegalovirovou infekcí, a kandidosou dutiny ústní [1]. V pozdějších studiích se mezi příznaky přidaly i v běžné populaci vzácně se vyskytující malignance jako Kaposiho sarkom a ne Hodgkingovské lymfomy, dále též encefalitida způsobená *Toxoplasma gondii* a neobvyklé meningitidy [2]. Jelikož byla choroba v počátcích pozorována pouze u mladých, sexuálně aktivních homosexuálů, byla označována GRID z anglického Gay-Related Immune Deficiency – s homosexualitou spojená imunitní nedostatečnost. Jak se však ukázalo z následného sledování propukající epidemie, nově objevené onemocnění se neomezovalo pouze na homosexuální muže, ale též na injekční uživatele drog, hemofiliky, pravidelné příjemce krevních transfuzí, nově příchozí imigranty pocházející z Haiti, osoby poskytující sexuální služby a také partnery a děti všech výše zmíněných rizikových skupin. Na základě těchto zjištění bylo onemocnění přejmenováno na AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) – syndrom získané imunitní nedostatečnosti [3].

2.2 Virus HIV

Hledání původce AIDS skončilo po dvou letech, kdy skupina francouzských virologů publikovala práci popisující izolaci dříve neznámého viru z lymfatických uzlin pacienta s chronickou lymfadenopatií a dalšími příznaky, charakteristicky předcházejícími propuknutí AIDS. Morfologické i funkční znaky popsáního viru jej řadily do čeledi *Retroviridae*, na rozdíl od jiných zástupců této čeledi však byl nový izolát silně cytopatický a specificky likvidoval CD4+ T lymfocyty [4]. Ve stejném čísle časopisu Science publikovali nezávisle Gallo a kolegové informaci o izolaci nového retroviru z krve pacientů s příznaky AIDS [5]. Později se ukázalo, že obě práce pojednávají o témže patogenu, původci onemocnění AIDS, pojmenovaném následně HIV (Human Immunodeficiency Virus) - virus lidské

imunitní nedostatečnosti. Roku 1986 pak byl ve vzorku pocházejícím z afrického pacienta izolován podobný virus, lišící se lehce v genomové organizaci, znatelně však ve virulenci a patogenicitě. Tento virus, vyskytující se téměř výhradně v oblastech západní Afriky byl označen jako HIV-2. Název původního izolátu byl rozšířen na HIV-1 [6].

Virus HIV-1 v těle infikovaného jedince způsobuje imunitní nedostatečnost selektivním napadáním CD4+ T lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk, tedy buněk imunitního systému, které jsou běžně zodpovědné právě za boj s virovou infekcí. K likvidaci CD4+ T lymfocytů dochází jednak přímým zabíjením buněk virem, dále díky zvýšené náchylnosti infikovaných buněk k programované buněčné smrti a v neposlední řadě také vlivem zvýšené aktivity cytotoxických CD8+ T lymfocytů zabíjejících infikované buňky [7]. Při poklesu počtu CD4+ T lymfocytů pod hladinu 200 buněk/mm³ dojde ke ztrátě specifické imunity, což dává příležitost k propuknutí oportunních infekcí a dalších patologických stavů vedoucích k rozvinutí onemocnění AIDS. Období mezi počátkem infekce HIV-1 virem a propuknutím AIDS se nejčastěji pohybuje kolem deseti let [8,9].

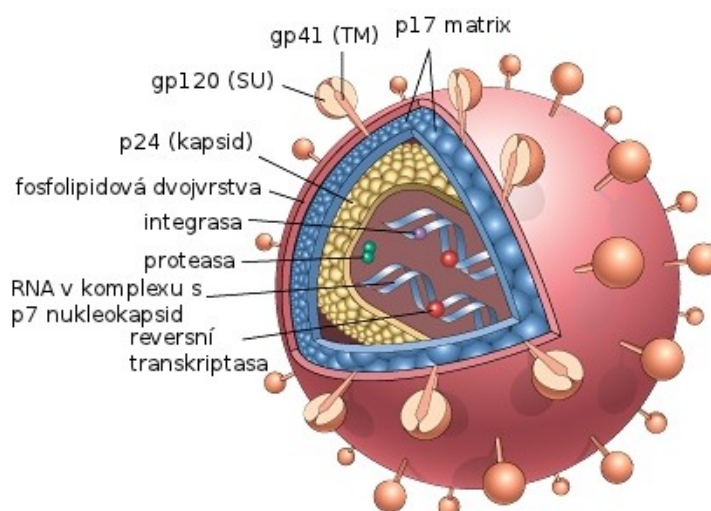


Obrázek 1: celosvětová prevalence viru HIV v populaci pro rok 2009. Převzato z [10]

V současné době, v počínající čtvrté dekádě epidemie AIDS, žije ve světě přibližně 33,3 (31,4 - 35,3) milionu HIV pozitivních jedinců. To představuje 0,5 % světové populace. Za rok 2009 přibylo celosvětově 2,6 (2,3 - 2,8) milionu nově nakažených a virus byl v témže roce příčinou 1,8 (1,6 - 2,1) milionu úmrtí. Jak je vidět z obrázku 1 nejzávažněji zasaženým regionem je jih Afriky, nepříznivé trendy v epidemiologii onemocnění je však možno pozorovat také v regionech východní Evropy a střední Asii [10].

2.2.1. Struktura virové částice HIV-1

Virus HIV-1 je obalený virus čeledi *Retroviridae*. Jeho genetická informace je přenášena ve formě pseudodiploidní jednořetězcové molekuly RNA, která je po vstupu do infikované buňky přepsána procesem zvaným reverzní transkripce do formy dvouřetězcové DNA a jako taková je posléze integrována do chromosomální DNA napadené buňky. Organizace genetické informace řadí HIV virus do rodu *Lentiviridae* [11].

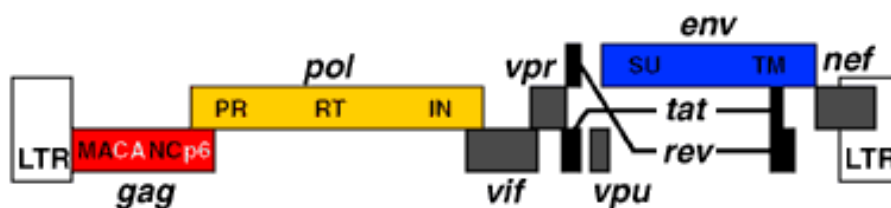


Obrázek 2: schematické zobrazení struktury virové částice HIV viru s označením jednotlivých virových proteinů převzato z [11] a upraveno.

Virová částice, zobrazená na obrázku 2, je kulovitá s průměrem 100 až 120 nm. Její povrch je pokryt fosfolipidovou membránou pocházející z cytoplasmatické membrány původní hostitelské buňky. Touto membránou prostupuje přibližně 70 kopií obalového proteinu Env. Ten se skládá ze dvou nekovalentně spojených částí - povrchového proteinu SU (gp120), zodpovědného za rozpoznávání receptoru na cílové buňce a transmembránového proteinu TM (gp41), kotvícího SU protein ke struktuře virové částice a také zprostředkovávajícího fúzi buněčné a virové membrány v průběhu vstupu viru do buňky. Pod virovou membránou se nachází vrstva matrixového proteinu MA. Ten nese na N-konci zbytek kyseliny myristové již je kotven do membrány. Funkcí MA proteinu je zejména zprostředkovávat v průběhu vytváření virových částic cílení virových komponent na membránu hostitelské buňky, kde později dochází k pučení [12]. Pod vrstvou MA proteinu se ve virionu nachází kónická kapsida tvořená sítí hexamerů s několika vhodně umístěnými pentamery kapsidového CA proteinu [13,14]. Uvnitř kapsidy se pak nachází genomová jednořetězcová RNA vázaná k RNA vazebnému nukleokapsidovému proteinu NC a enzymy důležité pro funkci viru - reverzní transkriptasa RT schopná přepisovat

genetickou informaci z genomové RNA do formy dvouřetězcové DNA, integrasa IN zodpovědná za vložení genetické informace viru do chromosomální DNA hostitelské buňky a proteasa PR podílející se na zrání nového virionu. Dále se uvnitř kapsidy nalézají regulační proteiny Vif, Vpr a Nef, poskytující podpůrné funkce v různých fázích životního cyklu viru [12].

Genetická informace viru je uložena v 9,7 kb dlouhé jednořetězcové molekule RNA. Organizace genetické informace je nápadně složitější než u dříve objevených retrovirů. Jak je vidět na obrázku 3 devět genů kódovaných genomem viru je rozprostřeno po všech třech čtecích rámcích, přičemž se některé geny částečně překrývají, popřípadě dochází k sestřihu mezi čtecími rámci [15]. První tři geny - *gag*, *pol*, a *env* jsou typické pro všechny retroviry. Jedná se o geny kódující polyproteiny - proteinové řetězce obsahující několik strukturních či funkčních proteinů, které jsou v průběhu zrání viru rozštěpeny na jednotlivé komponenty. Tato strategie usnadňuje udržení správných poměrů virových komponent a správné načasování v průběhu tvorby nového virionu na membráně hostitelské buňky. Gen *gag* kóduje informaci pro strukturní proteiny matrix (MA), kapsid (CA), nukleokapsid (NC), dělicí peptidy (p1 a p2) a koncový protein p6. Gen *pol* je překládán jako fúzní protein Gag-Pol po "pročtení se" ribosomu skrz slabý stopkodon na konci genu *gag*. V této genové oblasti se nachází informace pro syntézu virových enzymů proteasy (PR), reversní transkriptasy (RT) a integrasy (IN). Poslední polyprotein, kódovaný genem *env*, je štěpen na povrchový glykoprotein SU a transmembránový protein TM [11].



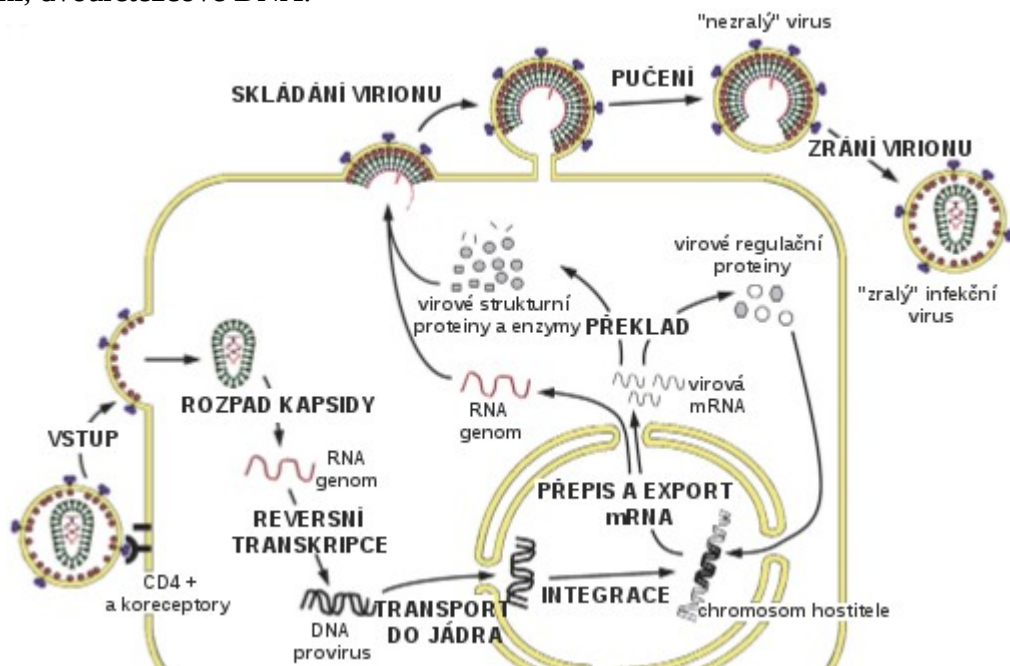
Obrázek 3: schema virové virového genomu. Zpracováno podle [11].

Dalších šest genů - *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* a *nef* je specifických pro rod *Lentiviridae*, popřípadě pro HIV-1 virus samotný. Produkty genů *tat* a *rev* jsou z celého genomu překládány jako první a zajišťují důležité regulační funkce [16]. Produkty čtyř zbývajících genů pak byly zprvu označovány jako doplňkové proteiny, jelikož se v raných studiích na laboratorních buněčných liniích jevíly jako postradatelné. Pozdější, přesněji navržené *in vitro* experimenty a také studie *in vivo* však ukázaly, že i produkty těchto genů jsou třeba

pro funkci a efektivní replikaci viru. Ve formě takzvaného proviru, kdy je integrován do chromosomální DNA hostitelské buňky, je genom HIV-1 viru po obou stranách ohraničen takzvanými LTR sekvencemi, jež obsahují promotorové sekvence a cílové oblasti regulačních proteinů jak virového tak buněčného původu [11].

2.2.2. Životní cyklus HIV-1 viru

Životní cyklus viru, zobrazený na obrázku 4, začíná po vstupu do napadeného organismu vazbou povrchového proteinu SU na CD4+ receptor a chemkinový koreceptor CCR5, popřípadě CXCR4, hostitelské buňky. Tato vazba spustí změnu v konformaci TM proteinu, vedoucí k fúzi virové a buněčné membrány, následované vstupem virového core do cytoplasmy. Jako další přichází nepříliš prozkoumaný krok částečného rozpadu kapsidy. Reversní transkriptasa následně přepíše genetickou informaci viru z RNA do podoby lineární, dvouřetězcové DNA.



Obrázek 4: životní cyklus HIV viru. Převzato z [17] a upraveno.

Tento proces je díky vysoké chybovosti reversní transkriptasy hlavním zdrojem velké genetické variability HIV-1 viru. Molekula DNA je pak v komplexu s integrasou transportována jadernými póry do jádra hostitelské buňky, kde je integrasou katalyzován proces začlenění virové DNA do některé z oblastí chromosomální DNA bohaté na geny [18]. Integrovaná virová DNA slouží jako templát pro buněčnou DNA dependentní RNA polymerasu II, syntetizující na jejím základě virovou RNA. Ze sestřižené RNA je

translatován transportní protein Rev, který pak z jádra transportuje nesestříženou a částečně sestříženou virovou RNA, sloužící jako templát pro syntézu virových polyproteinů a doplňkových proteinů a také jako genom virového potomstva [19].

Polyprotein Env je po translaci na drsném endoplasmatickém retikulu glykosylován v Golgiho aparátu, rozštěpen buněčnou proteasou na proteiny TM a SU, které jsou transportovány na membránu. Polyproteiny Gag a Gag-Pol, jejichž vzájemný poměr je přesně řízen frekvencí "pročtení se" volných cytoplasmatických ribosomů přes slabý stopkodon na konci Gag genu, jsou transportovány, spolu s RNA genomem, k buněčné membráně. Polyproteiny Gag, Gag-Pol a RNA genom se poté shlukují do kompaktních útvarů pod membránou pokrytou obalovými proteiny TM a SU a začíná proces nazvaný pučení virionu [17]. Po oddělení kulovitého, nezralého, a stále ještě neinfekčního virionu od hostitelské buňky přichází na řadu poslední krok takzvaného zrání, kdy se neznámým mechanismem z polyproteinového komplexu Gag-Pol autokatalyticky vyštěpí virová proteasa. Ta následně rozštěpí polyproteiny nezralého virionu na strukturní a funkční komponenty virionu zralého. Ten je pak již plně infekční a schopný tak infekci šířit dále [20].

V životním cyklu viru můžeme najít několik bodů, ve kterých je možno terapeuticky zasáhnout a tím virovou replikaci zastavit. V ideálním případě by bylo nejvhodnější blokovat prvotní rozšíření viru v těle pacienta vakcínou ihned v počátcích infekce. Vývoj vakcíny, ačkoli na počátku považovaný za otázku jen několika málo let, se však ukázal jako velmi obtížný problém. I přes některé slibně vypadající počáteční výsledky tak i po 25 letech vývoje není vakcína proti viru HIV dostupná [21]. Alternativou, ačkoli ne zcela plnohodnotnou, je boj s virem pomocí léčiv - antiretrovirotik. Ta jsou schopna blokovat replikaci viru v různých fázích životního cyklu. První a dosud nejpočetnější skupinou léčiv jsou nukleosidové inhibitory reversní transkriptasy (NRTI). Dále jsou k dispozici nenukleosidové inhibitory reversní transkriptasy (NNRTI), blokující účinek stejného enzymu, avšak nikoli jako analogy substrátu, nýbrž mechanismem nekompetitivní inhibice. Účinku HIV vakcíny jsou svým působením nejbliže inhibitory vazby koreceptoru, popřípadě inhibitory fúze virové a buněčné membrány. V neposlední řadě je též možno blokovat integraci provirové DNA do chromosomální DNA hostitelské buňky pomocí inhibitorů integrasy. Jistým milníkem v terapii HIV infekce bylo zavedení kombinované léčby, takzvané vysoce aktivní antiretrovirové terapie HAART (z anglického Highly Active

AntiRetroviral Therapy) [22]. Při této terapii se používají kombinace tří antiretrovirotik, nejčastěji dvou nukleosidových inhibitorů reversní transkriptasy a jednoho léčiva z některé z ostatních skupin. Dynamický rozvoj HAART byl umožněn mimo jiné také zavedením prvního inhibitoru z dosud nezmíněné skupiny terapeutik a to inhibitorů virové proteasy. Ty blokují poslední krok životního cyklu HIV viru, kterým je zrání virionu. Právě zavedení inhibitorů HIV proteasy a s nimi i HAART umožňuje snížit množství viru v krvi pacienta pod detekovatelnou hladinu, posílit imunitní systém, oddálit propuknutí terminálního stádia nemoci a tím znatelně prodloužit život léčeného [23].

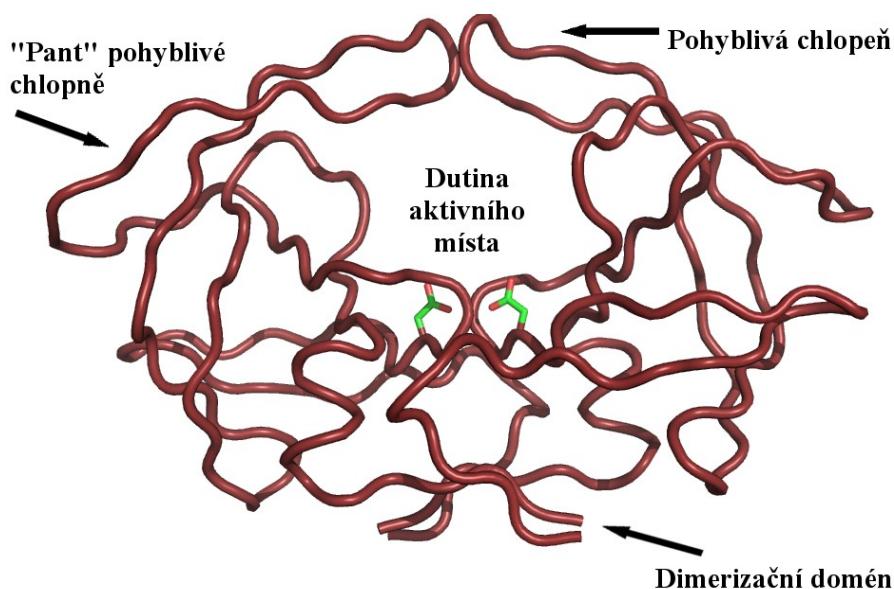
2.3. HIV-1 proteasa

Proteasa HIV-1 viru (EC 3.4.23.16) byla identifikována krátce po objevení viru při analýze jeho genomu. Jedná se o enzym patřící do rodiny aspartátových proteas [24]. Experimenty s její inaktivací pomocí inhibitorů nebo cestou cílené mutagenese katalytických aspartátů vedly k produkci nezralých virionů [25]. Funkce proteasy je tedy nepostradatelná pro infektivitu viru. Vzhledem ke svému medicínskému významu se HIV-1 proteasa stala jedním ze strukturně a funkčně nejpodrobněji prozkoumaných proteinů. Díky detailní znalosti struktury je také tento enzym jedním hlavních cílů takzvaného racionálního návrhu léčiv [26].

2.3.1 Trojrozměrná struktura HIV-1 proteasy

HIV-1 proteasa je ve své trojrozměrné struktuře, jak je vidět z obrázku 5, homodimerní molekula, sestávající ze dvou identických řetězců 99 aminokyselin, vykazující symetrii podle dvojčetné rotační osy procházející středem molekuly skrze oblast aktivního místa [27]. Aktivní místo je tvořeno dutinou uvnitř prostoru proteasy, mezi oběma peptidovými řetězci monomerů, které se tak na jeho tvorbě podílejí stejnou měrou. Na dně dutiny aktivního místa se pak nachází aminokyselinový triplet Asp-Thr-Gly, tvořený aminokyselinami v pozicích 25-27. Aspartát 25 je právě oním katalytickým aspartátem zodpovědným za katalýzu enzymové reakce, avšak celá oblast zmíněného tripletu je pro katalytickou funkci enzymu nepostradatelná díky schopnosti stabilizovat dimerní stav proteinu [28]. Dimerizaci zajišťuje čtveřice krátkých úseků antiparalelních beta skládaných listů, vytvářejících pomocí sítě vodíkových vazeb mezi N- a C-koncem peptidového řetězce (konkrétně mezi aminokyselinami v pozicích 1 až 4 a 96 až 99) oblast nazývanou dimerizační doména. Neméně důležitou roli v katalytické funkci proteasy pak

hraje i oblast mezi aminokyselinami 46 a 56, tvořící pohyblivé chlopně se strukturou vysoce flexibilních beta vlásenek. Ty v enzymu bez vázaného substrátu přecházejí mezi otevřeným a polootevřeným stavem s průměrnou vzdáleností 7 Å od katalytických aspartátů. Vazba peptidového substrátu pak indukuje konformační změnu, při které chlopně uzavřou prostor aktivního místa a interagují se substrátem [27].



Obrázek 5: Trojrozměrná struktura HIV-1 proteasy se zvýrazněnými katalytickými aspartáty. Zpracováno pomocí programu PyMol podle PDB souboru pocházejícího z [27].

2.3.2 Inhibitory HIV-1 proteasy

Detailní znalost trojrozměrné struktury a substrátové specifity HIV-1 proteasy [29] umožnila vývoj potenciálních léčiv, působících jako inhibitory tohoto enzymu, novou metodou takzvaného racionálního návrhu. Výchozím bodem pro návrh inhibitorů byla znalost substrátů HIV-1 proteasy a strukturních prvků vyskytujících se v nich [29]. V raných fázích tak inhibitory nesly strukturní motivy vycházející z neštěpitelných pseudopeptidových analogů substrátu. Takto navržená vedoucí sloučenina, u které byla potvrzena schopnost inhibovat, byla poté dále chemicky upravována na základě strukturních a kinetických dat pocházejících z biofyzikálních měření, s cílem získat sloučeninu s maximálním inhibičním účinkem [25].

2.3.2.1 Klinicky používané inhibitory HIV-1 proteasy

Počátek používání inhibitorů HIV-1 proteasy v terapii se pojí s rokem 1995, kdy americký Úřad pro potraviny a léčiva (FDA) povolil klinické užívání prvního proteasového

inhibitoru saquinaviru [30]. Díky výše zmíněnému postupu při návrhu léčiv patří všechny dnes klinicky užívané inhibitory s výjimkou jednoho do skupiny analogů substrátu a všechny také obsazují aktivní místo enzymu kde soutěží o pozici se substrátem [26]. Inhibitory HIV-1 proteasy užívané v klinické praxi je možno rozdělit na dvě skupiny. První skupina, označovaná jako inhibitory první generace, byla navrhována pro inhibici proteasy divokého typu. Při pozdějším návrhu inhibitorů takzvané druhé generace už byly zohledněny strukturní a biofyzikální změny u variant HIV proteasy u nichž se vyvinula rezistence vůči inhibitorům první generace [26].

Základním strukturním rysem, od kterého se odvíjel vývoj většiny inhibitorů první generace je specifické štěpné místo mezi fenylalaninem a prolinem v peptidovém substrátu HIV-1 proteasy [29]. Strukturní obdoba tohoto motivu byla vystavěna kolem neštěpitelného hydroxyethylaminového popřípadě hydroxypropylaminového isosteru, napodobujícího přechodný stav štěpeného substrátu. Na základě známé struktury enzymu pak byly na tuto páteř připojovány vhodné funkční skupiny s cílem dosáhnout optimálních interakcí s aktivním místem proteasy [25].

Inhibitory první generace zčásti sloužily jako předlohy při vývoji inhibitorů generace druhé. Mezi cíle při vývoji těchto inhibitorů patřilo a stále patří mimo inhibice proteas resistantních k inhibitorům první generace též zjednodušení léčebného režimu. Optimální je zredukování počtu tablet na den nebo počtu tablet v jedné dávce či odstranění některých z četných vedlejších účinků inhibitorů první generace [31].

K dnešnímu dni je pro klinickou praxi Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA) povoleno deset inhibitorů HIV-1 proteasy [32].

2.3.2.2 Inhibitory vázající se mimo aktivní místo HIV-1 proteasy

Mimo inhibitorů strukturně napodobujících substráty HIV-1 proteasy a vázajících se do aktivního místa, se podařilo nalézt i několik sloučenin schopných inhibovat proteasu vazbou na jiné části enzymu. Látky působící těmito zcela odlišnými mechanismy účinku jsou potenciálními inhibitory variant proteasy resistantních vůči komerčním, do aktivního místa se vázajícím, inhibitorům. Žádný z těchto projektů však prozatím nebyl doveden ani do fáze klinických studií.

Jednou z možností inhibice je znemožnění tvorby dimeru proteasy. Toho lze dosáhnout nejspíše pomocí peptidů napodobujících dimerizační doménu nebo upravených

peptidů s dimerizační doménou interagujících [33,34]. V literatuře lze nalézt též zmínky o možnosti blokovat dimerizaci pomocí specifických protilátek interagujících s oblastí dimerizační domény [35].

Dalším procesem, který je možno při inhibici HIV-1 proteasy cílit, je samotné skládání proteinu. Při něm dochází nejprve k utvoření takzvaných lokálních elementárních struktur, silně interagujících strukturních elementů bohatých na hydrofobní aminokyseliny, kolem nichž se posléze skládá zbytek proteinu. Látky schopné tvorbu těchto elementárních lokálních struktur blokovat pak působí jako inhibitory HIV-1 proteasy [36].

Poslední skupinou možných cílů jsou pozice mimo aktivní místo na dimerní, správně složené protease. Nejčastěji se jedná o oblast pohyblivých chlopní zakrývajících v průběhu katalytické činnosti enzymu dutinu aktivního místa. Tohoto druhu inhibice jsou schopny jednak protilátky vázající specificky motivy vyskytující se v oblasti chlopní [35], ale také například čistě anorganické inhibitory založené na strukturách polyoxometalátů [37]. Mimo aktivní místo se, z podstaty svého mechanismu inhibice, musí vázat i dosud jediná v literatuře popsána skupina akompetitivních inhibitorů HIV-1 proteasy - monocyklické betalaktamy. Ty by podle *in silico* modelů měly propojit chlopně obou monomerů v uzavřené konformaci a zamezit jejich opětovnému otevření. Výpočty však dosud nebyly potvrzeny rentgenostrukturní analýzou [38]. Mechanismy akompetitivní, ale i nekompetitivní inhibice jsou schopny působit též některé metallakarbonové inhibitory identifikované v nedávné době laboratoří Doc. Jana Konvalinky na ÚOCHB (kapitola 2.3.4)

2.3.3 Zkoumání strukturních a fyzikálních vlastností HIV-1 proteasy

Pro medicínskou chemii a další obory snažící se metodami racionálního návrhu připravit látky specifických vlastností působící na biomolekulární cíle je důkladná znalost strukturních a fyzikálních vlastností cílové biomolekuly jednou z klíčových informací pro úspěšný návrh, popřípadě optimalizaci potenciálního léčiva. Moderními metodami biofyzikální chemie je možno o zkoumané biomolekule získat množství informací, které popisují jednak její strukturu, charakteristiky případných multimerizací nebo interakcí s vazebným partnerem, konformační změny v průběhu vykonávání funkce, změny struktury a vlastností způsobené vlivem inhibitoru a mnohé další důležité charakteristiky. Právě HIV-1 proteasa je kvůli relativně snadné purifikaci, dostatečné stabilitě a motivaci

plynoucí z terapeutické zajímavosti ideálním příkladem využití metod biofyzikální chemie. Díky studiím, využívajícím rentgenostrukturní analýzu, spektroskopické, kalorimetrické a další metody, se tak HIV-1 proteasa stala jednou z nejlépe prozkoumaných proteinových molekul.

2.3.3.1 Sedimentační techniky

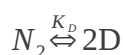
Homodimerní struktura molekuly HIV-1 proteasy a závislost její katalytické aktivity na pH přinášely již na počátku zkoumání tohoto enzymu otázku, jakým způsobem ovlivňuje funkci proteasy stabilita dimerní struktury. Již v prvních publikacích popisujících trojrozměrnou strukturu enzymu se objevovaly zmínky o možnosti inhibovat proteasu nejenom inhibitory založenými na neštěpitelných analozích peptidových substrátů, ale také molekulami napodobujícími dimerizační doménu proteinu [39]. Právě pro inhibici HIV-1 proteasy pak vznikl i vůbec první z této nové třídy takzvaných nekovalentních disociativních inhibitorů. Jednalo se o syntetický tetrapeptid Thr-Leu-Asn-Phe-COOH, odvozený od C-konce proteasy, který je součástí dimerizační domény. Jeho mechanismus účinku autoři studie potvrdili jednak zcela novou metodou analýzy dat enzymové kinetiky, zaměřenou právě na inhibici dimerizace proteinů, a také pomocí metody sedimentační rovnováhy. Za použití analytické centrifugy byl pozorován rozdíl relativních molekulových hmotností mezi vzorkem bez přítomnosti disociativního inhibitoru, který sedimentoval za podmínek experimentu (pH=5,0) jako nedisociující dimer o relativní molekulové hmotnosti 20800, a stejným množstvím enzymu v přítomnosti dvojnásobného nadbytku disociativního inhibitoru. Ten sedimentoval za shodných experimentálních podmínek jako monomer o relativní molekulové hmotnosti 12100, odpovídající základní hmotnosti monomeru, navýšené o navázaný inhibitor [33]. Důležitou charakteristikou HIV-1 proteasy související nejen s vývojem disociativních inhibitorů je disociační konstanta dimer - monomer, označovaná K_D . V prvotních studiích byla pro její určení využívána metoda založená na analýze kinetických dat pocházejících ze štěpení peptidových substrátů. Z několika studií vzešla poměrně nesourodá skupina výsledků, popisující disociaci za různých podmínek. Ani podmínky zcela stejné však nevedly ke shodným výsledkům, jak je vidět z rozdílu mezi dvěma studii, z nichž první určuje pro pH = 5,0 $K_D = 3,6$ nM [33] v kontrastu se studií konkurenční skupiny, jejímž výsledkem pro stejné pH byla $K_D < 80$ pM [40]. O komplexnější analýzu se pokusili v pozdější studii Drake a kol., kteří za použití vazby fluorescenční značky, vázající se do aktivního místa, sledovali disociaci proteasy za

různých pH a teplot [41]. S jejich prací pak polemizuje následná studie, která pro určení K_D využívá právě metody sedimentační rovnováhy [42]. Výhodou této metody je využití přímého fyzikálního měření, bez zavádění dalších proměnných do experimentu, kdy je ustavena rovnováha mezi sedimentací a volnou difúzí. Koncentrační profil v závislosti na vzdálenosti od osy rotace je pak sledován optickou detekcí jako absorbance elektromagnetického záření vlnové délky 280 nm. Závislost koncentrace na poloměru rotace je fitována modelovými křivkami, z nichž je možno získat molekulové hmotnosti sedimentujících částic, popřípadě parametry charakterizující jejich interakci. Nevýhodou metody je pak velmi dlouhé trvání experimentu. Dlouhý experimentální čas v případě HIV-1 proteasy vedl k její autoproteolytické degradaci. Autoři proto byli nuceni použít k autoproteolýze resistantní variantu proteasy nesoucí mutace Q7K/L33I/L63I, která je od proteasy divokého typu téměř nerozlišitelná jak strukturně, tak co se týče štěpení substrátu a vazby inhibitorů [43] a dále také proteasu katalyticky inaktivovanou mutací D25N. Pro tyto enzymy se pak pokusili stanovit disociační konstanty dimer - monomer. U pH = 4,5 byla naměřená disociační konstanta pod limitem optické detekce užívané v metodě a její hodnotu tedy autoři uvádějí jako nižší než 100 nM, což je výsledek shodující se s předchozími publikacemi. Pro pH = 7,0 však autoři získali z experimentálních dat fit odpovídající jednoznačně jednoduchému modelu monomer - dimer a přisuzující inaktivní variantě D25N disociační konstantu $K_D = 1 \mu\text{M}$ a variantě Q7K/L33I/L63I dokonce disociační konstantu ještě vyšší, $K_D = 5,8 \mu\text{M}$ [42]. Tyto výsledky jsou v silném rozporu s předchozí studií Drake a kol., která protease divokého typu za stejného pH přisuzuje $K_D = 23 \text{ nM}$ [41]. Autoři tento rozpor vysvětlují možným zkreslením dat u kinetické studie, zaviněným inhibitorem termodynamicky indukovanou tvorbou dimeru, jehož koncentrace je pak ve výpočtech silně nadhodnocena. Tuto hypotézu pak podporují vlastními výsledky z CD spektroskopického měření, ukazujícími s disociací korespondující úbytek struktury β skládaného listu při pH = 7,0, pravděpodobně pocházející z rozrušení dimerizační domény. Součástí práce je též určení disociačních konstant pro HIV-1 proteasy nesoucí mutace V82F; V82F/I84V; V82T/I84V a L90M, selektované pod tlakem klinicky užívaných inhibitorů. Všechny tyto mutantní proteasy vykazují znatelně navýšenou disociační konstantu a to 5x až 23x. Ve studii je naznačeno, že by určité zvýšení disociační konstanty dimeru mohlo představovat, vedle snížení afinity inhibitoru k aktivnímu místu mutantu, další cestu k omezení vlivu inhibitorů na enzym [42].

2.3.3.2 Kalorimetrická analýza

Další biofyzikálně chemickou technikou, užívanou ke studiu stability proteinu, je diferenční skenovací kalorimetrie, zkráceně DSC. Vzorek je zde v průběhu experimentu zahříván v adiabatické měřící cele a je sledována jeho tepelná kapacita při měnící se teplotě. Denaturace proteinu je provázána spotřebou tepla, využitého při strukturních přechodech, které ji provázejí. Stabilizace proteinu se pak projevuje posunem k vyšší teplotě denaturace a také vyšší spotřebou energie pro denuraci.

Pro HIV-1 proteasu divokého typu byl touto metodou potvrzen mechanismus denaturace sestávající z dvoustavového přechodu zahrnujícího denuraci probíhající současně s disociací dimeru dle schématu:



tedy rovnováhu mezi nativním dimerem a denaturovaným monomerem, bez existence nativního monomeru [44]. Tepelná denaturace proteasy byla zcela ve shodě s tímto schématem pozorována jako proces závislý na koncentraci enzymu. Na základě dříve vyřešených trojrozměrných struktur a naměřených dat z kalorimetrie byly provedeny výpočty strukturně-termodynamické analýzy HIV-1 proteasy, z nichž vyplývá, že téměř veškerá stabilizační energie pochází z procesu dimerizace. Samotná dimerizační doména, tvořená N a C-koncovými aminokyselinami v sekvenci monomerů, formujícími struktu β-skládaného listu, pak poskytuje přibližně 75% vazebné energie udržující dimerní strukturu. Další důležitou, dimer stabilizující oblastí jsou pak aminokyseliny Thr26, Gly27 a Asp29, nacházející se na dně dutiny aktivního místa [45].

Diferenční skenovací kalorimetrií byl také studován vliv vazby inhibitoru acetylpepstatinu na energii stabilizující strukturu proteasy. Jedná se o peptid o sekvenci Ac-Isovaleryl-Val-Val-Statin-Ala-Statin, obsahujícíh neobvyklou aminokyselinu statin (chemicky (3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanovou kyselinu), díky které působí jako obecný inhibitor aspartátových proteas [46]. Nalezená závislost popisovala stabilizaci struktury, jež se zesilovala s narůstající koncentrací inhibitoru. Detailním teoretickým popisem tohoto jevu pak byl vytvořen model, umožňující z míry tepelné stabilizace vypočítat vazebnou konstantu ligandu [47].

Druhou metodou založenou na přímém měření termodynamických jevů, kterou je možno využít pro studium HIV-1 proteasy, je isothermální titrační kalorimetrie,

zkráceně ITC. V experimentu je do adiabaticky izolované měřicí cely obsahující roztok jedné z interagujících složek (v tomto případě proteinu) titrací přidávána složka druhá (ligand). Měřena je tepelná odezva pozorované interakce vůči kontrolní adiabatické cele naplněné vodou nebo pufrem, projevující se změnou enthalpie systému. Směrnice titrační křivky v inflexním bodě poskytuje informaci o asociační konstantě sledovaného děje. Ze základních termodynamických rovnic

$$\Delta G = -RT \ln(K_a)$$

a

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

je pak již možno snadno dopočíst zbývající základní termodynamické charakteristiky sledovaného děje, tedy Gibbsovu energii a entropický příspěvek ke Gibbsově energii [48].

V případě studia HIV-1 proteasy je ITC metodou hojně užívanou k detailnímu popisu termodynamických parametrů interakce mezi enzymem a inhibitory. Jak je zřejmé z výše uvedených rovnic, při optimalizaci potenciálního inhibitoru zlepšováním jeho afinity k HIV-1 protease (a tedy i vylepšováním jeho Gibbsovy energie interakce) je možno postupovat třemi cestami - optimalizací entropického příspěvku, vazebné enthalpie nebo obou parametrů zároveň [49]. První inhibitory HIV-1 proteasy byly vytvářeny na základě strukturní podobnosti inhibitoru a substrátu, popřípadě strukturní komplementarity inhibitoru s aktivní dutinou enzymu. Tento systém návrhu léčiva vedl k termodynamicky značně nevyrovnaným inhibitorům, jejichž afinita k enzymu byla prakticky výhradně řízena entropickým členem, konkrétně změnou solvatační entropie při interakci. Pozitivní efekt tvarové komplementarity je však snadno překonatelný mutacemi v enzymu, které tak způsobují resistenci na inhibitor [50].

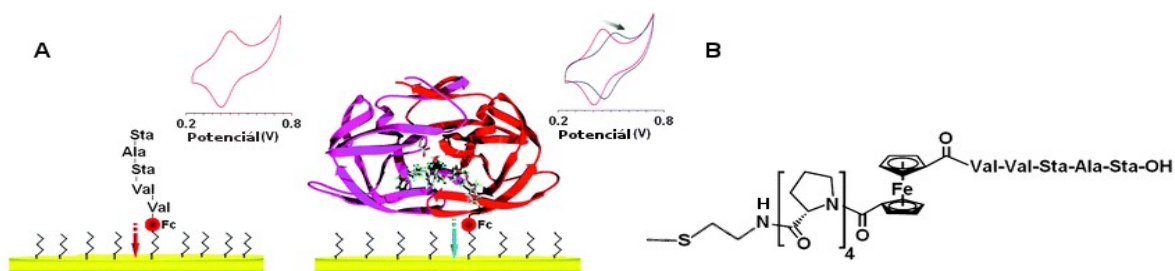
Novější inhibitory HIV-1 proteasy byly navrhovány nejen s ohledem na znalost strukturních dat, ale také na znalost charakteristik termodynamických. Cílem bylo posílení enthalpického členu interakční energie, pocházejícího především z vodíkových vazeb a dalších nekovalentních interakcí mezi inhibitorem a konzervovanými oblastmi enzymu. Tato strategie vede k navýšení genetické bariéry resistance. Jako nejefektivnější, ale zároveň též nejobtížnější, se pak jeví návrh inhibitoru založený na současné optimalizaci vazebné enthalpie maximalizací počtu nekovalentních interakcí s konzervovanými oblastmi proteinu a současně udržování příznivých hodnot entropického členu zvyšováním

konformační flexibility těch částí inhibitoru, jež se váží do míst enzymu často ovlivněných resistantními mutacemi. Inhibitory tohoto typu pak zachovávají svou inhibiční schopnost i vůči resistantním variantám HIV-1 proteasy [31,51,52].

Isothermální titrační kalorimetrií je též možno sledovat samotný mechanismus vývoje resistance vůči inhibitorům. V několika studiích byly analyzovány vícenásobně mutované HIV-1 proteasy s vysokou mírou resistance vůči klinicky užívaným inhibitorům. Příslušné mutace byly rozděleny do několika skupin a byly připraveny proteiny nesoucí pouze tyto skupiny mutací. Jejich vliv na resistenci byl poté analyzován izolovaně. U nejresistentnějších variant dochází mezi mutacemi ke kooperaci. Vliv skupiny mutací je tedy výrazně silnější než součet vlivů mutací individuálních. Zajímavým faktem se též zdá být, že nejsilnější příspěvky k této kooperativní resistenci nepocházejí z mutací v aktivním místě, ale z mutací blízko dimerizační domény proteinu [53,54].

2.3.3.3 Elektrochemické techniky

Pro velmi citlivou detekci HIV-1 proteasy v roztoku i biologických matricích byla vyvinuta metoda využívající elektrochemického biosenzoru. Na tištěnou zlatou elektrodu je imobilizován thiolem zakončený konjugát ferrocenu a pepstatinu, výše zmíněného universálního inhibitoru aspartátových proteas. Ferrocen je v tomto uspořádání, zobrazeném na obrázku 6A, při elektrochemické reakci oxidován, což je možno pozorovat pomocí cyklické voltametrie. V přítomnosti HIV-1 proteasy se však pík oxidace na cyklickém voltamogramu posouvá k vyšším potenciálům a jeho plocha se zároveň zmenšuje, obojí lineárně s narůstající koncentrací enzymu. Změny v cyklické mvoltamogramu jsou vyobrazeny na obrázku 6B. Jev je vysvětlován blokadou volné difuze pomocného elektrolytu k ferrocenové části konjugátu HIV-1 proteasou navázanou na pepstatinovou část konjugátu, čímž je znesnadněna elektrochemická oxidace ferrocenu. Limit detekce této metody pro HIV-1 proteasu byl stanoven na koncentraci 1 nM a na stanovení nemá žádný závažnější vliv přítomnost biologické matrice, ať už v podobě lidského sérového albuminu, nebo přímo 10x ředěného lidského krevního séra [55].



Obrázek 6: A) schema metody pro stanovení koncentrace HIV-1 proteasy pomocí zlatých elektrod modifikovaných konjugátem ferrocenu. Modrou křivkou je zobrazena změna cyklického voltamogramu po navázání proteasy na pepstatin. B) chemická struktura konjugátu ferrocen-pepstatin. Převzato z [56].

Metoda byla posléze zdokonalena nahrazením tištěné zlaté elektrody zlatou elektrodou, na jejímž povrchu byly elektrochemicky vygenerovány zlaté nanočástice. Touto modifikací byl limit detekce snížen k hranici 80 pM, avšak objevuje se i horní limit detekce 10 nM, za nímž již není závislost snížení a posunu signálu na koncentraci lineární, pravděpodobně vlivem saturace vrstvy. K dalšímu vylepšení limitu detekce pak došlo zavedením elektrody z uhlíkových nanotrubic funkcionalizovaných na povrchu thiolovou skupinou, na kterou byly navázány zlaté nanočástice, a nahrazením cyklické voltametrie jako detekční metody jinou elektrochemickou technikou, elektrochemickou impedanční spektroskopií. V tomto uspořádání se limit detekce snížil až na hranici 0,8 pM, se zachováním reproducibility a minimálního vlivu biologické matrice na analýzu [57].

Vazba HIV-1 proteasy na pepstatinovou část konjugátu senzoru je rozrušena přítomností silného kompetitivního inhibitoru proteasy. Toho bylo využito ve studii, při níž byla popsanou metodou analyzována vazba klinicky využívaných inhibitorů HIV proteasy [56] lopinaviru, saquinaviru, indinaviru a inhibitorového prekursoru fosamprenaviru [58-61]. V analýze byla nejprve na elektrodu naadsorbována HIV-1 proteasa, naměřen signál a posléze byly proměřeny vzorky obsahující příslušný inhibitor v ekvimolárním množství vůči enzymu, v deseti a stonásobném nadbytku. Analýzou elektrochemické odezvy pak bylo možno určit inhibiční potenciál zkoumané sloučeniny. Výsledky získané touto studií byly ve shodě s dříve publikovanými daty. Nejlépe působil inhibitor lopinavir, inhibitorový prekuzor fosaprenavir, který svou silnou inhibiční schopnost získává až metabolickou přeměnou, pak inhiboval nejhůře. Výsledky této studie spolu se snadnou automatizovatelností a nízkou cenou elektrochemických biosenzorů naznačují možnost dalšího využití metody pro testování rozsáhlých knihoven chemických sloučenin při hledání nových inhibitorů HIV-1 proteasy [56].

2.3.3.4 Resonance povrchového plasmonu

Pro identifikaci nových inhibitorů HIV-1 proteasy pocházejících z rozsáhlých knihoven sloučenin, může sloužit též povrchová plasmonová resonance, zkráceně SPR. Metoda využívá jevu resonance povrchového plasmonu, který se projevuje výraznou redukcí intenzity světla odraženého od tenké vrstvy některých kovů. Resonance se projevuje pouze v určitém rozmezí úhlů dopadajícího polarizovaného světla a je velmi citlivá na index lomu prostředí v těsné blízkosti kovového povrchu. Je proto možno sledovat adsorpční jevy, popřípadě interakci molekul v roztoku s molekulami adsorbovanými na kovovou vrstvu. Při analýze HIV-1 proteasy touto metodou je enzym imobilizován na zlatý čip pomocí nescifické kovalentní modifikace lysinových postranních řetězců N-hydroxysukcinimidem. Vazba ligandu je sledována jako změna indexu lomu vrstvy nad čipem [62].

Metoda nabízí možnost na multikanálových přístrojích v paralelních experimentech nebo s několikanásobnými kontrolními experimenty sledovat interakci nízkomolekulárních ligandů s imobilizovaným proteinem. Výhodou oproti jiným metodám, jako jsou například kalorimetrická analýza nebo eseje pro enzymovou kinetiku, poskytujícím termodynamickou informaci o rovnovážných konstantách, je získání informace o kinetických parametrech interakce. Získána je tak rychlostní konstanta asociace (k_{on}) a disociace (k_{off}) komplexu, z jejich poměru je pak možno určit rovnovážnou asociační konstantu K_a poskytující informaci o afinitě ligandu k enzymu [63].

Pro HIV-1 proteasu byla metoda optimalizována pro prvotní ověřování vazby látek vybraných z rozsáhlých knihoven sloučenin [62]. Pomocí SPR byla též studována asociační a disociační kinetika klinicky užívaných inhibitorů HIV-1 proteasy. Získané výsledky se shodovaly s afinitami inhibitorů vůči enzymu stanovenými jinými metodami. Data z povrchové plasmonové resonance je též možno využít při optimalizaci nových struktur inhibitorů, kde nabízí analýza možnost optimalizovat nejenom celkovou afinitu, ale i její jednotlivé komponenty, asociaci a disociaci. V kombinaci s kalorimetrickými měřeními je pak možno získat až tak detailní informace jako jsou enthalpicko - entropické charakteristiky asociačních a disociačních dějů [64].

Studována byla též kinetika vazby inhibitorů k resistantním variantám HIV-1 proteasy. Na čip byly imobilizovány proteasy nesoucí buď jednotlivé obvyklé mutace spojené s resistencí nebo kombinace těchto mutací a byla sledována kinetika vazby inhibitoru.

V přítomnosti jednotlivých resistantních mutací je snížena afinita téměř ve všech případech způsobena zrychlením disociace komplexu enzym-inhibitor. Při zapojení kombinace mutací pak docházelo většinou k současnému snížení rychlosti asociace a zvýšení rychlosti disociace. Výjimkou byly inhibitory, které vykazují velmi nízkou rychlost disociace vůči protease divokého typu, v tomto případě saquinavir a nelfinavir, u nichž docházelo i při přibývajícím počtu resistantních mutací pouze k dalšímu snižování rychlosti disociace [65].

Aplikací použitelnou pro hledání inhibitorů ve větších knihovnách sloučenin je spojení SPR analýzy s hmotnostní spektrometrií, konkrétně metodami MALDI-ToF a electrospray ionization tandem mass spectrometry. Při této analýze je enzym imobilizovaný na čipu vystaven směsi látek, neinteragující nebo nespecificky interagující látky jsou odmyty puřem a následně jsou eluovány látky, které s HIV proteasou interagovaly. Eluát je poté analyzován hmotnostní spektrometrií, která identifikuje interagující sloučeniny. Metoda nabízí možnost automatizace, vhodné pro testování velkých množství látek [66]. Jinou možností, jak testovat interagující látky, je SPR experiment v obráceném uspořádání. Imobilizován na čipu je zde nepříliš silně interagující pepidomimetický inhibitor. Na čip je přiveden roztok HIV-1 proteasy, která se na inhibitor naváže. Poté jsou přivedeny testované látky a sledováno je rozrušování komplexu enzymu s imobilizovaným inhibitorem, způsobené vytěsňením inhibitorem silněji interagujícím [67].

2.3.3.5 Rentgenostrukturní analýza

Patně nejdůležitějším poznatkem, který může biofyzikální chemie o biomolekule poskytnout, je její trojrozměrná struktura s atomárním rozlišením. Tato data v drtivé většině případů pocházejí z analýzy difrakce rentgenového záření na krystalu biomolekuly.

První trojrozměrná struktura HIV-1 proteasy byla vyřešena roku 1989 pro protein získaný totální chemickou syntézou [27]. Brzy následovala struktura proteinu v komplexu s inhibitorem na bázi neštěpitelného analogu substrátu [68]. S postupnou optimalizací expresních protokolů začalo struktur rychle přibývat, také díky motivaci vývojem a testováním nových inhibitorů. Jak je možno zjistit při pohledu do největší databáze proteinových struktur RCSB Protein Data Bank, HIV-1 proteasa je zde zastoupena 369 publikovanými strukturami, z nichž pochází 365 z dat získaných rentgenostrukturní

analýzou [69]. To z ní činí, vedle standardních modelových proteinů jako lysozym nebo hemoglobin, jednou ze strukturně nejprozkoumanějších proteinových molekul vůbec.

Nasazení rentgenostrukturní analýzy je spojeno především s vývojem a optimalizací nových inhibitorů metodou racionálního návrhu, kdy jsou na základě trojrozměrné struktury komplexu proteinu s optimalizovaným inhibitorem identifikovány potenciální interakční cílitelná interakční místa a molekula inhibitoru je poté chemicky modifikována přidáváním funkčních skupin s těmito místy interagujícími [70].

Druhým polem působnosti metody pak je studium strukturní podstaty vzniku resistance vůči inhibitorům. Ve vysoce rozlišených strukturách komplexů inhibitorů s variantami HIV-1 proteasy, nesoucími mutace selektované pod tlakem příslušných inhibitorů v klinické praxi, jsou identifikovány strukturní změny vyvolané působením těchto inhibitorů [71-73]. Mimo aminokyselinových záměn se jedná například o inserce aminokyselin do peptidového řetězce [74]. Strukturní data jsou pak využívána při racionálním návrhu inhibitorů působících proti těmto resistantním kmenům [75].

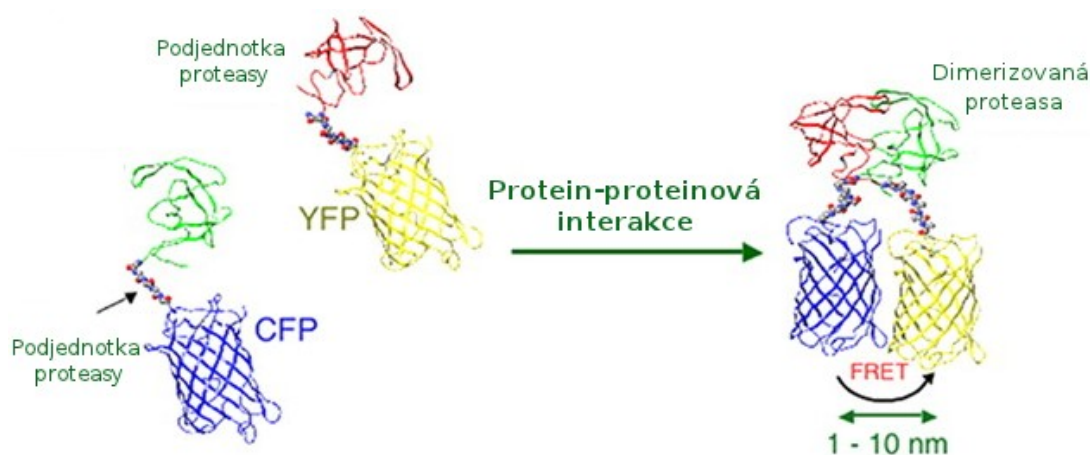
2.3.3.6 Fluorescenční spektroskopie

Hlavním uplatněním fluorescenčních technik při studiu vlastností HIV-1 proteasy je využití v kinetických esejích pro stanovení proteolytické aktivity s použitím fluorescenčních substrátů. Peptidový substrát obsahuje fluorescenční značku a zhášec fluorescencí oddělené na peptidovém řetězci štěpným místem pro enzym. Mezi nimi dochází k Försterovu rezonančnímu přenosu energie (FRET). Po hydrolýze substrátu proteasou dojde k odstranění vlivu zhášecí a tím i nárůstu fluorescence značky [76].

Obdobného principu bylo využito i v další studii zabývající se konstrukcí eseye pro stanovení proteolytické aktivity HIV-1 proteasy v buněčné kultuře savčích buněk. Buňky byly transfekovány DNA kódující polyprotein Gag-Pol, obsahující HIV-1 proteasu, a současně také DNA konstruktem kódujícím dva fluorescenční proteiny, humanizovanou luciferasu pocházející z korálnatce *Renilla reniformis* a humanizovaný zelený fluorescenční protein. Mezi ně byl umístěn peptidový řetězec nesoucí štěpné místo pro HIV-1 proteasu odvozené z rozhraní mezi dělicím peptidem 2 a nukleokapsidem (viz obrázek 3, strana 12). Po přidání substrátu luciferasy, který prochází cytoplasmatickou membránou, proběhne biochemická reakce a luciferasa začne produkovat bioluminiscenční záření o vlnové délce 395 nm. Jeho část se Försterovým rezonančním transferem energie

přenesu na zelený fluorescenční protein, pokud se nachází v dostatečné blízkosti (10-100 Å). Zelený fluorescenční protein pak emituje bioluminiscenční záření o vlnové délce 510 nm, jež je měřeno. Dojde-li však k štěpení substrátu HIV-1 proteasou, rezonanční přenos energie proběhnout nemůže, a luminiscence zeleného fluorescenčního proteinu není pozorována. Funkčnost systému pro testování inhibitorů byla ověřena klinicky užívanými inhibitory saquinavirem a amprenavirem, které štěpení substrátu efektivně blokovaly. Dále pak byl testován vliv nadměrné produkce jednoho z regulačních faktorů HIV-1 viru, proteinu Vif, který také, ve shodě s dříve publikovanými výsledky, zabraňoval štěpení substrátu. Výhodou této metody je bezpochyby její fungování přímo v savčích buněčných kulturách, kde se tak při testování inhibitorů zapojí i vlivy v *in vitro* esejích nesimulovatelné [77].

Försterův rezonanční přenos energie byl uplatněn i v práci zkoumající inhibici dimerizace HIV-1 proteasy pomocí nízkomolekulárních nepeptidových inhibitorů. V experimentu byly využity expresní konstrukty kódující fúzní protein spojující HIV-1 proteasu pětiaminokyselinovou spojkou na C-konci se žlutým (YFP), popřípadě azurovým (CFP) fluorescenčním proteinem. Oběma konstrukty pak byly kotransfekovány savčí buňky, jež fúzní protein následně syntetizovaly. Při dimerizaci molekuly HIV-1 proteasy v cytoplasmě docházelo i k heterodimerizaci mezi proteasou označenou žlutým a proteasou označenou azurovým fluorescenčním proteinem. U těchto heterodimerů probíhal Försterův rezonanční přenos energie z azurového na žlutý fluorescenční protein, jež byl detekován technikou fotobělení donoru. Princip metody je zobrazen na obrázku 7.



Obrázek 7: princip metody užívající fúzní proteiny pro studium inhibice dimerizace HIV-1 proteasy převzato z [79] a upraveno.

Metoda byla ověřena také na panelu různých variant proteas. U těch proteas, kde byly mutovány aminokyseliny, poskytující vodíkové vazby mezi monomery, které stabilizují strukturu dimeru, byl spolehlivě identifikován dimerizační defekt. Skupina nízkomolekulárních nepeptidových inhibitorů, odvozených od struktury klinicky užívaného inhibitoru darunaviru [78], byla testována výše zmíněnou metodou. Všechny testované inhibitory byly schopny inhibovat tvorbu dimeru na úrovni peptidového inhibitoru navrženého k napodobování dimerizační domény enzymu [33]. Inhibice dimerizace probíhala pouze při procesu prvotního skládání dimeru, strukturu již složeného dimeru nebyly inhibitory schopny rozrušit [79].

Další možností je též využít vlastní fluorescence proteinu, jmenovitě postranních řetězců tryptofanu, jejichž emisní maximum je sowlatochromní. Jeho poloha se tedy mění v závislosti na polaritě prostředí, ve kterém se nachází. V aminokyselinové sekvenci HIV-1 proteasy se nacházejí dva tryptofany, a to v pozicích 6 a 42. Tryptofan 6, nacházející se velmi blízko dimerizačního rozhraní, je pohřben v hydrofobní oblasti molekuly. Jeho vystavení polárnímu rozpouštědлу při rozpadu dimerní struktury je proto dobře pozorovatelné jako snížení intenzity fluorescence provázené rudým posunem spektra (zvýšení vlnové délky emisního maxima). Toho lze využít při denaturačních studiích proteinu, při ověřování stabilizace struktury proteinu vazbou inhibitoru nebo hledání pH optima proteinu [44].

2.3.3.7 Metody nukleární magnetické resonance

Ačkoli je rentgenostrukturní analýza ve strukturní biologii metodou nejvyužívanější, trpí i jistými nedostatky. Prvním z nich je nutnost vytvořit pro měření dostatečně velké, rentgenové paprsky difraktující, proteinové krystaly, což není možné pro každý protein. Druhou nevýhodou je statický obraz proteinu v rentgenové struktuře, postrádající informaci o pohyblivých částech a změnách konformace, které jsou u některých proteinů součástí mechanismu účinku. Krystalizace proteinu též může být zdrojem takzvaných krystalizačních artefaktů, strukturních prvků pocházejících z krystalových kontaktů molekul proteinu, v roztoku se běžně nevyskytujících. Metodou, jež je za určitých podmínek schopna odbourat všechny tyto nedostatky, je nukleární magnetická resonance, zkráceně NMR. Měření NMR probíhá v roztoku, nevýhodou je ovšem potřeba vysokých koncentrací a dlouhodobé časové stability proteinu. Pro analýzu též existuje velikostní

limit pro sledované proteiny, který se sice postupně daří navyšovat, stále však leží, za příznivých podmínek, na hodnotě přibližně 100 kDa [80].

Metoda využívá nenulového jaderného spinu, izotopů některých prvků, který umístěn do magnetického pole, obsazuje diskrétní energetické hladiny dané Zeemanovým jevem. Vystavení elektromagnetickému záření z radiofrekvenční oblasti spektra pak vede k přechodům jaderných spinů mezi těmito hladinami, doprovázeným absorpcí záření. V moderních spektrometrech je radiofrekvenční záření aplikováno pulsně a signál vyhodnocován Fourierovou transformací. Při biofyzikálně chemických aplikacích pro studium proteinů je pak využíváno zejména homo- a heteronukleárních korelačních experimentů a metod založených na relaxačních jevech [80].

Studium HIV proteasy pomocí NMR bylo umožněno díky prvotní práci, ve které byly enzymu vázanému k symetrickému inhibitoru z třídy cyklických derivátů močoviny přiřazeny NMR signály a určeny prvky sekundární struktury [81]. Následovalo několik prací zaměřujících se na určení vysoce rozlišené trojrozměrné struktury komplexů HIV-1 proteasy s jejími inhibitory symetrickými [82] ale i asymetrickými, u nichž byl pozorován vliv asymetrie inhibitoru na odlišnou strukturu a zejména dynamiku jednotlivých monomerů tvořících dimerní strukturu [83]. Posuzován byl i vliv strukturně fixovaných molekul vody na funkci enzymu. Pomocí pro studium interakcí s molekulou vody optimalizovaných relaxačních experimentů, byla potvrzena z krystalových struktur známá přítomnost takzvané strukturní vody, vázané pod pohyblivými chlopněmi, i její vytěsnění inhibitory z třídy cyklických močoviny a také přítomnost dalších molekul vody s podstatně rychlejší dynamikou výměny. Studovány byla též chemická výměna karboxylových vodíků na katalytických aspartátech 25, ukazující relativně snadnou možnost průniku rozpouštědla do aktivního místa a způsob protonace katalytických aspartátů v komplexu s některými inhibitory [84].

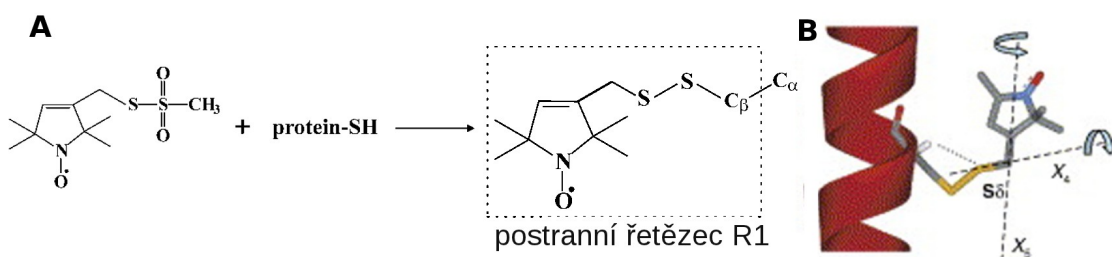
NMR bylo též aplikováno na studium roztokové struktury monomeru HIV-1 proteasy. Ačkoli se HIV proteasa divokého typu v roztoku jako strukturováý monomer nevyskytuje, a strukturní přechod se odehrává dvoustavovým mechanismem nativní dimer - denaturovaný monomer, byla identifikována mutace R87K, jež tuto situaci mění. HIV-1 proteasa nesoucí tuto mutaci se v roztoku vyskytuje v rovnováze mezi strukturovaným monomerem a dimerem, jež je výrazně posunutá směrem k monomeru. Přídavek inhibitoru tuto rovnováhu převrčí směrem k dimerní struktuře. Trojrozměrná

struktura monomeru proteasy s mutací R87K se velmi podobá struktuře individuálního monomeru v dimerní struktuře. K rozrušení dimeru dochází patrně díky ztrátě mezimonomerních interakcí zprostředkovaných argininem 87 a též narušením struktury vnitřního β -skládaného listu dimerizační domény, tvořeného aminokyselinami 96-99 [85]. To bylo potvrzeno ve studii zabývající se trojrozměrnou strukturou zkrácené HIV-1 proteasy postrádající právě tyto aminokyseliny dimerizační domény. Struktura i dynamika této monomerní proteasy byla téměř shodná s R87K mutantní proteasou [86].

Důležitou aplikací NMR je též studium dynamiky enzymu. V několika studiích byla popsána dynamika páteře peptidového řetězce s důrazem na pohyblivé části, zejména chlopně zakrývající dutinu aktivního místa. U těch byly identifikovány dva různé módy pohybu. Prvním je pohyb celé chlopně, zprostředkávající přechod mezo polootevřenou a otevřenou konformací enzymu, který se odehrává na časové škále desítek mikrosekund, druhým pak pohyby koncových smyček chlopní, odehrávající se na subnanosekundové časové škále [87,88]. Oba tyto pohyby jsou výrazně zpomaleny vazbou inhibitoru. Zajímavým a proti výsledkům z některých jiných metod jdoucím zjištěním je pak určitá míra konformační flexibility dimerizačního rozhraní, konkrétně aminokyselin 4-6 u volného i vázaného proteinu, s pohyby odehrávajícími se na milisekundové časové škále [87].

2.3.3.8 Elektronová paramagnetická resonance

Interakci spinového momentu s elektromagnetickým zářením využívá i další metoda, elektronová paramagnetická resonance, zkráceně EPR. V tomto případě se však nejedná o energetické přechody jaderného spinu jako u NMR, ale spinu volného nespárovaného elektronu [89]. Ve studiu proteinů se tedy zdá být tato metoda omezena na metaloproteiny, obsahující ve své struktuře navázané ionty přechodných kovů a pro studium HIV-1 proteasy se jeví jako těžce použitelná. Tento nedostatek byl ale překonán zavedením takzvaných spinových značek. Jedná se o stabilní organické radikály obsahující nejčastěji nitroxylovou skupinu, nesoucí volný, nespárovaný elektron. Značky jsou navrženy tak, aby kromě stabilního radikálu nesly i funkční skupiny schopné navázat se specificky na určité postranní řetězce v proteinových molekulách. Nejčastěji se jedná o různé funkční skupiny vázající se na postranní řetězce cysteinu. Hojně se užívá methanthiosulfonová kyselina zobrazená na obrázku 8 [90].



Obrázek 8: **A)** princip specifického spinového značení pomocí MTSL. **B)** Vazba spinové značky na α -helix proteinu. Načeny jsou vazby postranního řetězce značky s volnou rotací převzato z [91] a upraveno.

Odstraněním nežádoucích cysteinových postranních řetězců cílenou mutagenézí a naopak zavedením cysteinů na místa zájmu, v kombinaci s modifikací těchto nově zavedených cysteinů spinovými značkami, vznikla nová metoda cíleného spinového značení neboli "site-directed spin labeling." Analýza zavedených spinových značek elektronovou paramagnetickou resonancí pak může poskytnout informace jak o struktuře, tak o dynamice sledovaného proteinu [90].

Základní metodou, méně náročnou na instrumentaci, je měření EPR spektra v režimu fixní frekvence. V tomto případě je vzorek, umístěný do dutiny elektromagnetu, ozařován mikrovlnným elektromagnetickým zářením konstantní frekvence. Spektrum je pak získáno pomocí postupné změny síly magnetického pole elektromagnetu obklopujícího vzorek. V důsledku Zeemanova efektu se elektronové spiny v magnetickém poli orientují s polem buď souhlasně nebo nesouhlasně. Absorpce elektromagnetického záření, jehož energie odpovídá rozdílu energií těchto spinových hladin, pak vede k přechodu mezi hladinami. Dostane-li se tedy síla magnetického pole na hodnotu generující rozdíl energií spinových hladin elektronu odpovídající procházejícímu elektromagnetickému záření, dojde k absorpci záření [89].

Spektra spinových značek navázaných na protein, měřená v režimu fixní frekvence, mohou poskytnout několik informací o proteinu a jeho bezprostředním okolí. Analýzou tvaru spektrální linie je možno získat čtyři základní charakteristiky. První z nich je dostupnost spinové značky rozpouštědly měřená z kolizní frekvence značky s paramagnetickými molekulami, vyskytujícími se v rozpouštědle, a projevující se snížením spin - mřížkového relaxačního času značky [90]. Druhým parametrem získatelným z tvaru spektrální linie je mobilita řetězce spinové značky, korelující s mobilitou původního postranního řetězce. Ve spektru se projevuje rozšířením centrální spektrální linie značky.

Dále je možno ze vzdálenosti dvou okrajových linií spektra určit polaritu bezprostředního okolí značky. Kombinací těchto tří parametrů je možno o označeném postranním řetězci získat řadu strukturních informací. Například zda se nachází na povrchu proteinu, či je pohřben v jeho jádře, v jakém prvku sekundární struktury proteinu je zakotven, jedná li se o místo kontaktu proteinových struktur či o místo pohřbené v membráně a další [92,93].

Posledním parametrem zjistitelným z tvaru spektrální linie je pak vzdálenost spinových značek. Pro využití této metody je třeba protein modifikovat spinovými značkami na dvou různých místech, jejichž vzdálenost je pak možno měřit. Vzdálenost značek se ve spektru projeví celkovým rozšířením spektra a tím i vlivem na amplitudu spektrálních linií. Vhodnou volbou umístění značek je pak touto metodou možno pozorovat indukované konformační změny na úrovni pohybu prvků sekundárních struktur nebo vzájemný pohyb celých domén proteinu. V možnostech metody je i sledování dynamiky pohybů proteinu na milisekundové časové škále [92,94,95]. Vzhledem k použitelnosti metody i pro méně strukturované, flexibilní proteiny, které obecně hůře krystalizují, a také možnosti měřit vzdálenosti v proteinu v rozsahu nad limitem NMR metody jaderného Overhauserova efektu, je měření vzdáleností pomocí EPR vhodnou komplementární metodou k oběma zmíněným technikám strukturní biologie.

Při studiu vlastností HIV-1 proteasy byla spektroskopie EPR s fixní frekvencí použita ke zhodnocení vlivu složek pufru používaného při měření na výsledné charakteristiky spektra. Při měření malých molekul ($M_r \leq 20000$ Da) se totiž vlastní celkový korelační čas molekuly pohybuje v nanosekundové škále a mění tvar spektra. Do měřeného roztoku jsou proto přidávány viskogeny, čímž se korelační čas pohybu celého proteinu dostane do hodnot spektrum neovlivňující. Autoři studie se pak snažili objasnit, jaký vliv mají tyto látky zvyšující viskozitu na pohyblivost samotné značky a na pohyby jednotlivých za běžných podmínek flexibilních částí proteinu. V případě proteasy zkoumali vliv na mobilitu pohyblivých chlopní zakrývajících aktivní místo enzymu. Pro tuto příležitost zavedli spinovou značku do pozice 55, ležící na vrcholu molekuly proteasy, přibližně uprostřed pohyblivé chlopně, s postranním řetězcem přímo vystupujícím do okolního solventu. Výsledky ukazují, že žádný ze čtyř použitých viskogenů neměl vliv na konformační změny a distribuci vzdáleností pohyblivých chlopní proteasy, glycerol a PEG3000 však výrazně ovlivňovaly pohyblivost samotné značky. Jako nejlepší viskogen pro HIV-1 proteasu, s nejmenším vlivem na pohyblivost značky i chlopní, pak ze studie

vyšel Ficoll 400. Výsledky studie jsou pak aplikovatelné i pro rentgenostrukturní experimenty, kde se uvedené viskogeny používají k ochraně krystalu před poškozením mrazem v průběhu měření [96].

Ač je metoda EPR spektroskopie při fixní frekvenci v kombinaci se spinovým značením dobře použitelná při strukturním zkoumání biomolekul, existují pro ni i jisté limitace. Tou největší je vzdálenostní limit ležící pro tuto metodu na hodnotě 25 Å. Stejně tak je někdy obtížné interpretovat tvar spektrální linie, zejména zapojuje-li se více vlivů, které může být obtížné odlišit. Proto má vzdálenostní informace z měření s fixní frekvencí spíše kvalitativní charakter. Tyto nevýhody odbourává experimentální uspořádání EPR spektroskopie v pulsním módu [91]. Zde je na vzorek umístěný ve stálém magnetickém poli elektromagnetu aplikován mikrovlonný puls, po jehož vypnutí se spiny ve vzorku vrací zpět do rovnováhy. Vhodným nastavením pulsní sekvence je možno oddělit příspěvek dipól-dipólového kaplingu, vypovídajícího o vzdálenosti a vzájemné orientaci elektronových spinů, od ostatních příspěvků spinového Hamiltoniánu. Získaný signál pak má průběh dohasínání volné indukce definovaný rovnicí

$$V(t, \theta, r) = 1 - \lambda [1 - \cos(\omega_{dd}(\theta, r)t)]$$

kde r je vzdálenost mezi elektronovými spiny, θ úhel svíraný mezi vektorem směru magnetického pole a vektorem spojujícím elektronové spiny a λ parametr hloubky modulace závisící na frakci excitovaných spinů. Dipól-dipól kapling ω je potom definován vztahem

$$\omega_{dd}(\theta, r) = \frac{2\pi g_1 g_2}{g_e^2} (3\cos^2\theta - 1) \frac{52,04}{r^3} [\text{MHz}\cdot\text{nm}^3]$$

kde g_1 a g_2 jsou g -faktory sledovaných spinů, g_e pak g -faktor volného elektronu. Dipól-dipólový kapling je tedy nepřímo úměrný třetí mocnině vzdálenosti spinů elektronu. Získaný signál v podobě spinového echa je pak Fourierovou transformací převeden z časové domény do domény frekvenční za zisku bipolárního takzvaného Pakeova spektra, obsahujícího signál dipól-dipólového kaplingu. To je pak další Fourierovou transformací převedeno do vzdálenostní domény [97]. Metoda byla původně vyvinuta pro měření vzdáleností v syntetických makro- a supramolekulách [98], posléze však byla optimalizována i pro použití ve studiu biopolymerů. Při správné volbě pulsní sekvence a metody zpracování signálu, jako je třeba Tikhonovova regularizace [99], je možné měřit

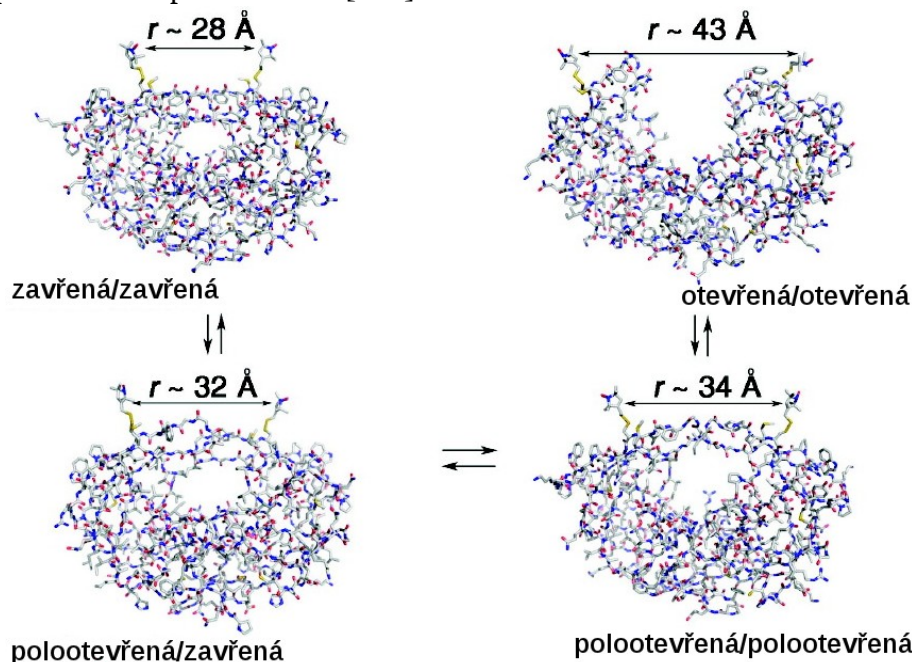
vzdálenosti až do limitu 80 Å. Další výhodou metody je možnost změřit distribuci vzdáleností, a to i v případě že je distribuce velmi široká [100].

Dynamika pohyblivých chlopní HIV-1 proteasy, její ovlivnění vazbou ligandů a změny v důsledku mutací, jsou problémy, k jejichž řešení se pulsní EPR spektroskopie nabízí. Pro EPR experimenty byl využit speciální mutant HIV-1 proteasy, nesoucí mimo tři stabilizačních mutací (Q7K/L33I/L63I) také mutace zaměňující cysteiny v pozici 67 a 95 za alaniny, čímž se předchází nespecifickému značení na těchto cysteinech. Jako místo pro vazbu značky pak byla vybrána aminokyselina v pozici 55, jež by jako jediná v pohyblivé chlopni svou záměnou neovlivňuje aktivitu ani strukturu enzymu [101]. Experimentálně bylo též prokázáno, že vazba spinové značky v této pozici nemá na strukturu ani aktivitu enzymu žádný zásadní vliv. V některých studiích je pak pro úplné vyloučení autoproteolýzy enzymu navíc zavedena inaktivující mutace D25N [102].

První práce využívající pulsní EPR při studiu HIV-1 proteasy [102] se zabývala porovnáním distribuce vzdáleností chlopní enzymu v nativním stavu a enzymu vázajícího v aktivním místě jeden z klinicky užívaných inhibitorů ritonavir [103]. V nevázaném stavu byla zjištěna průměrná vzdálenost mezi spinovými značkami 35,5 Å a distribuce vzdáleností byla velmi široká, s amplitudou pohybu 10,4 Å. Vazba inhibitoru oproti tomu vedla k snížení průměrné vzdálenosti značek, ale zejména k velmi dramatickému zúžení distribuce vzdáleností až k amplitudě 3,0 Å. Inhibitor tedy, ve shodě s pozorováními pocházejícími z ostatních metod, stabilizuje strukturu chlopní z částečně otevřené na zcela uzavřenou [102]. Výše zmíněná data byla též použita v jiné studii pokoušející se výpočetními metodami molekulové dynamiky zpřesnit získané závěry. Autoři výpočty částečně odstranili vliv vlastního pohybu značky, nezávislého na pohybech proteinu a také z distribucí vzdálenosti odvodili částečné strukturní charakteristiky plně otevřené formy enzymu [104].

Vliv mutací vyvolaných selekčním tlakem inhibitorů na mobilitu chlopní byl dalším předmětem zkoumání za použití pulsní EPR spektroskopie [105]. Střední vzdálenost chlopní a jejich pohyblivost u dvou rezistentních variant HIV-1 proteas izolovaných v klinické praxi byly porovnávány s hodnotami pro proteasu divokého typu. U jedné z rezistentních variant došlo ke snížení střední vzdálenosti chlopní, u druhé naopak k jejímu navýšení. Zásadnější je ovšem pozorovaná změna v amplitudě pohyblivosti chlopní, která byla u obou klinických izolátů znatelně nižší ve srovnání s enzymem divokého typu. Toto

pozorování může naznačovat méně standardní mechanismus tvorby resistance, kdy mimo odstraňování interakčních míst inhibitoru v aktivním místě dochází i k omezení přístupu inhibitoru, ale tím i substrátu, do aktivního místa enzymu [105]. Možné konformace chlopní byly zpřesněny v pozdější studii, ve které se autoři zaměřili na orientaci pohyblivých chlopní při vazbě tří různých inhibitorů, napodobujících tři přechodné stavy štěpného místa v průběhu hydrolýzy substrátu. Tyto výsledky pak doplnili i měřením enzymu ve stavu bez navázaného inhibitoru. Ve všech třech případech inhibovaného enzymu byla pozorována distribuce vzdáleností obsahující tři maxima, odpovídající konformacím chlopní zavřená/zavřená, zavřená/polootevřená a otevřená/otevřená. Nejobsazenějším stavem byl stav zavřená/polootevřená, v případě inhibitorů napodobujících první fáze štěpení pak byla distribuce v tomto stavu velmi úzká a ostatní stavy málo zastoupené. V případě inhibitoru napodobujícího pozdní fázi štěpení však byl průběh distribuce vzdáleností velmi podobný distribuci pro proteasu bez inhibitoru, což naznačuje možnost otevření struktury v pozdních fázích štěpení pro uvolnění produktů reakce. Struktury příslušných stavů jsou zobrazeny na obrázku 9. Distribuce vzdáleností pro enzym bez vázaného inhibitoru pak taktéž vykazovala tři maxima, celkově byla však oproti inhibovaným stavům posunuta k větším vzdálenostem chlopní, s nejobsazenější konformací polootevřená/polootevřená [106].



Obrázek 9: konformace zaujímané chlopněmi HIV proteasy. Naznačeny jsou střední vzdálenosti spinových značek v příslušné konformaci. Převzato z [106]

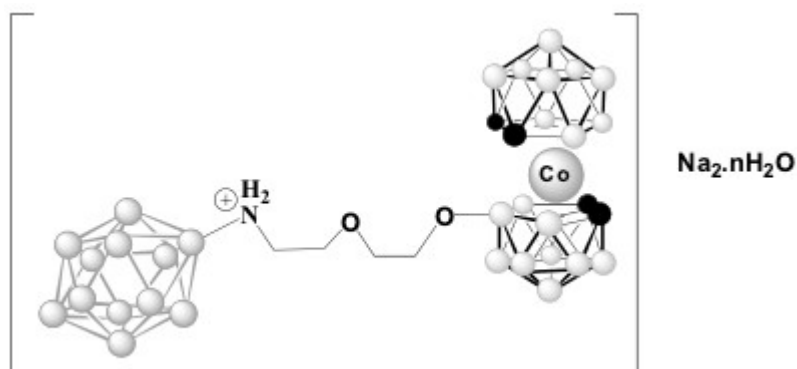
Přítomnost více maxim v distribuci vzdáleností byla následně potvrzena studií [107], ve které autoři navíc rozšířili možnosti interpretace profilu distribuce vzdáleností využitím Tikhonovovy regularizace [99] na souboru dat s lepším poměrem signál/šum. Z takto interpretovaných spekter pak bylo možno dokonce určit relativní zastoupení jednotlivých konformací chlopní ve vzorku enzymu s přesností 5%. Součástí práce bylo též zkoumání distribuce vzdáleností a zastoupení konformací chlopní pro enzym inhibovaný všemi klinicky užívanými inhibitory HIV-1 proteasy. Poměr uzavřené konformace chlopní zde velmi dobře koreloval s disociační konstantou enzym-inhibitor a výborná korelace byla také pozorována mezi zastoupením frakce s uzavřenými chlopněmi a počtem vodíkových vazeb vyskytujících se v krystalové struktuře komplexu enzym-inhibitor [107]. Metoda byla též použita pro analýzu rozdílů distribuce konformací chlopní u proteas z různých subtypů HIV-1 viru. Mezi těmito distribucemi byly pozorovány rozdíly, nikoli však zásadního charakteru [108]. Pulsní EPR spektroskopie v kombinaci se specifickým spinovým značením je tedy pro studium HIV-1 proteasy dobře optimalizovanou metodou, poskytující výsledky v dobré shodě s ostatními biofyzikálně chemickými metodami.

2.3.4. Metallakarborany jako inhibitory HIV-1 proteasy

Karborany jsou skupinou chemických sloučenin bóru, vodíku a uhlíku, patřící do skupiny polyhedrálních heteroboranů. Z hlediska využití jsou nejpodstatnější skupinou dikarba-*closo*-dodekaborany, látky sumárního vzorce $C_2B_{10}H_{12}$ a struktury ikosaedru o 20 stěnách a 12 vrcholech. Látky patřící do této skupiny našly využití jak v technických aplikacích, tak v experimentální medicíně [109-112].

Schopnost inhibovat primárně kompetitivním mechanismem proteolytickou aktivitu HIV-1 proteasy byla v nedávné době identifikována laboratoří Doc. Jana Konvalinky u derivátů kobalt bis(1,2-dikarbolliidu), látek s dikarba-*closo*-dodekaborany strukturně příbuzných. Tyto molekuly, jak je možno vidět na příkladu inhibitoru GB-110 zobrazeného na obrázku 10, ve své struktuře komplexují ion Co^{2+} mezi dvě karboranové klece, u kterých tak kovový ion nahrazuje jeden z vrcholů ikosaedru [113]. Vzniklá struktura, tvarově podobná burskému oříšku, je stálá, chemicky dobře modifikovatelná, synteticky dostupná a dostatečně hydrofobní a nukleofilní. To z ní dělá ideálního kandidáta na vedoucí sloučeninu pro racionální návrh inhibitorů. Při opracovávání základního skeletu chemickými modifikacemi, které vedlo ke snížení IC_{50} až k řádu desítek

nanomolární [30,114] bylo též vytvořeno několik sloučenin, u kterých se potvrdil mechanismus inhibice jiný než kompetitivní. Byly syntetizovány jak látky s mechanismem nekompetitivním, smíšeným tak inhibitory akompetitivní [115].



Obrázek 10: Chemická struktura akompetitivního metallakarboranového inhibitoru GB-110. Obrázek získán od Milana Kožíška (UOCHB). U metallakarboranových klecí byly atomy uhlíku zvýrazněny černou barvou, atomy bóru pak barvou bílou.

Vzhledem k stále se vyvíjející resistenci vůči klinicky užívaným inhibitorům HIV-1 proteasy, které ve všech případech interagují s enzymem v jeho aktivní dutině mechanismem kompetitivní inhibice, existuje stálá potřeba produkce inhibitorů nových, schopných inhibovat resistantní varianty HIV-1 proteasy. Tato nová skupina skupina inhibitorů se zcela odlišným mechanismem účinku a navíc i zcela odlišné chemické povahy je teoreticky vhodným kandidátem pro takové nasazení. Pro další optimalizaci těchto inhibitorů je však třeba najít biofyzikálně chemické metody pro popis strukturní a biofyzikální povahy interakce mezi nimi a enzymem. Většina z výše uvedených metod biofyzikálního zkoumání, používaných pro studium HIV-1 proteasy je pro tento úkol využitelná.

3. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce je vyvinout a připravit nástroje pro biofyzikální charakterizaci komplexu HIV-1 proteasy s jejím akompetitivním metallakboranovým inhibitorem GB-110 metodami elektronové paramagnetické resonance. Konkrétně, metodou proteinového inženýrství připravit sérii mutantů enzymu s unikátním cysteinovým zbytkem, plně je enzymaticky charakterizovat a nejvhodnější z nich modifikovat spinovou značkou.

4. Experimentální část

4.1. Přístroje a materiál

4.1.1 Použité chemikálie

▪ agarosa	Invitrogen (Carlsbad, USA)
▪ akrylamid	USB (Cleveland, USA)
▪ ampicilin	Biotika (Lupča, Slovensko)
▪ azid sodný	Penta (Praha, ČR)
▪ bromfenolová modř	Serva (Heidelberg, Německo)
▪ Casein Blocker v TBS	Thermo Scientific (Waltham, USA)
▪ Coomassie Brilliant Blue G250	Serva (Heidelberg, Německo)
▪ deoxycholát sodný (DOC)	Fluka (Buchs, Švýcarsko)
▪ dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema (Brno, ČR)
▪ dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ dusičnan stříbrný	Lachema (Brno, ČR)
▪ ethanol	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
▪ ethanol pro UV spektroskopii	Penta (Praha, ČR)
▪ fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ formaldehyd	Lachema (Brno, ČR)
▪ GelRed	Biotium (Hayward, USA)
▪ glycerol	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
▪ glycin	USB (Cleveland, USA)
▪ hydrogenfosforečnan sodný	Lachema (Brno, ČR)
▪ hydroxid sodný	Lachema (Brno, ČR)
▪ chlorid draselný	Lachema (Brno, ČR)
▪ chlorid sodný	Lachema (Brno, ČR)
▪ chromogenní substrát HIV-1 proteasy KARV KARVNle*NphEANle-NH ₂	UOCHB (Praha, ČR)

▪ inhibitor HIV-1 proteasy rKARV KARVNle[CH ₂ -NH]NphEANle-NH ₂	UOCHB (Praha, ČR)
▪ isopropanol	Lachema (Brno, ČR)
▪ isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biosynth AG (Staad, Švýcarsko)
▪ kanamycinsulfát	Fluka (Buchs, Švýcarsko)
▪ kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ kyselina chlorovodíková	Lachema (Brno, ČR)
▪ kyselina 2-[N-morfolin]ethansulfonová (MES)	USB (Cleveland, USA)
▪ kyselina octová	Lachema (Brno, ČR)
▪ 2-merkaptoethanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ methanol	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
▪ n-dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ N,N'-methylenbisakrylamid	USB (Cleveland, USA)
▪ N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ octan sodný	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
▪ peroxodisíran amonný	Serva (Heidelberg, Německo)
▪ S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol -3-yl)methyl methanesulfonothioate (MTSL)	Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
▪ sacharosa	Sigma Aldrich (St-Louis, USA)
▪ síran amonný	Lachema (Brno, ČR)
▪ (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO)	Sigma Aldrich (St.Louis, USA)
▪ thiosíran sodný(pentahydrát)	Penta (Praha, ČR)
▪ tris(hydroxymethyl)aminoethan (TRIS)	USB (Cleveland, USA)
▪ Triton X 100	Serva (Heidelberg, Německo)
▪ uhličitán sodný	Lachema (Brno, ČR)

4.1.2 Laboratorní přístroje

▪ teplotní cyklér	T-Gradient Thermocycler, Biometra (Německo)
▪ transiluminátor	Dualwave Transilluminator, Ultra-Lūm (USA)
▪ laboratorní váhy	HL-400, A&D Engineering, Inc. (USA) EK-400H, A&D Engineering, Inc. (USA)

- centrifugy Centrifuge 5415R, Eppendorf (Německo)
Biofuge pico, Heraeus (Německo)
Evolution RC, Sorvall (USA)
Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments (SRN)
Megafuge 2,0 R, Heraeus Instruments (SRN)
- rotační inkubátor Gallenkamp (UK)
- sonikátor Soniprep 150, MSE (USA)
- autokláv MLS-3020U, Sanyo (Japonsko)
- pH metr Unicam 9450, Unicam (USA)
- UV-VIS spektrofotometry Unicam UV 500, Unicam (USA)
Nanodrop 1000, Thermo Scientific (USA)
SPECORD 210, Analytik Jena (Německo)
- aparatura pro vertikální elektroforesu Amersham Pharmacia Biotech (Švédsko)
- aparatura pro horizontální elektroforesu B1A, Owl Separation Systems (USA)
- aparatura pro elektropřenos Trans-Blot SD, Bio-Rad (USA)
- CCD kamera LAS-3000 CCD, Fujifilm (Japonsko)
- fotoaparát SP-5000UZ, Olympus (Japonsko)
- FPLC chromatograf ÄKTA explorer, Amersham Pharmacia Biotech (Švédsko)
- termostaty TE-10D, Techne (UK)
Mixing block MB-102, Bioer (Čína)
TCH 100, Laboratorní přístroje Praha (CZ)
- vakuová odsávačka Vac-Man Laboratory vacuum minifold, Promega (USA)
- EPR spektrometr EMX^{plus} -10/12 CW, Bruker (Německo)
- mikrovlnný můstek Premium X -band microwave bridge, Bruker (Německo)
- dvojitá pravoúhlá dutina ER410500DR, Bruker (Německo)

4.1.3 Ostatní použitý materiál

- marker molekulových hmotností AllBlue marker, BioRad (USA)
- marker pro DNA elektroforesu DNA marker 200-1600, Ascoprot Biotech (ČR)
50 bp DNA ladder, Qiagen (USA)
- kit pro stanovení proteinů Bio-Rad protein Assay Kit, Biorad (USA)
- premix pro PCR reakci PPP Master Mix, TopBio (ČR)
- kit pro izolaci DNA fragmentu QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen (USA)

- kit pro minipreparaci DNA Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo (USA)
- luminescenční substrát SuperSignal West Dura, Pierce (USA)
- kolona pro FPLC MonoS 10/100 GL, Amersham Pharmacia Biotech (Švédsko)
- dialyzační membrána Spectrapor, Spectrum Laboratories (USA)
- zahušťovací kolonky Amicon Ultra 4, Milipore (USA)
Amicon Ultra 15, Milipore (USA)
Amicon Ultra 2, Milipore (USA)
- odsolovací kolona PD-10 desalting column, GE Healthcare (USA)
- filtrační kolonka Millex-GS 0,22 µm, Milipore (USA)
- kapiláry pro EPR spektroskopii Blaubrand micropipettes (Německo)

4.1.4 Bakteriální kmeny, vektory, enzymy a média

- bakteriální kmeny *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL, Novagen (USA)
Escherichia coli TOP10, Invitrogen (USA)
- živné médium LB Broth, Sigma Aldrich (USA)
- agar LB Agar, Sigma Aldrich (USA)
- expresní vektory pET11c, Novagen (USA)
pET24a, Novagen (USA)
- restriční endonukleasy *NdeI*, New England Biolabs (USA)
ApaI, New England Biolabs (USA)
EcoRI, New England Biolabs (USA)
DpnI, New England Biolabs (USA)
- DNA ligasa T4 DNA ligase, New England Biolabs (USA)
- DNA polymerasa *Pfu* DNA polymerase, Promega (USA)
- kozí anti-myší-IgG protilátka Pierce (USA)
konjugovaná křenovou peroxidasou

4.2. Metody

4.2.1 Příprava expresních vektorů

4.2.1.1 Cílená mutagenese polymerasovou řetězovou reakcí

Cílená mutagenese byla prováděna dle protokolu "Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit" [116]. Jako prvotní templátová DNA sloužil expresní konstrukt ve vektoru pET11c kódující gen pro HIV-1 proteasu divokého typu inaktivovanou mutací D25N, získaný z laboratoře Doc. Jana Konvalinky na ÚOCHB. Pro PCR reakce byla

navržena série dvojic oligonukleotidových primerů pro zavedení požadovaných mutací do nukleotidové sekvence kódující DNA shrnutá v tabulce 1. Oligonukleotidové primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR)

Tabulka 1: nukleotidové sekvence primerů pro cílenou mutagenezi

Mutace	Označení primeru	Nukleotidová sekvence (5' → 3')
C67A	O67-UP	TCATAGAAATCGCTGGACATAAAGC
	O67-DWN	GCTTTATGTCCAGCGATTTCTATGA
C95A	O95-UP	GACTCAGATTGGTGCCACTTTAAATTTT
	O95-DWN	AAAATTTAAAGTGGCACCAATCTGAGTC
K55C	O55-UP	GGAGGTTTTATCTGCGTAAGACAGTATG
	O55-DWN	CATACTGTCTTACGCAGATAAAAACCTCC
R41C	R41C-UP	GAGTTTGCCAGGATGTTGGAAACCAAAAATG
	R41C-DWN	CATTTTGGTTTCCAACATCCTGGCAAACCTC
N25D	N25D-UP	GAAGTCCTATTAGATACAGGAGCAGATG
	N25D-DWN	CATCTGCTCCTGTATCTAATAGAGCTTC

Typická PCR reakce byla prováděna v reakčním objemu 50 μ l, s následujícími množstvími reakčních složek. 25 μ l HPLC H₂O; 1 μ l templátová DNA (100 ng/ μ l); 1 μ l *sense* primer (10 μ M); 1 μ l *antisense* primer (10 μ M); 25 μ l PPP master mix; 0,5 μ l *Pfu* DNA polymerasa (3U/ μ l).

Reakce probíhala v teplotním cyklu při nastavení teplotních cyklů:

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| 1. počáteční denaturace templátu | 95 °C/30 s |
| 2. denaturace | 95 °C/30 s |
| 3. nasedání primerů | 55 °C/60 s |
| 4. polymerázová reakce | 68 °C/5 min |
| 5. Koncová polymerace | 68 °C/8 min |

Kroky 2 až 4 byly opakovány v 18 cyklech. Po dokončení mutagenační polymerasové řetězové reakce byl do reakční směsi přidán 1 μ l restriční endonukleasy *DpnI* (20U) pro odstranění templátové nemutované DNA a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C.

4.2.1.2 Transformace kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP10

Ke 40 μ l vysoce kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP10 bylo přidáno přibližně 100 ng expresního vektoru nesoucího požadovaný gen. Buňky byly ponechány po 20

minut na ledu, následoval tepelný šok (42 °C, 90 s) ve vodní lázni. Kultura byla následně přenesena zpět na led, kde byla ponechána po dobu 2 min. Dále bylo přidáno 400 µl sterilního LB média a kultura byla inkubována po dobu 1 hodiny při 37 °C. Po inkubaci byla kultura nanášena na agarovou plotnu s přidáním antibiotikem odpovídajícím resistenci kódované expresním vektorem, umístěna do termostatu a zde při 37 °C inkubována přes noc.

4.2.1.3 Minipreparace plasmidové DNA

Bakteriální kolonie z agarové plotny byly vypíchnuty za použití sterilní špičky pro pipetu a přeneseny do 15 ml sterilního LB média s přidáním antibiotikem dle resistance kódované expresním vektorem. Inokulovaná kultura byla ponechána přes noc v rotačním inkubátoru (220 ot/min, 37 °C). Druhý den byla kultura centrifugována (3350×g, 10 min, 4°C), supernatant byl odlit a buněčná peleta následně rozsuspendována v 600 µl destilované vody a přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky.

Preparace plasmidové DNA byla prováděna dle protokolu pro "Zyppy Plasmid Miniprep Kit" [117]. K peletě bakteriálních buněk rozsuspendované v 600 µl destilované vody bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru. Vzorek byl lehce promíchán několikanásobným převrácením mikrozkušavky. Následovalo přidání 350 µl neutralizačního pufru obsahujícího RNAsu, další promíchání směsi a ponechání při pokojové teplotě až do kompletní změny barvy v pufru přítomného pH indikátoru (přibližně 2 min). Poté byl vzorek centrifugován (16100 g, 10 min, RT), odebraný supernatant přenesen do Zymo-Spin cetrifugační kolonky a centrifugován (16100 g, 1 min, RT). Následovalo promytí 200 µl Endo-Wash pufru, centrifugace (16100 g, 1 min, RT), promytí 400 µl Zyppy-Wash pufru a další centrifugace (16100 g, 1 min, RT). Poté byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky, bylo nanášeno 50 µl sterilní HPLC vody, kolonka byla ponechána 3 min při pokojové teplotě a poté cetrifugována (16100 g, 30 s, RT). Získaný vzorek DNA byl pro další použití uchován zamrazením na -20 °C.

Získaná DNA byla charakterizována kontrolním restričním štěpením (4.2.1.4) popřípadě sekvenací.

4.2.1.4 Kontrolní štěpení restrikčními endonukleasami

Vzorky DNA obsahující požadovanou kódující sekvenci byly vybrány pomocí kontrolního štěpení restrikčními endonukleasami. Kontrolní restrikční reakce byly prováděny v objemu 50 μ l s množstvím vzorku DNA přibližně 1 μ g. Restrikční enzymy byly vybrány na základě restrikčních míst nacházejících se ve sledovaném úseku DNA. Podmínky reakce se pak řídily doporučením výrobce příslušných enzymů. Po restrikčním štěpení byla výsledná směs DNA fragmentů analyzována horizontální agarosovou elektroforesou, vzorky vykazující požadovaný restrikční vzor pak byly dále odeslány k sekvenaci do servisní laboratoře DNA sekvenace na Přírodovědecké fakultě University Karlovy.

4.2.1.5 Horizontální agarosová elektroforesa

Pufry:

50 \times TAE pufry: 2 M Tris; 1 M kyselina octová; 0,05 M EDTA; pH = 8,0

vzorkový pufry: 40% sacharosa; 0,1 bromfenolová modř; 0,02% NaN₃

Pro přípravu 1,3% agarosového gelu bylo 0,65 g agarosy rozpuštěno v 50 ml 1x TAE pufry zahříváním v mikrovlnné troubě. Po částečném zchladnutí roztoku bylo přidáno 5 μ l barviva pro zviditelnění DNA GelRed a roztok byl nalit do aparatury pro horizontální agarosovou elektroforesu. Po utuhnutí byl gel převrstven 1x TAE pufrem a do připravených jamek byly nanášeny vzorky DNA promíchané v poměru 5:1 se vzorkovým pufrem. Elektroforetické dělení probíhalo za konstantního proudu 120 V po dobu 30 minut.

Pro srovnání velikostí pozorovaných fragmentů byl použit standard připravený štěpením DNA fága λ endonukleasou *BstEII*, popřípadě komerčně dodávané standardy vhodné velikosti. Fragmenty DNA byly zviditelněny pomocí UV transiluminátoru.

4.2.1.6 Amplifikace DNA oblasti kódující HIV-1 proteasu

Pro amplifikaci požadovaného úseku DNA a současně zavedení vhodných restrikčních míst byla použita polymerasová řetězová reakce (PCR). Pro reakci byly navrženy oligonukleotidové primery rozpoznávající templátovou DNA a také kódující cílové sekvence požadovaných endonukleas. Nukleotidové sekvence primerů jsou shrnuty v tabulce 2, vlastní syntéza oligonukleotidů pak byla provedena společností Generi Biotech.

Tabulka 2: nukleotidové sekvence primerů pro amplifikaci genu kódujícího HIV-1 proteasu

Označení primeru	Nukleotidová sekvence (5' → 3')	Restrikční místo
Apa1-UP	CAACCATATGCCTCAGATCACTCTTTGG	NdeI
2Apa1-DWN	GCTCTAGGGCCCCCAAATTTAAAGTGGC	ApaI
2Apa2-UP	GCGGAATGGGCCCTCAGATCACTCTTTGG	ApaI
2Apa2-DWN	GCCCCTTCGTCTTCAAGAATTCAC	EcoRI
ApaC-UP	GAATATAGGGCCCTCAGATCACTCTTT	ApaI
ApaC-DWN	ATTATATGGGCCCGAACCACAAAATTTAAAGTGGC	ApaI

Typická PCR reakce byla prováděna v reakčním objemu 50 μ l, s následujícími množstvími reakčních složek. 25 μ l HPLC H₂O; 1 μ l templátová DNA (100 ng/ μ l); 1 μ l *sense* primer (20 μ M); 1 μ l *antisense* primer (20 μ M); 25 μ l PPP master mix; 0,5 μ l *Pfu* DNA polymerasa (3U/ μ l). Reakce probíhala v teplotním cyklu podle schematu

1. počáteční denaturace templátu	95 °C/5 min
2. denaturace	95 °C/30 s
3. nasedání primerů	54 °C/30 s
4. polymerázová reakce	72 °C/1 min
5. Koncová polymerace	72 °C/8 min

Kroky 2 až 4 byly zopakovány v 31 cyklech. Po dokončení PCR reakce byla směs rozdělena horizontální agarosovou elektroforesou v 1,2% agarosovém gelu (4.2.1.5) a produkty PCR reakce byly z gelu izolovány (4.2.1.7).

4.2.1.7 Izolace DNA fragmentu z agarosového gelu

Izolace fragmentů z agarosového gelu probíhala dle protokolu pro "QIAQuick Gel Extraction Kit" [118]. Požadovaný DNA fragment byl za zviditelnění transiluminátorem vyříznut z gelu skalpelem a přenesen do 1,5 ml mikrozkuřavky. Ke vzorku gelu byl přidán trojnásobný objem QG pufru a směs byla třepána v termobloku (1500 ot/min, 5 min, 56 °C) pro rozpuštění agarosového gelu. Následně bylo ke vzorku přidáno 200 μ l isopropanolu, vzorek byl promíchán, nanesen na QIA kolonku a centrifugován (13000 g, 1 min, RT). Poté byla kolonka promyta 750 μ l PE pufru obsahujícího ethanol a dvakrát centrifugována (13000 g, 1 min, RT). Následovalo nanesení 50 μ l HPLC vody, ekvilibrace po dobu 5 min a eluce přečištěné DNA centrifugací (13000 g, 1 min, RT).

4.2.1.8 Ligace

DNA byla před ligací naštěpena příslušnými restričními endonukleasami odpovídajícími danému fragmentu a požadované aplikaci. Štěpení probíhalo podle protokolu výrobce pro vybranou endonukleasu, objem reakční směsi byl 50 µl, doba štěpení 4 hod. Po štěpení byly DNA fragmenty přečištěny pomocí QIAQuick Gel Extraction Kitu (4.2.1.7) s vynecháním kroku rozpouštění gelu.

Fragmenty DNA upravené restričním štěpením byly ligovány do endonukleasami *NdeI* a *EcoRI* předem štěpeného a defosforylovaného vektoru pET24a. Koncentrace vektoru i rozštěpených fragmentů byla určena z absorbance při 260 nm. Celkové množství DNA v ligační reakci bylo 30 ng v případě ligace jednoho fragmentu do vektoru, v případě současné ligace dvou fragmentů do vektoru (pro tvorbu kovalentně spojených dimerů) pak 100 ng. Molární poměr mezi fragmentem a vektorem byl optimalizován na 5:1 pro jeden fragment popřípadě 6:6:1 pro fragmenty dva. Ligace probíhala přes noc při 16 °C v celkovém objemu 10 µl v prostředí pufru pro T4 DNA ligasu. Množství T4 DNA ligasy v ligační reakci bylo 200 U. Výsledek ligace byl analyzován kontrolním restričním štěpením (4.2.1.4) endonukleasami *NdeI* a *EcoRI*. Ligační směs byla transformována do kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli* TOP 10 (4.2.1.2), výsledná plasmidová DNA byla izolována minipreparací (4.2.1.3) a její sekvence potvrzena sekvenováním DNA v servisní laboratoři UK.

4.2.2 Exprese a izolace proteinu

HIV-1 proteasy ve formě kovalentně spojených dimerů byly produkovány v bakteriálním expresním systému z připravených expresních vektorů pET24a, nesoucích DNA kódující příslušné proteiny.

4.2.2.1 Transformace *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL plasmidovou DNA

Ke 150 µl kompetentních buněk kmene *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL byly přidány 3 µl expresního vektoru pET24a s vloženým genem kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy. Směs byla ponechána 20 minut na ledu, poté byly bakterie vystaveny tepelnému šoku (42 °C / 90s) a znovu uloženy na led na dobu 2 minut. Následovalo přidání 800 µl sterilního LB média a kultura byla inkubována po dobu 1 h při 37 °C. Po inkubaci byla kultura nenesena na tři agarové plotny obsahující kanamycin a inkubována přes noc při 37 °C.

4.2.2.2 Exprese proteinů v *Escherichia coli*

Kolonie narostlé na plotnách byly smyty a rozsuspendovány v 9 ml sterilního LB média. 6 ml této kultury bylo inokulováno do 3 l sterilního LB média obsahujícího kanamycin (40 μ g/ml) a ponecháno růst v rotačním inkubátoru při 220 ot/min a 37 °C. Průběžně byla sledována optická hustota kultury při vlnové délce procházejícího světla 595 nm. Při dosažení hodnoty OD₅₉₅ = 0,8 byla indukována produkce rekombinantního proteinu přidáním IPTG na výslednou koncentraci 0,75 mM. Tři hodiny po indukci exprese byla bakteriální kultura přesunuta do chladové místnosti a zde při teplotě 4°C ponechána přes noc.

Následující den byla kultura centrifugována (6000 g, 10 min, 4°C) zvážena a pro další zpracování uchována při -80 °C v mrazícím boxu.

4.2.2.3 Izolace inkluzních tělísek

Pufry:

pufř A: 50 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH=8,0

pufř SA: 50 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; pH=8,0

pufř TA: 50 mM Tris-HCl; 1 % Triton X100; 1 mM EDTA; pH=8,0

Bakteriální buňka produkuje HIV-1 proteasu i její kovalentně spojený dimer jako nerozpustná inkluzní tělíška proteinu v denaturované podobě. Ta byla izolována následujícím způsobem. Peleta bakteriálních buněk byla rozsuspendována ve 150 ml pufřu A, do kterého bylo přidáno 0,05 mg inhibitoru serinových proteas PMSF na 1 g hmotnosti vlhké biomasy. Suspenze byla poté pro mechanické rozrušení buněčných stěn ve třech opakováních zamrazena na -80 °C s následným rozmrazením ve vodní lázni při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 0,5 ml 1 % (w/v) deoxycholátu sodného na 1 g hmotnosti vlhké biomasy a směs byla míchána po 30 minut za pokojové teploty. Výsledný roztok byl poté na ledu s přestávkami po dobu 10 minut sonikován. Peleta inkluzních tělísek byla oddělena centrifugací (16000 g, 10 min, 4 °C) od supernatantu a znovu rozsuspendována ve 200 ml pufřu SA. Následovala opět sonikace a centrifugace stejným postupem jako v předchozím případě. Rozsuspendování, sonikace a centrifugace byly poté opakovány ještě jedenkrát ve 200 ml pufřu SA, dvakrát ve 200 ml pufřu TA a nakonec ve 100 ml pufřu A.

Oddělená peleta inkluzních tělísek byla po promývání pro další použití uchována při -20 °C v mrazícím boxu. Průběh izolační procedury byl sledován pomocí SDS elektroforesy.

4.2.2.4 Renaturace kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy

Pufry:

dialyzační pufry: 50 mM MES; 1 mM EDTA; 10% glycerol; 0,05% 2-merkптоethanol;
pH=5,8

Peleta přečištěných inkluzních tělísek, obsahujících nesbalený, kovalentně spojený dimer HIV-1 proteasy, byla rozsuspendována ve 3 ml destilované vody, následně byla přidána koncentrovaná kyselina octová do finální koncentrace 67% (v/v). Směs byla míchána do úplného rozpuštění inkluzních tělísek, nerozpustné zbytky byly odstraněny centrifugací (3400 g, 10 min, 4 °C). Protein byl renaturován postupným naředěním do 24-násobného množství destilované vody za stálého míchání. Roztok byl následně míchán po dobu 30 minut v chladové místnosti při 4 °C a cetrifugován (20000 g, 10 min, 4 °C) pro odstranění vyprecipitovaných nečistot. Poté byl roztok proteinu dialyzován přes dialyzační membránu s propustností 6-8 kDa po dobu 2 hodin při 4 °C proti 5 l destilované vody a následně při stejné teplotě přes noc, proti 8 l dialyzačního pufru. Dialyzát byl ráno následujícího dne cetrifugován (20000 g, 20 min, 4 °C) pro odstranění precipitujících nečistot a zbytků nerenaturovaného proteinu. Supernatant obsahující sbalený kovalentně spojený dimer HIV-1 proteasy byl filtrován přes filtry s velikostí pórů 22 µm a dále čištěn pomocí iontově výměnné chromatografie.

4.2.2.5 Iontově výměnná chromatografie na katexové koloně

Pufry:

pufry A: 50 mM MES; 1 mM EDTA; 10% glycerol; 0,05% 2-merkптоethanol; pH=5,8

pufry B: 50 mM MES; 1 mM EDTA; 10% glycerol; 0,05% 2-merkптоethanol; 2 M NaCl;
pH=6,7

Vzorkek proteinu byl čištěn chromatograficky na katexové koloně MonoS 10/100 GL pomocí iontově výměnné FPLC chromatografie. K eluci proteinu bylo použito lineárního gradientu iontové síly a pH, jež byl prováděn postupným navyšováním koncentrace pufru B z 0% na 80% v časovém úseku 100 minut při průtoku 0,7 ml/min. Průběh chromatografického čištění byl monitorován sledováním absorpance eluátu při 280 nm.

Frakce byly jímány manuálně podle sledovaného elučního profilu. Čistota jednotlivých frakcí byla analyzována pomocí SDS elektroforesy, byla též stanovena aktivita enzymu (4.2.4.1) a koncentrace proteinu (4.2.3.1) v každé frakci. Frakce obsahující čistý a aktivní enzym byly pro další zpracování uchovány zmrazením na -20 °C.

4.2.3 Analýza proteinu

4.2.3.1 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Koncentrace proteinu byla stanovena podle Bradfordové [119], za použití kitu „5×Bio-Rad protein Assay Kit“ (Bio-Rad), založeného na měření absorpce komplexu proteinu s Coomasie Brilliant Blue G250 při 595 nm. Ke kalibraci byla použita koncentrační řada standardů BSA.

4.2.3.2 Elektroforesa v denaturujícím polyakrylamidovém gelu

Pufry:

vzorkový pufr (6x): 350 mM Tris-HCl; pH = 6,8; 30% glycerol; 6% 2-merkaptoethanol; 10% SDS; 0,012% bromfenolová modř

elektrodový pufr: 25 mM Tris-HCl; 250 mM glycin; 0,1% (w/v) SDS

zaostřovací gel (5%): 375 mM Tris-HCl; pH = 6,8; 4,86% akrylamid; 5% glycerol; 1,4 mM EDTA; 0,1% SDS; 0,14% N,N'-metylen-bis(akrylamid); 0,2% TEMED; 0,2% peroxodisíran amonný

separační gel (18%): 375 mM Tris-HCl; pH = 8,8; 17,5% akrylamid; 5% glycerol; 1,4 mM EDTA; 0,1% SDS; 0,5% N,N'-metylen-bis(akrylamid); 0,1% TEMED; 0,09% peroxodisíran amonný

Analýza proteinového složení vzorků v průběhu exprese, izolace inkluzních tělísek a chromatografického čištění proteinu byla provedena pomocí diskontinuální vertikální polyakrylamidové elektroforesy v denaturujícím prostředí dodecysulfátu sodného.

Před vlastní analýzou byly proteinové vzorky smíchány s vzorkovým pufrém v poměru 5:1 a po dobu 5 minut denaturovány varem na vodní lázni. Elektroforetická separace probíhala na vertikální aparatuře za konstantního napětí 140V po dobu 1h 45 min. Separované proteiny byly následně obarveny stříbrem, popřípadě přeneseny elektropřenosem na nitrocelulosovou membránu.

4.2.3.3 Barvení polyakrylamidového gelu stříbrem

Proteiny separované pomocí SDS elektroforesy (4.2.3.2) byly následně zviditelněny pomocí barvení polyakrylamidového gelu stříbrem.

Roztoky:

<u>1. fixace:</u>	12% kyselina octová; 50% methanol; 0,02% formaldehyd	30 min
<u>2. promytí:</u>	50% methanol	3 × 15 min
<u>3. exponace:</u>	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 min
<u>4. promytí:</u>	destilovaná voda	3 × 20 s
<u>5. impregnace:</u>	0,2% AgNO ₃ ; 0,02% formaldehyd	20 min
<u>6. promytí:</u>	destilovaná voda	3 × 20 s
<u>7. vyvolání:</u>	566 mM Na ₂ CO ₃ ; 16 μM Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O; 0,02% formaldehyd	10 s až 5 min
<u>8. promytí:</u>	destilovaná voda	3 × 20 s
<u>9. zastavení:</u>	12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) formaldehyd	10 min
<u>10. uchování:</u>	50% (v/v) methanol	

4.2.3.4 Elektropřenos proteinů na nitroceluloseovou membránu

Pufry:

přenosový pufr: 192 mM glycin; 25 mM Tris-HCl; 10% methanol; 0,1% SDS;
(pH neupravováno)

PBS pufr: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH = 7,4

Po ukončení elektroforetické separace byl gel spolu s nitroceluloseovou membránou po dobu 2 minut ekvilibrován v přenosovém pufru. Následně byly spolu s předvlhčenými filtračními papíry umístěny v pořadí filtrační papír, nitroceluloseová membrána, polyakrylamidový gel, filtrační papír na anodu přenosového zařízení. Přenos byl poté prováděn za konstantního napětí 13 V po dobu 25 min.

Po přenosu byla membrána opláchnuta v PBS pufru s 0,05% Tween-20 a po dobu 1 hodiny při 4 °C inkubována v 5 ml Casein Blockeru pro zabránění nespecifické vazbě protilátky. Zviditelnění kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy bylo provedeno myší monoklonální protilátkou IgG F11.1.3.11 (7 mg/ml), rozpoznávající epítopy v chlopni HIV-1 proteasy. Ta byla zředěna 2500x v roztoku Casein Blockeru a v takto připraveném

roztoku byla membrána inkubována po dobu 2 hodin při 4 °C. Protilátka byla získána od Ing. Ireny Siegllové z laboratoře Dr. Pavlína Řezáčové. Následně byla membrána promyta třikrát po dobu 5 min roztokem PBS pufru s 0,05% Tween-20 a po přenesení do roztoku Casein Blockeru byla přidána sekundární kozí anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (32 ng/ml v Casein Blockeru, 1 hod, 4 °C). Následovalo další trojnásobné promytí roztokem PBS pufru s 0,05% Tween-20 a 5 minutová inkubace ve směsi stabilizovaného peroxidu vodíku s roztokem Luminol/Enhancer v poměru 1:1. Membrána byla poté vysušena mezi dvěma filtračními papíry a chemiluminescenční signál byl měřen pomocí CCD kamery.

4.2.4 Kinetická měření

Veškerá popisovaná kinetická měření byla prováděna pomocí standardní spektrofotometrické metody pro stanovení aktivity HIV-1 proteasy využívající chromogenní substrát KARVNle*NphEANle-NH₂ odvozený od štěpného místa CA-p2 v přirozeném substrátu Gag-Pol [120]. Průběh proteolytické reakce byl monitorován pomocí úměrného poklesu absorpce substrátu při 305 nm. Měření byla prováděna v 1 ml reakční směsi. Měřicí cela použitého UV/VIS spektrofotometru Unicam UV 500 byla temperována pomocí vodní lázně s vnějším oběhem na 37 °C, optická délka použitých křemenných kyvet pak byla 1 cm. Při všech měřeních bylo použito prostředí pufru obsahujícího 0,1 M octan sodný (pH = 4,7); 4 mM EDTA a 0,3 M NaCl .

4.2.4.1 Stanovení kinetických parametrů enzymu

Pufry:

acetátový pufr: 0,1 M octan sodný; 0,3 M NaCl; 4 mM EDTA; pH = 4,7

Pro připravené enzymy byly stanoveny Michaelisova konstanta a katalytická efektivita enzymu. Michaelisova konstanta byla stanovena měřením počátečních rychlostí proteolytické reakce při konstantní koncentraci enzymu a proměnlivé koncentraci substrátu. Naměřená data byla analyzována pomocí programu Grafit 5.0.4 za použití nelineárního fitu do rovnice Michaelise a Mentenové [121]

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

kde v_0 je počáteční rychlost reakce, V_{max} limitní rychlost reakce při nekonečné koncentraci substrátu, $[S]$ koncentrace enzymu a K_m Michaelisova konstanta. Po získání výše zmíněných parametrů z nelineárního fitu je pak možno spočítat katalytickou efektivitu enzymu pomocí vztahu

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{\varepsilon E_0}$$

kde k_{cat} je katalytická efektivita enzymu, ε molární absorpční koeficient substrátu, stanovený ze změny absorbance provázející totální rozštěp definovaného množství substrátu a E_0 pak celková koncentrace aktivního místa enzymu v reakci. Ta byla stanovena titrací enzymu pevně se vázajícím inhibitorem brecanavirem [122].

4.2.4.2 Stanovení IC_{50} inhibitoru

Pufry:

acetátový pufr: 0,1 M octan sodný; 0,3 M NaCl; pH = 4,7

Koncentrace inhibitoru nutná pro dosažení padesátiprocentní inhibice enzymové reakce (IC_{50}) byla stanovena měřením počátečních rychlostí proteolytické reakce za proměnné koncentrace inhibitoru při fixní koncentraci enzymu a substrátu (koncentrace odpovídající K_m). Do grafu byla vynesena závislost počáteční rychlosti reakce v procentech rychlosti reakce neinhibované oproti koncentraci enzymu. Data byla analyzována pomocí programu Grafit 5.0.4 za použití nelineárního fitu [123].

4.2.4.3 Určení mechanismu inhibice

Pufry:

acetátový pufr: 0,1 M octan sodný; 0,3 M NaCl; pH = 4,7

Mechanismus účinku inhibitorů HIV-1 proteasy byl stanoven pomocí dvojnásobně reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka. Byly naměřeny hodnoty počáteční rychlosti enzymové reakce při konstantní koncentraci enzymu v závislosti na koncentraci substrátu. Tato měření byla provedena při několika různých koncentracích inhibitoru a následně byly vyneseny závislosti převrácené hodnoty počáteční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace substrátu pro různé koncentrace inhibitoru. Mechanismus inhibice byl poté určen z pozice průsečíku vynesných křivek.

4.2.5 Spinové značení a EPR spektroskopie

Jeden z připravených kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy byl specificky označen spinovou značkou na unikátním cysteinu zavedeném technikami molekulární biologie.

4.2.5.1 Specifické spinové značení

Pufry:

pufř A: 10 mM Tris-HCl; pH = 6,9

pufř B: 2 mM octan sodný; pH = 5,0

Vzorek proteinu byl po rozmražení zahuštěn pomocí centrifugační zahušťovací kolonky na koncentraci přibližně 200 µg/ml. Vorek byl předvázáán trojnásobným molárním nadbytkem inhibitoru rKARV a 2,5 ml vzorku bylo převedeno pomocí odsolovací kolonky do pufřu A. Následně byl vzorek proteinu rozdělen na dva shodné alikvoty. K jednomu z alikvotů byl přidán roztok spinové značky MTSL v ethanolu v množství odpovídajícím 50-násobnému molárnímu nadbytku oproti koncentraci proteinu. K druhému alikvotu, sloužícímu jako kontrola, bylo přidáno pouze odpovídající množství ethanolu. Reakce spinového značení probíhala po dobu 2 hodin za temna při 4 °C. Následně byl vzorek převeden odsolovací kolonkou do pufřu B, zahuštěn na objem 2,5 ml a znovu odsolen odsolovací kolonkou pro odstranění nezreagované značky. K výslednému roztoku spinově značeného proteinu byl znovu přidán trojnásobný molární nadbytek inhibitoru rKARV, byl zahuštěn pomocí centrifugační zahušťovací kolonky na koncentraci přibližně 400 µg/ml a pro další použití uchován zamrazením na -80 °C. Úspěšnost spinového značení byla sledována hmotnostní spektrometrií a spektroskopií EPR.

4.2.5.2 Spektroskopie EPR

Veškerá EPR měření byla prováděna na spektrometru EMX^{plus} -10/12 CW (Bruker) pracujícím v režimu fixní frekvence, vybaveném mikrovlnným můstkem pro frekvenční pásmo X-band. Vzorky spinově značeného proteinu byly zbaveny přítomnosti paramagnetického vzdušného kyslíku nasycením plynným dusíkem a nanесeny do 50 µl měřící kapiláry. Kapilára byla umístěna do dvojité pravouhlé dutiny optimalizované pro měření více vzorků při stejné geometrii měřící cely. EPR spektra byla snímána při následujících parametrech měření: frekvence mikrovlnného záření 9.825873 GHz, střední

magnetické pole 350.05 mT, spektrální šířka 18.00 mT, modulační amplituda 0.12 mT, modulační frekvence 100 KHz, výkon mikrovlnného zdroje 8 mW. Výsledný záznam byl kvůli potlačení šumu získán akumulací 32 spekter.

4.2.5.3 Měření koncentrace spinové značky

Koncentrace spinové značky byla stanovena srovnáním dvojných integrálů spektra vzorku a spinového standardu (vodný roztok TEMPO; $6,4 \cdot 10^{-4}$ M), umístěného do kapiláry stejného typu. Vzorek i standard byly umístěny do dvojité pravoúhlé dutiny a při stejných experimentálních podmínkách jako v 4.2.5.2 byl zaznamenán jeden sken spektra vzorku, následovaný skenem spektra standardu. Měření bylo provedeno v triplikátech. Koncentrace spinové značky ve vzorku byla spočtena dle vztahu

$$c_{\text{značka}} = \frac{DI_{av}(\text{značka})}{DI_{av}(\text{standard})} \cdot c_{\text{standard}}$$

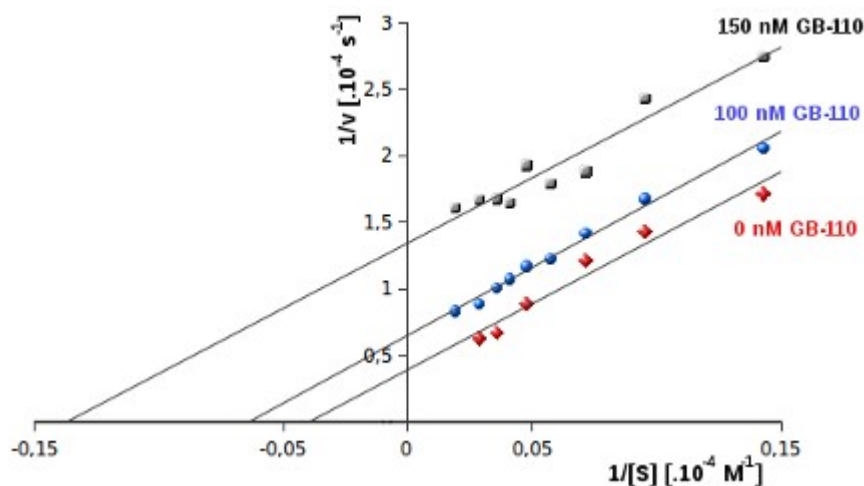
kde DI_{av} je hodnota dvojného integrálu EPR spektra definovaná vztahem

$$DI_{av} = \iint_{B_i}^{B_f} \frac{dI}{dB} dB dB$$

který byl numericky vyřešen softwarovým balíkem pro program Origin 8.0 [124]. Vzhledem k nedostatečnému poměru signál/šum nemohla být integrace provedena přímo z naměřených spekter. Bylo proto využito simulace spektra, ve které byla intenzita získaná akumulací 32 spekter fitována do intenzity získané individuálním skenem spektra. Následně byla provedena integrace. Měření EPR spekter a měření koncentrace spinové značky bylo bylo prováděno za asistence Dr. Jána Tarábka z laboratoře Dr. Detlefa Schrödera. Dr. Ján Tarábek také provedl simulaci a dvojnou integraci spekter.

5. Výsledky

Pro strukturní charakterizaci komplexu HIV-1 proteasy s jejím akompetitivním karboranovým inhibitorem GB-110 technikou EPR spektroskopie, ve spojení se specifickým spinovým značením byl navržen postup, využívající měření vzdálenosti mezi spinovou značkou vázanou na specifický postranní řetězec cysteinu a iontem kovu ve struktuře inhibitoru. Vzhledem k homodimerní povaze HIV-1 proteasy je nemožné zavést metodami molekulární biologie do její struktury pouze jediný cystein. Bylo proto navrženo několik proteinových konstruktů kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy, sestávajících se z monomeru HIV-1 proteasy nesoucího ve struktuře jediný cystein na požadované pozici, který je spojen dvou- až čtyř-aminokyselinovým můstkem s druhým monomerem, v němž byla všechna cysteinová residua odstraněna. Použitelnost této strategie byla nejprve ověřena měřením mechanismu inhibice inhibitoru GB-110 vůči kovalentně spojenému dimeru HIV-1 proteasy divokého typu. (protein pro měření byl získán od Ing. Ireny Sieglové z laboratoře Dr. Pavlína Řezáčové na ÚOCHB. Mechanismus inhibice zůstal zachován jako akompetitivní. Dvojitě reciproký výnos podle Lineweaver-Burka použitý pro určení mechanismu je zachycen na obrázku 11.



Obrázek 11: Dvojitě reciproký výnos podle Lineweaver-Burka ukazující akompetitivní mechanismus inhibice GB-110 vůči kovalentně spojenému dimeru HIV-1 proteasy divokého typu.

Pro navrženou metodu tedy byly naklonovány expresní konstrukty kódující požadované proteiny, část proteinů byla exprimována, purifikována a kineticky charakterizována. Pro jeden protein pak byla provedena optimalizace specifického spinového značení.

5.1. Klonování

Expresní konstrukty pro kovalentně spojené dimery HIV-1 proteasy určené pro EPR experimenty byly připraveny technikami molekulární biologie. Jako výchozí DNA pro přípravu konstruktů sloužil plasmid pET11c s vloženou kódující sekvencí pro HIV-1 proteasu divokého typu inaktivovanou z důvodu eliminace nežádoucí autoproteolýzy mutací katalytického aspartátu D25N. Cílenou mutagenezí byly z této DNA sekvence odstraněny oba cysteiny zavedením mutací C67A a C95A. Takto připravený expresní konstrukt byl pojmenován *CF*-HIV-1*, kde * značí inaktivaci mutací D25N. Zpětnou mutagenezí N25D byla připravena i varianta *CF-HIV-1*, kódující katalyticky aktivní formu enzymu. Obě varianty cysteinu zbavených enzymů pak sloužily jako základ pro další mutagenezi, kterou byly zavedeny cysteiny na požadované pozice. Konkrétně mutací K55C, kterou byly vytvořeny konstrukty *K55CinCF-HIV-1* a *K55CinCF*-HIV-1* a dále záměnou R41C, poskytující konstrukty *R41CinCF-HIV-1* a *R41CinCF*-HIV-1*.



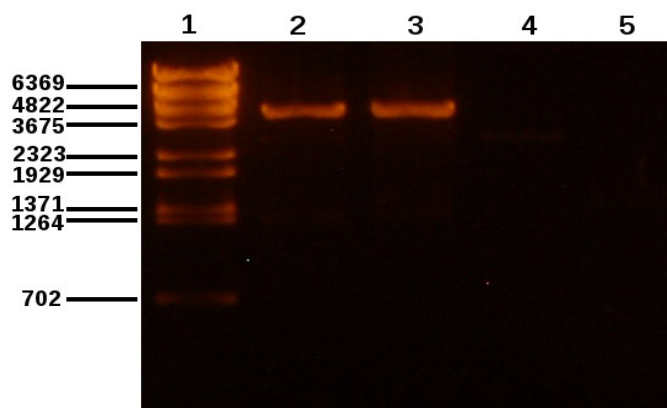
Obrázek 12: Schematické znázornění expresních konstruktů připravených v rámci práce. Sekvence HIV-1 proteasy divokého typu je zobrazena jako modrý obdélník. Naznačeny jsou provedené aminokyselinové záměny, zavedený cystein modifikovatelný spinovou značkou označen červeně. Spojovací můstek je u kovalentně spojených dimerů naznačen sekvencí aminokyselin.

Takto připravené monomerní jednotky pak byly spojeny pomocí polymerasové řetězové reakce a DNA ligace do konstruktů kódujících -Gly-Gly- můstkem kovalentně spojené dimery HIV-1 proteasy, ve kterých vždy první monomerní jednotka nesla cystein

na požadované pozici a jednotka druhá byla cysteinů zbavena. Byly připraveny expresní konstrukty jak pro aktivní tak inaktivované varianty nesoucí cystein v pozici 55, respektive 41 - označeny *TWT-55*, *TWT-55**, *TWT-41* a *TWT-41**. Dále byl připraven konstrukt pro aktivní i inaktivovanou variantu sestávající se ze dvou cysteinu zbavených monomerů spojených čtyř-aminokyselinovým můstkem nesoucím cystein. Tyto konstrukty byly označeny *TWT-CL* a *TWT-CL**. Na obrázku 12 jsou schematicky znázorněny všechny připravené expresní konstrukty.

5.1.1 Příprava DNA pro monomerní jednotky cílenou mutagenézí

Postup přípravy DNA monomerních jednotek je popsán v kapitole 4.2.1.1. Jako templát pro prvotní mutagenézi sloužil plasmid pET11c s vloženou kódující sekvencí pro HIV-1 proteasu divokého typu inaktivovanou mutací katalytického aspartátu D25N, získaný v laboratoři Doc. Konvalinky. Templáty pro následné kroky pak byly postupně produkty předchozích mutagenézí. Po proběhnutí PCR byly templátové DNA odstraněny štěpením endonukleasou *DpnI* a produkty mutagenéze byly analyzovány na horizontální agarosové elektroforesi (4.2.1.5), elektroforeogram je zobrazen na obrázku 13.



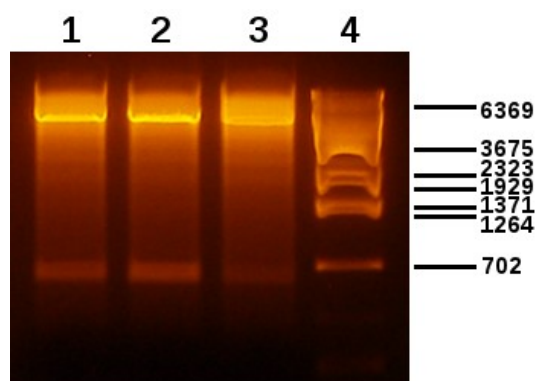
Obrázek 13: agarosový gel zobrazující produkt cílené mutagenéze na pozici K55C s použitím konstruktu *CF-HIV-1* jako templátu. Dráha 1: λ DNA - *BstEII* štěpený standard, dráha 2: produkt mutagenéze (pET24a s vloženou sekvencí *K55CinCF-HIV-1*), dráha 3: produkt mutagenéze štěpený *DpnI*, dráha 4: templátová DNA v množství vloženém do PCR reakce, dráha 5: templátová DNA štěpená *DpnI*.

Po mutagenézi byla získaná DNA transformována do bakterií *Escherichia coli* TOP10 (4.2.1.2) a izolována pomocí minipreparace plasmidové DNA (4.2.1.3). Správná sekvence oblastí kódujících požadované HIV-1 proteasy byla ověřena sekvencí DNA v servisní laboratoři na PřF UK. Fragmenty DNA kódující požadované proteiny byly poté amplifikovány PCR a ligací přeneseny do vektoru pET24a. Připraveny byly expresní

konstrukty *CF-HIV-1*, *CF*-HIV-1*, *K55CinCF-HIV-1*, *K55CinCF*-HIV-1*, *R41CinCF-HIV-1* a *R41CinCF*-HIV-1*.

5.1.2 Klonování kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy

Monomerní jednotky připravené cílenou mutagenezí byly použity k tvorbě DNA konstruktů kódujících kovalentně spojené heterodimery HIV-1 proteasy. Fragmenty DNA kódující monomerní jednotky byly amplifikovány pomocí PCR a pomocí vhodně zvolených primerů byla na jejich konce zavedena restriční místa tak, aby z jedné strany bylo místo komplementární s předštěpeným vektorem pET24a a z druhé strany pak restriční místo pro endonukleasu *ApaI*, využívanou pro spojení monomerních jednotek -Gly-Gly- můstkem, popřípadě čtyř-aminokyselinovým můstkem -Cys-Gly-Ser-Gly-. Amplifikované fragmenty byly po štěpení příslušnými restričními endonukleasami ligovány pomocí jednokrokové trojfragmentové ligace do předštěpeného vektoru pET24a za vzniku požadovaných expresních konstruktů. Ty pak byly transformovány do bakterií *Escherichia coli* TOP10 (4.2.1.2) a izolovány pomocí minipreparace plasmidové DNA (4.2.1.3).



Obrázek 14: Ověření přítomnosti fragmentu TWT-55 proteasy ve vektoru pET24a. Expresní konstrukt po ligaci štěpen restričními endonukleasami *EcoRI* a *NdeI*, očekávaná velikost fragmentů 5300 a 616 bp. Dráhy 1 až 3: klony izolované DNA, dráha 4: λ DNA - *BstEII* štěpený standard.

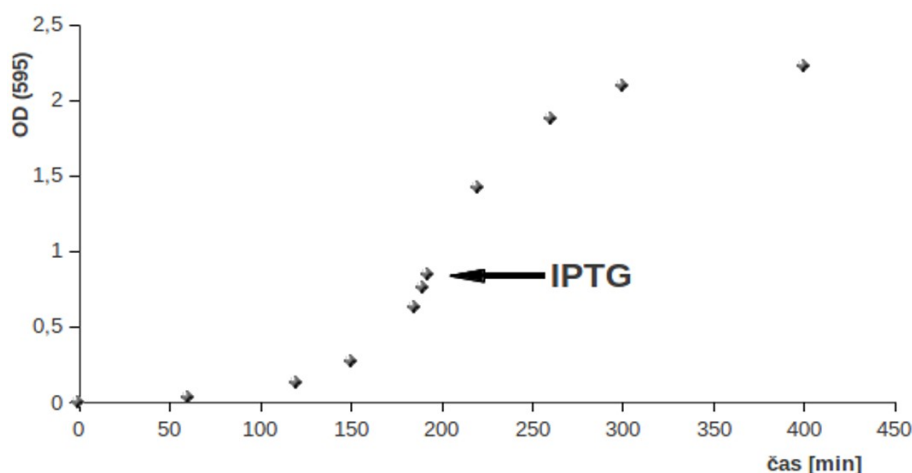
Správnost sekvence oblastí kódujících požadované kovalentně spojené dimery HIV-1 proteasy byla ověřena restričním štěpením endonukleasami *NdeI* a *EcoRI* (viz obrázek 14) a sekvenací DNA v servisní laboratoři na PřF UK. Byly připraveny expresní konstrukty pro kovalentně spojené dimery HIV-1 proteasy *TWT-55*, *TWT-55**, *TWT-41*, *TWT-41**, *TWT-CL* a *TWT-CL**.

5.2. Expresse a purifikace HIV proteas

Z připravených expresních konstruktů byly heterologní expresí v bakteriálních buňkách *E. coli* připraveny a přečištěny kovalentně spojené dimerní HIV proteasy TWT-55, TWT-CL a TWT-41. Pro využití v optimalizaci specifického spinového značení a pro kinetickou charakterizaci vlivu zavedených mutací byly též exprimovány nespojené varianty HIV-1 proteasy CF-HIV-1 a K55CinCF-HIV-1.

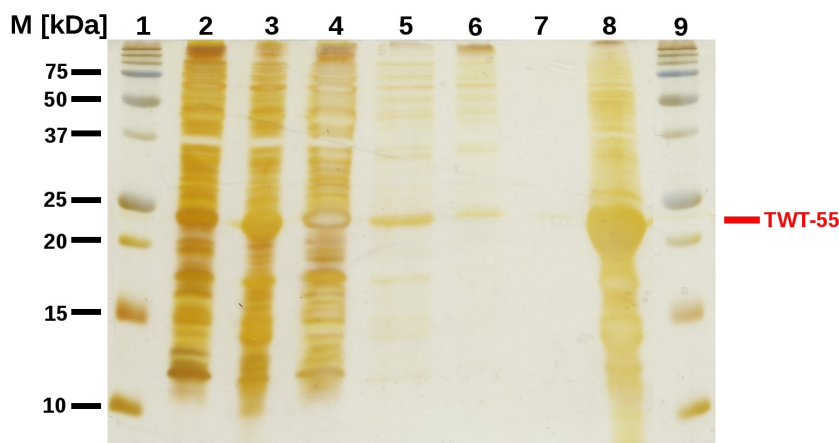
5.2.1 Expresse HIV-1 proteasy TWT-55

Kovalentně spojená HIV-1 proteasa TWT-55 určená pro specifické spinové značení a EPR experimenty byla exprimována z připraveného expresního konstruktů v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL. Kultura byla kultivována ve 3 l LB média obsahujícího antibiotikum kanamycin, exprese byla indukována přidavkem IPTG při dosažení hodnoty $OD_{595} = 0,84$. Exprimovaný protein byl bakterií ukládán v denaturované formě jako inkluzní tělíska. Růstová křivka bakteriální kultury je zobrazena na obrázku 15. Výtěžek kultivace činil 2,85 g vlhké buněčné biomasy na litr kultury.



Obrázek 15: Růstová křivka bakteriální kultury *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL, nesoucí expresní plasmid kódující kovalentně spojený dimer HIV-1 proteasy TWT-55. Šipkou označena indukce exprese pomocí IPTG.

Inkluzní tělíska byla izolována a přečištěna několikanásobnou sonikací v alkalických pufrách o proměnné iontové síle a koncentraci detergentu postupem popsáním v kapitole 4.2.2.3. Obrázek 16 zachycuje průběh procesu izolace a promývání inkluzních tělísek. Promýváním byly ze vzorku postupně odstraněny některé bakteriální proteiny a získán byl preparát obsahující vysoké množství částečně přečištěné HIV-1 proteasy v denaturovaném stavu.



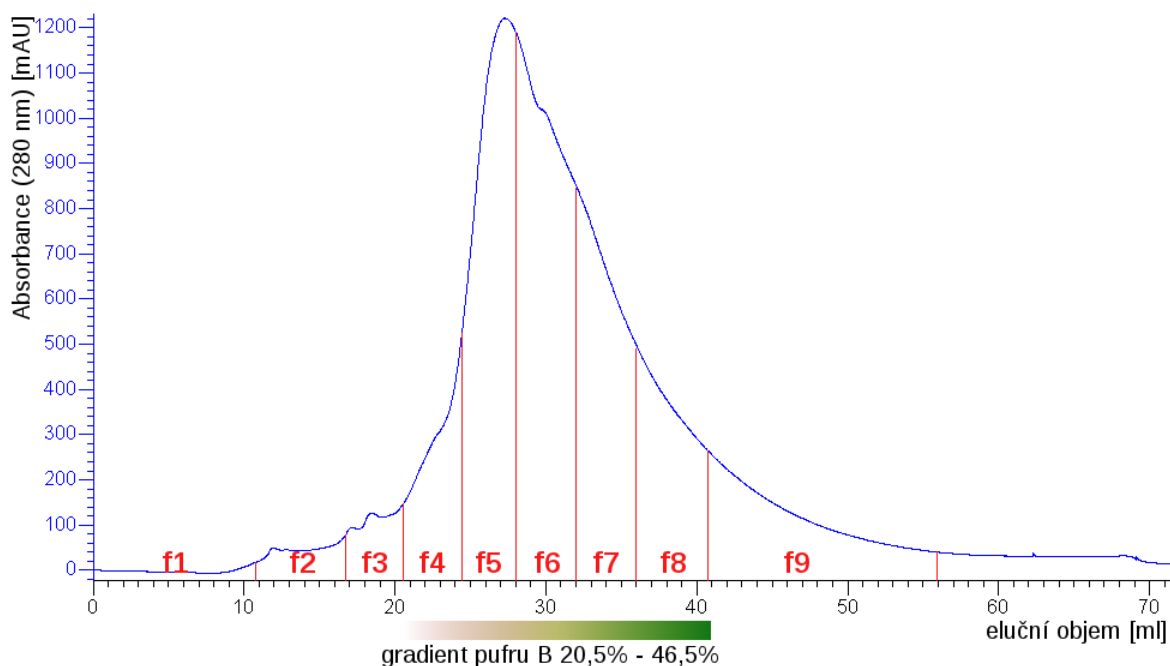
Obrázek 16: SDS gel zachycující proceduru izolace a promývání inkluzních tělísek HIV-1 proteasy TWT-55. Dráha 1: Standard molekulových hmotností, dráha 2: bakteriální buňky před indukcí, dráha 3: bakteriální buňky po indukci, dráha 4: buněčný supernatant, dráha 5: supernatant po promytí pufrem SA, dráha 6: supernatant po promytí pufrem TA, dráha 7: supernatant po promytí pufrem A, dráha 8: izolovaná inkluzní tělíska, dráha 9: standard molekulových hmotností. Byl použit 18% separační gel (4.2.3.2), proteiny byly barveny stříbrem (4.2.3.3)

Výtěžek izolace inkluzních tělísek činil 0,27 g vlhkých inkluzních tělísek na litr buněčné kultury. Pro renaturaci byla odebrána polovina získaných přečištěných inkluzních tělísek. HIV-1 proteasa byla renaturována rozpuštěním inkluzních tělísek v 67% kyselině octové a postupným naředěním do čtyřiadvacetinásobného objemu vody, následovaným dialýzou do renaturačního pufru. Podrobně je postup popsán v kapitole 4.2.2.4.

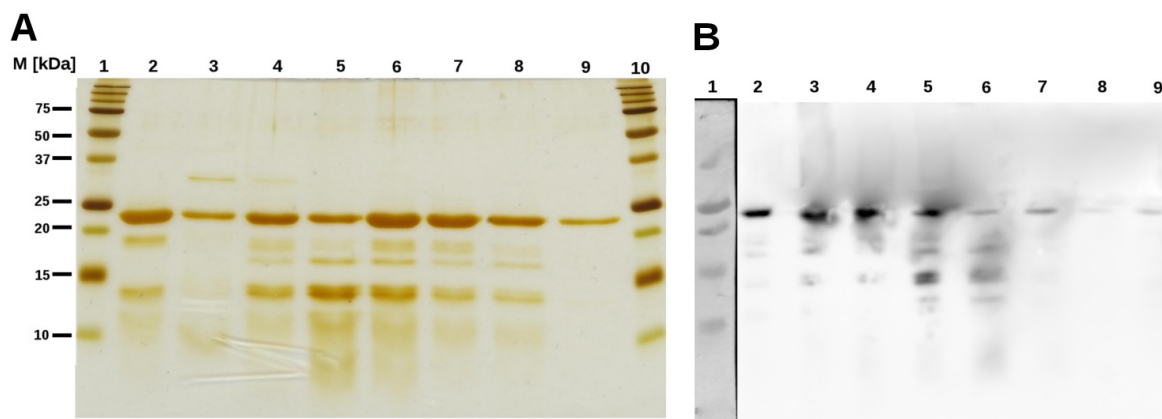
5.2.2 Chromatografické čištění TWT-55 HIV proteasy

Chromatografické čištění renaturovaného proteinu bylo provedeno pomocí FPLC chromatografie na kationtově výměnné koloně MonoS 10/100 GL gradientem iontové síly a pH. Eluční profil TWT-55 HIV proteasy se je možno vidět na obrázku 17.

Frakce byly při chromatografickém čištění jímány manuálně na základě vizuální kontroly elučního profilu. Čistota frakcí byla vyhodnocena vertikální elektroforesou v denaturujícím prostředí SDS, elektroforeogram je možno vidět na obrázku 17A. Přítomné proteinové nečistoty byly pomocí elektropřenosu na nitrocelulosovou membránu s následnou vizualizací monoklonální protilátkou IgG F11.1.3.11, rozpoznávající epitop v oblasti pohyblivé chlopně proteasy, identifikovány jako produkty autoproteolýzy enzymu (obrázek 17B).



Obrázek 16: eluční profil FPLC chromatografie na katexové koloně pro HIV-1 proteasu TWT-55. Svislými čarami jsou naznačeny jednotlivé frakce.



Obrázek 17: A) SDS PAGE gel zobrazující proteinové složení jednotlivých frakcí jímáných v průběhu chromatografického čištění kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy TWT-55 na koloně MonoS 10/100 GL pomocí FPLC. Dráha 1: Standard molekulových hmotností (4 μ l), dráha 2: vzorek před chromatografickou purifikací (15 μ l), dráhy 3 až 9: jímáné frakce f3 až f9 (10 μ l), dráha 10: standard molekulových hmotností (4 μ l). **B)** fotografie nitrocelulosové membrány po elektropřenosu gelu se shodným složením drah. Proteiny byly zviditelněny chemiluminescenčně monoklonální protilátkou IgG F11.1.3.11, rozpoznávající epitop v oblasti pohyblivé chlopně proteasy. Standard molekulových hmotností v dráze 1 do obrázku přidán z černobílé fotografie membrány snímávané současně s chemiluminescenčním snímkem.

V každé frakci byla též změřena koncentrace proteinu dle Bradfordové (4.2.3.1) a enzymová aktivita (4.2.4.1). Frakce 5 až 7 byly z důvodu vysoké koncentrace proteinu a soli a počínající viditelné precipitace proteinu ihned po najímání naředěny puforem A pro FPLC. Precipitát se po naředění okamžitě rozpustil. Jako hlavní frakce byly identifikovány

frakce číslo 5 a 6, jako vedlejší frakce pak frakce číslo 4, 7 a 8. Frakce 4 až 8 byly spojeny a dále použity pro kinetickou charakterizaci, specifické spinové značení proteinu a EPR spektroskopická měření. Výtěžek purifikace činil 3,7 mg proteinu na litr bakteriální kultury, při zisku 73% z aktivního proteinu, jež byl nanášen na kolonu. průběh purifikace je shrnut v tabulce 3. Pro popis průběhu purifikace byla zavedena „relativní jednotka aktivity“ (ru), definována jako aktivita, která při štěpení chromogenního peptidového substrátu za standardních podmínek (37 °C; 0,3 M NaCl; octan sodný pH = 4,7) způsobí pokles absorbance o 10^{-4} AU.s⁻¹

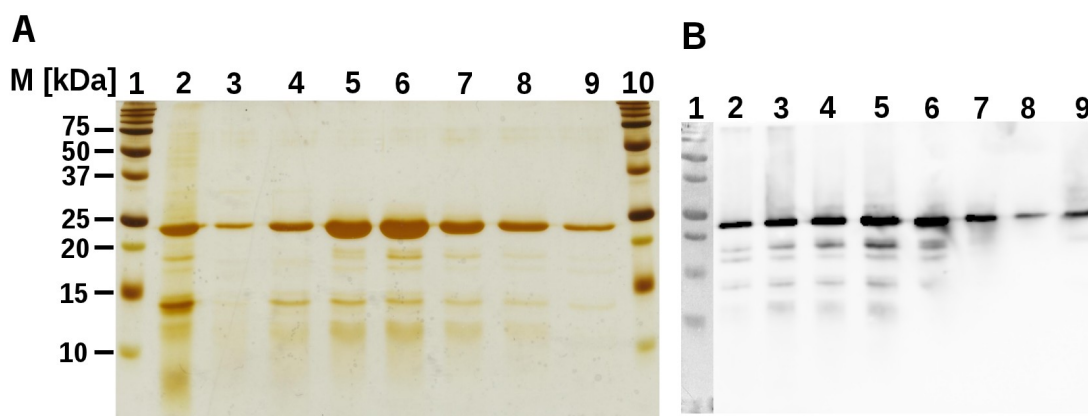
Tabulka 3: shrnutí chromatografické purifikace kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy TWT-55.

frakce	objem [ml]	aktivita [mAU.s ⁻¹ .μl ⁻¹]	aktivita [ru]	výtěžek [%]	konc. proteinu [μg/ml]	spec. aktivita [ru/μg]	purifikační koeficient
před FPLC	75	0,6161	46210	-	126	4,9	1,0
f1	10,8	0,0000	0	0,0	0	0,0	0,0
f2	5,9	0,0000	0	0,0	0	0,0	0,0
f3	3,7	0,0356	132	0,3	27	1,3	0,3
f4	4,0	0,3410	1364	3,0	92	3,7	0,8
f5	5,6	2,0213	11279	25,4	282	7,2	1,5
f6	8,0	1,3295	10636	23,0	220	6,0	1,2
f7	6,0	1,0288	6173	13,4	164	6,3	1,3
f8	4,8	0,8539	4098	8,9	142	6,0	1,2
f9	15,1	0,1526	2304	5,0	31	4,9	1,0
suma f4-f8				72,6			

5.2.3 Exprese a purifikace HIV proteas TWT-CL, K55inCF-HIV-1 a CF-HIV-1

Všechny proteiny byly exprimovány z připravených expresních konstruktů v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL. Kultura byla kultivována ve 3 l LB média obsahujícího antibiotikum kanamycin, exprese proteinu byla indukována přidávkem IPTG. Proteiny byly produkovány ve formě inkluzních tělísek, která byla izolována, v případě TWT-CL byla k dalšímu zpracování použita pouze polovina inkluzních tělísek. Proteiny byly renaturovány a čištěny FPLC chromatografií na katexové koloně. Frakce byly jímány manuálně, byla v nich změřena koncentrace proteinu a proteolytická aktivita enzymu, čistota frakcí byla monitorována SDS elektroforesou. Gel zachycující čistotu frakcí proteasy TWT-CL je zobrazen na obrázku 18A, na obrázku 18B je pak membrána po elektropřenosu zobrazující proteinové složení nečistot. Průběh

purifikace TWT-CL je shrnut v tabulce 4. Frakce 5 až 7 byly z důvodu vysoké koncentrace proteinu a soli a počínající viditelné precipitace proteinu ihned po najímání naředěny puforem A pro FPLC. Precipitát se po naředění okamžitě rozpustil. Jako hlavní frakce byla identifikována frakce číslo 6, jako vedlejší frakce pak frakce číslo 4, 5, 7 a 8. Frakce 4 až 8 byly spojeny a uchovány pro další použití. Výtěžek proteinu činil 2,8 mg na litr kultury.

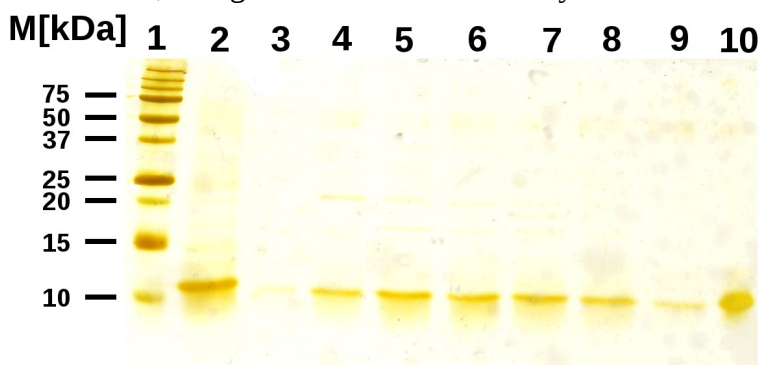


Obrázek 18: **A)** SDS PAGE gel zobrazující proteinové složení jednotlivých frakcí jímáných v průběhu chromatografického čištění kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy TWT-CL na koloně MonoS 10/100 GL pomocí FPLC. Dráha 1: Standard molekulových hmotností (4 μ l), dráha 2: vzorek před chromatografickou purifikací (15 μ l), dráhy 3 až 9: jímáné frakce f3 až f9 (10 μ l), dráha 10: standard molekulových hmotností (4 μ l). **B)** fotografie nitrocelulosové membrány po elektropřenosu gelu se shodným složením drah. Proteiny byly zviditelněny chemiluminescenčně monoklonální protilátkou IgG F11.1.3.11, rozpoznávající epitop v oblasti pohyblivé chlopně proteasy. Standard molekulových hmotností v dráze 1 do obrázku přidán z černobílé fotografie membrány snímané současně s chemiluminescenčním snímkem.

Tabulka 4: shrnutí chromatografické purifikace kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy TWT-CL

frakce	objem [ml]	aktivita [mAU.s ⁻¹ . μ l ⁻¹]	aktivita [ru]	výtěžek [%]	konc. proteinu [μ g/ml]	spec. aktivita [ru/ μ g]	purifikační koeficient
před FPLC	100	0,3976	39756	-	179	2,2	-
f1	14,9	0,0000	0	0,0	0	0,0	0,0
f2	3,3	0,0000	0	0,0	22	0,0	0,0
f3	3,0	0,0367	110	0,3	44	0,8	0,4
f4	4,6	0,2874	1322	3,3	86	3,3	1,5
f5	3,5	1,6371	5730	14,4	230	7,1	3,2
f6	5	1,7500	8750	22,0	278	6,3	2,8
f7	4	0,7433	2973	7,5	135	5,5	2,5
f8	10,2	0,4000	4080	10,3	98	4,1	1,8
f9	15	0,1951	2927	7,3	38	5,2	2,3
suma f4-f8				57,5			

Čistota frakcí proteasy K55CinCF-HIV byla monitorována SDS elektroforesou, gel zachycující proteinové složení jednotlivých frakcí je zobrazen na obrázku 19. Průběh purifikace je shrnut v tabulce 5. Jako hlavní frakce byla identifikována frakce 5, jako vedlejší pak frakce 3, 4, 6 a 7. Frakce 3 až 7 byly spojeny a uchovány pro další použití. Výtěžek proteinu činil 0,14 mg na litr bakteriální kultury.

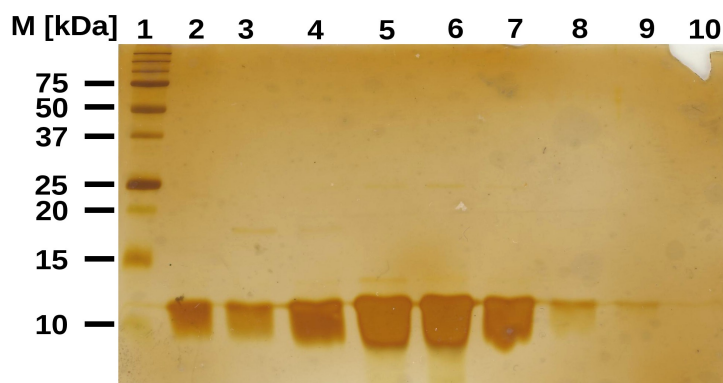


Obrázek 19: SDS PAGE gel zobrazující proteinové složení jednotlivých frakcí jímáných v průběhu chromatografického čištění varianty HIV proteasy K55CinCF-HIV-1 na koloně MonoS 10/100 GL pomocí FPLC. Dráha 1: Standard molekulových hmotností (4 μ l), dráha 2: vzorek před chromatografickou purifikací (15 μ l), dráhy 3 až 9: jímáné frakce f2 až f8 (15 μ l), dráha 10: standard HIV-1 proteasy divokého typu (4 μ l).

Tabulka 5: shrnutí chromatografické purifikace varianty HIV-1 proteasy K55CinCF-HIV-1

frakce	objem [ml]	aktivita [mAU.s ⁻¹ . μ l ⁻¹]	aktivita [ru]	výtěžek [%]	konc. proteinu [μ g/ml]	spec. aktivita [ru/ μ g]	purifikační koeficient
před FPLC	160	0,0710	11363	-	103	0,7	-
f1	10	0,0000	0	0,0	0	0,0	0,0
f2	2,5	0,0300	77	0,7	13	2,4	3,5
f3	2,5	0,0863	221	1,9	16	5,5	8,1
f4	2,8	0,0881	247	2,2	34	2,6	3,8
f5	4,3	0,0791	343	3,0	31	2,6	3,7
f6	2,0	0,0376	75	0,7	49	0,8	1,1
f7	5,2	0,0281	145	1,3	46	0,6	0,9
f8	10	0,0158	158	1,4	0	0,0	0,0
suma f3-f7				9,1			

Průběh purifikace a proteinové složení jímáných frakcí proteasy CF-HIV-1 byly sledovány pomocí elektroforesy v denaturujícím prostředí SDS. Gel je zachycen na obrázku 20, tabulka 6 pak shrnuje průběh purifikace. Jako hlavní frakce byly identifikovány frakce 7 a 8, jako vedlejší frakce 6 a 9. Frakce 6 až 9 byly spojeny a uchovány pro další použití. Purifikací bylo získáno 3,3 mg proteinu na litr bakteriální kultury.



Obrázek 20: SDS PAGE gel zobrazující proteinové složení jednotlivých frakcí jímaných v průběhu chromatografického čištění varianty HIV proteasy CF-HIV-1. Dráha 1: Standard molekulových hmotností (4 μ l), dráha 2: vzorek před chromatografickou purifikací (15 μ l), dráhy 3 až 10: jímané frakce f5 až f12 (10 μ l).

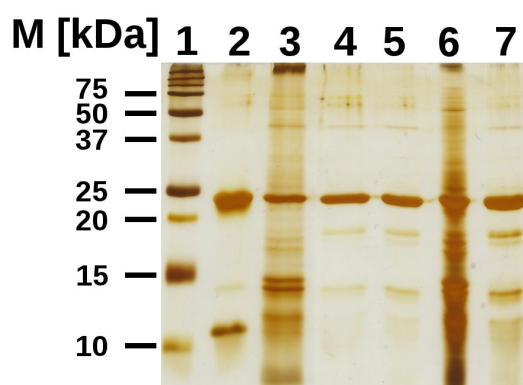
Tabulka 6: shrnutí chromatografické purifikace varianty HIV-1 proteasy CF-HIV-1

frakce	objem [ml]	aktivita [mAU.s ⁻¹ . μ l ⁻¹]	aktivita [ru]	výtěžek [%]	konc. proteinu [μ g/ml]	spec. aktivita [ru/ μ g]	purifikační koeficient
před FPLC	175	0,5035	88113	-	80	6,2	-
f1	12,5	0,0000	0	0,0	2	0,0	0,0
f2	1,9	0,0016	3	0,0	5	0,3	0,1
f3	3,0	0,0022	7	0,0	6	0,4	0,1
f4	4,0	0,0169	68	0,1	28	0,6	0,1
f5	3,0	0,1746	524	0,6	132	1,3	0,2
f6	2,4	0,8638	2073	2,4	134	6,5	1,0
f7	6,5	3,6125	23481	26,7	612	5,9	1,0
f8	5,5	3,7085	20397	23,1	679	5,5	0,9
f9	7,1	1,1037	7836	8,9	273	4,1	0,7
f10	4,1	0,1351	549	0,6	106	1,3	0,2
f11	8,7	0,0319	276	0,3	33	1,0	0,2
f12	10,0	0,0087	87	0,1	5	1,7	0,3
suma f6-f9				61,0			

5.2.4 Exprese a purifikace HIV proteasy TWT-41

HIV proteasa TWT-41 byla exprimována z připraveného expresního konstruktu *TWT-41* v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL. Kultura byla kultivována ve 3 l LB média obsahujícího antibiotikum kanamycin, exprese proteinu byla indukována přidávkem IPTG. Inkluzní tělíska, do nichž byl protein produkován, byla izolována a přečištěna. Z důvodu nízké stability nebyl protein čištěn chromatograficky, rozpuštěním inkluzních tělísek v 67% kyselině octové, renaturací postupným naředěním do čtyřnásobku objemu vody a následnou dialýzou do vody a poté do pufru složením shodného s renaturačním pufrům, avšak neobsahujícího 2-merkaptoethanol. V průběhu

těchto procedur došlo, jak je možno vidět na obrázku 21, ke specifickému vyprecipitování některých proteinových nečistot. Protein byl poté zakoncentrován za použití centrifugačních zahušťovacích filtrů na koncentraci 350 µg/ml, při specifické aktivitě 1,174 ru/µg a využit pro kinetickou charakterizaci. Výtěžek proteasy TWT-41 činil 1,5 mg na litr bakteriální kultury. V tabulce 7 jsou pak shrnuty výtěžky všech proteinů exprimovaných a purifikovaných při vypracovávání diplomové práce.



Obrázek 21: SDS PAGE gel zachycující postup čištění kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy TWT-41. Dráha 1: standard molekulových hmotností (4 µl), dráha 2: standard kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy divokého typu (6 µl), dráha 3: protein po rozpuštění v 67% kyselině octové, zředění do 24-násobku vody a dialýze proti vodě (10 µl), dráha 4: supernatant po dialýze přes noc proti renaturačnímu pufru (15 µl), dráha 5: vzorek odebraný v průběhu zahušťování proteinu v centrifugačních zahušťovacích kolonkách (10 µl), dráha 6: peleta po dialýze přes noc proti renaturačnímu pufru (5 µl), dráha 7: výsledný vzorek proteinu po zahuštění (7 µl).

Tabulka 7: shrnutí výtěžků připravených proteinů:

exprimovaný protein	množství proteinu [mg/l média]	výtěžek aktivity vůči celkové aktivitě před chromatografií [%]
TWT-55	3,6	73
TWT-CL	2,8	58
TWT-41	1,5	nestanoven
K55CinCF-HIV-1	0,1	9
CF-HIV-1	3,3	61

5.3. Kinetická charakterizace HIV proteas

Kinetická charakterizace enzymů byla prováděna měřením počátečních rychlostí proteolytické reakce štěpení substrátu KARVNle*NphEANle-NH₂ odvozeného od štěpného místa CA-p2 nacházejícího se v přirozeném substrátu HIV-1 proteasy Gag-Pol.

Při všech měřeních byly použity standardní podmínky (37 °C, 0,3 M NaCl, octanový pufr pH = 4,7).

Výsledné hodnoty Michaelisových konstant K_m a katalytických konstant enzymu k_{cat} jsou shrnuty v tabulce 8. Proteasy TWT-55 i TWT-41 byly schopny štěpit peptidový substrát, tato schopnost však byla snížena přibližně na třetinu, respektive polovinu. Snížení katalytické efektivity patrně vychází z přítomnosti mutace v pohyblivé chlopni, jež je pro štěpení substrátu klíčová. Pro proteasu TWT-CL nebyla naměřena hodnota katalytické konstanty k_{cat} , její Michaelisova konstanta se však oproti protease divokého typu zlepšila přibližně dvojnásobně. Hodnoty konstant pro HIV-1 proteasu divokého typu byly naměřeny v laboratoři Doc. Jana Konvalinky na ÚOCHB.

Tabulka 8: hodnoty kinetických parametrů pro připravené enzymy

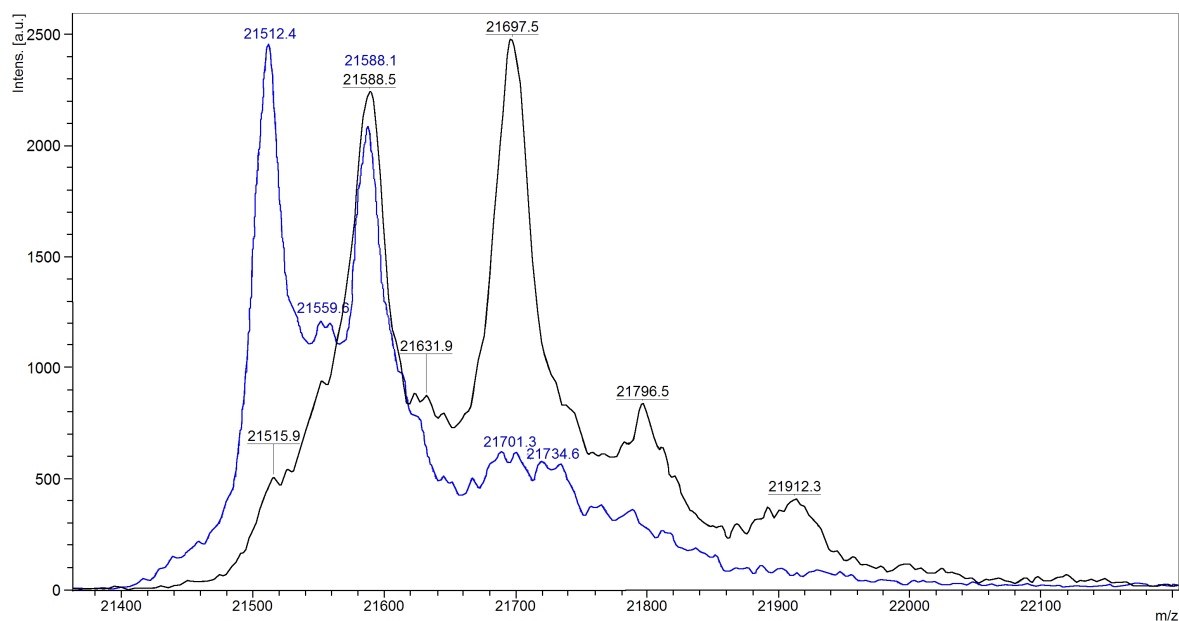
enzym	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$]	$\frac{(k_{cat}/K_m)_{enzym}}{(k_{cat}/K_m)_{divoký\ typ}}$
divoký typ	15 ± 1	30 ± 2	2000 ± 200	1
TWT-55	24 ± 1	17 ± 1	700 ± 60	0,35
TWT-41	11 ± 1	12 ± 1	1050 ± 60	0,53
TWT-CLA	9 ± 1	nestanoveno	nestanoveno	nestanoveno

5.4. Specifické spinové značení HIV proteasy

Pro variantu kovalentně spojeného dimeru HIV-1 proteasy TWT-55 byl částečně optimalizován postup specifického spinového značení na cysteinu v pozici 55. Protein byl předvázán inhibitorem rKARV pro prevenci autoproteolýzy v průběhu značení, převeden odsolovací chromatografií do pufru o neutrálním pH a značen po dobu dvou hodin v temnu a chladu spinovou značkou MTSL v padesátinásobném molárním nadbytku. Nadbytek značky byl odstraněn odsolovací chromatografií za současného převodu do pufru pro další uchovávání. Účinnost specifického spinového značení byla vyhodnocena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI. Analýza byla provedena servisní laboratoří ÚOCHB.

Spektrum vzorku po spinovém značení v porovnání se spektrem kontrolního vzorku, připraveného stejným postupem, avšak za absence spinové značky, je zobrazeno na obrázku 22. Spektrum v obou případech obsahuje v oblasti molekulárního píku enzymu dva píky, z nichž jeden se vždy nachází na hodnotě molekulové hmotnosti 21588 Da. Tato molekulová hmotnost odpovídá variantě HIV proteasy TWT-55 s cysteinem

modifikovaným molekulou 2-merkptoethanolu pocházejícího z původního pufru pro uchování enzymu, který se patrně nepodařilo zcela odstranit v průběhu specifického značení. 2-merkptoethanol blokuje přístup spinové značky k síře cysteinu a postranní řetězec jím modifikovaný tedy nemůže být označen. Pík na hmotnosti 21512 Da ve spektru kontroly odpovídá nemodifikované molekule proteasy TWT-55. Ve spektru vzorku po značení tento pík téměř zcela vymizel a přesunul se na hmotnost 21697 Da odpovídající navýšení hmotnosti TWT-55 právě o spinovou značku MTSL.



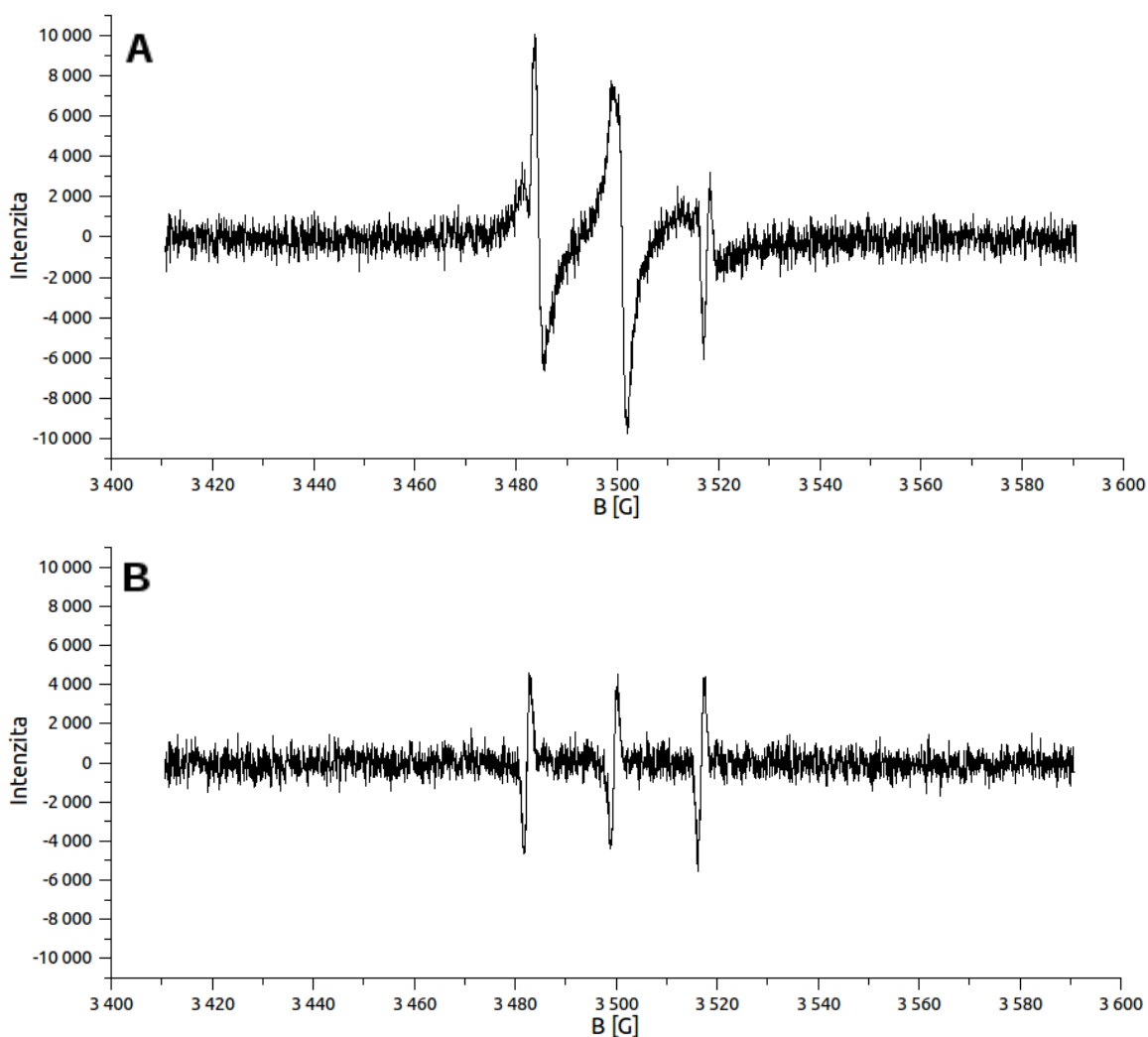
Obrázek 22: hmotnostní spektra vzorku před (modrá linie) a po (černá linie) specifickém spinovém značení

5.5. Spektroskopie EPR

Úspěšnost spinového značení proteinu TWT-55 byla ověřena též změřením EPR spektra proteinu po značení. Vzorek proteinu byl po provedení specifického spinového značení zakoncentrován za použití zahušťovacích centrifugačních kolonek (MWCO = 10000 Da) na koncentraci přibližně 25 μM (stanoveno spektrofotometricky podle Bradfordové viz 4.2.3.1). Nízkomolekulární frakce procházející filtrem byla odebrána jako kontrola pro stanovení EPR pozadí rozpouštědla, tvořeného například nedokonale odstraněnými volnými spinovými značkami. Vzorek byl zbaven vzdušného kyslíku nasycením dusíkem, nanesen do kapiláry pro EPR měření a bylo změřeno EPR spektrum. Podmínky experimentu jsou detailně popsány v kapitole 4.2.5.2 Na obrázku 23A je zobrazeno výsledné EPR spektrum spinově značené HIV proteasy TWT-55, na

obrázku 23B pak EPR spektrum rozpouštědla. Oba záznamy byly získány akumulací 32 skenů spektra pro navýšení poměru signál/šum.

Spektrální linie naměřeného spektra spinově značeného proteinu jsou oproti spektru standardu spinové značky v roztoku značně rozšířeny. Rozšíření svědčí o anizotropii v pohybu spinové značky, která může pocházet jednak z vazby značky na molekulu proteinu, nebo také, méně pravděpodobně, ze zachycení volné spinové značky v agregátech vysokých molekulových hmotností (například agregáty precipitujícího denaturovaného proteinu).



Obrázek 23: **A)** EPR spektrum specificky spinově značeného proteinu TWT-55, záznam získán akumulací 32 skenů spektra. **B)** kontrolní EPR spektrum rozpouštědla odebraného při zahušťování vzorku proteinu.

Z tvaru spektrální linie lze též usuzovat, že výsledné spektrum je superpozicí dvou individuálních spekter. Změřením kontrolního spektra rozpouštědla obklopujícího protein

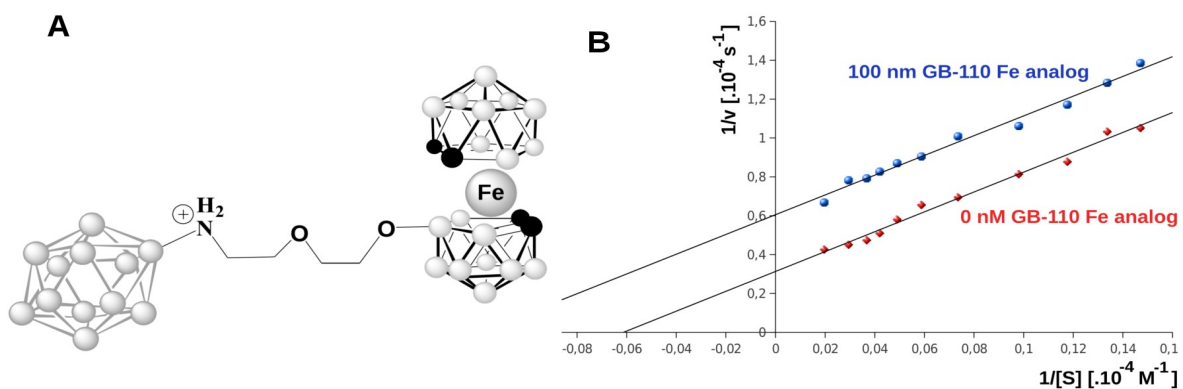
bylo potvrzeno, že ve vzorku je přítomna i spinová značka s podstatně nižší mírou anizotropie. Tato značka se může nacházet buď volná v roztoku, nebo navázaná na krátké peptidové štěpy pocházející z autoproteolýzy enzymu. Ze signálu volné značky pravděpodobně pochází druhé spektrum načítající se přes spektrum značeného enzymu.

5.5.1 Měření koncentrace spinové značky.

Koncentrace spinové značky byla stanovena metodou porovnání dvojnásobného integrálu spektra vzorku proteinu s dvojnásobným integrálem standardu spinové značky o známé koncentraci. Stanovena byla též koncentrace volné značky v rozpouštědle. Kalkulace byly provedeny z individuálních spekter korigovaných nasimulovanou intenzitou spektra akumulovaného z 32 skenů. Měření byla prováděna v triplicátech. Detailní výpočty a podmínky experimentu jsou uvedeny v 4.2.5.3 Koncentrace spinové značky ve vzorku spinově označeného proteinu byla stanovena $c = 2,0 \cdot 10^{-5}$ M, koncentrace volné spinové značky v roztoku pak činila $c = 1,0 \cdot 10^{-6}$ M. Odečtení těchto hodnot poskytuje koncentraci spinově označeného proteinu, dosahující hodnoty $c = 1,9 \cdot 10^{-5}$ M. Porovnáním s celkovou koncentrací proteinu $c = 2,4 \cdot 10^{-5}$ M změřenou spektrofotometricky dle Bradfordové je možno konstatovat že frakce spinově označeného proteinu činila přibližně 80%.

5.6. Ověření mechanismů inhibice

Pro strukturní charakterizaci komplexu HIV-1 proteasy s jejím akompetitivním metallakarboranovým inhibitorem GB-110 pomocí EPR spektroskopie představovala problém skutečnost, že v původní struktuře inhibitoru byl kovovým iontem koordinujícím dvě karboranové klece kobaltnatý kation Co^{2+} , který samozřejmě neposkytuje EPR signál (viz obrázek 10, strana 38) Byl proto navržen a Dr. Václavem Šíchou z ÚACH syntetizován analog inhibitoru, ve kterém byl Co^{2+} ion nahrazen paramagnetickým EPR aktivním iontem Fe^{2+} . Struktura Fe analogu GB-110 je zobrazena na obrázku 24A. Pro nový inhibitor byla stanovena hodnota koncentrace pro dosažení padesátiprocentní inhibice enzymové reakce (IC_{50}) a byl ověřen mechanismus inhibice vůči HIV-1 protease divokého typu. Výsledky analýz spolu se srovnáním s původním kobaltovým analogem jsou shrnuty v tabulce 9, výnos pro stanovení mechanismu inhibice pak znázorněny na obrázku 24B.



Obrázek 24: A) Struktura Fe analogu GB-110 B) dvojitě reciproký výnos podle Lineweaver-Burka použitý pro určení mechanismu inhibice Fe analogu GB-110 vůči HIV-1 protease divokého typu.

Tabulka 9: srovnání inhibičních charakteristik GB-110 s jeho analogem obsahujícím ion Fe^{2+} . Data pro GB-110 byla získána od Ing. Jany Pokorné z laboratoře Doc. Jana Konvalinky na ÚOCHB.

Inhibitor	IC50	mechanismus inhibice
GB-110	$174 \pm 17 \text{ nM}$	akompetitivní
GB-110 Fe analog	$120 \pm 13 \text{ nM}$	akompetitivní

6. Diskuse

Proteasa viru HIV patří mezi hlavní cíle terapeutického zásahu při klinické léčbě onemocnění AIDS. V současné době existuje v praxi deset užívaných inhibitorů tohoto enzymu a několik inhibitorů se nachází v různých fázích testování. Ačkoli jsou proteasové inhibitory v terapii velice efektivní, virus je schopen díky vysoké genetické variabilitě produkovat mutantní varianty, schopné účinku proteasových inhibitorů unikat. Je zde proto stálá potřeba inhibitorů nových, které budou schopny inhibovat tyto resistantní mutantní kmeny viru a současně nebudou samy nové resistantní kmeny produkovat. Vzhledem k tomu, že všechny dosud užívané inhibitory HIV proteasy s enzymem interagují na stejném místě, v jeho aktivním centru, nabízí se jako cesta k produkci nových, resistenci potlačujících inhibitorů hledání sloučenin, které budou cílit na jiná místa ve struktuře enzymu. Mechanismus účinku takových inhibitorů by pak byl nejspíše nekompetitivní či akompetitivní.

Skupinu sloučenin, z nichž některé působí jako akompetitivní či nekompetitivní inhibitory HIV proteasy, se podařilo v minulých letech identifikovat v laboratoři Doc. Jana Konvalinky. Jedná se o látky, jejichž společným strukturním motivem je přítomnost metallakarboranové dvojklece, v nichž je ion kobaltu komplexován mezi dvě klece složené z uhlíku, bóru a vodíku. Pro další vývoj a optimalizaci těchto sloučenin je však třeba důkladné strukturní a biofyzikální charakterizace interakce mezi inhibitorem a enzymem. Přes všechny pokusy se totiž nepodařilo jednoznačně strukturně charakterizovat komplex mezi HIV proteasou a těmito ligandy. Není tedy jasné, do jakého místa ve struktuře HIV proteasy se přesně vážou.

Byl proto vybrán nejúčinnější z připravených metallakarboranových akompetitivních inhibitorů HIV proteasy, sloučenina GB-110, a pro tuto molekulu byly vyvíjeny nástroje pro strukturní charakterizaci interagujícího komplexu enzym - inhibitor. Jako metoda pro zkoumání interakce byla vybrána spektroskopie elektronové paramagnetické resonance v kombinaci se specifickým spinovým značením proteinu.

Pro spinové značení proteinu je vyžadována přítomnost jediného cysteinového postranního řetězce v molekule proteinu. Technikami molekulární biologie byly proto připraveny expresní konstrukty, v nichž byly běžně se vyskytující cysteinové zbytky (v polohách 67 a 95) nahrazeny alaninovými a současně byl na požadované místo v sekvenci

proteinu zaveden cystein. Vzhledem k homodimerní povaze enzymu bylo též nutno spojit dvě monomerní jednotky HIV proteasy do jednořetězcového, kovalentně spojeného dimeru. Pro tyto účely byl mezi monomerní jednotky při klonování vložen dvoj- nebo čtyřaminokyselinový propojovací můstek. Veškeré konstrukty byly připraveny jak ve formě kódující proteolyticky aktivní enzym, tak ve formě kódující jeho variantu inaktivovanou mutací katalytického aspartátu D25N. Připraveno bylo tedy celkem dvanáct expresních konstruktů, šest z nich (*CF-HIV-1*, *CF*-HIV-1*, *K55CinCF-HIV-1*, *K55CinCF*-HIV-1*, *K55CinCF-HIV-1* a *K55CinCF*-HIV-1*) pro jednotlivé monomerní jednotky a šest dalších (*TWT-55*, *TWT-55**, *TWT-41*, *TWT-41**, *TWT-CL* a *TWT-CL**) pro kovalentně spojené dimery HIV proteasy. Správnost nukleotidové sekvence všech expresních konstruktů byla potvrzena sekvenováním DNA.

Aktivní formy kovalentně spojených dimerů HIV-1 proteasy TWT-55, TWT-41 a TWT-CL byly heterologně exprimovány v bakteriálním expresním systému, renaturovány a přečištěny. Podle analýzy SDS PAGE se zdá, že purifikační proces byl dostatečně efektivní pro produkci proteinu v čistotě odpovídající dalšímu použití vzorku. Celkové výtěžky proteinů pro TWT-55, TWT-41 a TWT-CL byly 3,6, 1,5 a 2,8 mg na litr bakteriální kultury. Nižší výtěžek u proteinu TWT-41 patrně vychází z odlišného způsobu purifikace, s chybějícím chromatografickým krokem, kde bylo využito zahušťování proteinu pomocí centrifugačních zahušťovacích filtrů. Právě na filtrech patrně došlo k největším ztrátám. Problémem purifikace však zůstává autoproteolytická degradace enzymu.

Při analýze proteinových nečistot ve vzorcích kovalentně spojených dimerů HIV proteasy byly všechny výraznější nečistoty právě jako produkty autoproteolýzy enzymu identifikovány pomocí elektropřenosu. Kovalentně spojené dimery jsou autoproteolyticky znatelně aktivnější než běžná HIV-1 proteasa divokého typu a při dlouhé renaturaci a neméně dlouhou dobu trvající purifikaci pomocí chromatografie za pokojové teploty dochází k výraznému autoproteolytickému štěpení. Řešením tohoto problému by mohlo být jednak použití vícekrokové dialýzy se zkrácenou celkovou dobou renaturace, dále též nahrazení FPLC systému pracujícího při pokojové teplotě systémem s chlazeným kolonovým prostorem a možná i přidání malého množství (0,1%) PEG 8000 do pufrů, v nichž se HIV proteasa nachází. V literatuře je toto aditivum popsáno jako autoproteolytický stabilizátor pro proteasu divokého typu.

Kovalentně spojené dimery HIV proteasy byly kineticky charakterizovány za použití spektrofotometrické eseje s chromogenním substrátem. Všechny purifikované kovalentně spojené dimery vykazovaly proteolytickou aktivitu vůči substrátu, jejich kinetické charakteristiky se od charakteristik proteasy divokého typu mírně lišily. U proteasy TWT-55 (kovalentně spojený dimer HIV proteasy obsahující mutace K55C, C67A a C95A) došlo ke zvýšení hodnoty Michaelisovy konstanty na 1,6-násobek a snížení hodnoty katalytické konstanty na polovinu. Hodnota katalytické účinnosti vyjádřená poměrem k_{cat}/K_m tak klesla přibližně na třetinu. Pro proteasu TWT-41 (obsahující cystein namísto lysinu v pozici 41) pak došlo ke snížení Michaelisovy konstanty na 80% a současnému snížení katalytické konstanty na třetinu. Katalytická účinnost pro proteasu TWT-41 tak klesla přibližně na polovinu. Pro obě tyto proteasy je možno změny v katalytické účinnosti vysvětlit aminokyselinovými změnami v oblasti pohyblivých chlopní, které se aktivně účastní procesu štěpení substrátu. Pozorované změny kinetických charakteristik však nebrání využití enzymů jako modelového systému pro studium komplexu inhibitoru GB-110 s HIV proteasou. Pro proteasu TWT-CL (kovalentně spojený dimer obsahující jediný cystein v oblasti linkeru mezi oběma podjednotkami) byla stanovena pouze Michaelisova konstanta, jejíž hodnota oproti protease divokého typu klesla přibližně na polovinu. Tento vliv lze vysvětlit pravděpodobnou stabilizací dimerní struktury kovalentním spojením. Katalytická konstanta prozatím nebyla stanovena, nejsou však očekávány její dramatické změny vzhledem k nepřítomnosti mutací v katalyticky důležitých částech sekvence proteasy. Pro detailnější popis vlivu jednotlivých aminokyselinových změn na proteolytickou funkci enzymu bude třeba v budoucnu připravit a kineticky charakterizovat i běžné homodimery proteas vzniklé z použitých monomerních jednotek.

Pro specifické spinové značení byla vybrána proteasa TWT-55, obsahující unikátní cystein v pozici 55. V téže pozici byla proteasa značena i ve studiích publikovaných v literatuře (zde však jako na obou monomerech značený dimer). Spinová značka MTSL byla přidána v padesátinásobném molárním nadbytku. Protokol pro spinové značení byl oproti publikovaným pracem značně zkrácen z důvodu minimalizace autoproteolýzy, na efektivitu značení však tento krok zdánlivě neměl vliv, jak je možno vidět z analýzy hmotnostní spektrometrií. Překážkou pro značení naopak byla přítomnost zbytků 2-merkptoethanolu, které se nepodařilo odstranit při převodu proteinu mezi uchovávacím pufrem a pufrem pro značení. Z rentgenových struktur, jež byly pro HIV proteasu vyřešeny

v laboratoři Dr. Pavlína Řezáčové, je nám známo, že merkaptoethanol v některých případech kovalentně modifikuje cysteinové postranní řetězce enzymu. Ačkoli bylo očekáváno, že vazba spinové značky by měla tuto kovalentní modifikaci rozrušit, získané výsledky ukazují, že se tak neděje. Řešením tohoto problému by mohlo být přidání protein nemodifikujícího efektivního redukčního činidla, například TCEP, ke směsi proteinu těsně před převodem do pufru pro značení pomocí odsolovací chromatografie.

Specificky spinově označený protein byl použit pro měření spektroskopie elektronové paramagnetické resonance v režimu fixní frekvence. Spektrální linie vzorku proteinu jsou oproti volné spinové značce v roztoku znatelně rozšířeny, což naznačuje anizotropii v pohybu spinové značky, s nejvyšší pravděpodobností způsobenou vazbou na protein. Jako kontrola bylo změřeno spektrum rozpouštědla odebraného ze vzorku při zahušťování, které prochází zahušťovací membránou jako odpad. I v rozpouštědle byl zaznamenán EPR signál, avšak znatelně menší než signál značeného proteinu. Vzorek proteinu tedy obsahoval i určitou frakci neodstraněné značky volně se pohybující v roztoku. Pro oba vzorky byla metodou porovnání dvojných integrálů s roztokem standardu spinové značky stanovena koncentrace spinové značky ve vzorku. Pro vzorek proteinu činila koncentrace $c = 2,0 \cdot 10^{-5}$ M, pro okolní rozpouštědlo pak $c = 1,0 \cdot 10^{-6}$ M. Po odečtení těchto hodnot pak koncentrace spinově značeného proteinu činila $c = 1,9 \cdot 10^{-5}$ M. Po porovnání hodnoty s koncentrací celkového proteinu stanovenou dle Bradfordové lze zjistit, že bylo spinově označeno přibližně 80% proteinu. Spinově označený protein by měl být v budoucnu použit pro strukturní charakterizaci komplexu inhibitoru GB-110 s HIV proteasou. Pro tuto aplikaci by mohla jistý problém představovat na protein nenavázaná značka vyskytující se volně v rozpouštědle. Pro její odstranění by proto bylo vhodné použít efektivnější chromatografické odsolování.

Pro strukturní charakterizaci komplexu inhibitoru GB-110 s HIV proteasou byl také navržen analog inhibitoru GB-110, ve kterém byl diamagnetický ion kobaltu komplexovaný karboranovými klecemi ve struktuře inhibitoru nahrazen paramagnetickým iontem železa. Pro posouzení efektu této záměny byl stanoven mechanismus inhibice modifikovaného inhibitoru vůči HIV-1 protease divokého typu. V mechanismu inhibice i inhibiční účinnosti nebyla pozorována oproti inhibitoru původnímu žádná závažná změna. Paramagnetické železo v molekule inhibitoru tak umožní sledování vazby látky GB-110 na HIV proteasu pomocí EPR spektroskopie.

7. Závěr

- Bylo navrženo a vytvořeno dvanáct expresních konstruktů kódujících modifikované HIV proteasy určené pro specifické spinové značení a analýzu EPR spektroskopii.
- Pět modifikovaných HIV proteas bylo exprimováno v bakteriálním expresním systému *Escherichia coli*. Byla izolována inkluzní tělíska a proteiny byly přečištěny. Výtěžek proteinů činil 3,6; 1,5; 2,8, 0,1 respektive 3,3 mg na litr bakteriální kultury.
- Tři kovalentně spojené proteasy byly kineticky charakterizovány. Ačkoli u dvou z nich došlo ke snížení katalytické účinnosti, ta zůstala dostatečná pro použití enzymů jako modelového systému pro charakterizaci jeho komplexu s akompetitivním inhibitorem GB-110.
- Jedna mutantní proteasa (TWT-55, kovalentně spojený dimer enzymu se zavedením unikátním cysteinem v poloze 55) byla specificky spinově označena, přítomnost spinové značky byla potvrzena hmotnostní spektrometrií.
- Bylo změřeno EPR spektrum spinově označené proteasy TWT-55, spektrum neslo znaky charakteristické pro změnu vlastností značky vyvolanou vazbou proteinu.
- Byla stanovena koncentrace spinově označeného proteinu a efektivita spinového značení. Označeno bylo přibližně 80% proteinu.
- Pro EPR měření byl navržen analog inhibitoru poskytující signál při EPR měření, modifikace neměla vliv na inhibiční charakteristiky molekuly.

8. Seznam zkratek

AIDS	syndrom získaného selhání imunity (z angl. acquired immunodeficiency syndrome)
AMP	ampicilin
bp	pár bazí
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
CA	kapsidový protein
CCD	charge-coupled device
CCR5	C-C chemokinový receptor typu 5
CD	cirkulární dichroismus
CD4+	diferenční skupina 4 (z angl. cluster of differentiation 4)
CD8+	diferenční skupina 8 (z angl. cluster of differentiation 8)
CFP	azurový fluorescenční protein (z angl. cyan fluorescence protein)
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typu 4
DOC	deoxycholát sodný
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
EC	Číslo EC (z angl. Enzyme Commission number)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
Env	povrchový polyprotein
<i>env</i>	gen pro povrchový polyprotein
EPR	elektronová paramagnetická resonance
FDA	americký úřad pro potraviny a léčiva (z angl. Food and Drug Administration)
FPLC	fast protein liquid chromatography
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
FT	Fourierova transformace
Gag	strukturní polyprotein
<i>gag</i>	gen kódující strukturní polyprotein
Gag-Pol	polyprotein vzniklý "pročtením se" ribosomu mezi čtecími rámci <i>gag</i> a <i>pol</i>
GRID	s homosexualitou spojený syndrom imunitní nedostatečnosti (z angl. Gay related immunodeficiency)
HAART	vysoce aktivní antiretroviróvá terapie (z angl. highly active antiretroviral therapy)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. human immunodeficiency virus)
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru pro dosažení 50% inhibice enzymové reakce
IgG	imunoglobulin G
IN	integráza
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid

ITC	isotermální titrační kalorimetrie
K_a	rovnovážná asociační konstanta
KAN	kanamycin
K_D	rovnovážná disociační konstanta
k_{cat}	katalytická konstanta enzymu
K_M	Michaelisova konstanta
k_{off}	rychlostní konstanta disociace
k_{on}	rychlostní konstanta asociace
K_i	inhibiční konstanta
LB	lysogenní médium (z angl. lysogeny broth, též Luria-Bertani broth)
LTR	úseky dlouhých koncových opakování v provirové DNA (z angl. long terminal repeat)
MA	matrixový protein
MALDI	matricí zprostředkovaná laserová desorpční ionizace
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
MTSL	S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate)
MWCO	limit molekulových hmotností (z angl. molecular weight cut off)
NC	nukleokapsidový protein
Nef	negativní regulační faktor
<i>nef</i>	gen pro negativní regulační faktor
NMR	nukleární magnetická resonance
NNRTI	nenukleosidové inhibitory reversní transkriptasy
NRTI	nukleosidové inhibitory reversní transkriptasy
OD	optická hustota (z angl. optical density)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa
PBS	fosfátový pufru (z angl. phosphate buffer solution)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
<i>pol</i>	gen kódující funkční polyprotein funkčních enzymů viru
PR	proteasa
Rev	regulátor exprese virionu
<i>rev</i>	gen pro regulátor exprese virionu
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reversní transkriptasa
RT	pokojová teplota (z angl. room temperature)
ru	relativní jednotka fluorescence
SDS	dodecylsulfát sodný
SPR	resonance povrchového plasmonu (z angl. surface plasmon resonance)

Tat	Transaktivátor transkripce
<i>tat</i>	gen kódující transaktivátor transkripce
TBS	Tris-pufr (z angl. Tris buffer solution)
TCEP	<i>tris</i> (2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
TM	transmembránový protein
ToF	čas letu (z angl. time of flight)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminoethan
TWT	kovalentně spojený dimer HIV proteasy divokého typu (z angl. tethered wild type)
SU	povrchový protein
ÚACH	Ústav anorganické chemie Akademie věd České Republiky
UK	Universita Karlova
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České Republiky
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
Vif	virový faktor infekivity
<i>vif</i>	gen kódující virový faktor infekivity
VIS	elektromagnetické záření viditelné oblasti
V_{\max}	limitní rychlost enzymové reakce
Vpr	virový protein R
<i>vpr</i>	gen kódující virový protein R
Vpu	virový protein U
<i>vpu</i>	gen kódující virový protein U
YFP	žlutý fluorescenční protein (z angl. yellow fluorescent protein)

9. Literatura

1. Centers for Disease Control (CDC): MMWR Morb Mortal Wkly Rep **30**, 250-252 (1981)
2. Centers for Disease Control (CDC): MMWR Morb Mortal Wkly Rep **31**, 305-307 (1982)
3. Centers for Disease Control (CDC): MMWR Morb Mortal Wkly Rep **31**, 507-8, 513-4 (1982)
4. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L.: Science **220**, 868-871 (1983)
5. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., Popovic, M.: Science **220**, 865-867 (1983)
6. Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C.: Science **233**, 343-346 (1986)
7. Alimonti, J.B., Ball, T.B., Fowke, K.R.: J Gen Virol **84**, 1649-1661 (2003)
8. Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y., Ho, D.D.: J Virol **67**, 1772-1777 (1993)
9. Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., Kingsley, L.A.: Science **272**, 1167-1170 (1996)
10. UNAIDS: Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic: 2010, UN Joint Programme on HIV/AIDS, Ženeva Švýcarsko (2010)
11. Knipe, D. Howley, P.: Fields virology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA (2007)
12. Frankel, A.D., Young, J.A.: Annu Rev Biochem **67**, 1-25 (1998)
13. Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Kelly, B.N., Hua, Y., Whitby, F.G., Stout, C.D., Sundquist, W.I., Hill, C.P., Yeager, M.: Cell **137**, 1282-1292 (2009)
14. Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M.: Nature **469**, 424-427 (2011)
15. Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K.: Nature **313**, 277-284 (1985)
16. Feinberg, M.B., Jarrett, R.F., Aldovini, A., Gallo, R.C., Wong-Staal, F.: Cell **46**, 807-817 (1986)

17. Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., Sundquist, W.I.: *Curr Opin Struct Biol* **18**, 203-217 (2008)
18. Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., Bushman, F.: *Cell* **110**, 521-529 (2002)
19. Coffin, J.M., Hughes, S. Varmus, H.: *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury USA (1997)
20. Greene, W.C., Peterlin, B.M.: *Nat Med* **8**, 673-680 (2002)
21. Barouch, D.H.: *Nature* **455**, 613-619 (2008)
22. Ledergerber, B., Egger, M., Opravil, M., Telenti, A., Hirschel, B., Battegay, M., Vernazza, P., Sudre, P., Flepp, M., Furrer, H., Francioli, P., Weber, R.: *Lancet* **353**, 863-868 (1999)
23. Clercq, E.D.: *Int J Antimicrob Agents* **33**, 307-320 (2009)
24. Seelmeier, S., Schmidt, H., Turk, V., von der Helm, K.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6612-6616 (1988)
25. Wlodawer, A., Vondrášek, J.: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 249-284 (1998)
26. Mastrolorenzo, A., Rusconi, S., Scozzafava, A., Barbaro, G., Supuran, C.T.: *Curr Med Chem* **14**, 2734-2748 (2007)
27. Wlodawer, A., Miller, M., Jaskólski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J., Kent, S.B.: *Science* **245**, 616-621 (1989)
28. Stříšovský, K., Tessmer, U., Langner, J., Konvalinka, J., Kräusslich, H.G.: *Protein Sci* **9**, 1631-1641 (2000)
29. Tözsér, J., Bláha, I., Copeland, T.D., Wondrak, E.M., Oroszlan, S.: *FEBS Lett* **281**, 77-80 (1991)
30. Kožíšek, M., Cígler, P., Lepšík, M., Fanfrlík, J., Řezáčová, P., Brynda, J., Pokorná, J., Plešek, J., Grüner, B., Šašková, K.G., Václavíková, J., Král, V., Konvalinka, J.: *J Med Chem* **51**, 4839-4843 (2008)
31. Vega, S., Kang, L.-W., Velazquez-Campoy, A., Kiso, Y., Amzel, L.M., Freire, E.: *Proteins* **55**, 594-602 (2004)
32. FDA: **Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection**, webová adresa: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm> platné k: 8/2011
33. Zhang, Z.Y., Poorman, R.A., Maggiora, L.L., Heinrikson, R.L., Kézdy, F.J.: *J Biol Chem* **266**, 15591-15594 (1991)

34. Schramm, H.J., de Rosny, E., Reboud-Ravaux, M., Büttner, J., Dick, A., Schramm, W.: Biol Chem **380**, 593-596 (1999)
35. Bartoňová, V., Král, V., Siegllová, I., Brynda, J., Fábry, M., Hořejší, M., Kožíšek, M., Šašková, K.G., Konvalinka, J., Sedláček, J., Řezáčová, P.: Antiviral Res **78**, 275-277 (2008)
36. Broglia, R.A., Provasi, D., Vasile, F., Ottolina, G., Longhi, R., Tiana, G.: Proteins **62**, 928-933 (2006)
37. Judd, D.A., Nettles, J.H., Nevins, N., Snyder, J.P., Liotta, D.C., Tang, J., Ermolieff, J., Schinazi, R.F., Hill, C.L.: J Am Chem Soc **123**, 886-897 (2001)
38. Sperka, T., Pitlik, J., Bagossi, P., Tözsér, J.: Bioorg Med Chem Lett **15**, 3086-3090 (2005)
39. Weber, I.T.: J Biol Chem **265**, 10492-10496 (1990)
40. Jordan, S.P., Zugay, J., Darke, P.L., Kuo, L.C.: J Biol Chem **267**, 20028-20032 (1992)
41. Darke, P.L., Jordan, S.P., Hall, D.L., Zugay, J.A., Shafer, J.A., Kuo, L.C.: Biochemistry **33**, 98-105 (1994)
42. Xie, D., Gulnik, S., Gustchina, E., Yu, B., Shao, W., Qoronfleh, W., Nathan, A., Erickson, J.W.: Protein Sci **8**, 1702-1707 (1999)
43. Mildner, A.M., Rothrock, D.J., Leone, J.W., Bannow, C.A., Lull, J.M., Reardon, I.M., Sarcich, J.L., Howe, W.J., Tomich, C.S., Smith, C.W.: Biochemistry **33**, 9405-9413 (1994)
44. Grant, S.K., Deckman, I.C., Culp, J.S., Minnich, M.D., Brooks, I.S., Hensley, P., Debouck, C., Meek, T.D.: Biochemistry **31**, 9491-9501 (1992)
45. Todd, M.J., Semo, N., Freire, E.: J Mol Biol **283**, 475-488 (1998)
46. Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M.: J Antibiot (Tokyo) **23**, 259-262 (1970)
47. Todd, M.J., Freire, E.: Proteins **36**, 147-156 (1999)
48. Ladbury, J. Doyle, M.: Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological sciences, John Wiley and Sons, West Sussex, Anglie (2004)
49. Velazquez-Campoy, A., Todd, M.J., Freire, E.: Biochemistry **39**, 2201-2207 (2000)
50. Todd, M.J., Luque, I., Velázquez-Campoy, A., Freire, E.: Biochemistry **39**, 11876-11883 (2000)
51. Velazquez-Campoy, A., Freire, E.: J Cell Biochem Suppl **Suppl 37**, 82-88 (2001)

52. Velazquez-Campoy, A., Kiso, Y., Freire, E.: Arch Biochem Biophys **390**, 169-175 (2001)
53. Muzammil, S., Ross, P., Freire, E.: Biochemistry **42**, 631-638 (2003)
54. Ohtaka, H., Schön, A., Freire, E.: Biochemistry **42**, 13659-13666 (2003)
55. Kerman, K., Mahmoud, K.A., Kraatz, H.-B.: Chem Commun (Camb) , 3829-3831 (2007)
56. Mahmoud, K.A., Luong, J.H.T.: Anal Chem **80**, 7056-7062 (2008)
57. Mahmoud, K.A., Hrapovic, S., Luong, J.H.T.: ACS Nano **2**, 1051-1057 (2008)
58. Craig, J.C., Duncan, I.B., Hockley, D., Grief, C., Roberts, N.A., Mills, J.S.: Antiviral Res **16**, 295-305 (1991)
59. Vacca, J.P., Dorsey, B.D., Schleif, W.A., Levin, R.B., McDaniel, S.L., Darke, P.L., Zugay, J., Quintero, J.C., Blahy, O.M., Roth, E.: Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 4096-4100 (1994)
60. James, J.S.: AIDS Treat News , 6 (1997)
61. Gatell, J.M.: J HIV Ther **6**, 95-99 (2001)
62. Markgren, P.O., Hämäläinen, M., Danielson, U.H.: Anal Biochem **265**, 340-350 (1998)
63. Markgren, P.-O., Schaal, W., Hämäläinen, M., Karlén, A., Hallberg, A., Samuelsson, B., Danielson, U.H.: J Med Chem **45**, 5430-5439 (2002)
64. Shuman, C.F., Hämäläinen, M.D., Danielson, U.H.: J Mol Recognit **17**, 106-119 (2004)
65. Shuman, C.F., Markgren, P.O., Hämäläinen, M., Danielson, U.H.: Antiviral Res **58**, 235-242 (2003)
66. Sonksen, C., Roepstorff, P., Markgren, P., Danielson, U., Hamalainen, M., Jansson, O.: Eur J Mass Spectrom **7**, 385-391 (2001)
67. Alterman, M., Sjöbom, H., Säfsten, P., Markgren, P.O., Danielson, U.H., Hämäläinen, M., Löfås, S., Hultén, J., Classon, B., Samuelsson, B., Hallberg, A.: Eur J Pharm Sci **13**, 203-212 (2001)
68. Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B.K., Toth, M.V., Marshall, G.R., Clawson, L., Selk, L., Kent, S.B., Wlodawer, A.: Science **246**, 1149-1152 (1989)
69. KEGG: **KEGG database**, webová adresa: http://www.genome.jp/dbget-bin/get_linkdb?-t+11+ec:3.4.23.16 platné k: 8/2011
70. Mastrolorenzo, A., Rusconi, S., Scozzafava, A., Supuran, C.T.: Expert Opin Ther Pat **16**, 1067-1091 (2006)

71. Kožíšek, M., Bray, J., Řezáčová, P., Šašková, K., Brynda, J., Pokorná, J., Mammano, F., Rulišek, L., Konvalinka, J.: *J Mol Biol* **374**, 1005-1016 (2007)
72. Šašková, K.G., Kožíšek, M., Lepšík, M., Brynda, J., Řezáčová, P., Václavíková, J., Kagan, R.M., Machala, L., Konvalinka, J.: *Protein Sci* **17**, 1555-1564 (2008)
73. Šašková, K.G., Kožíšek, M., Řezáčová, P., Brynda, J., Yashina, T., Kagan, R.M., Konvalinka, J.: *J Virol* **83**, 8810-8818 (2009)
74. Kožíšek, M., Šašková, K.G., Řezáčová, P., Brynda, J., van Maarseveen, N.M., Jong, D.D., Boucher, C.A., Kagan, R.M., Nijhuis, M., Konvalinka, J.: *J Virol* **82**, 5869-5878 (2008)
75. Ghosh, A.K., Chapsal, B.D., Weber, I.T., Mitsuya, H.: *Acc Chem Res* **41**, 78-86 (2008)
76. Geohegan, K.F., Spencer, R.W., Danley, D.E., Contillo, L.G., Andrews, G.C.: *FEBS Lett* **262**, 119-122 (1990)
77. Hu, K., Clément, J.-F., Abrahamyan, L., Strelbe, K., Bouvier, M., Kleiman, L., Mouland, A.J.: *J Virol Methods* **128**, 93-103 (2005)
78. Ghosh, A.K., Leshchenko, S., Noetzel, M.: *J Org Chem* **69**, 7822-7829 (2004)
79. Koh, Y., Matsumi, S., Das, D., Amano, M., Davis, D.A., Li, J., Leschenko, S., Baldrige, A., Shioda, T., Yarchoan, R., Ghosh, A.K., Mitsuya, H.: *J Biol Chem* **282**, 28709-28720 (2007)
80. Cavanagh, J.: *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*, Academic Press, Burlington USA (2007)
81. Yamazaki, T., Nicholson, L.K., Torchia, D.A., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Wingfield, P.T., Domaille, P.J., Campbell-Burk, S.: *Eur J Biochem* **219**, 707-712 (1994)
82. Yamazaki, T., Hinck, A.P., Wang, Y.X., Nicholson, L.K., Torchia, D.A., Wingfield, P., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Chang, C.H., Domaille, P.J., Lam, P.Y.: *Protein Sci* **5**, 495-506 (1996)
83. Freedberg, D., Wang, Y., Stahl, S., Kaufman, J., Wingfield, P., Kiso, Y., Torchia, D.: *J Am Chem Soc* **120**, 7916-7923 (1998)
84. Wang, Y.X., Freedberg, D.I., Grzesiek, S., Torchia, D.A., Wingfield, P.T., Kaufman, J.D., Stahl, S.J., Chang, C.H., Hodge, C.N.: *Biochemistry* **35**, 12694-12704 (1996)
85. Ishima, R., Ghirlando, R., Tözsér, J., Gronenborn, A.M., Torchia, D.A., Louis, J.M.: *J Biol Chem* **276**, 49110-49116 (2001)

86. Ishima, R., Torchia, D.A., Lynch, S.M., Gronenborn, A.M., Louis, J.M.: *J Biol Chem* **278**, 43311-43319 (2003)
87. Ishima, R., Freedberg, D.I., Wang, Y.X., Louis, J.M., Torchia, D.A.: *Structure* **7**, 1047-1055 (1999)
88. Freedberg, D.I., Ishima, R., Jacob, J., Wang, Y.-X., Kustanovich, I., Louis, J.M., Torchia, D.A.: *Protein Sci* **11**, 221-232 (2002)
89. Atkins, P. DePaula, J.: *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, Velká Británie (2006)
90. Hubbell, W.L., Cafiso, D.S., Altenbach, C.: *Nat Struct Biol* **7**, 735-739 (2000)
91. Fanucci, G.E., Cafiso, D.S.: *Curr Opin Struct Biol* **16**, 644-653 (2006)
92. Altenbach, C., Yang, K., Farrens, D.L., Farahbakhsh, Z.T., Khorana, H.G., Hubbell, W.L.: *Biochemistry* **35**, 12470-12478 (1996)
93. Merianos, H.J., Cadieux, N., Lin, C.H., Kadner, R.J., Cafiso, D.S.: *Nat Struct Biol* **7**, 205-209 (2000)
94. Mchaourab, H.S., Lietzow, M.A., Hideg, K., Hubbell, W.L.: *Biochemistry* **35**, 7692-7704 (1996)
95. Mchaourab, H.S., Oh, K.J., Fang, C.J., Hubbell, W.L.: *Biochemistry* **36**, 307-316 (1997)
96. Galiano, L., Blackburn, M.E., Veloro, A.M., Bonora, M., Fanucci, G.E.: *J Phys Chem B* **113**, 1673-1680 (2009)
97. Jeschke, G.: *Chemphyschem* **3**, 927-932 (2002)
98. Pannier, M., Veit, S., Godt, A., Jeschke, G., Spiess, H.W.: *J Magn Reson* **142**, 331-340 (2000)
99. Chiang, Y.-W., Borbat, P.P., Freed, J.H.: *J Magn Reson* **172**, 279-295 (2005)
100. Jeschke, G., Polyhach, Y.: *Phys Chem Chem Phys* **9**, 1895-1910 (2007)
101. Shao, W., Everitt, L., Manchester, M., Loeb, D.D., Hutchison, C.A., Swanstrom, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2243-2248 (1997)
102. Galiano, L., Bonora, M., Fanucci, G.E.: *J Am Chem Soc* **129**, 11004-11005 (2007)
103. Kempf, D.J., Marsh, K.C., Denissen, J.F., McDonald, E., Vasavanonda, S., Flentge, C.A., Green, B.E., Fino, L., Park, C.H., Kong, X.P.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2484-2488 (1995)
104. Ding, F., Layten, M., Simmerling, C.: *J Am Chem Soc* **130**, 7184-7185 (2008)

105. Galiano, L., Ding, F., Veloro, A.M., Blackburn, M.E., Simmerling, C., Fanucci, G.E.: *J Am Chem Soc* **131**, 430-431 (2009)
106. Torbeev, V.Y., Raghuraman, H., Mandal, K., Senapati, S., Perozo, E., Kent, S.B.H.: *J Am Chem Soc* **131**, 884-885 (2009)
107. Blackburn, M.E., Veloro, A.M., Fanucci, G.E.: *Biochemistry* **48**, 8765-8767 (2009)
108. Kear, J.L., Blackburn, M.E., Veloro, A.M., Dunn, B.M., Fanucci, G.E.: *J Am Chem Soc* **131**, 14650-14651 (2009)
109. Endo, Y., Iijima, T., Amakoshi, Y., Kubo, A., Itai, A.: *Bioorg Med Chem Lett* **9**, 3313-3318 (1999)
110. Endo, Y., Iijima, T., Yaguchi, K., Kawachi, E., Inoue, N., Kagechika, H., Kubo, A., Itai, A.: *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 1307-1311 (2001)
111. Valliant, J., Guenther, K., King, A., Morel, P., Schaffer, P., Sogbein, O., Stephenson, K.: *Coord Chem Rev* **232**, 173-230 (2002)
112. Bregadze, V.I., Sivaev, I.B., Glazun, S.A.: *Anticancer Agents Med Chem* **6**, 75-109 (2006)
113. Cígler, P., Kožíšek, M., Řezáčová, P., Brynda, J., Otwinowski, Z., Pokorná, J., Plešek, J., Grüner, B., Dolečková-Marešová, L., Máša, M., Sedláček, J., Bodem, J., Kräusslich, H.-G., Král, V., Konvalinka, J.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15394-15399 (2005)
114. Řezáčová, P., Pokorná, J., Brynda, J., Kožíšek, M., Cígler, P., Lepšík, M., Fanfrlík, J., Řezáč, J., Šašková, K.G., Siegllová, I., Plešek, J., Šícha, V., Grüner, B., Oberwinkler, H., Sedláček, J., Kräusslich, H.-G., Hobza, P., Král, V., Konvalinka, J.: *J Med Chem* **52**, 7132-7141 (2009)
115. Pokorná, J.: Nepublikované výsledky (2010)
116. Stratagene: **QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.**, webová adresa: <http://www.stratagene.com/manuals/200519.pdf> platné k: 8/2011
117. ZymoResearch: **Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit**, webová adresa: <http://www.zymoresearch.com/zrc/pdf/D4036i.pdf> platné k: 8/2011
118. QIAGEN: **QIAquick® Spin Handbook. Sample \& Assay Technologies**, webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000252> platné k: 8/2011
119. Bradford, M.M.: *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976)

120. Richards, A.D., Phylip, L.H., Farmerie, W.G., Scarborough, P.E., Alvarez, A., Dunn, B.M., Hirel, P.H., Konvalinka, J., Strop, P., Pavlickova, L.: J Biol Chem **265**, 7733-7736 (1990)
121. Menten, L., Michaelis, M.: Biochem Z **49**, 333-369 (1913)
122. Miller, J.F., Andrews, C.W., Brieger, M., Furfine, E.S., Hale, M.R., Hanlon, M.H., Hazen, R.J., Kaldor, I., McLean, E.W., Reynolds, D., Sammond, D.M., Spaltenstein, A., Tung, R., Turner, E.M., Xu, R.X., Sherrill, R.G.: Bioorg Med Chem Lett **16**, 1788-1794 (2006)
123. Erithacus: **Grafit 5.0.4**, webová adresa: <http://www.erithacus.com> platné k: 9/2011
124. OriginLab: **Origin 8.0**, webová adresa: <http://www.originlab.com/index.aspx?go=Products/OriginPro> platné k: 8/2011