

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Mikrokalorimetrie jako metoda studia interakcí proteinů  
s ligandy**

**Microcalorimetry as a method to analyze protein interactions  
with ligands**

*Bakalářská práce*

Jindřich Durčák

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 23. května 2013

.....

Jindřich Durčák

## Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za příležitost k vypracování bakalářské práce v jeho laboratoři, za vedení této práce a za jeho vřelý přístup již od našeho prvního setkání.

Dále patří můj velký dík RNDr. Milanovi Kožíškovi, Ph.D. za teoretické i praktické objasnění laboratorních postupů, za mnoho odborných rad a také za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Můj dík také samozřejmě patří mé rodině a přítelkyni za bezmeznou podporu jak v rámci studia, tak i mimo něj.

# Obsah

Poděkování.....	3
Seznam použitých zkratk ..... 6	6
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1. Úvod.....	9
1.1 Mikrokalorimetrie .....	9
1.1.1 ITC (isothermální titrační kalorimetrie) .....	9
1.1.1.1 Technické aspekty ITC.....	10
1.1.1.2 Změna enthalpie .....	12
1.1.1.3 Změna entropie .....	13
1.1.1.4 Změna tepelné kapacity vazby .....	13
1.1.1.5 Vliv protonace .....	14
1.1.1.6 Optimalizace vazby a kompenzace entropických a enthalpických změn ....	15
1.1.2 Využití mikrokalorimetrie při vývoji léčiv .....	16
1.1.2.1 Inhibitory proteasy viru HIV.....	17
1.2 Skládání viru HIV jako cíl terapeutického zásahu .....	20
1.2.1 HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti .....	20
1.2.1.1 Struktura HIV .....	20
1.2.1.2 Replikační cyklus HIV .....	21
1.2.1.3 Kapsidový protein viru HIV (CA).....	23
1.2.2 Skládání viru HIV .....	24
1.2.3 Inhibitory skládání viru HIV.....	28
1.2.3.1 CAP – 1 .....	28
1.2.3.2 CAI .....	28
1.2.3.3 NYAD – 1 .....	30
1.2.3.3 NYAD – 13 .....	31
2. Cíle bakalářské práce .....	32
3. Materiál a metody .....	33
3.1 Použitý materiál a chemikálie.....	33

3.2 Přístroje.....	34
3.3 Bakteriální kmeny, vektory a média .....	34
3.4 Ostatní materiál.....	34
3.5 Transformace bakterií.....	35
3.6 Exprese kapsidového proteinu v <i>E. coli</i> .....	35
3.7 Precipitace síranem amonným .....	36
3.8 Iontoměničová chromatografie .....	37
3.9 Gelová permeační chromatografie .....	37
3.10 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS .....	38
3.11 Určení koncentrace proteinů .....	38
3.12 Isothermální titrační kalorimetrie .....	38
4. Výsledky .....	40
4.1 Exprese proteinů .....	40
4.2 Purifikace proteinů.....	41
4.2.1 Precipitace síranem amonným .....	41
4.2.2 Iontoměničová chromatografie a gelová permeační chromatografie .....	42
4.3 Výsledky purifikace .....	44
4.4 Termodynamické parametry vazby obou variant CA na CAI .....	44
5. Diskuse .....	48
6. Závěr.....	50
7. Seznam použité literatury .....	51

## Seznam použitých zkratek

AIDS	syndrom získaného selhání imunity
APS	peroxodisíran amonný
CA	kapsidový protein viru HIV
CA <sub>CTD</sub>	C – terminální doména kapsidového proteinu
CA <sub>NTD</sub>	N – terminální doména kapsidového proteinu
CAI	kapsidový inhibitor skládání viru
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCR5	chemokinový koreceptor
CD4	receptor pomocných T – lymfocytů
CXCR4	chemokinový koreceptor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
Gag	polyprotein viru HIV
Gag – Pol	polyprotein viru HIV
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
ITC	isothermální titrační kalorimetrie
MHR	hlavní homologní region
NMR	nukleární magnetická resonance
OD	optická hustota
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsíran sodný
SDS – PAGE	elektroforéza v prostředí SDS

## Abstrakt

Interakce proteinů s vazebnými partnery se vyskytují u všech živých organismů, takřka u každého buněčného procesu. Studium proteinových interakcí proto tvoří významnou část biochemického výzkumu. Ukazuje se, že ještě cennější, než získání rovnovážných konstant těchto dějů, je určení hodnot jednotlivých energetických složek, tedy změn enthalpie a entropie. Pro termodynamickou analýzu vzniku komplexu vazebných partnerů, tedy pro určení hodnot změn entropie a enthalpie, lze využít isothermální titrační kalorimetrii (ITC). Mikrokalorimetrie se tak stává důležitou optimalizační technikou při vývoji nových léčiv, například protivirových látek.

Přestože je virus HIV známý přes 30 let, intenzivní výzkum nepřinesl ani vakcínu ani lék, který by trvale vyléčil pacienty. Bylo schváleno již 26 léků, z nichž většina cílí virové enzymy reversní transkriptasu a proteasu. Antiretrovirální léčba brání množení HIV a udržuje v chodu imunitní systém, avšak dlouhodobé užívání vede k resistenci vůči farmakům, která je způsobena mutacemi v cílových proteinech. Jeden z poměrně nových cílů terapeutického zásahu je formování kapsidy při vzniku nových virionů. Při skládání kapsidy dochází k mnoha protein – proteinovým interakcím, které jsou nezbytné při tvorbě infekčních virových částic.

Jako účinný inhibitor skládání kapsidy *in vitro* byl objeven peptid CAI, který se váže na C – terminální doménu kapsidového proteinu. V rámci této bakalářské práce byla provedena pomocí ITC termodynamická analýza vazby CAI na kapsidový protein a také jeho mutantní variantu CA Y169A. Právě tyrosin v pozici 169 se podílí na vazbě peptidu, a proto by tato bodová mutace v sekvenci kapsidového proteinu měla mít za následek změny termodynamických parametrů vzniku komplexu oproti komplexu CAI s nemutovaným kapsidovým proteinem.

*Klíčová slova:* isothermální proteinová mikrokalorimetrie; disociační konstanta; protein – proteinové interakce; kapsid HIV; skládání virových částic

## Abstract

The interactions of proteins with their binding partners occur in every living organisms, in almost every cell process. Therefore the exploration of protein interactions forms significant part of biochemical research. It appears that even more valuable information than the value of equilibrium constants of these interactions is determination of individual energy components – changes in enthalpy and entropy. Thermodynamic analysis by isothermal titration calorimetry (ITC) can determine the changes in entropy and enthalpy caused by formation of complex of binding partners. Microcalorimetry is also an important optimization technique in development of new drugs, for example antiretrovirals.

Despite HIV is a virus known for over 30 years, intensive research has neither brought vaccine nor drug that would permanently cure patients. Already 26 drugs were approved, most of them target viral enzymes reverse transcriptase and protease. Antiretroviral treatment prevents the propagation of HIV and maintains immune system, but long – term use leads to resistance against drugs, which is caused by mutations in the target proteins. One of relatively new targets of therapeutic intervention is capsid core formation of during assembly of new virions. During the assembly many protein – protein interactions take place, which are necessary for production of infectious virions.

Peptide CAI, that binds to the C – terminal domain of capsid protein, has been identified as an effective inhibitor of HIV assembly *in vitro*. Within this bachelor thesis thermodynamic analyses of CAI binding to the capsid protein and its mutant variant CA Y169A were performed by ITC. The tyrosine at position 169 is involved in binding to the peptide, so this mutation in sequence of the capsid protein should lead into the changes in thermodynamic parameters of complex formation when compared to the capsid protein without mutations. (In Czech)

*Key words:* isothermal protein microcalorimetry; dissociation constant; protein – protein interactions; HIV capsid; viral particle assembly



# 1. Úvod

## 1.1 Mikrokolorimetrie

Kalorimetrie je fyzikální metoda, která je používána již od 17. století a která charakterizuje tepelné zabarvení přírodních dějů [1]. Pomocí této techniky lze studovat biologické molekuly a jejich vzájemné interakce [2]. Jelikož je v mikrokolorimetrii vzhledem k měřenému množství tepelných změn nutná vysoká citlivost kalorimetrů, výrazný rozvoj této vědecké disciplíny nastal až v druhé polovině 20. století, kdy došlo k velkému pokroku v elektronickém průmyslu, vývoji materiálů a technologiích, které snímají teplotu.

ITC (z angl. *isothermal titration calorimetry*) a DSC (z angl. *differential scanning calorimetry*) jsou mikrokolorimetrické techniky, které se dnes běžně využívají v biochemické laboratoři [3]. Jelikož cílem této bakalářské práce je charakterizace interakce protein – peptid a ke studiu vzniku komplexu biomolekul se využívá ITC, bude dále popsána pouze tato metoda.

### 1.1.1 ITC (*isothermální titrační kalorimetrie*)

ITC je metoda, která měří tepelnou změnu při tvorbě komplexu zkoumaných molekul za konstantní teploty [3]. Při experimentu je roztok ligandu titrován do roztoku makromolekuly. Proces tvorby komplexu popisuje následující rovnice:



kde  $M$  označuje makromolekulu,  $L$  ligand a  $ML$  vytvořený komplex.

Termodynamické parametry, které popisují tvorbu komplexu, jsou stechiometrie interakce ligandu a makromolekuly ( $n$ ), rovnovážná asociační konstanta ( $K_a$ ), změna Gibbsovy volné energie ( $\Delta G$ ), změna enthalpie ( $\Delta H$ ), změna entropie ( $\Delta S$ ) a změna tepelné kapacity vazby ( $\Delta C_p$ ) [4]. Při jednom měření lze přímo získat hodnoty asociační konstanty, stechiometrie interakce a změny enthalpie.

Začátkem většiny termodynamických studií je experimentální určení rovnovážné asociační konstanty ( $K_a$ ) [2]. Definice rovnovážné asociační konstanty ( $K_a$ ) je uvedena v následující rovnici:

$$K_a = [ML]/([M] \cdot [L]) \quad (2)$$

kde  $[ML]$  vyjadřuje rovnovážnou koncentraci komplexu,  $[M]$  koncentraci makromolekuly a  $[L]$  koncentraci ligandu. Hodnota rovnovážné asociační konstanty ( $K_a$ ) je převrácenou hodnotou rovnovážné disociační konstanty ( $K_d$ ), která je častěji užívaným výrazem.

Změnu Gibbsovy volné energie ( $\Delta G$ ) je možné vypočítat podle standardního termodynamického vztahu:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_a \quad (3)$$

kde  $T$  je hodnota absolutní teploty v Kelvinech a  $R$  je univerzální plynová konstanta.

Změnu entropie ( $\Delta S$ ) pak lze dopočítat podle základního termodynamického vztahu, uvedeného v následující rovnici:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (4)$$

Definice změny tepelné kapacity vazby ( $\Delta C_p$ ) je uvedena tímto vztahem:

$$\Delta C_p = d(\Delta H)/dT \quad (5)$$

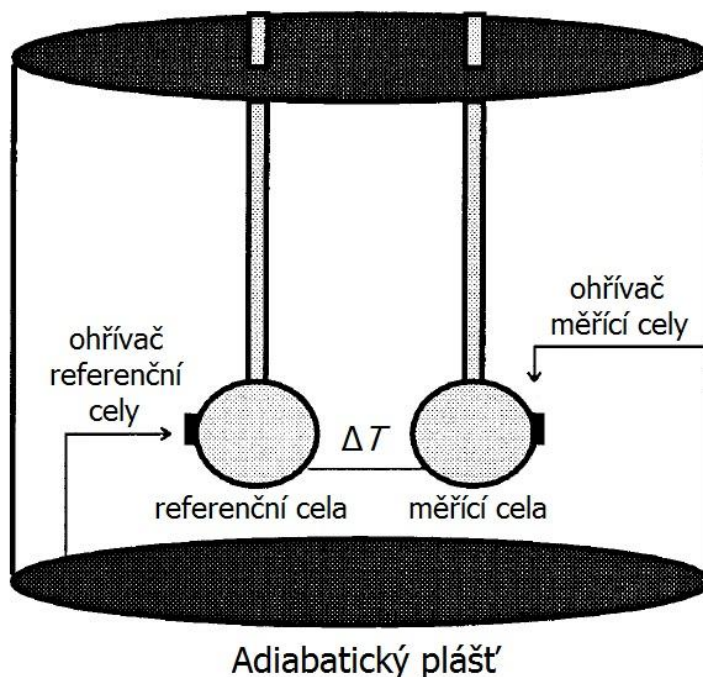
K určení změny tepelné kapacity vazby ( $\Delta C_p$ ) pomocí ITC je proto nezbytné provést titrační experimenty při více teplotách.

#### **1.1.1.1 Technické aspekty ITC**

Součástí mikrokolorimetru jsou dvě identické cely (obvykle o objemu 0,5 – 1,5 ml), které jsou vyrobeny z materiálu se značnou tepelnou vodivostí (např. zlato, slitina niklu, molybden a chromu – Hasteloy, slitina tantalu a wolframu – Tantaloy 61) [4]. V první, měřící cele, je roztok makromolekuly, do které je během experimentu titrován roztok ligandu pomocí automatické byrety. Druhá, referenční cela, obsahuje pufr nebo

vodu. Obě cely jsou umístěny v adiabatickém plášti. Teplotní rozdíly mezi oběma celami a také mezi celami a pláštěm snímají citlivé termočlánky.

Základní schéma kalorimetru, pomocí něhož jsou určeny termodynamické parametry sledované reakce, je uvedeno na *Obrázku 1*.



**Obrázek 1:** Schéma ITC kalorimetru. Upraveno podle [4].

Při interakci ligandu s makromolekulou teplo buď vzniká, nebo se spotřebovává, popřípadě k tepelné změně nedochází. Podle charakteru interakce je pak elektrickému obvodu s ohřívčem měřící cely buď dodána, nebo odebrána elektrická energie k zachování stejné teploty, kterou má referenční cely. Závislost výkonu na čase při udržování stejné teploty v obou celách poskytuje přímá výstupní data experimentu.

Přestože je ITC vysoce citlivá metoda vzhledem k přesnému měření teploty, má i své limity. Pokud je hodnota asociační konstanty velmi vysoká nebo naopak velmi malá, nelze ji určit pomocí ITC z jednoho měření [3]. V případě velmi vysoké  $K_a$  však lze přesně určit enthalpickou změnu. Pokud se makromolekula v měřící cele nejdříve naváže na jiný ligand, který má nízkou hodnotu asociační konstanty a až poté je tento slabý komplex titrován ligandem, který má vysokou hodnotu asociační konstanty, dochází ke kompetitivní interakci a následným přepočtem lze určit hodnotu  $K_a$  silné interakce [5].

Dalším limitem metody je vysoká spotřeba interagujících látek. Při měření ITC je nutné použít koncentraci biomolekuly v reakční cele dle vztahu popsaného v *Rovnici 6*, ve kterém parametr  $C$  představuje bezrozměrnou hodnotu, která charakterizuje vazebnou isotermu [6].

$$C = n \cdot K_a \cdot [M] \quad (6)$$

Podle zkušeností z analýz dat je zapotřebí, aby hodnota  $C$  byla v ideálním případě mezi 1 – 500 [2]. V praxi to znamená, že pokud je stechiometrie interakce 1:1 a  $K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$ , což představuje středně silnou interakci, měla by být koncentrace makromolekuly v cele v rozmezí 10  $\mu\text{M}$  – 5 mM. Pokud je objem měřicí cely 1,5 ml, pak je v každém experimentu spotřebováno 15 nmol – 7,5  $\mu\text{mol}$  biomolekuly, což může být u vzácných, nestabilních nebo špatně rozpustných biomolekul problém.

#### 1.1.1.2 Změna enthalpie

Hodnota změny enthalpie, získaná při experimentu, odpovídá celkovému teplu, které je uvolněno nebo spotřebováno při vzniku komplexu [3]. K enthalpické změně nejvíce přispívají vodíkové vazby, elektrostatické a van der Waalsovy interakce. Dochází přitom k ustavení rovnováhy mezi tvorbou nových interakcí mezi ligandem a makromolekulou a interakcemi, které tvoří molekuly rozpouštědla se samostatným ligandem (popř. se samostatnou makromolekulou). K experimentálnímu popsání enthalpického příspěvku těchto nekovalentních vazeb bylo využito především umělé vnášení bodových mutací, např. odebrání určitých vodíkových vazeb cílenou záměnou aminokyselin, které byly zodpovědné za interakci [7].

Dalším příspěvkem enthalpické změny je reorganizace rozpouštědla při experimentu [3]. U sledovaných molekul dochází k desolvataci polárních skupin, které jsou zodpovědné za vazbu. Tato desolvatace je pro vazbu sama o sobě nepříznivá, přesto v některých vysoce rozlišených krystalových strukturách komplexů lze spatřit molekuly vody, které mohou zlepšit komplementaritu interagujících molekul [8]. Z mikrokolorimetrických srovnání změn enthalpie vazeb různých molekul v  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{D}_2\text{O}$  navíc vyplývá, že příspěvek reorganizace rozpouštědla může být značný [9].

Celkovou změnu enthalpie systému ovlivňují také nesespecifické příspěvky [3]. Jedná se především o rozpouštěcí teplo ligandu, který je titrován do měřicí cely. Je proto nezbytné vždy provádět kontrolní experiment, kdy je ligand titrován do měřicí cely, ve které je pouze pufr, a získané rozpouštěcí teplo se odečítá od tepelného zabarvení, které se získává při tvorbě komplexu. Dalším nesespecifickým příspěvkem může být smíchání dvou pufrů o nepatrně rozdílném složení, a proto je také nutná pečlivost při přípravě roztoků.

### **1.1.1.3 Změna entropie**

Stejně jako enthalpický faktor má i změna entropie během vzniku komplexu více příspěvků. Interpretace změny entropie ale není tak jednoduchá jako u změny enthalpie [2]. Entropie je obvykle jednoduše definována jako stavová funkce, která vyjadřuje míru neuspořádanosti systému. Tento popis se může použít na úrovni atomů, kdy lze porovnat uspořádanost systému za volného a vázaného stavu. V případě biomolekul je však situace složitější. Jasně je, že během seskupování dvou (nebo i více) biomolekul je nutná určitá míra uspořádanosti. Při vazbě ale dochází k uvolnění molekul rozpouštědla z vazebných míst interagujících molekul, což má naopak za následek zvýšení neuspořádanosti systému.

Příznivá změna entropie při interakci je tedy víceznačná, ale hlavní spojitost má s "pohřbením" hydrofobních částí biomolekul do komplexu [10]. Na povrchu hydrofobních částí totiž mohou molekuly vody tvořit i několik vrstev, a proto jejich uvolnění má značný vliv na celkovou změnu entropie systému. Nepříznivý příspěvek k entropické změně pochází z poklesu stupňů volnosti oproti volnému stavu, především snížením pohyblivosti postranních řetězců ve vazebném místě [3].

### **1.1.1.4 Změna tepelné kapacity vazby**

Změna tepelné kapacity vazby pochází ze změny stupně hydratace povrchu volných a vázaných molekul [11]. V menší míře je změna tepelné kapacity vazby ovlivněna změnami v molekulových vibracích. Z toho je patrné, že změna tepelné kapacity vazby má úzký vztah ke změně entropie. Hodnota  $\Delta C_p$  je téměř vždy negativní, pokud se vzniklý komplex bere jako referenční stav [3]. Jinými slovy tento komplex má menší hodnotu tepelné kapacity než součet jednotlivých volných složek komplexu.

Pro určení  $\Delta C_p$  se provádí titrace při více teplotách, poté je dle *Rovnice 5* (str. 10) sestrojen graf a ze směrnice proložené přímkou závislosti  $\Delta H$  na  $T$  je určena hodnota změny tepelné kapacity. Jelikož jsou tyto výnosy lineární v rámci experimentální chyby, ukazuje se, že je  $\Delta C_p$  nezávislá na teplotě [3]. Z této nezávislosti na teplotě lze usuzovat, že nedochází ke změně ani interagujících částí molekul, ani molekulových vibrací mezi komplexem a volnými molekulami ve zvoleném teplotním rozmezí.

Spojení dvou proteinů do komplexu lze přirovnat ke skládání samostatného proteinu. V obou případech spolu značná část polárních a nepolárních skupin interaguje, čímž se mění stupeň povrchové hydratace. Byly vytvořeny semiempirické metody, které jsou určeny k výpočtu  $\Delta C_p$  ze změny vodou dostupného povrchu při skládání proteinu, popřípadě při interakci proteinů [12]. Dobrý výsledek je však dosažen pouze u interakcí, které mají povahu zámeč – klíč nebo u interakcí, u kterých nedochází k výrazné změně konformací molekul. Výpočet změny tepelné kapacity vazby je navíc možný pouze u biomolekul, které mají experimentálně určenou prostorovou strukturu.

#### 1.1.1.5 Vliv protonace

Pokud je tvorba komplexu biomolekul doprovázena změnami v protonaci systému, změřená změna enthalpie ( $\Delta H_c$ ) obsahuje kromě vazebné enthalpie ( $\Delta H$ ) příspěvek, který odpovídá ionizační enthalpii pufru ( $\Delta H_i$ ), ve kterém je měření prováděno [1]. Změřená změna enthalpie v tomto případě je uvedena v následující rovnici:

$$\Delta H_c = \Delta H + n_{H^+} \cdot \Delta H_i \quad (7)$$

kde  $n_{H^+}$  značí počet protonů, které se účastní interakce. Hodnota  $\Delta H_i$  může být určena pomocí ITC, většina běžně využívaných pufrů již však má  $\Delta H_i$  tabelovanou [13]. Při znalosti ionizační enthalpie pufru lze určit počet vyměněných protonů tak, že se experiment provede alespoň ve dvou pufrech o rozdílné  $\Delta H_i$ , avšak stejném pH. Směrnice proložené přímkou z grafu závislosti  $\Delta H_c$  na  $\Delta H_i$  (dle *Rovnice 7*) udává počet vyměněných protonů a průsečík s osou y určuje enthalpický příspěvek ( $\Delta H$ ).

Při každém experimentu je nutné provést měření ve dvou pufrech a stejném pH. Pokud je hodnota  $\Delta H_c$  v obou případech stejná, nedochází při interakci k výměně

protonů. V opačném případě jde o jasný znak změny protonace v systému, a tedy pro získání  $\Delta H$  je nutná titrace v dalším pufru.

#### **1.1.1.6 Optimalizace vazby a kompenzace entropických a enthalpických změn**

Při optimalizaci vazby biomolekul je cílem dosáhnout vyšší hodnoty asociační konstanty. Velmi vysoké afinity lze dosáhnout pouze kombinací příznivých enthalpických i entropických příspěvků [14]. Současné dosažení příznivějších  $\Delta H$  a  $\Delta S$  je ale náročné.

Optimalizace enthalpického příspěvku je složitá sama o sobě, jelikož k němu kladně přispívá tvorba vodíkových vazeb a van der Waalsových interakcí a zároveň negativně desolvatace polárních skupin [15]. Jestliže se přidáním polární skupiny dosáhne vzniku nové vodíkové vazby, nese s sebou tato změna negativní příspěvek kvůli desolvataci další polární skupiny. Aby byla desolvatační negativní změna enthalpie převýšena, je nutná přesná geometrie u van der Waalsových interakcí a přesný úhel a vzdálenost u vodíkových vazeb. Cílený vývoj léků podle struktury není v dnešní době dostatečně účinný a enthalpická optimalizace trvá mnoho let, jako například u inhibitorů proteasy viru HIV (z angl. *human immunodeficiency virus*; kapitola 1.1.2.1) [16]. Pokud je přesto dosaženo příznivější enthalpie vazby, často dochází ke kompenzaci v entropickém příspěvku a nedochází tak k výraznému zvýšení vazebné konstanty. Nepříznivá entropická kompenzace je způsobena kombinací konformačních efektů a vlivu rozpouštědla [17].

Naproti tomu optimalizace entropického příspěvku je mnohem jednodušší a neprojevuje se tak významnou nežádoucí enthalpickou kompenzací [15]. Jelikož je  $\Delta S$  určena hlavně příznivou desolvatační složkou, která je způsobena uvolněním molekul vody z povrchu interagujících látek, a nepříznivou konformační složkou, která je způsobena omezením stupňů volnosti ligandů, nejjednodušší optimalizace spočívá ve zvýšení hydrofobicity léčiva. Nicméně tato strategie vede k výrazným překážkám, pokud chceme dosáhnout velmi vysoké afinity [17]. Léčiva jsou poté málo rozpustná, což ve výsledku způsobuje špatnou biodostupnost. Nepříznivou konformační složku lze snížit přidáním funkčních skupin, které mají podobné konformační možnosti jak ve volném, tak v navázaném stavu, čímž nedojde ke snížení počtu stupňů volnosti po navázání na cílovou molekulu [18].

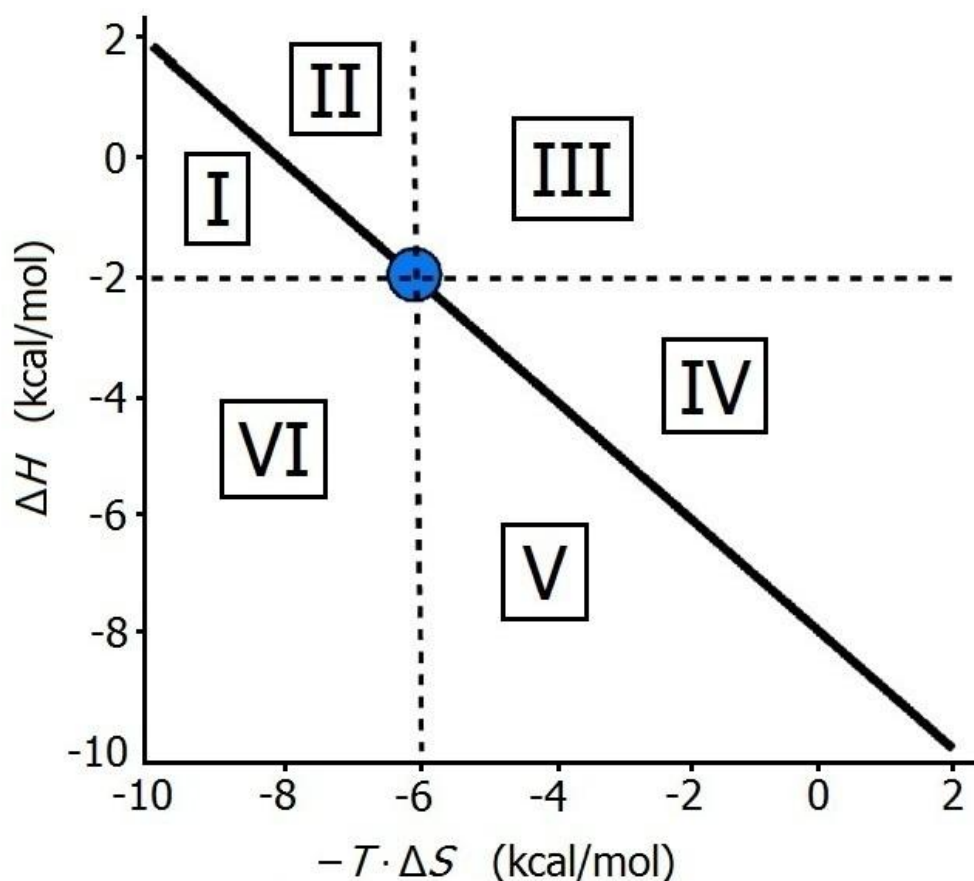
### 1.1.2 Využití mikrokalorimetrie při vývoji léčiv

K vývoji úspěšné strategie molekulárního návrhu farmak je velmi důležité přesně určit termodynamické parametry vazby léčiva na cílovou molekulu. Proteasa viru HIV je důležitým terapeutickým cílem kvůli její klíčové roli při maturaci viru. Při klinickém užívání proteasových inhibitorů se však objevují kmeny viru, které vykazují resistenci [19]. Menší citlivost léčiv je zapříčiněná mutacemi specifických aminokyselin v sekvenci proteasy, a proto je žádoucí vývoj adaptivních inhibitorů, které jsou účinné i vůči mutantním kmenům HIV.

Rozšířenou strategií ve farmaceutickém výzkumu je vývoj vysoce hydrofobních ligandů s omezenou konformační variabilitou [20]. Vazba takových molekul je entropicky řízená a často je doprovázena nepříznivou enthalpickou změnou. Jelikož je však struktura ligandů rigidní, neumožňuje adaptaci na konformační změny vazebného místa, které jsou zapříčiněné mutacemi. Určité mutace v protease viru HIV způsobily pokles vazebné konstanty o tři řády, zatímco hodnota  $K_m$  (Michaelisova konstanta) pro substrát se zvýšila pouze o jeden řád [21]. Pro optimalizační proces jsou však výhodnější sloučeniny, jejichž vazba na cílovou molekulu je řízena enthalpicky [20]. V takovém případě je totiž vždy možné snížit hodnotu disociační konstanty přidáním hydrofobních skupin nebo omezením konformační pohyblivosti ligandu.

Jelikož má Gibbsova volná energie enthalpický a entropický příspěvek, je možné dosáhnout stejné hodnoty  $\Delta G$  mnoha kombinacemi  $\Delta H$  a  $\Delta S$  (Rovnice 4, str. 10). Na Obrázku 2 (str. 17) je uvedena závislost enthalpického příspěvku na entropickém příspěvku pro stejnou hodnotu  $\Delta G$  (dle vztahu v Rovnici 3, str. 10, tedy i stejnou hodnotu  $K_a$ , respektive  $K_d$ ) [18]. Graf lze rozdělit na šest částí podle výchozího bodu, který je znázorněn modře. Při optimalizačním procesu se do grafu vynášejí další body nových ligandů podle jejich termodynamických parametrů, získaných pomocí ITC. Pokud nový ligand spadá do segmentu I nebo II, znamená to, že entropický příspěvek je příznivější, avšak enthalpický příspěvek nepříznivější oproti výchozímu stavu. Část grafu III odpovídá sloučeninám, které mají oba příspěvky horší než původní molekula, region VI naopak značí zlepšení vazby oběma parametry. Do segmentů IV a V patří ligandy s příznivějším enthalpickým příspěvkem, zatímco entropický příspěvek je nepříznivější [22].





**Obrázek 2: Optimalizační graf pro ITC.** Modrý bod označuje výchozí sloučeninu pro optimalizaci. Všechny body na plné čáře mají stejnou hodnotu Gibbsovy volné energie. Bližší popis je uveden v textu. Upraveno podle [22].

V regionech I, IV a V jsou ligandy, které mají nižší hodnotu Gibbsovy volné energie (nižší hodnota disociační konstanty), a proto jsou kandidáty na další optimalizační proces. Naopak sloučeniny ze segmentu III nejsou vhodné pro další optimalizaci, ale podávají důležitou informaci o tom, které chemické modifikace způsobují nepříznivější změnu Gibbsovy energie. Pro další optimalizaci sloučenin z částí grafu II a IV je nutné překonat kompenzaci enthalpických, respektive entropických změn. Cílem optimalizačního procesu je dostat nové ligandu do segmentu VI na grafu [22].

### 1.1.2.1 Inhibitory proteasy viru HIV

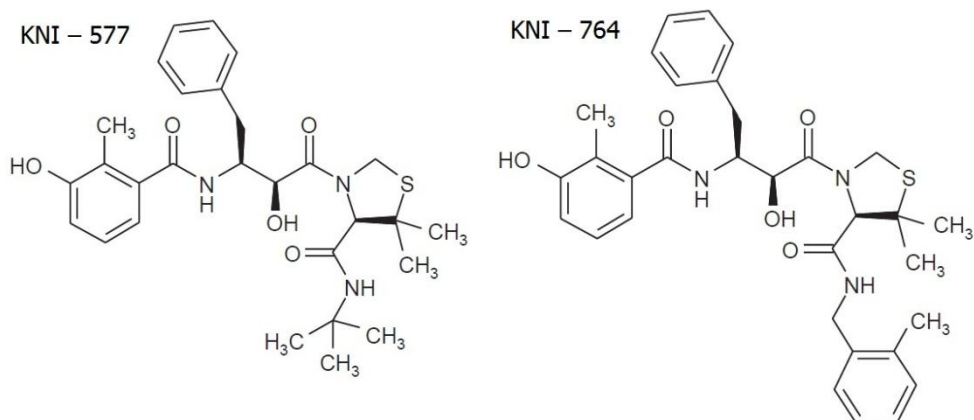
Klinicky užívané inhibitory první generace (indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir) se vážou na proteasu viru HIV s vysokou pozitivní entropickou změnou. Naopak změna enthalpie vzniku komplexu je nepříznivá, kromě ritonaviru, u kterého je mírně

příznivá (  $-2,3$  kcal/mol; ITC) [23]. Tyto výsledky naznačují, že interakce mezi proteasou a inhibitory nejsou dostatečně silné na to, aby překonaly nepříznivou, desolvatační enthalpii. Změna Gibbsovy energie při vazbě na proteasu bez mutací je v rozmezí hodnot od  $-12,4$  do  $-13,7$  kcal/mol, což odpovídá hodnotám disociační konstanty přibližně od 100 do 750 pM (ITC) [24]. Některé mutace v protease ale způsobují zvýšení disociační konstanty o 2 – 3 řády, což je způsobeno téměř výhradně nepříznivější hodnotou změny enthalpie oproti nemutované protease. Toto snížení afinity odpovídá poklesu v enthalpickém příspěvku přibližně o 2,5 kcal/mol [25].

Jelikož dochází k resistenci viru vůči farmakům, hlavním cílem při vývoji nových inhibitorů je najít sloučeniny, které jsou účinné i proti mutantním kmenům HIV a méně náchylné k efektům, které vyvolají nové mutace v molekule proteasy. Dále bylo snahou omezit peptidový charakter inhibitorů, a tím zvýšit jejich stabilitu a zlepšit farmakokinetické vlastnosti. Tyto sloučeniny jsou nazývány “proteasové inhibitory druhé generace“. Klinicky užívané inhibitory druhé generace jsou amprenavir, lopinavir, atazanavir a darunavir. Jedním z experimentálních inhibitorů druhé generace je sloučenina označovaná KNI – 764. Na rozdíl od inhibitorů první generace přispívá k vazbě srovnatelně jak entropický, tak enthalpický příspěvek, čímž je dosaženo velmi vysoké afinity. Změřená disociační konstanta je 32 pM (ITC) [26]. Mutace, které způsobily u první generace inhibitorů pokles až o 3 řády, vyvolaly u vazby KNI – 764 snížení hodnoty disociační konstanty pouze 26 – krát [26]. I přes tento pokles v afinitě KNI – 764 stále inhiboval mutantní typ proteasy HIV účinněji, než inhibitory první generace proteasu bez mutací.

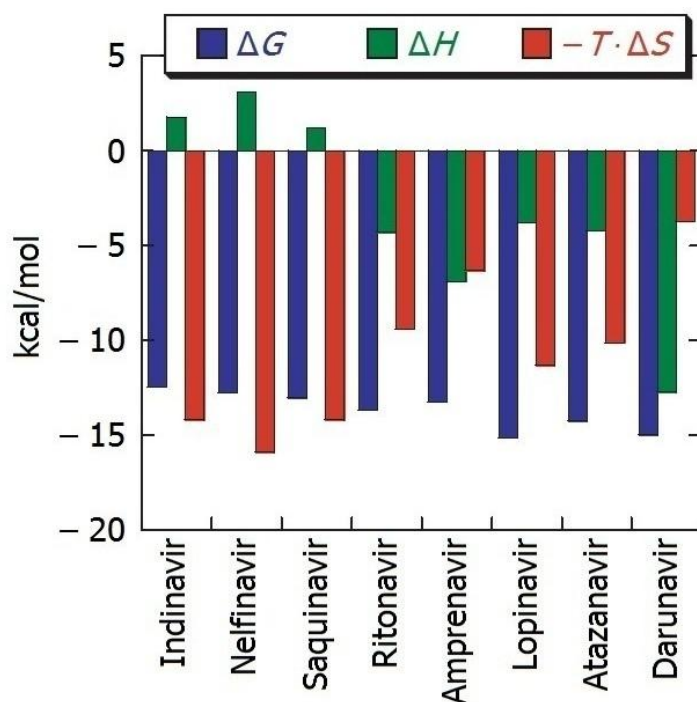
Princip zachování vysoké afinity KNI – 764 vůči mutantnímu typu proteasy lze vysvětlit při porovnání struktury inhibitoru KNI – 577. Obě molekuly jsou na *Obrázku 3* (str. 19). Přestože se jedná o dvě strukturně velmi podobné látky a mají srovnatelné disociační konstanty s nemutovanou proteasou, jejich odezva na stejné mutace je pozoruhodně rozdílná. Zatímco v případě KNI – 764 se u mutantní proteasy sníží afinita pouze 26 – krát, u KNI – 577 je disociační konstanta 260 – krát vyšší [27]. Rozdíl ve strukturách sloučenin je pouze na jednom z dusíků inhibitorů, kde u KNI – 764 je navázána větší methylbenzylamidová skupina, kdežto u KNI – 577 je symetrická *t* – butylamidová

funkční skupina. U KNI – 764 jsou proto dvě volně otáčivé vazby mezi amidovým dusíkem a fenylovým kruhem, avšak u KNI – 577 je pouze jedna otáčivá vazba mezi amidovou skupinou a *t* – butylovou skupinou.



**Obrázek 3: Chemické vzorce KNI – 764 a KNI – 577.** Upraveno podle [27].

Obě molekuly mají přibližně o 2,5 kcal/mol nepříznivější enthalpickou změnu při vazbě na mutantní proteasu oproti protease bez mutací, avšak KNI – 764 se díky přítomnosti jedné dodatečné otáčivé vazby dokáže adaptovat na konformační změnu, což se odráží v kompenzační příznivé změně v entropickém příspěvku [27].



**Obrázek 4: Termodynamické parametry inhibitorů HIV proteasy první a druhé generace.** Upraveno podle [27].

Vazba inhibitorů druhé generace na proteasu viru HIV má jiné termodynamické parametry než vazba inhibitorů generace první. Všechny inhibitory druhé generace mají příznivý jak enthalpický, tak entropický příspěvek vzniku komplexu. Vazba inhibitoru darunavir je dokonce výrazně exothermická [27]. U většiny inhibitorů je dosaženo vyšší afinity k protease než u inhibitorů první generace. Hodnoty změn Gibbsovy volné energie vzniku komplexu jsou v rozmezí od  $-13,2$  do  $-15,6$  kcal/mol, což odpovídá hodnotám disociační konstanty přibližně od 4 do 200 pM (měřeno ITC) [25]. Na *Obrázku 4* (str. 19) jsou uvedeny termodynamické parametry inhibitorů první a druhé generace.

## **1.2 Skládání viru HIV jako cíl terapeutického zásahu**

Současná léčba HIV pozitivních pacientů je založena na inhibici virových enzymů reversní transkriptasy, proteasy a integrasy [28]. Přestože tato terapie antivirotyky je velmi úspěšná, dlouhodobá účinnost je výrazně snižována tvorbou resistance vůči farmakům. Z tohoto důvodu je velmi důležité najít nové terapeutické cíle. Skládání virové částice a nekovalentní interakce mezi kapsidovými proteiny jsou zajímavým cílem terapeutického zásahu.

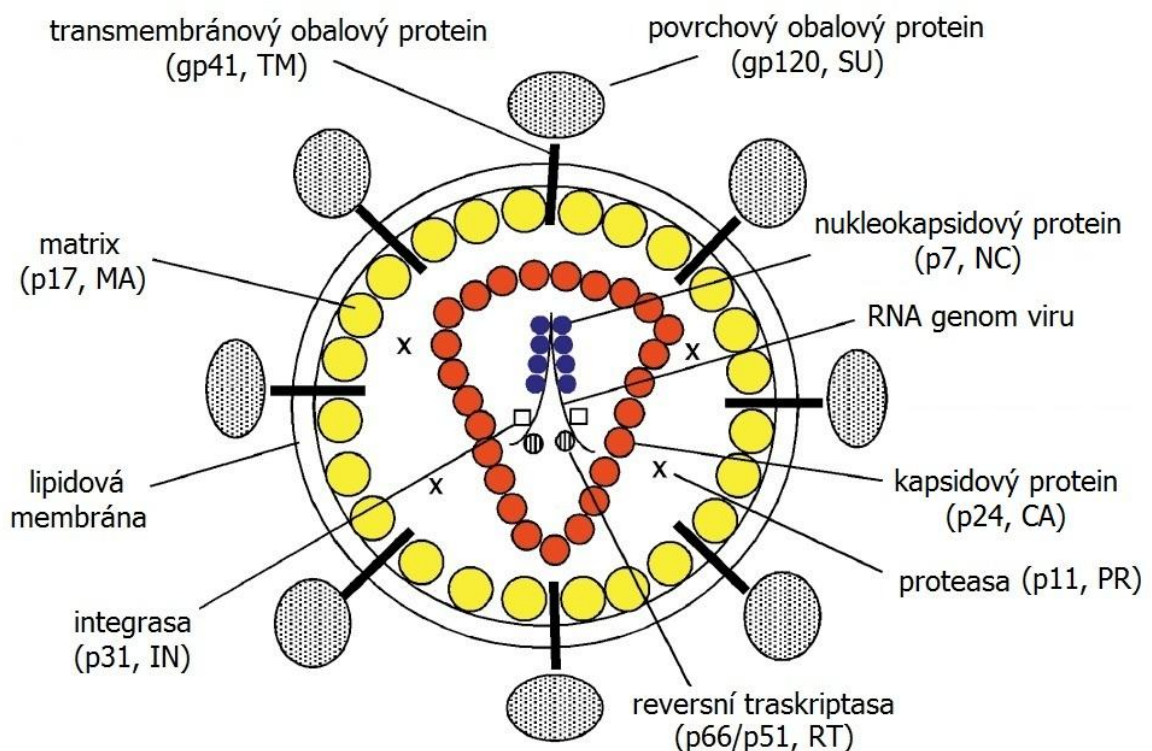
### **1.2.1 HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti**

HIV je lentivirus, patřící do skupiny retrovirů, který způsobuje AIDS (z angl. *acquired immune deficiency syndrome*) [29]. Během prvních týdnů se infekce projevuje vyrážkou a symptomy, které jsou podobné chřipce. Následuje dlouhé období bez symptomů, které může trvat i řadu let. Přestože se nevyskytují v tomto období příznaky, dochází k replikaci viru a k postupnému napadání lymfocytů  $CD4^+$ . Jako AIDS se označuje fáze, kdy počet lymfocytů  $CD4^+$  klesne pod 200 na  $mm^3$  krve a pacient se stane takřka bezbranným vůči infekcím.

#### **1.2.1.1 Struktura HIV**

Základní schéma virové částice HIV je uvedeno na *Obrázku 5* (str. 21). HIV se skládá ze dvou identických molekul jednovláknové RNA, které jsou spojeny s nukleokapsidovým proteinem [30]. Tento komplex je společně s enzymy viru, dvěma

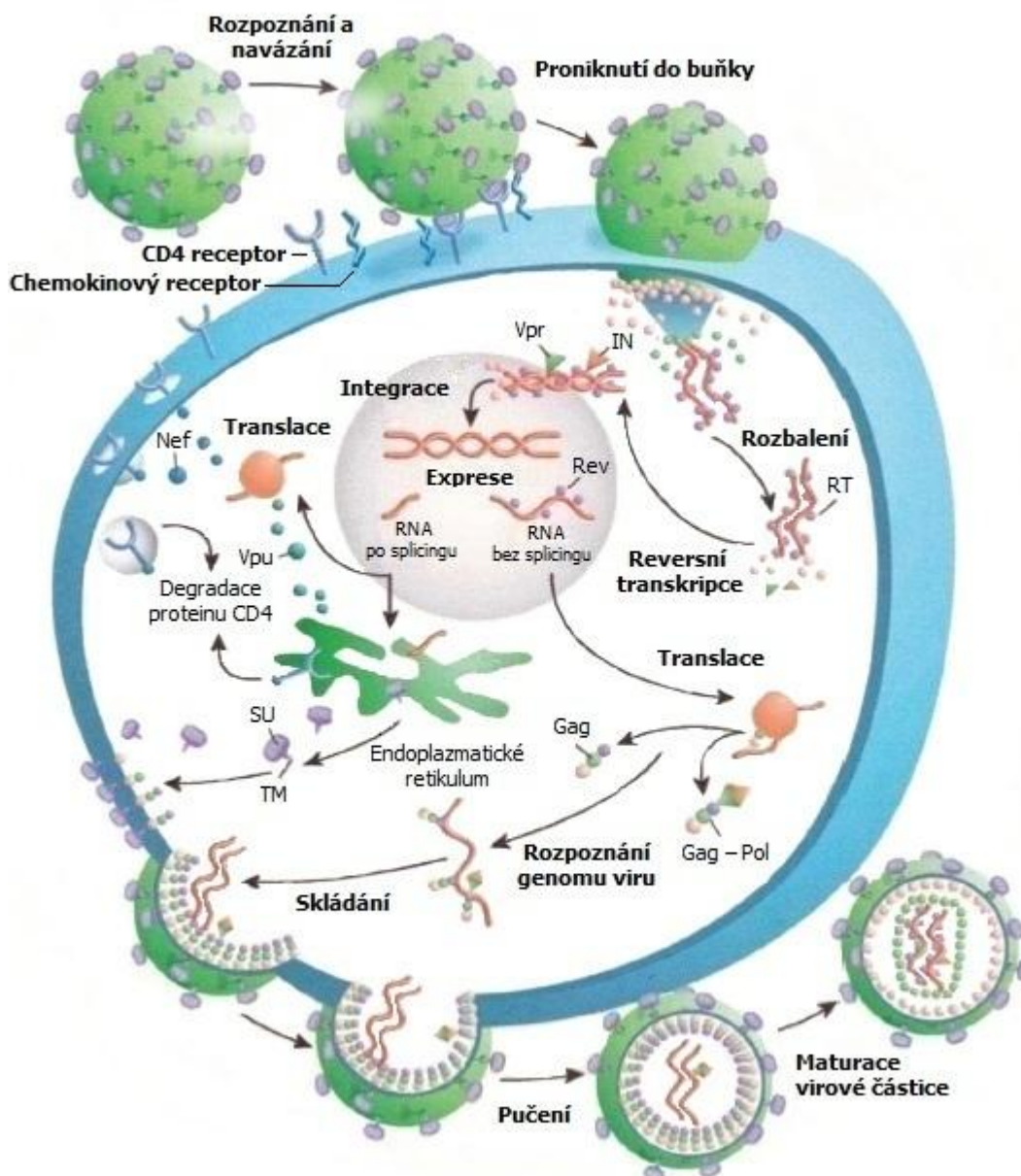
molekulami integrasy a dvěma molekulami reversní transkriptasy, uzavřen v kónické kapsidě, které je vytvořeno kapsidovým proteinem. Virová proteasa je lokalizována mimo kapsidu. Vnější obal tvoří lipidová membrána, do které je z vnitřní strany ukotven protein zvaný matrix [31]. Součástí lipidové membrány každého virionu jsou komplexy, které jsou tvořeny transmembránovým glykoproteinem gp41 a glykoproteinem gp120, který je na vnější straně membrány. Tyto komplexy jsou zodpovědné za rozeznání receptorů na povrchu buněk.



**Obrázek 5: Schéma virové částice HIV.** Upraveno podle [30].

### 1.2.1.2 Replikační cyklus HIV

HIV vstupuje do lymfocytů  $CD4^+$  po vazbě na  $CD4$  receptory a chemokinové koreceptory (CXCR4, CCR5) [32]. Jakmile virus pronikne do buněk, dojde k rozbalení kapsidy a uvolnění virového genomu do cytoplazmy. Následně enzym reversní transkriptasa přepíše genetickou informaci z RNA do DNA. Nově vytvořená DNA je poté přesunuta do jádra napadené buňky, kde ji enzym integrasa zabuduje do genomu hostitelské buňky [29]. Takto inkorporovaná DNA viru se nazývá provirus.



**Obrázek 6: Replikační cyklus HIV.** Upraveno podle [29].

Jakmile je provirus v jádře aktivován, DNA je přepsána do mRNA [29]. Nově vytvořená mRNA se v buňce nachází ve více typech, buď v plné délce, nebo upravená splicingem. Oba typy jsou transportovány k ribozomům v cytoplazmě a dochází k translaci na virové proteiny. Následně mRNA, která není upravená splicingem, vytvoří genom nové virové částice. Genom HIV obsahuje devět genů – *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* [30]. Produkty exprese společně s genomem viru putují k plazmatické membráně buňky, kde dochází ke skládání a následně pučení nové virové částice [33]. Virová proteasa

následně štěpí polyproteiny Gag a Gag – Pol na jednotlivé funkční složky, čímž vzniká infekční virová částice. Replikační cyklus HIV je uveden na *Obrázku 6* (str. 22).

### 1.2.1.3 Kapsidový protein viru HIV (CA)

Kapsidový protein (CA) HIV obsahuje 231 aminokyselin a je složen ze dvou nezávisle složených globulárních domén, N – terminální domény a C – terminální domény [34]. Obě domény jsou propojeny krátkým flexibilním spojem, tvořeným aminokyselinami 146 – 149. Po proteolytickém štěpení molekul Gag se uvolní volné molekuly CA, které se následně skládají do jádra [35].

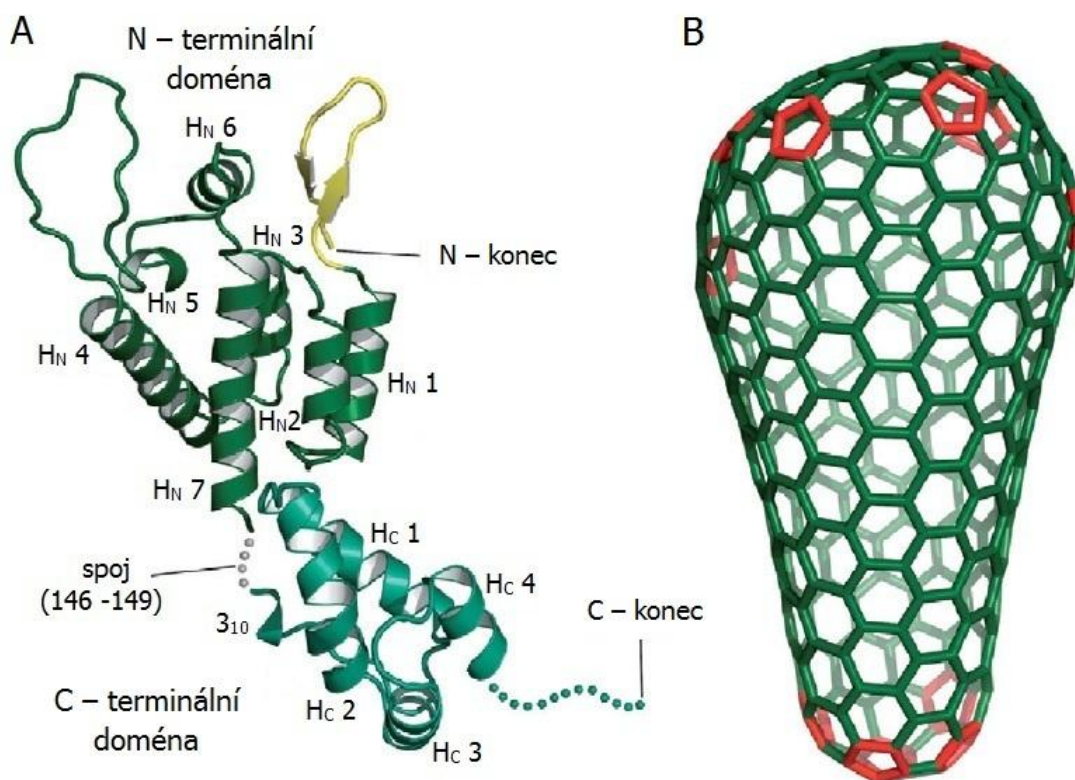
N – terminální doména CA je vytvořena aminokyselinami 1 – 145 [36]. Skládá se z pěti dlouhých  $\alpha$  – helixů, dvou kratších  $\alpha$  – helixů, dvou vlásenek a smyčky, ve které je hojně zastoupen prolin. Tato doména je zodpovědná především za tvorbu jádra během skládání virové částice a neovlivňuje produkci virionů. Bylo dokázáno, že i přes odstranění celých N – terminálních domén kapsidového proteinu z polyproteinu Gag docházelo ke skládání a pučení nových, neinfekčních virionů z buněk [37].

C – terminální doména je složena z aminokyselin 150 – 231 [36]. Tvoří ji krátký  $3_{10}$  – helix a čtyři  $\alpha$  – helixy, které jsou spojeny flexibilními smyčkami. Tyto smyčky dodávají molekulám CA značnou mobilitu, což umožňuje strukturní změny a možnost navázání ligandů [38].

Na rozdíl od N – terminální domény je C – terminální doména zásadní pro produkci nových virionů. Ve své sekvenci obsahuje vysoce konzervovanou oblast přibližně 20 aminokyselin zvanou MHR (z angl. *major homology region*), která je typická pro retroviry [39]. MHR určuje protein – proteinové a protein – membránové interakce molekul polyproteinu Gag, nutné pro tvorbu nových virionů.

C – terminální domény obsahují dimerizační strukturní část, která způsobuje, že se jak tyto domény, tak i celé molekuly CA vyskytují především jako dimery v roztoku i krystalech [38]. Za dimerizaci je zodpovědné spojení dvou  $\alpha$  – helixů 2 obou monomerů, u kterých jsou vzájemně zanořeny postranní řetězce Trp184 a Met185. Bodové mutace na pozicích 184 a 185 CA znemožnily skládání *in vitro* a v buněčných kulturách nebyl virus s těmito mutacemi infekční [40].





**Obrázek 7: Struktura kapsidového proteinu (CA) a kapsidy.** A) Struktura domén kapsidového proteinu; B) Struktura kapsidy. Zeleně jsou zobrazeny hexamery a červeně pentametry. Upraveno podle [41].

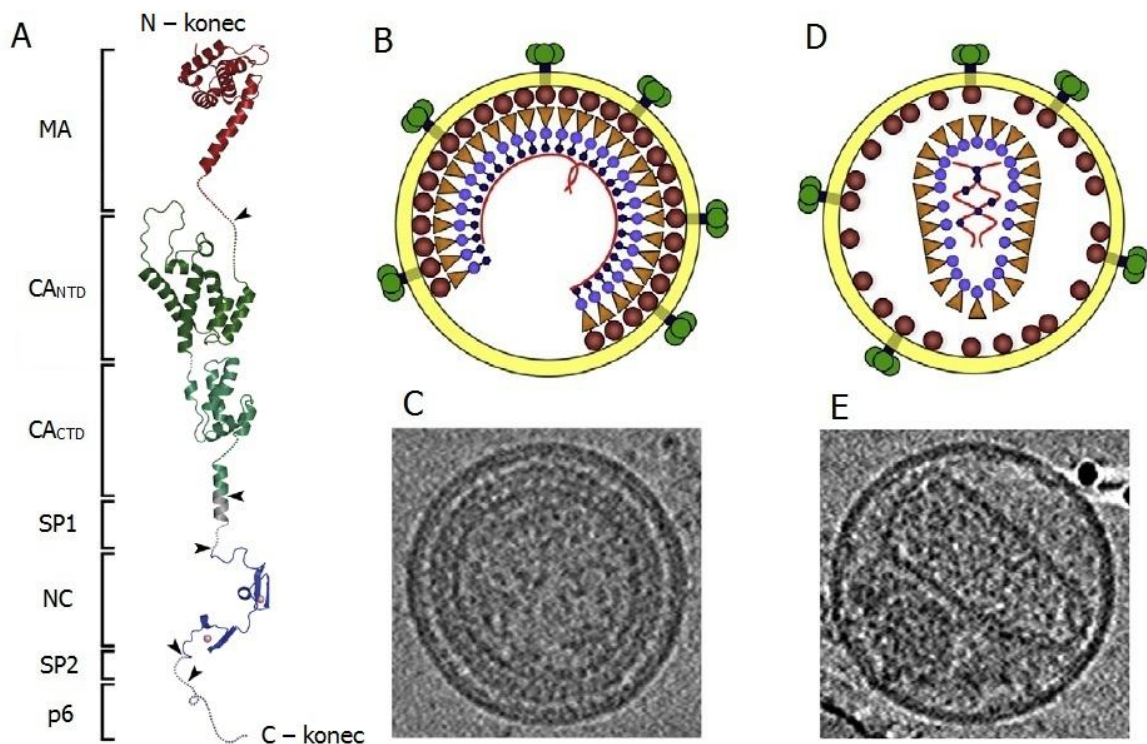
Dimery se vyskytují ve dvou typech. První typ je charakterizován protein – proteinovými interakcemi, které jsou typické pro skládání domén samostatného proteinu [42]. Tento typ dimeru se nevyskytuje v polymerech kapsidy, ale je přítomný při interakci molekul Gag, za kterou jsou zodpovědné C – terminální domény kapsidového proteinu. Oba monomery jsou propojeny prostřednictvím MHR. Druhý typ dimeru je vytvořen paralelním skládáním  $\alpha$  – helixů H<sub>C</sub> 2 jednotlivých monomerů. Interakce stavebních prvků je navíc ovlivněna 3<sub>10</sub> – helixem [35]. Tento typ dimeru se nachází v kapsidě zralých virionů. Struktura kapsidového proteinu a kapsidy je uvedena na *Obrázku 7*.

### 1.2.2 Skládání viru HIV

HIV se skládá do morfologicky rozdílných nezralých a zralých virionů [41]. Virus se nejdříve skládá a následně pučí jako neinfekční, nezralá virová částice sférického tvaru.



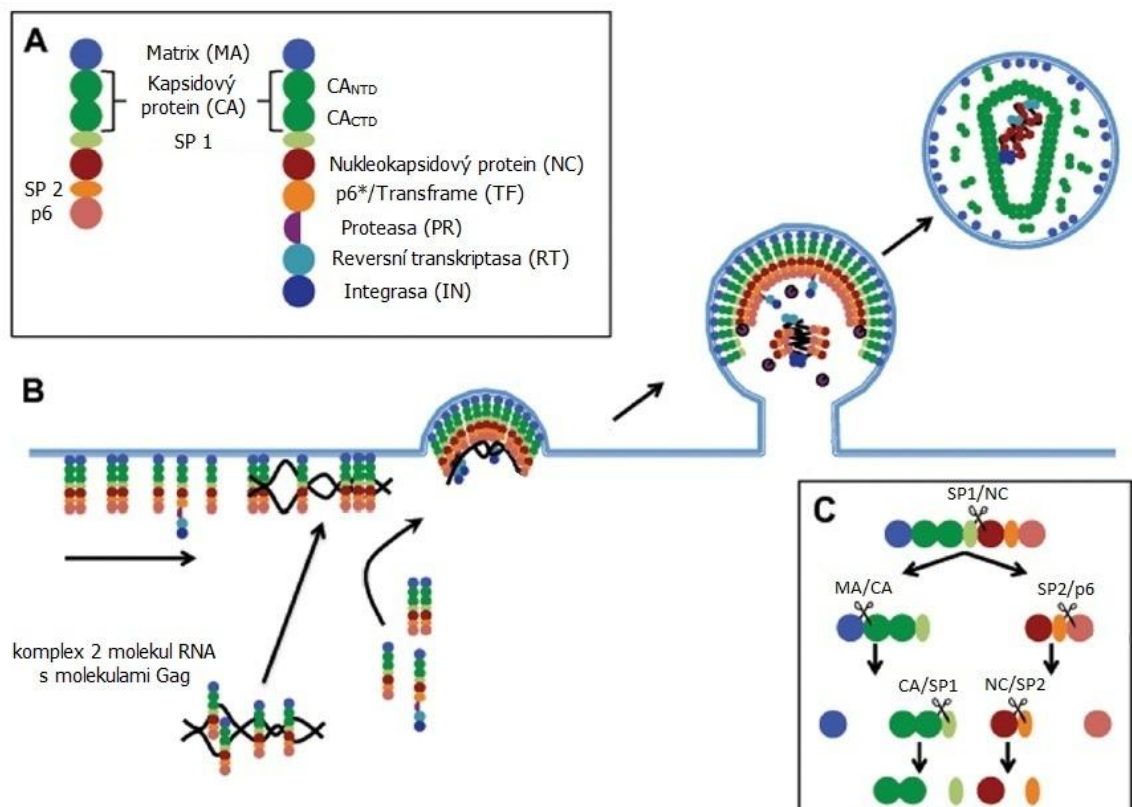
Molekuly polyproteinu Gag jsou transportovány k plazmatické membráně buňky společně s genomem viru a komplexy polyproteinů Gag – Pol. Na vnitřní straně membrány virové částice jsou organizována seskupení Gag molekul, které jsou nespecificky vázány s RNA viru. Nespecifické interakce Gag a RNA viru jsou nezbytné k správnému skládání virionů jak *in vivo*, tak *in vitro* [43]. Struktura polyproteinu Gag a složení zralého i nezralého virionu je na *Obrázku 8*.



**Obrázek 8: Polyprotein Gag, struktura zralé a nezralé virové částice.** A) Schéma terciální struktury molekuly Gag. Černé šipky označují místa, kde proteasa štěpí molekulu; Schéma B) nezralého virionu a D) zralého virionu; Fotografie z elektronového mikroskopu C) nezralého virové částice a E) zralé virové částice. Upraveno podle [44].

Pro přesun molekul Gag k plazmatické membráně je nezbytná interakce s fosfatidylinositol – (4,5) – bisfosfátem [45]. Struktura virové membrány není stejná jako struktura plazmatické membrány napadených buněk. Množství cholesterolu, sphingomyelinu, fosfatidyllové kyseliny a fosfatidylserinu je zvýšeno, zatímco množství fosfatidylcholinu je sníženo [41]. To naznačuje, že ke skládání nových virových částic dochází v částech plazmatické membrány se specifickým složením.

Po pučení nastává dramatická reorganizace struktury a následně vzniká zralá, infekční částice. Dochází k rozvolnění interakcí mezi jednotlivými molekulami Gag a proteasa štěpí molekuly polyproteinu Gag na jednotlivé proteiny – matrix, kapsidový protein, nukleokapsidový protein, SP1, SP2 a p6 [30]. Protein matrix zůstává navázaný svou N–terminální doménou k vnitřní straně membrány viru, zatímco molekuly kapsidového proteinu tvoří kónické jádro okolo genomu viru, který je v komplexu s nukleokapsidovým proteinem a enzymy reversní transkriptasou a intergrasou. Skládání virových částic HIV je schematicky zobrazeno na *Obrázku 9*.

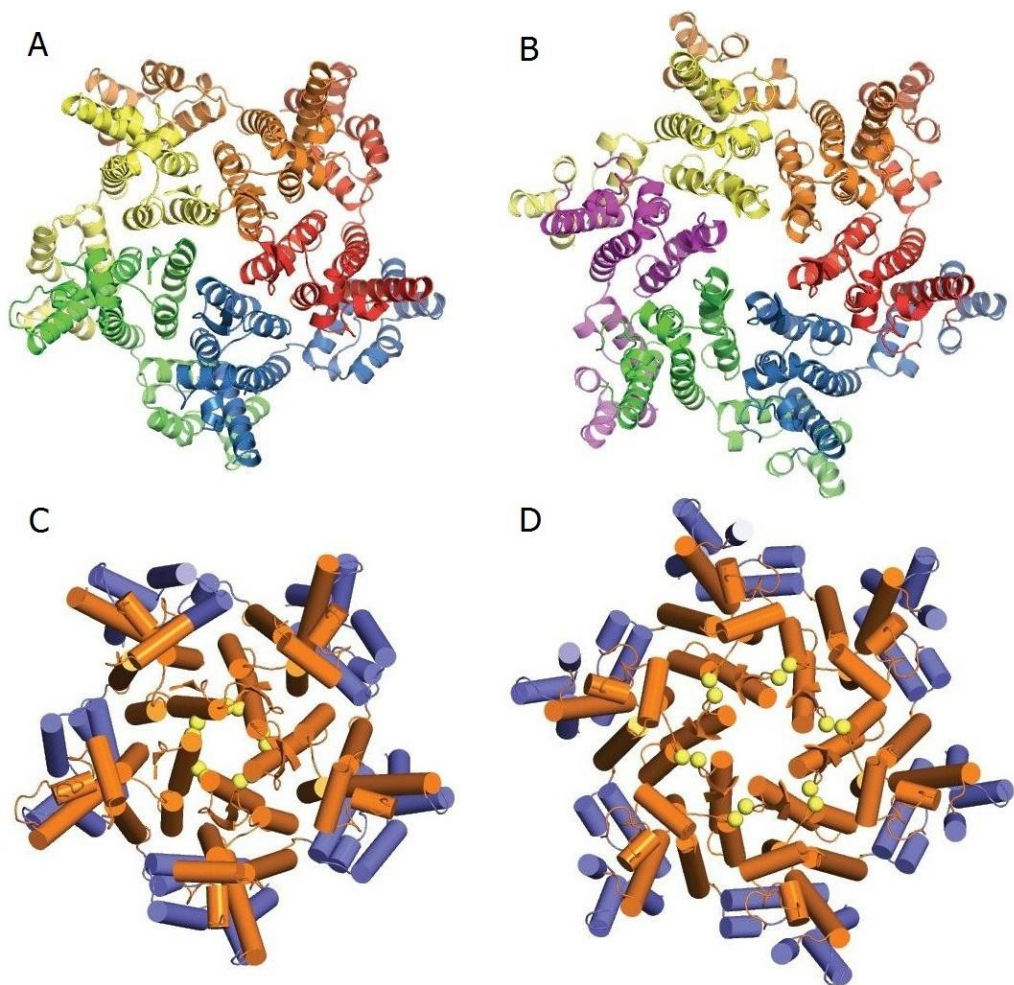


**Obrázek 9: Skládání viru HIV.** A) Složení molekul Gag (vlevo) a Gag – Pol (vpravo); B) Proces skládání virové částice; C) Proteolytické štěpení molekuly Gag. Upraveno podle [46].

Po proteolytickém štěpení je kapsida vytvořena protein – proteinovými interakcemi přibližně 250 hexamerů a přesně 12 pentamerů kapsidového proteinu [47]. Šest N – terminálních domén CA vytváří hexamer seskupením do vnitřního symetrického prstence, který je stabilizován centrálním  $\alpha$  – helikálním barelem. Každá z těchto domén

přispívá k barelu  $\alpha$  – helixy 1, 2 a 3. Šest C – terminálních domén kapsidového proteinu tvoří okolní prstenec hexamerů.

Kapsida je složena interakcemi okolních prstenců, kdy C – terminální domény kapsidových proteinů ze sousedních hexamerů vytvoří homodimery, čímž se vytvoří síť mezi jednotlivými stavebními prvky. Kapsida viru HIV je označována jako fullerenový kužel, který k uzavření celé struktury potřebuje 12 pentamerů [48]. Vytvoření kapsidy je nezbytné pro vznik infekčních virionů. Na tvorbě kapsidy se také uplatňují interakce mezi C – terminálními a N – terminálními doménami sousedních kapsidových proteinů v polymerech. Struktury pentameru a hexameru CA jsou na *Obrázku 10*.



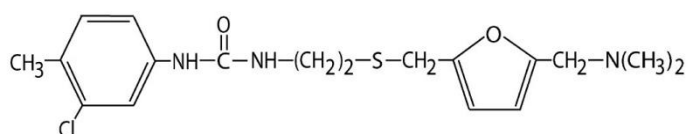
**Obrázek 10:** Struktury pentameru a hexameru kapsidového proteinu. Struktura A) pentamer a B) hexameru CA. Jednotlivé molekuly CA jsou zobrazeny různými barvami; C) pentamer a D) hexamer CA, kde jsou  $\alpha$  – helixy zobrazeny jako válce, N – terminální domény jsou oranžové, C – terminální domény jsou modré, žluté body označují disulfidické vazby *in vitro*. Upraveno podle [49].

### 1.2.3 Inhibitory skládání viru HIV

Jelikož má kapsidový protein v pozdní fázi replikačního cyklu viru nezbytnou funkci, stává se atraktivním terapeutickým cílem [50]. Princip potenciálního terapeutického působení je zabránění skládání viru sloučeninami, vázajícími se na ty části kapsidového proteinu, které jsou zodpovědné za skládání. Inhibitory skládání zamezují složení jak zralých, tak nezralých virových částic.

#### 1.2.3.1 CAP – 1

CAP – 1 je malá molekula, která tvoří vazbu s N – terminální doménou CA [51]. Tuto molekulu objevil NMR titrací Chun Tang (*Howard Hughes Medical Institute*). Stanovená disociační konstanta komplexu s CA je přibližně 800  $\mu\text{M}$  (měřeno NMR titrací). CAP – 1 nevykazuje cytotoxicitu, avšak hodnota  $K_d$  není dostatečně nízká pro terapeutické využití. Vzorec molekuly je na *Obrázku 11*.



**Obrázek 11: Chemický vzorec molekuly CAP – 1.** Upraveno podle [51].

Mechanismus působení CAP – 1 spočívá ve výrazné změně konformace N – terminální domény CA během vazby inhibitoru, kdy je aminokyselina Phe32 vytlačena z vnitřní části domény. Vytvoří se tím hluboká hydrofobní dutina, která je vazebným místem pro inhibitor [52]. Aromatický kruh CAP – 1 je zasazen do dutiny, NH skupiny inhibitoru vytváří vodíkovou vazbu s Val59 CA a skupina  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  interaguje s postranními řetězci aminokyselin Glu28 a Glu29. Vazbou inhibitoru na CA jsou ovlivněny interakce mezi C – terminální doménou a N – terminální doménou, čímž je narušeno skládání virové částice.

#### 1.2.3.2 CAI

CAI (z angl. *capsid assembly inhibitor*) je peptid složený z 12 aminokyselin [28]. Tento peptid byl vybrán metodou “*peptide phage display*” Janou Sticht v laboratoři prof. H. G. Kräusslicha. Primární sekvence CAI je ITFEDLLDYGP. Tento peptid se váže jak

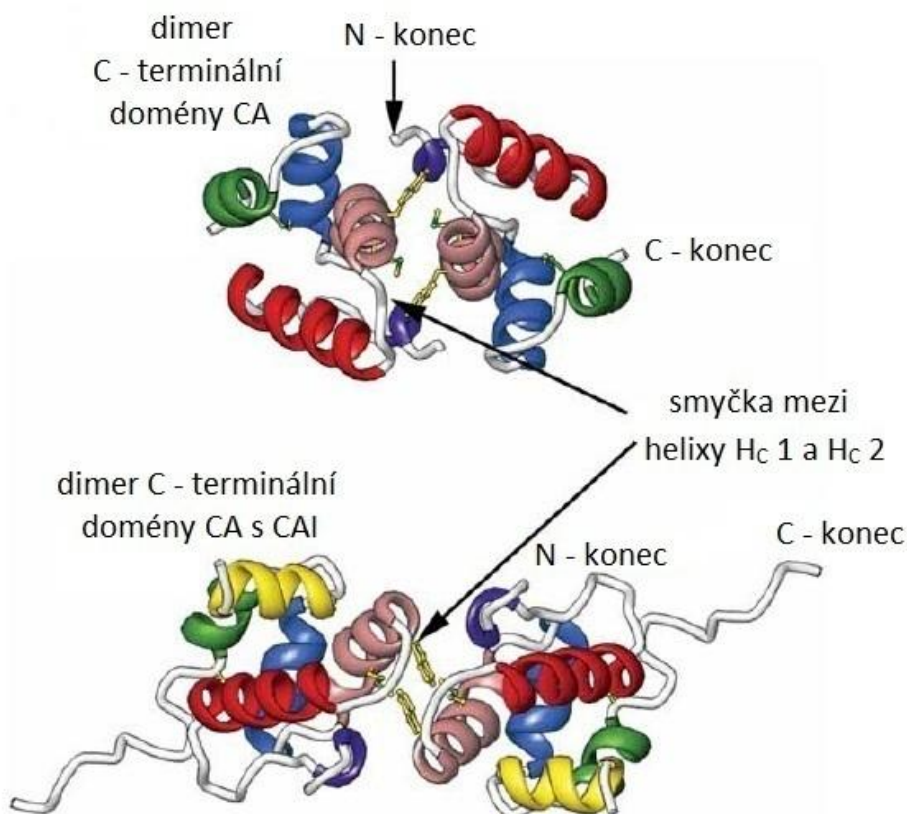
na kapsidový protein v polyproteinu Gag, tak na volný CA a zabraňuje tím skládání nezralých virových částic i tvorbě kapsid *in vitro*. Jak bylo zjištěno rentgenodifrakční a NMR analýzou příslušného komplexu, vazebné místo pro tento peptid je v C – terminální doméně mezi aminokyselinami 169 – 191 kapsidového proteinu (oblast  $\alpha$  – helixů 1 a 2 C – terminální domény). K vazbě navíc přispívá i  $\alpha$  – helix 4 této domény. Tvorba vazby probíhá v konzervované reaktivní hydrofobní oblasti kapsidového proteinu, která je nadějným cílem pro vývoj antivirotických léčiv.

C – terminální doména je tvořena čtyřmi  $\alpha$  – helixy. Peptid CAI je při tvorbě komplexu vložen jako doplňkový  $\alpha$  – helix [53]. Komplex vzniká mechanismem indukovaného přizpůsobení, CAI ve volném stavu nemá uspořádanou sekundární strukturu. Dochází tak k vytvoření kompaktního komplexu pěti  $\alpha$  – helixů. Touto alosterickou vazbou CAI ovlivňuje dimerizační strukturní část CA. Postranní řetězce aminokyselin Ile1 a Leu6 peptidu směřují do hluboké hydrofobní kapsy, která je vytvořena aminokyselinami Val165, Phe168, Leu190 a Leu211 kapsidového proteinu. Phe3 z CAI interaguje s postranními řetězci Leu172 a Lys182 CA, Tyr9 z CAI tvoří vazbu s Leu211 a Met215 CA. Z peptidu CAI vytváří Tyr10 patrovou  $\pi$  –  $\pi$  interakci s Tyr169 kapsidového proteinu. Hodnota disociační konstanty komplexu CAI s C – terminální doménou CA je  $K_d = 1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$  (měřeno fluorescenční polarizací) [54].

Peptid CAI ovlivněním dimerizační strukturní části C – terminální domény CA znemožňuje spojení hexamerů v kapsidě. I přes navázání CAI kapsidový protein podléhá dimerizaci, avšak stabilita dimerů je menší [50]. Dimery C – terminálních domén CA jak s navázaným CAI, tak bez CAI jsou uvedeny na *Obrázku 12* (str. 30).

Peptidové inhibitory ovšem nejsou vhodné pro farmaceutické využití kvůli krátkému poločasu života a malé biodostupnosti [28]. Ukázalo se, že přidáním CAI k buňkám, které produkovaly virus, nedošlo k inhibici HIV. Z tohoto důvodu není peptid CAI vhodný k léčbě, ale strukturu komplexu CAI s CA lze využít jako výchozí bod při vývoji nových inhibitorů skládání viru.

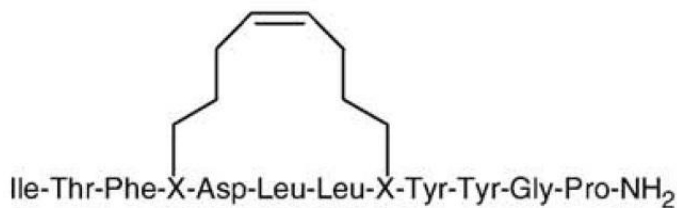




**Obrázek 12: Dimery C – terminálních domén CA.** Nahoře je uveden dimer C – terminální domény, dole je dimer C – terminální domény s CAI.  $\alpha$  – helixy 1, 2, 3 a 4 domény jsou v tomto pořadí znázorněny červenou, růžovou, modrou a zelenou barvou. Peptid CAI je zobrazen žlutou barvou. Aminokyseliny Trp184 a Met185 jsou znázorněny žlutě v místě vazby. Konformace těchto aminokyselin jsou zásadně odlišné u jednotlivých dimerů. Smyčka mezi helixy H<sub>c</sub> 1 a H<sub>c</sub> 2 směřuje nahoře od místa vazby, zatímco po vytvoření komplexu s CAI směřuje k místu vazby. Upraveno podle [53].

### 1.2.3.3 NYAD – 1

Na základě znalosti struktury CAI byl vytvořen cíleným návrhem peptid, jehož  $\alpha$  – helikální struktura je stabilizovaná i v roztoku [55]. NYAD – 1 na rozdíl od CAI proniká membránami buněk a na vazebné místo kapsidového proteinu (C – terminální doména, aminokyseliny 169 – 191) se váže srovnatelně s CAI, hodnota  $K_d \approx 1 \mu\text{M}$  (určeno NMR titrací). NYAD – 1 má sekvenci ITFXDLLXYYGP, kde X značí (S) – 2 – (2' – pentenyl) alanin. Schéma molekuly je uvedeno na *Obrázku 13* (str. 31).



**Obrázek 13: Schéma molekuly NYAD – 1.** Upraveno podle [55].

Přestože sloučenina NYAD – 1 účinně proniká membránami, problémem tohoto inhibitoru skládání je jeho minimální rozpustnost ve vodě a omezená stabilita [55].

### 1.2.3.3 NYAD – 13

Peptid NYAD – 13 je odvozený analog ze sloučeniny NYAD – 1, ve které byla aminokyselina prolin na konci řetězce nahrazena třemi aminokyselinami – lysiny [56]. Sekvence je tedy ITFXDLLYYGKKK. Hodnota vazebné konstanty komplexu s CA je takřka totožná pro obě varianty peptidu NYAD. Přidáním pozitivně nabitých aminokyselin se zvýšila rozpustnost, avšak zvýšila se také jeho cytotoxicita.

Pro praktickou část bakalářské práce byl zvolen termodynamický popis vzniku komplexu kapsidového proteinu viru HIV s peptidem CAI, jelikož struktura komplexu je potenciálním výchozím bodem pro vývoj inhibitorů skládání viru. Z teoretické části práci také jasně vyplývá, že cílem při vývoji farmak proti viru je nalezení adaptivních inhibitorů, které jsou účinné i vůči mutantním formám cílových molekul. Z tohoto důvodu bude v praktické části termodynamicky popsána také vazba CAI s kapsidovým proteinem s bodovou mutací v místě vazby s CAI.

## 2. Cíle bakalářské práce

- Rekombinantní exprese a purifikace kapsidového proteinu viru HIV
- Rekombinantní exprese a purifikace mutantního kapsidového proteinu (Y169A) viru HIV
- Termodynamická charakterizace vzniku komplexu peptidového inhibitoru CAI s kapsidovým proteinem a mutantním kapsidovým proteinem



## 3. Materiál a metody

### 3.1 Použitý materiál a chemikálie

- **AppliChem**, Gatersleben (Německo)  
síran amonný
- **Bio – Rad**, Hercules (USA)  
proteinová analýza – barvicí činidlo
- **Biosynth AG**, Staad (Švýcarsko)  
IPTG
- **Biotika**, Slovenská Ľupča (Slovenská republika)  
Ampicilin
- **Fisher Scientific**, Hampton (USA)  
Decon 90
- **Lachema**, Brno (Česká republika)  
bromfenolová modř
- **Lach – Ner**, Neratovice (Česká republika)  
ethanol, hydroxid sodný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová,  
octan sodný
- **Penta**, Praha (Česká republika)  
glycerol
- **Roche Diagnostics GmbH**, Basilej (Švýcarsko)  
Complete Mini (inhibitorová směs)
- **Serva**, Heidelberg (Německo)  
Coomassie Brilliant Blue R250
- **Sigma – Aldrich**, Bucks (Švýcarsko)  
SDS, DMSO, LB Broth, LB Agar, 2 – merkptoethanol,
- **USB**, Cleveland (USA)  
akrylamid, glycin, Tris, MES

### 3.2 Přístroje

- Centrifugy: Biofuge – pico, Heraeus Instruments (Německo)  
Allegra X – 15R, Beckman Coulter (USA)  
Avanti J – 30I, Beckman Coulter (USA)  
Sorvall Evolution RC Centrifuge, Thermo Scientific (USA)
- rotační třepačka Innova 44, Eppendorf (Německo)
- pH metr Unicam 9450, ATI Unicam (Velká Británie)
- vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza, AP Czech (Česká republika)
- spektrofotometr Specord 210, Chromspec (Česká republika)
- inkubátor, Memmert (USA)
- homogenizátor EmulsiFlex C – 3, Avestin (Kanada)
- ÄKTA Explorer FPLC systém, Amersham Pharmacia Biotech; GE Healthcare Bio – Sciences (USA)
- Auto – ITC<sub>200</sub> microcalorimeter, MicroCal, Inc.; GE Healthcare Bio – Sciences (USA)

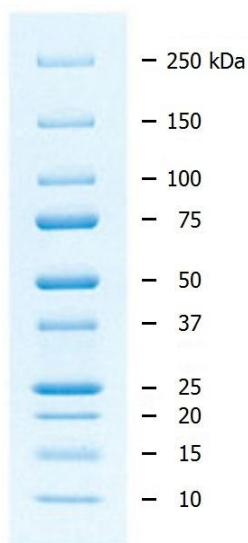
### 3.3 Bakteriální kmeny, vektory a média

- Bakteriální kmen *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL, Novagen (USA)
- LB Broth, LB Agar, Sigma – Aldrich (Švýcarsko)
- Expresní vektor pET11c (AMP+), Novagen (USA)

### 3.4 Ostatní materiál

- kolona MonoS HR 10/10, Amersham Pharmacia Biotech; GE Healthcare Bio – Sciences (USA)
- kolona Superdex 75 prep grade, Amersham Pharmacia Biotech; GE Healthcare Bio – Sciences (USA)
- dialyzační membrána Spectrapor, Spectrum Laboratories (USA)
- filtr SterivexGP 0,22 µm, Millipore (USA)
- Amicon Ultra – 4, Millipore (USA)

All Blue Standard pro elektroforézu v prostředí SDS je uveden na *Obrázku 14*.



**Obrázek 14: All Blue Standard.** Upraveno podle [57].

### 3.5 Transformace bakterií

Bakterie *E. coli* kmenu BL21(DE3)RIL (Novagen) byly transformovány expresním vektorem, který kódoval kapsidový protein (z laboratoře doc. Jana Konvalinky). Transformace byla provedena podle následujícího protokolu [58]: 1  $\mu$ l rekombinantní DNA (0,9 mg/ml) byl přidán k 150  $\mu$ l kompetentních buněk. Bakterie byly ponechány 5 minut na ledu, následoval tepelný šok – 90 sekund 42°C a 5 minut na ledu. Buňky byly poté inkubovány s 800  $\mu$ l LB media po dobu 1 hodiny při 37°C. Bakteriální kultura byla následně rozetřena na Petriho miskách s agarem, který obsahoval antibiotikum ampicilin o koncentraci 100  $\mu$ g/ml, a ponechána přes noc v inkubátoru při 37°C.

### 3.6 Expresse kapsidového proteinu v *E. coli*

pufr A: 50 mM Tris – HCl; pH 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA

150  $\mu$ l bakterií *E. coli* kmenu BL21(DE3)RIL (Novagen) bylo transformováno 1  $\mu$ l rekombinantní DNA, která byla připravena izolací DNA (*midipreparation*). Proteiny byly produkovány využitím transkripčního/translačního systému T7 promotor/T7 RNA polymerasy [59]. Kompetentní buňky bakteriálního kmenu *E. coli* BL21(DE3)RIL obsahují

vloženou kopii genu pro T7 RNA polymerasu, kontrolovanou promotorem *lacUV5*, a proto je expresi možné indukovat přidáním IPTG.

Expresi obou proteinů byla provedena podle stejného protokolu. Čerstvě narostlé kolonie na Petriho miskách s LB agarem a ampicilinem byly rozsuspendovány v 9 ml sterilního LB media. Do 6 lahví po 0,5 l LB media bylo přidáno vždy 0,5 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Do každé lahve byl přidán 1 ml bakteriální suspenze.

Bakteriální kultura byla inkubována v rotační třepačce Innova 44 (Eppendorf) při 37°C a 220 RPM. Během inkubace byla pravidelně měřena optická hustota při 595 nm ( $OD_{595}$ ) na spektrofotometru Specord 210 (Chromspec). Poté, co hodnota  $OD_{595}$  dosáhla hodnoty 0,5, byla teplota snížena na 25°C. Jakmile hodnota  $OD_{595}$  dosáhla hodnoty 0,8, exprese byla indukována přidávkem IPTG na konečnou koncentraci 0,75 mM. Po 3 hodinách byla teplota snížena na 15°C a kultura byla ponechána při 15°C v rotační třepačce přes noc.

Buňky byly odděleny centrifugací (6 000g, 10 minut, 10°C). Buněčná peleta byla zvážena (vlhká biomasa) a rozpuštěna v 150 ml pufru A. V suspenzi byla rozpuštěna 1 tableta proteasových inhibitorů Complete Mini (Roche). Následně byla směs třikrát zmražena a rozmražena kvůli mechanickému narušení buněčných stěn. Suspenze byla homogenizována ve skleněném homogenizátoru a poté v homogenizátoru EmulsiFlex C – 3 (Avestin) třemi průchody systémem při tlaku 1100 bar. Buněčné stěny byly odstraněny centrifugací (10 000g, 20 minut, 5°C) a supernatant byl ponechán v lednici před dalším zpracováním.

Před indukcí IPTG a 3 hodiny po indukcí byl odebrán vzorek buněčné kultury pro analýzu pomocí elektroforézy v prostředí SDS. Vzorek byl centrifugován (6 000g, 5 minut) a peleta byla rozpuštěna v 100  $\mu$ l HPLC vody.

### **3.7 Precipitace síranem amonným**

Dalším purifikačním krokem bylo srážení síranem amonným. K supernatantu byl za míchání po částech přidáván síran amonný do 20 % nasycení a vzorek byl následně míchán 30 minut při 4°C. Suspenze byla poté centrifugována (10 000g, 10 minut, 5°C) a k rozpustné frakci byl stejným způsobem přidán síran amonný do 50 % nasycení.

Celý proces precipitace byl sledován pomocí elektroforézy v prostředí SDS.

### 3.8 Iontoměničová chromatografie

pufr MCA – A: 50 mM octan sodný; pH 5,5; 10 % (v/v) glycerol;  
2 mM 2 – merkaptoethanol

pufr MCA – B: 50 mM octan sodný; pH 5,5; 10 % (v/v) glycerol;  
2 mM 2 – merkaptoethanol; 2 M NaCl

Po srážení síranem amonným byly frakce, které obsahovaly kapsidový protein, dialyzovány proti pufru MCA – A v dialyzačních membránách (Spectrapor, molární síto 6 – 8 kDa) přes noc při 4°C. Dialyzovaný vzorek byl centrifugován (13 000g, 5 minut, 4°C) a supernatant byl po filtraci přes filtr SterivexGP 0,22 µm (Millipore) nanesen na kolonu MonoS HR 10/10 (GE Healthcare Bio – Sciences) pomocí FPLC systému ÄKTA Explorer (GE Healthcare Bio – Sciences). Po aplikaci vzorku byla kolona promyta 10 ml pufru MCA – A. Kapsidový protein byl během 90 minut eluován lineárním gradientem 0 – 40 % pufru MCA – B. Objem jednotlivých frakcí byl 4 ml, průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm. U frakcí, které vykazovaly absorpci, byla změřena koncentrace proteinů a stejné frakce byly také analyzované pomocí elektroforézy v prostředí SDS.

### 3.9 Gelová permeační chromatografie

pufr MCA – G: 50 mM octan sodný; pH 5,5; 10 % (v/v) glycerol; 150 mM NaCl;  
2 mM 2 – merkaptoethanol

Frakce, které obsahovaly produkováný protein, byly sloučeny a dialyzovány přes noc proti pufru MCA – G při 4°C. Po centrifugaci (4 000g, 10 minut, 4°C) byl supernatant rozdělen na 3 části (po cca 15 ml) a každá část byla centrifugací (4000g, 15 minut, 4°C) zahuštěna na 5 ml ve zkumavkách Amicon Ultra – 4 (Millipore). Po filtraci přes filtr SterivexGP 0,22 µm (Millipore) byl vzorek nanesen na kolonu Superdex 75 prep grade (GE Healthcare Bio – Sciences). Chromatografie byla provedena pomocí FPLC systému ÄKTA Explorer (GE Healthcare Bio – Sciences), její průběh byl sledován měřením absorbance při 280 nm. U frakcí, které vykazovaly absorpci, byla změřena koncentrace proteinů a stejné frakce byly také analyzované pomocí elektroforézy v prostředí SDS.

Frakce s purifikovaným proteinem byly rozděleny do mikrozkuvek a uchovány v – 20°C.

### 3.10 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS

vzorkový pufr (6x): 350 mM Tris – HCl; pH 6,8; 30 % (v/v) glycerol; 350 mM SDS;  
4 % (v/v) 2 – merkaptoethanol; 180  $\mu$ M bromfenolová modř

elektrodový pufr (5x): 140 mM Tris – HCl; pH 8,8; 1,4 M glycin; 20 mM SDS

vyvolávací roztok: 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 50 % (v/v) methanol;  
10 % (v/v) octová kyselina

Expresa a purifikace proteinů byla sledována pomocí elektroforézy v prostředí SDS. K elektroforéze byly vždy připraveny 6,6 % zaostřovací gel a 18 % rozdělovací gel z roztoku 44 % akrylamidu (42,8 g akrylamidu, 1,2 g N, N' – methylen bisakrylamidu v 100 ml vody). Složení gelů:

18 % gel: 375 mM Tris – HCl; pH 8,8; 18 % akrylamid; 0,1 % (w/v) SDS;  
0,1 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) APS

6,6 % gel: 375 mM Tris; pH 6,8; 6,6 % akrylamid; 0,1 % (w/v) SDS;  
0,2 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) APS

Vzorky pro elektroforézu byly po přidání vzorkového pufru denaturovány varem po dobu 5 minut. Elektroforéza probíhala na vertikální aparatuře (AP Czech) 2 hodiny při napětí 140 V. Gely byly následně obarveny vyvolávacím roztokem k identifikaci proteinů a následně byl gel promýván 10 % (v/v) kyselinou octovou k odstranění přebytečné barvy. Na závěr byly gely naskenovány.

### 3.11 Určení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla určena dle Bradfordové z hodnoty absorbance komplexů proteinů s barvicím činidlem (Bio – Rad) při 595 nm [60]. Hovězí sérový albumin byl použit jako standard podle protokolu Bio – Rad [61].

### 3.12 Isothermální titrační kalorimetrie

pufr CA – ITC: 30 mM MES; pH 6,0; 10 % (v/v) glycerol; 2 mM 2 – merkaptoethanol,  
2 % (v/v) DMSO

pufr CA – ITC 2: 30 mM MES; pH 6,0; 10 % (v/v) glycerol; 2 mM 2 – merkaptoethanol

Roztok purifikovaného proteinu byl smíchán s 4 ml pufru CA – ITC a následně byl dialyzován proti pufru CA – ITC přes noc při 4°C v dialyzační membráně (Spectrapor, molární hmotnost 6 – 8 kDa). Roztok CAI v DMSO byl smíchán s pufrům CA – ITC 2 a DMSO tak, aby koncentrace CAI byla 12,5x vyšší než kapsidového proteinu a koncentrace DMSO byla 2 % (v/v). Přesné koncentrace byly stanoveny aminokyselinovou analýzou pomocí HPLC (Radko Souček, ÚOCHB). Následně byly vzorky nanесeny na destičku pro Auto – ITC<sub>200</sub> (GE Healthcare Bio – Sciences) a destička byla centrifugována (500g, 2 min, 20°C).

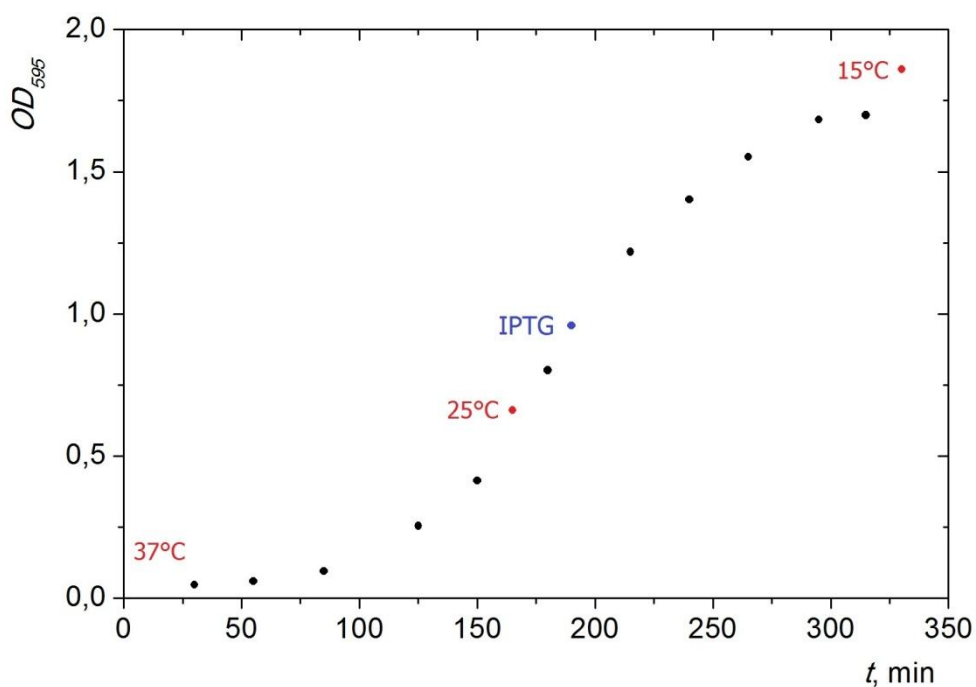
Kalorimetrická měření byla provedena v mikrokalorimetru Auto – ITC<sub>200</sub> (GE Healthcare Bio – Sciences). Při měření byl roztok CAI po částech přidán k roztoku kapsidového proteinu v měřící cele. Experimenty byly provedeny při 8 různých teplotách, při jednom měření bylo také určeno rozpouštěcí teplo přidáním roztoku CAI do pufru CA – ITC. K vyhodnocení výsledků byl využit software, vyvinutý společností MicroCal, Inc. v programu Origin [62].

## 4. Výsledky

Dvě varianty kapsidového proteinu byly produkovány v bakteriích v dostatečné čistotě a dostatečném množství pro isothermální titrační kalorimetrii. V kapitolách 4.1 a 4.2 jsou vzorově uvedeny jednotlivé části purifikace mutantního kapsidového proteinu. Celkové výsledky obou purifikací s výtěžky a čistotou proteinů, která byla analyzována pomocí elektroforézy v prostředí SDS, je popsána v kapitole 4.3. V kapitole 4.4 jsou uvedeny výsledky termodynamické analýzy vazby obou purifikovaných proteinů s peptidem CAI, které byly určeny pomocí isothermální titrační kalorimetrie.

### 4.1 Exprese proteinů

Kapsidový protein a jeho mutantní varianta Y169A byly produkovány v bakteriálním kmenu BL21(DE3)RIL *E. coli*. Exprese byly indukované přidáním IPTG na finální koncentraci 0,75 mM. Bakteriální buňky produkovaly velmi dobře rozpustné proteiny, které se shromažďovaly v cytoplasmě. Buňky byly sklizeny obvykle 20 hodin po indukci. Výtěžky biomasy pro 3 litry media byly přibližně 16 g. Na *Obrázku 15* je uvedena růstová křivka při expresi mutantního kapsidového proteinu CA Y169A.



**Obrázek 15:** Růstová křivka *E. coli* BL21(DE3)RIL při expresi CA Y169A. Na grafu jsou vyznačeny změny teploty a indukce IPTG. Hodnota  $OD_{595}$  po 20 hodinách byla 2,632.

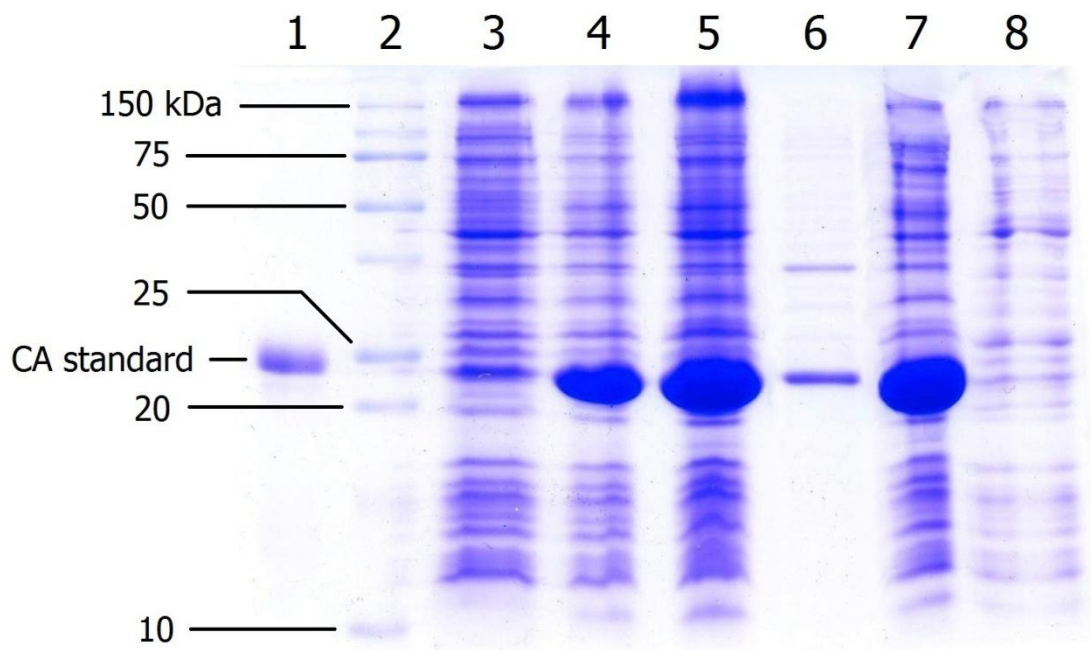


Buněčná kultura před a po indukci byla sledována pomocí elektroforézy v prostředí SDS (*Obrázek 16*). Rozpustná frakce, která byla použita k purifikaci, je uvedena v dráze 5.

## 4.2 Purifikace proteinů

### 4.2.1 Precipitace síranem amonným

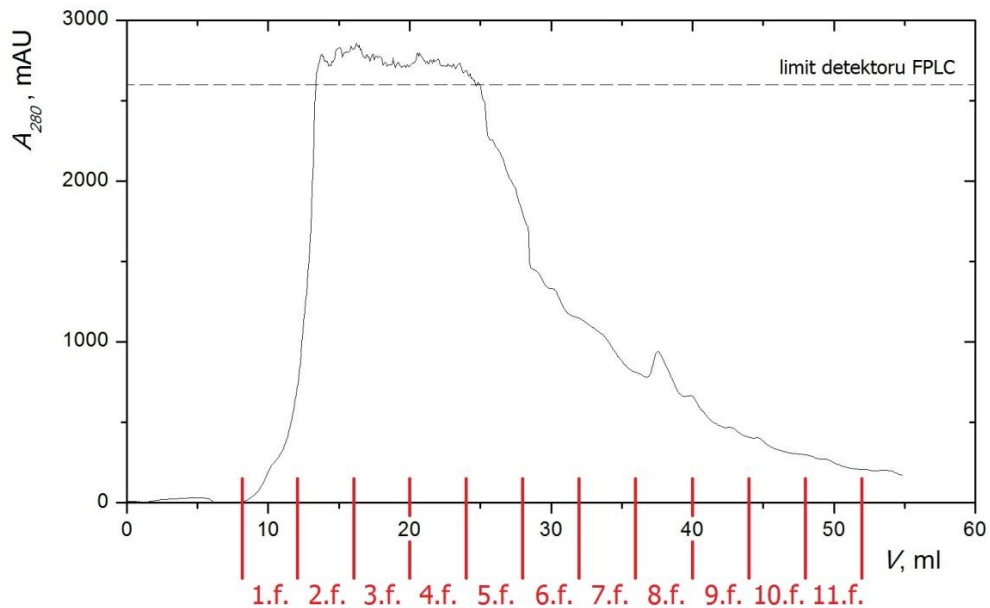
Po separaci rozpustné frakce byla dalším purifikačním krokem precipitace síranem amonným. Po 20 % nasycení došlo k precipitaci malého množství proteinů (dráha 6, *Obrázek 16*). Po 50 % nasycení síranu amonného došlo k precipitaci většího množství proteinů a produkovaný mutantní kapsidový protein byl přítomný právě v této frakci (dráha 8, *Obrázek 16*). Precipitát po 50 % nasycení byl rozpuštěn v pufru MCA – A a po centrifugaci byl supernatant použitý k dalším purifikačním krokům (dráha 9, *Obrázek 16*).



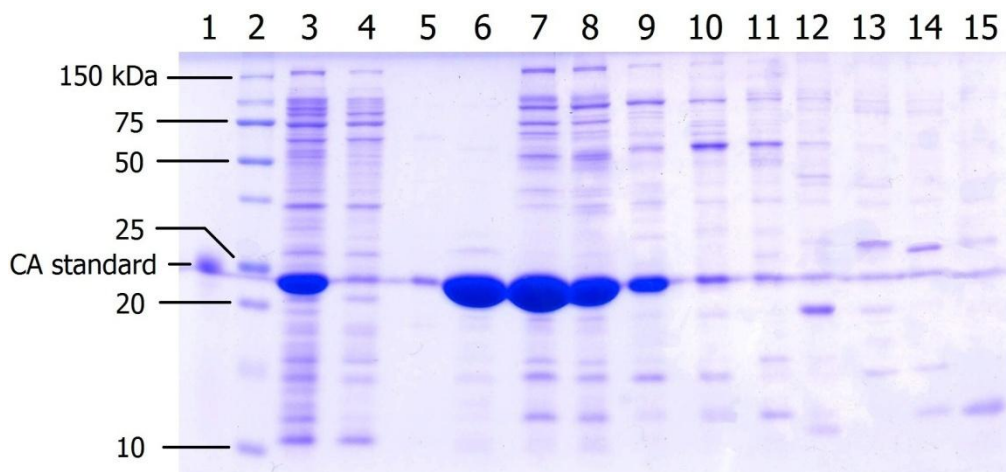
**Obrázek 16: SDS – PAGE exprese CA Y169A a následná precipitace síranem amonným.** Dráha 1: 1,5  $\mu$ l CA standardu; dráha 2: 1  $\mu$ l All Blue Standardu; dráha 3: 12  $\mu$ l buněčné kultury před indukcí; dráha 4: 3,5  $\mu$ l buněčné kultury po indukci; dráha 5: 3,5  $\mu$ l buněčného supernatantu; dráha 6: 3,5  $\mu$ l supernatantu po rozpuštění precipitovaných proteinů po 20 % nasycení síranu amonného; dráha 7: 3,5  $\mu$ l supernatantu po rozpuštění precipitovaných proteinů po 20 – 50 % nasycení síranu amonného; dráha 8: 3,5  $\mu$ l frakce rozpustné i v 50 % nasycení síranu amonného. Detaily experimentu jsou uvedeny v kapitole 3.10.

#### 4.2.2 Iontoměničová chromatografie a gelová permeační chromatografie

Dalším purifikačním krokem byla iontoměničová chromatografie na koloně MonoS HR 10/10 při pH 5,5. Chromatogram je uveden na *Obrázku 17*, frakce, které obsahovaly proteiny, byly analyzovány pomocí elektroforézy v prostředí SDS (*Obrázek 18*). Na gelu je patrné, že některé proteiny byly pomocí iontoměničové chromatografie separovány od mutantního kapsidového proteinu.

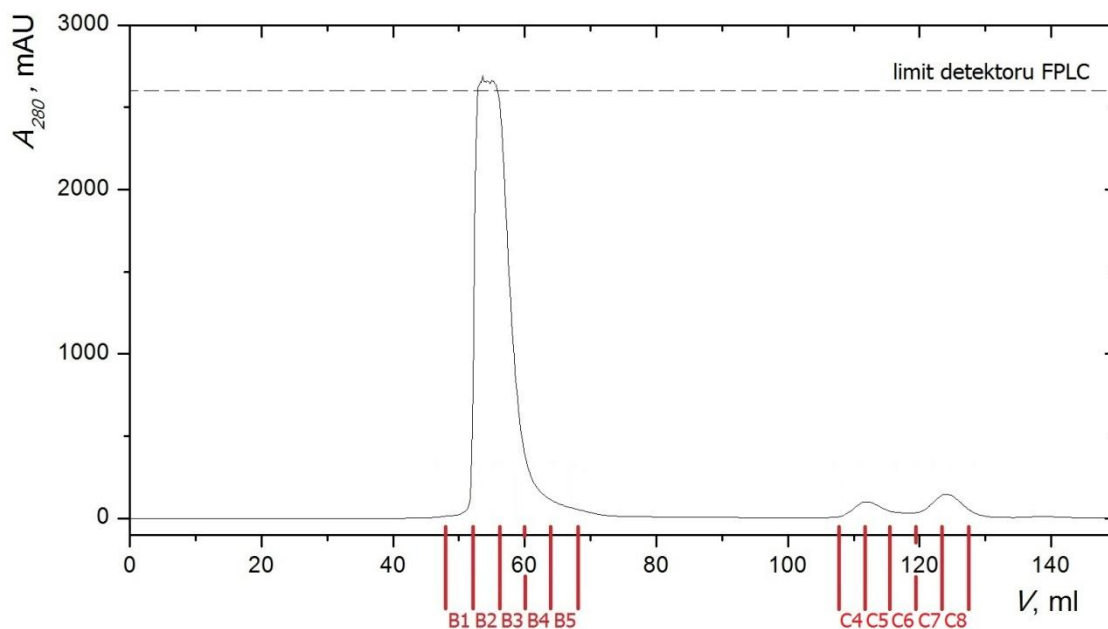


**Obrázek 17:** Chromatogram iontoměničové chromatografie. Analyzované frakce jsou vyznačeny červeně (po 4 ml). Kolona MonoS, pH 5,5. Detaily jsou uvedeny v kapitole 3.8.

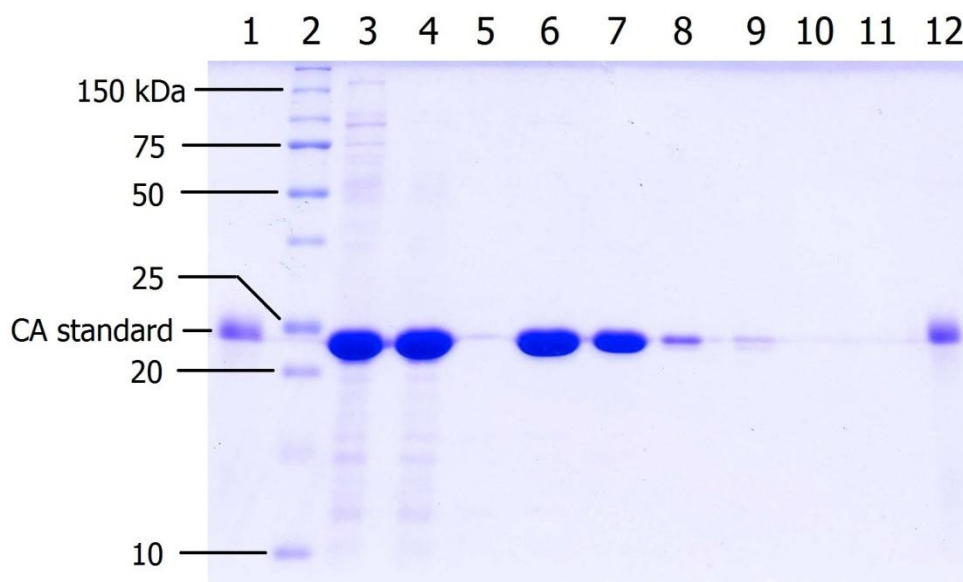


**Obrázek 18:** SDS – PAGE frakcí iontoměničové chromatografie. Dráha 1: 0,6  $\mu$ l CA standardu; dráha 2: 0,9  $\mu$ l All Blue Standardu; dráha 3: 2  $\mu$ l vzorku, který se nanášel na kolonu; dráha 4: 2  $\mu$ l vzorku, která se nevázala na kolonu; dráha 5: 0,8  $\mu$ l 1. frakce; dráha 6: 2,4  $\mu$ l 2. frakce; dráha 7: 2,4  $\mu$ l 3. frakce; dráha 8: 0,8  $\mu$ l 4. frakce; dráha 9: 0,8  $\mu$ l 5. frakce; dráha 10: 0,8  $\mu$ l 6. frakce; dráha 11: 0,8  $\mu$ l 7. frakce; dráha 12: 0,8  $\mu$ l 8. frakce; dráha 13: 0,8  $\mu$ l 9. frakce; dráha 14: 0,8  $\mu$ l 10. frakce; dráha 15: 0,8  $\mu$ l 11. frakce.

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie (1. – 5. frakce z iontoměničové chromatografie) na koloně Superdex 75 prep grade. Chromatogram je uvedený na *Obrázku 19*, analýza frakcí pomocí elektroforézy v prostředí SDS je uvedena na *Obrázku 20*.



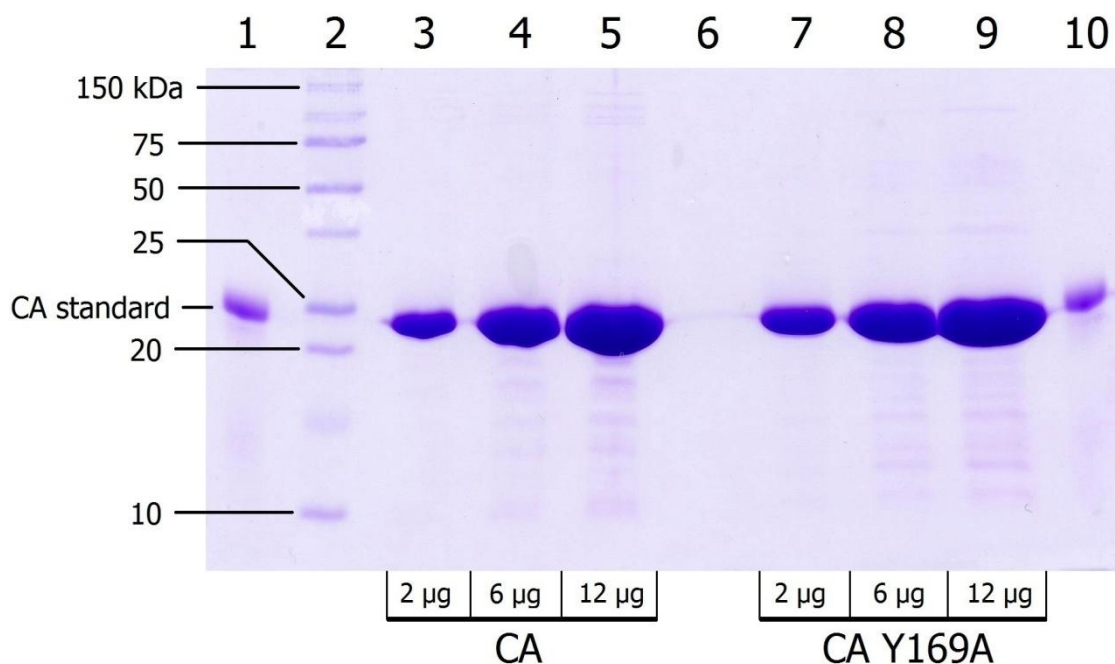
**Obrázek 19: Chromatogram gelové permeační chromatografie.** Analyzované frakce (po 4 ml) jsou vyznačeny červeně. Detaily experimentu jsou uvedeny v kapitole 3.9.



**Obrázek 20: SDS – PAGE frakcí gelové permeační chromatografie.** Dráha 1: 0,6  $\mu$ l CA standardu; dráha 2: 0,9  $\mu$ l All Blue Standardu; dráha 3: 1  $\mu$ l spojených frakcí po iontoměničové chromatografii; dráha 4: 1  $\mu$ l spojené frakce po dialýze, vzorek nanášený na kolonu; dráha 5: 1  $\mu$ l frakce B1; dráha 6: 1  $\mu$ l frakce B2; dráha 7: 1  $\mu$ l frakce B3; dráha 8: 1  $\mu$ l frakce B4; dráha 9: 1  $\mu$ l frakce B5; dráha 10: 1  $\mu$ l spojených frakcí C4 a C5; dráha 12: 1  $\mu$ l spojených frakcí C7 a C8; dráha 12: 0,6  $\mu$ l CA standardu.

### 4.3 Výsledky purifikace

Methody a výsledky purifikace mutantního kapsidového proteinu CA Y169A jsou uvedeny v kapitolách 3.6 – 3.9 a 4.1 – 4.2. Kapsidový protein bez mutací byl purifikován podle stejného protokolu. Celkové výsledky obou purifikací byly analyzovány pomocí elektroforézy v prostředí SDS (Obrázek 21). V *Tabulce 1* jsou shrnuty výtěžky purifikací, získané postupem popsaným v kapitole 3.11.



**Obrázek 21:** SDS – PAGE purifikovaných čistých proteinů. Dráha 1: 1 µl CA standardu; dráha 2: 1 µl All Blue Standardu; dráha 3: 1 µl CA (2 µg proteinu); dráha 4: 3 µl CA (6 µg proteinu); dráha 5: 6 µl CA (12 µg proteinu); dráha 7: 1 µl CA Y169A (2 µg proteinu); dráha 8: 3 µl CA Y169A (6 µg proteinu); dráha 9: 6 µl CA Y169A (12 µg proteinu); dráha 10: 1 µl CA standardu.

**Tabulka 1:** Výtěžky purifikovaných čistých proteinů.

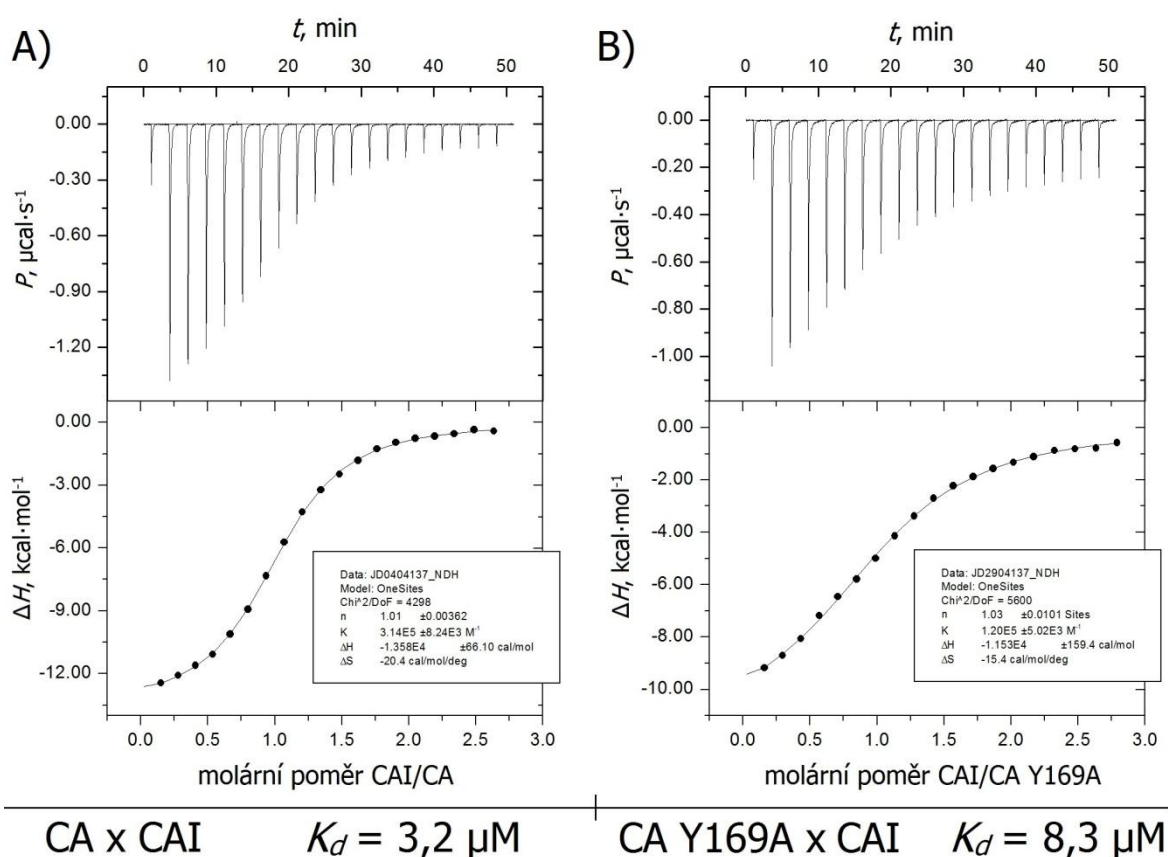
protein	výtěžek (mg/l media)
CA	77
CA Y169A	22

### 4.4 Termodynamické parametry vazby obou variant CA na CAI

Kapsidový protein tvoří s peptidem CAI komplex, který zabraňuje skládání virové částice. Jelikož se na vazbě podílí také aminokyselina tyrosin v pozici 169, byla zvolena záměna právě této aminokyseliny za alanin k popisu vazby kapsidového proteinu a CAI.

Při postupné titraci malého množství CAI k proteinu CA docházelo při vzniku komplexu k exothermickým tepelným pulsům. Tyto tepelné odezvy byly integrovány, upraveny proměření kontrolního experimentu a hodnotami byla následně proložena titrační křivka v programu vyvinutém firmou MicroCal, Inc. Koncentrace proteinů byla určena aminokyselinovou analýzou (Radko Souček, ÚOCHB).

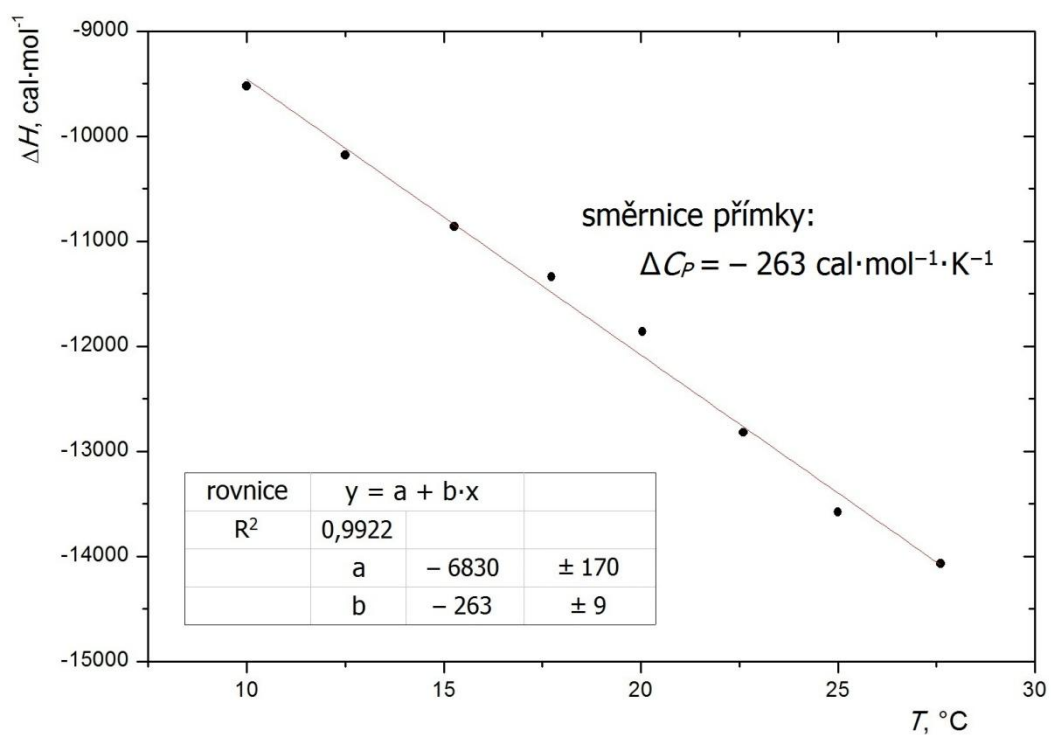
Na *Obrázku 22* jsou uvedeny výsledky titrace, které popisují vznik komplexu CAI s kapsidovým proteinem a mutantním kapsidovým proteinem při 25°C.



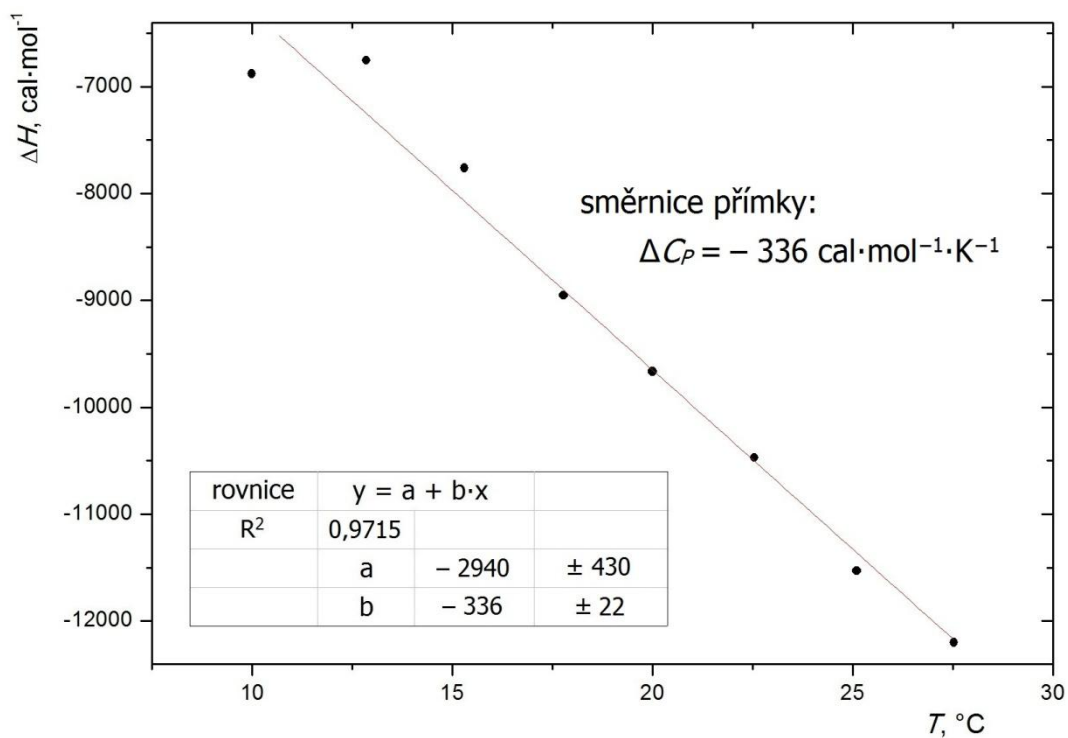
**Obrázek 22: Mikrokolorimetrické titrace.** A) Průběh titrace CA s CAI a proložená titrační isotherma. B) Průběh titrace CA Y169A s CAI a proložená titrační křivka. Obě měření byla provedena při 25°C.

Z titračních křivek byly určeny hodnoty disociačních konstant komplexů, změny enthalpie a entropie. Výsledky termodynamické analýzy vzniku komplexu CAI jak s kapsidovým proteinem bez mutací, tak s mutantním kapsidovým proteinem, jsou uvedeny v *Tabulce 2* (str. 47).

Na *Obrázcích 23 a 24* jsou grafy závislostí změn enthalpie na teplotě. Směrnice proložených přímk se rovnají hodnotám změn tepelné kapacity vazby (*Rovnice 5*, str. 10).



**Obrázek 23:** Závislost změny enthalpie na teplotě pro vznik komplexu CA s CAI.



**Obrázek 24:** Závislost změny enthalpie na teplotě pro vznik komplexu CA Y169A s CAI.

**Tabulka 2: Výsledky termodynamické analýzy vzniku komplexu kapsidového proteinu a mutantního kapsidového proteinu s peptidem CAI.**

	CAI x CA	CAI x CA Y169A
stechiometrie ( $n$ )	1,01	1,03
$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$3,2 \pm 0,1$	$8,3 \pm 0,4$
$\Delta H$ ( $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$-13,6 \pm 0,1$	$-11,5 \pm 0,2$
$-T \cdot \Delta S$ ( $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$6,1 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$
$\Delta C_p$ ( $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )	$-263 \pm 9$	$-336 \pm 22$

Pro měření v pufru CA – ITC vyšla změna enthalpie vzniku komplexu kapsidového proteinu a peptidu CAI  $-13,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , entropický příspěvek  $-T \cdot \Delta S$  činil  $6,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  a změna tepelné kapacity vazby byla  $-263 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ . Stanovená stechiometrie interakce CAI/CA se rovnala 1,01 a hodnota disociační konstanty byla  $3,2 \mu\text{M}$ . V případě mutantního kapsidového proteinu měla stanovená hodnota změny enthalpie  $-11,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , entropický příspěvek činil  $4,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  a  $\Delta C_p$  vyšla  $-336 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ . Stechiometrie interakce CAI/CA Y169A byla 1,03 a hodnota disociační konstanty se rovnala  $8,3 \mu\text{M}$ .

## 5. Diskuse

Studium proteinových interakcí s vazebnými partnery patří mezi hlavní výzkumné oblasti biochemie. Pomocí isothermalní titrační kalorimetrie je možné stanovit nejen hodnotu rovnovážné disociační konstanty a stechiometrii interakce, ale také změnu enthalpie a změnu entropie vzniku komplexu. Při měření při více teplotách je možné určit také změnu tepelné kapacity vazby proteinu s ligandy. Získané termodynamické parametry popisují vznik komplexu podrobněji než samotná hodnota rovnovážné disociační konstanty. Hodnoty  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  a  $\Delta C_p$  jsou také velmi cenné při optimalizaci nových léčiv a mikrokalorimetrie je dnes proto využívanou metodou farmaceutického průmyslu.

Podle purifikačního protokolu, vypracovaného v laboratoři doc. Jana Konvalinky, byly připraveny dva proteiny – kapsidový protein viru HIV a jeho mutantní varianta CA Y169A. Značná rozpustnost obou proteinů přispěla k vysokému výtěžku obou purifikací, kdy bylo získáno velké množství čistého proteinu. Kapsidového proteinu bylo připraveno přibližně 230 mg, čistého mutantního kapsidového proteinu CA Y169A bylo získáno přibližně 66 mg. Výtěžek mutantního proteinu byl sice více než třikrát menší než výtěžek kapsidového proteinu bez mutací, přesto bylo připraveno dostatečné množství obou proteinů k ITC experimentům.

Pomocí mikrokalorimetrických měření byla provedena termodynamická analýza vzniku komplexu peptidového inhibitoru skládání CAI s kapsidovým proteinem a mutantním kapsidovým proteinem. Tepelné pulsy, které vznikaly při titraci peptidu k roztoku kapsidového proteinu, byly integrovány a upraveny po kontrolním měření, při kterém byl k pufru titrován pouze peptid CAI. Pro obě varianty kapsidového proteinu byla titrací stanovena stechiometrie interakce a disociační konstanta komplexu, změny enthalpie a entropie vzniku komplexu pro daný pufr. Kromě těchto termodynamických parametrů byla experimenty při více teplotách stanovena změna tepelné kapacity vazby.

Stechiometrie interakce byla jak pro CA, tak pro CA Y169A 1:1 s peptidem CAI. Disociační konstanta komplexu kapsidového proteinu s peptidem byla 3,2  $\mu\text{M}$ , v případě mutantního kapsidového proteinu byla hodnota disociační konstanty 8,3  $\mu\text{M}$ . Hodnota



disociační konstanty se tedy oproti nemutovanému kapsidovému proteinu zvýšila přibližně 2,6 – krát.

Vazba inhibitoru CAI na kapsidový protein je v obou případech enthalpicky řízená a v obou případech je vazba doprovázena nepříznivým entropickým příspěvkem. Při porovnání změn entropie a enthalpie u obou variant kapsidového proteinu lze pozorovat častý fenomén, kdy vazba CAI na mutantní protein je enthalpicky nepříznivější než na kapsidový protein bez mutací, avšak tento pokles je částečně kompenzován méně nepříznivým entropickým příspěvkem.

Změna tepelné kapacity vazby popisuje především změnu hydratace povrchu interagujících molekul. Hodnoty se obvykle pohybují od  $-200 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , což je hodnota typická například u povrchových interakcí protilátek s epitopem antigenu, až do  $-400 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , kdy dochází k výraznému zanoření ligandu do struktury proteinu, jako například u některých inhibitorů proteasy viru HIV. Interpretace výsledků však není jednoduchá a změnu tepelné kapacity lze využít například při porovnání hydrofobních interakcí, účastnících se vzniku komplexu mutovaného a nemutovaného proteinu. Z naměřených hodnot vyplývá, že u mutantního kapsidového proteinu dochází při vzniku komplexu s CAI k výraznější změně hydratace než u nemutovaného proteinu.

Z čistě termodynamického pohledu by peptid CAI mohl být kandidátem pro optimalizaci vazby a vývoj léčiva, jelikož hodnota disociační konstanty je v řádu  $10^{-6} \text{ M}$  a zároveň je vazba inhibitoru na kapsidový protein řízena enthalpicky. CAI ovšem účinně neproniká přes buněčnou membránu, jeho molekulová hmotnost je 1,44 kDa, má krátký poločas života a malou biodostupnost. Pro vývoj účinného inhibitoru by bylo nutné chemickými modifikacemi snížit molekulovou hmotnost a peptidový charakter CAI pro lepší farmakokinetické vlastnosti a přitom zvýšit afinitu CAI vůči kapsidovému proteinu.

## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce byla příprava kapsidového proteinu HIV a mutantního kapsidového proteinu (CA Y169A) a následná termodynamická charakterizace vzniku komplexu proteinů s peptidovým inhibitorem skládání viru CAI.

Oba proteiny byly připraveny, přečištěny a na závěr uskladněny pro další experimenty. Pomocí isothermální titrační kalorimetrie byla provedena termodynamická analýza vzniku komplexu purifikovaných proteinů s peptidem CAI. Výsledky kalorimetrických měření byly srovnatelné s publikovanými daty, kdy disociační konstanta vzniku komplexu je v rozmezí  $10^{-6} - 10^{-5}$  M [54]. Mutantní kapsidový protein vykazoval horší vazbu na peptidový inhibitor, což značí vliv tyrosinu v pozici 169 na vazbu CAI.

Kromě základních termodynamických parametrů byla kalorimetrickým měřením při různých teplotách určena tepelná kapacita vazby obou purifikovaných proteinů s CAI. Hodnoty naměřených tepelných kapacit naznačují, že nedochází k výraznému zanoření peptidu CAI do proteinu CA a že mutace Y169A zvyšuje hydrofobní interakce proteinu s CAI peptidem.

## 7. Seznam použité literatury

- [1] Perozzo, R., Folkers, G., Scapozza, L.: Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J. Recept. Signal Tr. R.*; 24: 1-52 (2004)
- [2] Ladbury, J. E., Doyle, M. L.: *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. John Wiley & Sons; Cornwall, Great Britain (2004)
- [3] Jelesarov, I., Bosshard, H. R.: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.*; 12: 3-18 (1999)
- [4] Pierce, M. M., Raman, C. S., Nall, B. T.: Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*; 19: 213-221 (1999)
- [5] Sigurskjold, B. W.: Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem*; 277: 260-266 (2000)
- [6] Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., Lin, L. N.: Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.*; 179: 131-137 (1989)
- [7] Connelly, P. R., Aldape, R. A., Bruzzese, F. J., Chambers, S. P., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Itoh, S., Livingston, D. J., Navia, M. A., Thomson, J. A.: Enthalpy of hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91: 1964-1968 (1994)
- [8] Ladbury, J. E.: Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.*; 3: 973-980 (1996)
- [9] Chervenak, M. C., Toone, E. J.: A direct measure of the contribution of solvent reorganisation to the enthalpy of ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.*; 116: 10533-10539 (1994)
- [10] Spolar, R. S., Record, M. T., Jr.: Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science*; 263: 777-784 (1994)

- [11] Makhatadze, G. I., Privalov, P. L.: Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.*; 47: 307-425 (1995)
- [12] Murphy, K. P., Freire, E.: Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.*; 43: 313-361 (1992)
- [13] Fukada, H., Takahashi, K.: Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins*; 33: 159-166 (1998)
- [14] Carbonell, T., Freire, E.: Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry*; 44: 11741-11748 (2005)
- [15] Freire, E.: Do Enthalpy and Entropy Distinguish First in Class From Best in Class? *Drug Discov. Today*; 13: 869-874 (2008)
- [16] King, N. M., Prabu-Jeyalaban, M., Nalivaika, E. A., Wigerinck, P., de Béthune, M.P., Schiffer, C. A.: Structural and thermodynamic basis for the binding of TMC114, a next-generation human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J. Virol.*; 78: 12012-12021 (2004)
- [17] Lafont V., Armstrong, A. A., Ohtaka, H., Kiso, Y., Mario Amzel, L., Freire, E.: Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. *Chem. Biol. Drug Des.*; 69: 413-422 (2007)
- [18] Ruben, A. J., Kiso, Y., Freire, E.: Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. *Chem. Biol. Drug Des.*; 67: 2-4 (2006)
- [19] Bardi, J. S., Luque, I., Freire, E.: Structure-based thermodynamic analysis of HIV-1 protease inhibitors. *Biochemistry*; 36: 6588-6596 (1997)
- [20] Velázquez-Campoy, A., Luque, I., Freire, E.: The application of thermodynamic methods in drug design. *Thermochim. Acta*; 380: 217-227 (2001)
- [21] Hong, L., Treharne, A., Hartsuck, J. A., Foundling, S., Tang, J.: Crystal structures of complexes of a peptidic inhibitor with wild-type and two mutant HIV-1 proteases. *Biochemistry*; 35: 10627-10633 (1996)
- [22] Freire, E.: A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. *Chem. Biol. Drug Des.*; 74: 468-472 (2009)

- [23] Todd, M., Luque, I., Velázquez-Campoy, A., Freire, E.: Thermodynamic basis of resistance to HIV-1 protease inhibition: calorimetric analysis of the V82F/I84V active site resistant mutant. *Biochemistry*; 39: 11876-11883 (2000)
- [24] Ohtaka, H., Schön, A., Freire, E.: Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations. *Biochemistry*; 42: 13659-13666 (2003)
- [25] Ohtaka, H., Velázquez-Campoy, A., Xie D., Freire, E.: Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: the binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease. *Protein Sci.*; 11: 1908-1916 (2002)
- [26] Velázquez-Campoy, A., Kiso, Y., Freire, E.: The binding energetics of first- and second-generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design. *Arch. Biochem. Biophys.*; 390: 169-175 (2001)
- [27] Ohtaka, H., Freire, E.: Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*; 88: 193-208 (2005)
- [28] Sticht, J., Humbert, M., Findlow, S., Bodem, J., Müller, B., Dietrich, U., Werner, J., Kräusslich, H. G.: A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 12: 671-677 (2005)
- [29] Klimas, N., Koneru, A. O., Fletcher, M. A.: Overview in HIV. *Psychosom. Med.*; 70: 523-530 (2008)
- [30] Freed, E. O.: HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology*; 251: 1-15 (1998)
- [31] Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., Buttò, S.: HIV virology and pathogenetic mechanism of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super. Sanita*; 46: 5-14 (2010)
- [32] Berger, E. A., Murphy, P. M., Farber, J. M.: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol.*; 17: 657-700 (1999)
- [33] Zheng, Y. H., Lovsin, N., Peterlin, B. M.: Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol. Lett.*; 97: 225-234 (2005)

- [34] Barrera, F. N., Hurtado-Gómez, E., Lidón-Moya, M. C., Neira, J. L.: Binding of the C-terminal domain of the HIV-1 capsid protein to lipid membranes: a biophysical characterization. *Biochem. J.*; 394: 345-353 (2006)
- [35] Mateu, M. G.: The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J.*; 276: 6098-6109 (2009)
- [36] Chen, B., Tycko, R.: Simulated self-assembly of the HIV-1 capsid: protein shape and native contacts are sufficient for two-dimensional lattice formation. *Biophys. J.*; 100: 3035-3044 (2011)
- [37] Borsetti, A., Ohagen, A., Göttlinger, H. G.: The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J. Virol.*; 72: 9313-9317 (1998)
- [38] Alcaraz, L. A., Del Alamo, M., Mateu, M. G., Neira, J. L.: Structural mobility of the monomeric C-terminal domain of the HIV-1 capsid protein. *FEBS J.*; 275: 3299-3311 (2008)
- [39] Wills, J. W., Craven, R. C.: Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS*; 5: 639-654 (1991)
- [40] von Schwedler, U. K., Stray, K. M., Garrus, J. E., Sundquist, W. I.: Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J. Virol.*; 77: 5439-5450 (2003)
- [41] Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M., Sundquist, W. I.: The Structural Biology of HIV Assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 18: 203-217 (2008)
- [42] Ivanov, D., Tsodikov, O. V., Kasanov, J., Ellenberg, T., Wagner, G., Collins, T.: Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 104: 4353-4358 (2007)
- [43] Klein, K. C., Reed, J. C., Lingappa, J. R.: Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag. *AIDS Rev.*; 9: 150-161 (2007)
- [44] Yeager, M.: Design of in vitro symmetric complexes and analysis by hybrid methods reveal mechanism of HIV capsid assembly. *J. Mol. Biol.*; 410: 534-552 (2011)
- [45] Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K., Freed, E. O.: Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 101: 14889-14894 (2004)

- [46] Lee, S. K., Potempa, M., Swanstrom, R.: The Choreography of HIV-1 Proteolytic Processing and Virion Assembly. *J. Biol. Chem.*; 287: 40867-40874 (2012)
- [47] Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., Banumathi, S., Hua, Y., Yeager, M.: Disulfide Bond Stabilization of the Hexameric Capsomer of Human Immunodeficiency Virus. *J. Mol. Biol.*; 401: 985-995 (2010)
- [48] Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H. G., Fuller, S. D.: Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.*; 22: 1707-1715 (2003)
- [49] Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M.: Atomic-level modeling of the HIV capsid. *Nature*; 469: 424-427 (2011)
- [50] Jiang, Y., Liu, X., De Clercq, E.: New Therapeutic Approaches Targeted at the Late Stages of the HIV-1 replication cycle. *Curr. Med. Chem.*; 18: 16-28 (2011)
- [51] Tang, C., Loeliger, E., Kinde, I., Kyere, I., Mayo, K., Barklis, E., Sun, Y., Huang, M., Summers, M. F.: Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J. Mol. Biol.*; 327: 1013-1020 (2003)
- [52] Kelly, B. N., Kyere, S., Kinde, I., Tang, C., Howard, B. R., Robinson, H., Sundquist, W. I., Summers, M. F., Hill, C. P.: Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. *J. Mol. Biol.*; 373: 355-366 (2007)
- [53] Ternois, F., Sticht, J., Duquerroy, S., Kräusslich, H. G., Rey, F. A.: The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 12: 678-682 (2005)
- [54] Bartonova, V., Igonet, S., Sticht, J., Glass, B., Habermann, A., Vaney, M. C., Sehr, P., Lewis, J., Rey, F. A., Kräusslich, H. G.: Residues in the HIV-1 capsid assembly inhibitor binding site are essential for maintaining the assembly-competent quaternary structure of the capsid protein. *J. Biol. Chem.*; 283: 32024-32033 (2008)
- [55] Zhang, H., Zhao, Q., Bhattacharya, S., Waheed, A. A., Tong, X., Hong, A., Heck, S., Curreli, F., Goger, M., Cowburn, D., Freed, E. O., Debnath, A. K.: A Cell-penetrating Helical Peptide as a Potential HIV-1 inhibitor. *J. Mol. Biol.*; 378: 565-580 (2008)
- [56] Bhattacharya, S., Zhang, H., Debnath, A. K., Cowburn, D.: Solution structure of a hydrocarbon stapled peptide inhibitor in complex with monomeric C-terminal domain of HIV-1 capsid. *J. Biol. Chem.*; 283: 16274-16278 (2008)

- [57] <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/SKU/161-0373EDU/Precision-Plus-Protein-All-Blue-Standards>; citováno 9.4.2013
- [58] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press; New York, USA (1989)
- [59] Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W.: Use of T7 RNA - Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Method Enzymol.*; 85: 60-89 (1990)
- [60] Bradford, M. M.: Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-254 (1976)
- [61] <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/SKU/500-0006/Bio-Rad-Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate>; citováno 9.4.2013
- [62] Bello, M., Pérez-Hernández, G., Fernández-Velasco, D. A., Arreguín-Espinosa, R., García-Hernández, E.: Energetics of Protein Homodimerization: Effects of Water Sequestering on the Formation of  $\beta$ -lactoglobulin dimer. *Proteins*; 70: 1475-1487 (2007)



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	číslo OP	datum vypůjčení	poznámka