Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Bakalářská práce

Inserty v HIV protease – nový typ rezistence vůči antiretrovirové léčbě

Pavla Strnadová

Vedoucí bakalářské práce : **Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.**

Praha 2006

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za podporu a odborné rady během práce, dále RNDr. Milanovi Kožíškovi za pomoc, trpělivost, přátelský přístup a cenné rady.

Děkuji též ostatním členům z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za příjemné pracovní prostředí.

Poděkování patří v neposlední řadě mým rodičům, kteří mě podporovali během celého mého studia a byli mi ve všem oporou.

Prohlašuji tímto, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 8.6.2006

Obsah

1. **Úvod** 1
2. **Teoretická část** 2
   - 2.1. virus HIV 2
   - 2.2. Životní cyklus HIV 3
   - 2.3. Onemocnění AIDS a terapie 4
   - 2.4. Reverzní transkriptasa 7
     - 2.4.1. Problém rezistence u HIV RT 9
     - 2.4.2. Inserty v HIV RT 10
   - 2.5. HIV proteasa 13
     - 2.5.1. Problém rezistence u HIV PR 15
     - 2.5.2. Inserty v HIV PR 16
3. **Cíl práce** 24
   - 3.1. Studovaná HIV-1 proteasa 24
4. **Praktická část** 25
   - 4.1. Materiály a přístroje 25
     - 4.1.1. Použité chemikálie 25
     - 4.1.2. Laboratorní přístroje 26
     - 4.1.3. Ostatní použité materiály 26
   - 4.2. Metody 27
     - 4.2.1. Transformace 27
     - 4.2.2. Exprese HIV-1 PR indukovatelná IPTG 27
     - 4.2.3. Izolace inkluzních tělísek a jejich přečištění 28
     - 4.2.4. Renaturace HIV-1 proteasy 28
     - 4.2.5. Ionexová chromatografie na katexové koloně 29
     - 4.2.6. SDS elektroforéza 30
     - 4.2.7. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové 31
     - 4.2.8. Kinetická charakterizace 31

5. **Výsledky** 32
5.1. Exprese HIV-1 PR indukovaná IPTG 32
5.2. Izolace inkluzních tělísek a jejich přečištění 33
5.3. Renaturace a purifikace HIV-1 PR DB1 33
6. **Závěr** 36
7. **Použitá literatura** 37
8. **Seznam použitých zkratek** 39

1. Úvod

V roce 1981 bylo v USA poprvé rozpoznáno nové onemocnění, které později dostalo název AIDS. Název onemocnění je zkratkou anglického Acquired Immune Deficiency Syndrome, které vyjadřuje podstatu onemocnění. Jedná se o syndrom získaného imunodeficitu, tedy soubor příznaků, které vedou ke ztrátě obranyschopnosti organismu. Lidský organismus se tak stává náchylným k řadě dalších infekčních a nádorových onemocnění. V roce 1983 objevily nezávisle na sobě vědecké týmy dr. Galla v USA a dr. Montagniera ve Francii původce onemocnění AIDS. Je jím virus, který byl nazván HIV - Human Immunodeficiency Virus, což znamená virus způsobující ztrátu obranyschopnosti u člověka. Tento virus napadá v organismu zejména určitou skupinu bílých krvinek, T lymfocytů, v nichž se množí, později je i zabíjí a snižuje tak jejich počet v těle nakaženého člověka. Výrazný pokles počtu bílých krvinek, které hrají důležitou úlohu v obranyschopnosti lidského organismu, vede k selhávání imunity a rozvíjí se v onemocnění AIDS.

Základem léčby je protivirová terapie. Jejím cílem je alespoň zpomalit množení HIV a předejít tak zhroucení imunitního systému. Konečný cíl protiretrovirové terapie - odstranění viru z organismu - není dosud vyřešen. Všechna dosud dostupná antiretrovirová chemoterapeutika svým zásahem do životního cyklu viru pouze více či méně úspěšně zpomalují jeho množení v organismu. Existuje celá řada antiretrovirových preparátů, které působí v různých fázích replikace viru. Jejich kombinací lze dosáhnout zvýšeného účinku a omezit výskyt rezistentních variant HIV.

Předkládaná práce je zaměřená na mutantní formy HIV viru s inserty v HIV protease, které se objevují zcela náhodně u pacientů protivirové terapie a není dosud znám jejich přímý dopad na protivirovou léčbu a vznik rezistence. Cílem této práce byla příprava mutantní HIV proteasy.

2. Teoretická část

2.1. Virus HIV

HIV (Human Immunodeficiency Virus), virus lidského imunodeficitu, se řadí do čeledi Retroviridae, rodu Lentivirus. Vyskytuje se ve dvou typech značených jako HIV-1 a HIV-2, které se liší ve složení, patogenitě a geografickém výskytu *(11)*.

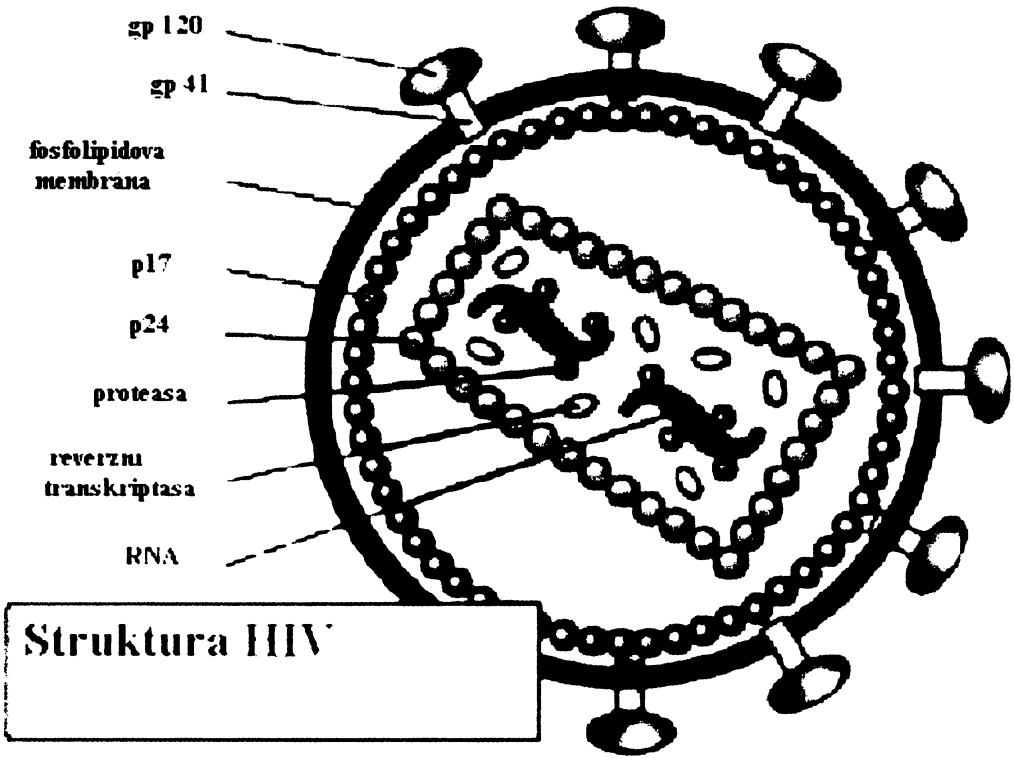
HIV-1 je v onemocnění AIDS častějším virem. Jeho genetický kód se natolik liší od genetického kódu HIV-2, že nelze předpokládat, že by vznikl pouhou jeho mutací. Je však možné, že pochází z viru vyskytujícího se u šimpanze. HIV-1 se patrně již dlouhou dobu vyskytoval u některých izolovaně žijících lidských populací, kterými byl relativně dobře tolerován. Jedná se o velmi variabilní vir, který snadno podléhá mutacím. V dnešní době dělíme izoláty do dvou skupin : M (major) a O (outlier). Kmeny M se dále dělí ještě na subtypy A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, z toho se v České republice vyskytuje subtyp B stejně jako v USA, Evropě, Austrálii či Jižní Africe *(12)*.

HIV-2 je relativně blízkým příbuzným viru africké opice (mangabey, rod *Cercocebus*). Nejpravděpodobnější hypotéza naznačuje, že někdy v bližší či vzdálenější minulosti došlo k přenosu tohoto viru z opice, která byla jeho rezervoárem s relativně dobrou tolerancí k němu, na člověka, který se stal novým hostitelem tohoto viru a nebyl na něj připraven. HIV-2 stejně jako HIV-1 může u člověka způsobit onemocnění AIDS, jeho přenos je však obtížnější. Dojde-li k němu, projeví se ve srovnání s infekcí HIV-1 rozvinuté onemocnění méně často a za delší dobu *(13)*.

Virová partikule o průměru 110 nm je tvořena fosfolipidovým obalem, pocházející z hostitelské buňky a přiléhající na vrstvu molekul matrixového proteinu p17, do něhož ústí trimer povrchového glykoproteinu gp 120, který nasedá na transmembránový glykoprotein gp 41. Glykoprotein gp 120 je odpovědný za vazbu na receptory CD4, jež jsou na povrchu T_h lymfocytů.

Vnitřek tvoří kapsida válcovitého tvaru, jež je obalena proteinem p24. V ní je uložen genom HIV, dvě identická vlákna ribonukleové kyseliny (RNA), kódující devět genů, z toho geny gag, pol a env jsou typické pro všechny retroviry. Kromě těchto základních

struktur obsahuje virová partikule HIV některé enzymy, reverzní transkriptasu, integrasu a proteasu. *(12)*.



Obr. č.1: *Struktura viru HIV, upraveno podle (1)*

2.2 Životní cyklus HIV

HIV se do organismu může dostat krví, poševním sekretem nebo vertikálním přenosem z matky na dítě *(12)*. Krevním řečištěm se virová partikule dostane k T_h lymfocytu, s jehož receptorem CD4+ interaguje pomocí glykoproteidu gp 120. Důležité pro vstup do buňky jsou také koreceptory CXCR4 (receptor pro fusin) a CCR5 (receptor pro β–chemokiny). Tímto dochází k fúzi obalu viru s povrchem lymfocytu a tím ke vstupu virové částice do hostitelské buňky. Zde dochází k odstranění obalu kapsidy a vnitřní obsah viru se dostává do cytoplasmy hostitelské buňky.

Následuje přepsání genetické informace z RNA do DNA pomocí reverzní transkriptasy. Dvouřetězcová molekula DNA se jadernými póry dostává do jádra, kde se náhodně začlení do chromozomu hostitelské buňky. Tento proces je řízen enzymem, který je součástí virové výbavy, integrasou *(11)*. V tomto stavu zůstává hostitelská buňka než se vnějším signálem zaktivuje transkripce. Tu katalyzuje RNA polymerasa II a vznikají tak i virové geny uložené v mRNA, ze které po translaci buňka vytvoří i virové polyproteinové prekurzory Gag a Gag-Pol. Gen env je přepsán do prekurzoru, který je v Golgiho systému glykosylován na glykoprotein gp 160. Ten je proteolyticky štěpen buněčnou serinovou proteasou furinem na dva proteiny gp 41 a gp 120.

Tyto glykoproteiny, polyproteiny Gag a Gag-Pol a genomová RNA se kumulují na vnitřním povrchu membrány. Při pučení těchto částic ven z buňky se uvnitř polyproteinů aktivuje virová proteasa, která štěpí zbytek polyproteinu na devíti místech za vzniku všech strukturních proteinů a replikačních enzymů viru (včetně reverzní transkriptasy, integrasy a samotné proteasy). Teprve po proteolytickém štěpení získává jádro viru svůj charakteristický tvar a virus je plně infekční *(11)*. Hostitelskou buňku tak opouští infekční virová částice, která napadá další T_h lymfocyty.

Obr. č. 2: *Pučení virové částice, převzato podle (2)*

2.3. Onemocnění AIDS a terapie

V roce 1981 bylo v odborné literatuře popsáno nové onemocnění člověka, jehož podstata spočívala v selhání buněčné imunity a proto bylo nazváno syndrom získaného selhání imunity – AIDS. Prudce stoupající počet onemocnění, jejich časová a místní souvislost i další epidemiologické údaje svědčily již od začátku o infekční etiologii.

Popisem prvních případů AIDS, odhalení původce nemoci a objasnění způsobu přenosu vyvrcholila situace na Mezinárodní konferenci o AIDS v Atlantě v roce 1985 *(14)*.

Roku 1987 se do klinické praxe dostal první lék – zidovudin (AZT), jehož původní využití spočívalo v léčení protinádorových onemocnění. Stal se tak prvním zástupcem léků, které se používají jako inhibitory reverzní transkriptasy. Dnes se používá pro klinickou léčbu dalších 9 nukleosidových analogů. Postupem času se byly vyvinuty i nenukleosidová a nukloetidová analoga.

Nukleosidové inhibitory (NRTIs) jsou analoga purinových (adenosinu a guanosinu) a pyrimidinových (cytidinu, thymidinu) nukleotidů. Jedná se o proléčiva, která jsou efektivní pouze po metabolické přeměně na trifosfáty. Takto upravené soutěží s buněčnými nukleotidy o navázání do vznikajícího polynukleotidového řetězce. Po začlenění do provirové DNA blokují další elongaci řetězce a tím přeruší růst nukleotidového řetězce. Příklady používaných inhibitorů jsou uvedeny v tabulce i s jejich zkratkou a komerčním názvem léku *(24,25)*.

Léčivo	Zkratka	Přípravek
zidovudin	ZDV	Retrovir
didanosin	ddI	Videx
zalcitabin	ddC	Hivid
stavudin	d4T	Zerit
lamivudin	3TC	Epivir
abacavir	ABV	Ziagen
zidovudin/lamivudin	ZDV + 3TC	Combivir
zidovudin/lamivudin/abacavir	ZDV + 3TC + ABV	Trizivir
emtricitabin	FTC	Emtriva
abacavir/lamivudine	ABV+3TC	Epzicon

Tab. č. 1: *Nukleosidové inhibitory*

Nukleotidové inhibitory se liší od nukleosidových tím, že mají již jeden fosfát navázaný a ke své funkci potřebují pouze dvoustupňovou fosforylaci. V současné době se používají dva inhibitory tohoto typu: tenofovir diisopropyl fumarát (tenofovir DF, Viread) a tenofovir DF v kombinaci s emtricitabinem (tenofovir DF + FTC, Truvada). Jinak se jejich mechanismus působení shoduje s nukleosidovými analogy *(25)*.

Nenukleosidové inhibitory (NNRTIs) jsou nekompetitivní inhibitory převážně hydrofobní povahy. Na rozdíl od nukleosidových nevyžadují intracelulární metabolismus ke splnění své funkce. Jsou relativně netoxické. Tento typ inhibitoru se váže do hydrofobní kapsy blízko polymerasového aktivního místa v podjednotce p66 a inhibuje enzymovou aktivitu prostřednictvím změn ve struktuře RT. Využití těchto inhibitorů při monoterapii se setkává s problémem vysoké rezistence způsobené díky změnám v aminokyselinové sekvenci v okolí vazebného místa. Příklady jsou uvedeny v tabulce *(23)*.

Léčivo	Zkratka	Přípravek
delavirdin	DLV	Recriptor
efavirenz	EFV	Sustiva
nevirapin	NVR	Viramune

Tab. č. 2: *Nenukleosidové inhibitory*

Další skupinou antiretrovirotik používaných pro léčbu jsou inhibitory HIV proteasy (PIs). Prvním byl roku 1995 schválen saquinavir. Další následovaly a v dnešní době je k dispozici 9 léků. Jejich jména i se zkratkami jsou uvedeny v tabulce *(15)*.

Léčivo	Zkratka	Přípravek
saguinavir	SQV	Invirase/Fortovase
ritonavir	RTV	Norvir
indinavir	IDV	Crixivan
nelfinavir	NFV	Viracept
lopinavir/ritonavir	LPV	Kaletra
amprenavir	APV	Agenerase
fosamprenavir	fAPV	Lexiva
atazanavir	ATV	Reyataz
tipranavir	TPV	Aptivus

Tab. č. 3: *Proteasové inhibitory*

Novinkou je lék, který inhibuje vstup virové částice do buňky: enfuvirtide (Fuzeon), kde rezistence však vzniká velice rychle. Všechny výše uvedené typy léků se však potýkají s celou řadou vedlejších účinků, jejich výroba je nákladná a velkým problémem je vznik rezistence v průběhu léčby *(13)*.

V dnešní době se nejvíce osvědčuje terapie HAART (highly active antiretroviral therapy). Dlouhodobě se kombinují tři preparáty dvou různých skupin typů léků. Základem léčby je kombinace dvou nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptasy s jedním inhibitorem proteasy. Hlavním cílem léčby je zpomalit působení viru v těle a inhibovat jeho množení. To je možné pouze tehdy, pokud byla terapie zahájena v nepříliš pokročilé fázi onemocnění, kdy ještě nenastala nevratná destrukce imunitního systému. Jestliže se má destrukci zabránit, je třeba maximálně potlačit replikaci zhoubného viru. Při léčbě je nezbytné sledovat kromě imunologických parametrů a virové nálože také krevní obraz, hodnoty jaterních enzymů a řadu dalších parametrů *(17)*.

Obr. č. 3: *Symbol boje proti AIDS (3)*

2.4. Reverzní transkriptasa

Jak již bylo výše uvedeno, reverzní transkriptasa (RT) je virový enzym, který obsahuje virová částice uvnitř kapsidy a po vstupu virové částice do T_h lymfocytů zprostředkovává přepsání genetické informace z RNA do dvouřetězcové DNA.

Funkční HIV-1 RT je asymetrický heterodimer spojený dvěma řetězci p66, který má molekulovou hmotnost 66 kD a zahrnuje 560 aminokyselin, a p51, jenž má 51 kD a obsahuje 440 aminokyselin. Podjednotka p66 se skládá ze dvou domén : N-terminální polymerasové (440 AA) a C-terminální RNAsové H domény (120 AA) a vykazuje určitou strukturní podobnost s polymerasovou doménou DNA polymerasy I *E. Coli*. Obě výše zmíněné části si můžeme představit jako pravou ruku, kterou tvoří tři podjednotky : prsty, dlaň a palec, které jsou vzájemně spojené, což zajišťuje RNAsa H, jež je vybavena

ribonukleasovou aktivitou. Je zajímavé, že ačkoli mají obě podjednotky p51 i p66 podobnou primární sekvenci, jejich struktura je odlišná.

Obr. č. 4: *Vypodobnění RT do dlaňové formy. Červené atomy znázorňují aktivní centrum enzymu, kde probíhá elongace DNA. Žluté atomy představují inhibitor ve vazné dutině, převzato podle (4)*

Tři alfa helixy v „palci" v kombinaci s „prsty" slouží jako „svorka", která upevňuje vznikající DNA v místě „dlaně", jež obsahuje polymerasové aktivní centrum. Aktivní místo p66 zahrnuje tři katalytické zbytky v dlaňové podjednotce, které by mohly vázat dva ionty kovu Mg^{2+} : Asp ^{185}, Asp ^{186}, Asp ^{110} . Tato aktivní triáda je lokalizována poblíž 3′-OH konce DNA primeru. Při tvorbě molekuly DNA jsou velice důležité van der Waalsovy interakce a šest vodíkových vazeb, které stabilizují DNA primer. Toto v molekule zajišťují Asp ^{185}, Asp^{186}, Met ^{230}, Lys ^{236}, Glu ^{258}, Asn ^{225}. První tři z nich stabilizují 3′ konec rostoucího primerového řetězce.

Podjednotka RNAsa H je nezbytná pro přeměnu RNA do dvouřetězcové DNA. Díky ní se degraduje RNA v přítomnosti duplexní RNA-DNA. Má také vliv na efektivitu iniciace synthesy DNA. V dnešní době se stává dalším cílem výzkumu pro tvorbu nového typu inhibitoru *(17)*.

Obr. č. 5: *RT s komplexem RNA – DNA, převzato podle (5)*

2.4.1. Problém rezistence u reverzní transkriptasy

Rezistence u reverzní transkriptasy vzniká pomocí třech biochemických mechanismů. Sterická inhibice je způsobena bodovými mutacemi, které umožňují reverzní transkriptase rozpoznat strukturní rozdíl mezi fosforylovaným inhibitorem a nukleotidem. Začlenění inhibitoru do provirové DNA je pak potlačeno ve prospěch nukleotidů. Příkladem těchto mutací jsou M184V, Q151M, L74V, K65R.

Druhým typem způsobující rezistenci je fosforylace pomocí ATP (adenosin trifosfát) popřípadě pyrofosfátu, která vede k přemístění již začleněného inhibitoru z rostoucího DNA řetězce. Toto zapřičiňují mutace M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y , K219Q. Vliv různých inhibitorů na tento typ rezistence se liší, klesá v tomto pořadí AZT, d4T > ABC > ddC, ddI > 3TC.

Posledním typem mechanismu je vznik insertů v RT (tento problém bude diskutován v následující kapitole).

Jednotlivé mutace mohou vést k vysokému stupni rezistence k jednomu nebo více inhibitorům. Relativně častá mutace K103N vede k 20 – 30 násobném zvýšení rezistence na všechny nenukleosidové inhibitory. Z tohoto důvodu se pak další používání NNRTIs nedoporučuje.

Mutace V106A vede k 30ti násobnému zvýšení rezistence na nevirapin a je prokázáno i snížení citlivosti na efavirenz. Tento typ rezistence je více frekventovaný u subtypu C.

Mutace G190A je spojována s vysokým stupněm rezistence na nevirapin a ovlivňuje rezistenci na efavirenz a delavirdin. Je též znám vysoký stupeň rezistence na efavirenz a nevirapin u mutací G190S a Y188C/L/H.

S léčbou zidovudinu je spojen vznik mutací M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y, K219Q. Na kmeny s mutací M184V je účinný tenofovir na rozdíl od didanosinu, abacaviru a zalcitabinu, kdy je pozorována rezistence. Mutace Q151M zapřičiňuje rezistenci na zidovudin,stavudin, didanosin, zalcitabin, abacavir a je proti ní účinný tenofovir. Pěti násobné zvýšení rezistence se prokázalo u matuce V75T na stavudin, didanosina zalcitabin. Vyskytlo se i snížení replikační schopnosti u mutace M184V a K65R o 40 – 50%. Pokud se v řetězci vyskytují obě, jedná se o snížení o 70 % *(25)*.

2.4.2. Inserty v HIV reverzní transkriptase

Inserty v úseku DNA kódující RT vznikají během léčby nukleosidovými RT inhibitory. Typickým insertem je šest nukleotidů v pozici mezi kodonem 69 a 70 (RT69S+XX) a tři nebo šest nukleotidů mezi kodonem 102 a 103 (RT102K+X, RT102K+XX). Výsledkem jsou tedy 1-2 aminokyselinové inserty v reverzní transkriptase. Malé procento řetězců obsahuje jednoaminokyselinové inserty stejně tak jako inserty s pěti, osmi, jedenácti a patnácti aminokyselinami. Inserty se objevují jako duplikace sousedních genetických sekvencí pravděpodobně při „přetažení“ a „smeknutí“ reverzní transkriptasy, ačkoli je stejně tak navrhována možnost, že patnácti aminokyselinové inserty jsou způsobeny intramolekulárními rekombinacemi *(8)*.

RT69S+XX - mají tedy dvou aminokyselinové inserty mezi kodony 69 a 70.

kmen	kodony							
	67	68	69	insert	insert	70	71	72
wild type - DNA	GAC	AGT	ACT			AAA	TGG	AGA
- aminokys.	Asp	Ser	Thr			Lys	Trp	Arg
mutant - DNA	GAC	AGT	TCT	AGT	TCT	AAA	TGG	AGA
- aminokys.	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Trp	Arg

Tab. č. 4: *Inserty v RT v pozici 69*

Díky této změně v primární sekvenci dochází ke změně ve struktuře. Šest na sobě nezávislých studií pro 144 izolovaných kmenů z pacientů ukázalo sníženou citlivost k inhibitorům po objevení insertů :

typ inhibitoru	násobek snížení
zidovudin	500
stavudin	20
didanosin	5
zalcitabin	14
lamivudin	250
abacavir	10
tenofovir	10

Tab. č. 5: *Násobky snížení citlivosti na uvedené inhibitory RT*

Kmeny s těmito inserty také podléhají dalším křížovým mutacím, které mají vliv na rezistenci užívaných inhibitorů. Léčebná historie 36 pacientů z 12 odlišných výzkumů ukazuje, že ke vzniku insertů došlo, když byla léčba zahájena zidovudinem samotným nebo v kombinaci obvykle s didanosinem nebo s zalcitabinem. Z toho vyplývá, že vznik těchto insertů je spojován s léčbou nukleosidových RT inhibitorů v kombinaci s zidovudinem nebo s použitím monoterapie zidovudinu. Mechanismus rezistence je zde spojován se strukturní změnou, která zapřičiňuje horší vaznost inhibitoru do aktivního centra RT a tím snižuje jeho efektivnost.

Snížení množství virových částic v organismu obsahující řetězce s inserty, a tedy na používané inhibitory již značně rezistentní, se podařilo díky včasnému nasazení nového typu léku jako jsou nenukleosidové RT inhibitory popřípadě proteasové inhibitory.

Dvě laboratorní studie hodnotily replikační kapacity RT s těmito inserty . Obě se shodují na tom, že těmito inserty klesla replikační schopnost. I tady však musíme uvažovat další křížové mutace ve studovaných virových kmenech *(8)*.

Obr. č. 6: *RT s vyznačenými inserty, převzato podle (8)*

RT102K+X, RT102K+XX obsahují jedno nebo dvou aminokyselinové inserty v pozici mezi 102 a 103 kodonem *(8)*.

kmen	kodony							
	100	101	102	insert	insert	103	104	105
wild type - DNA	TTA	AAA	AAG			AAA	AAA	TCA
- aminokys.	Leu	Lys	Lys			Lys	Lys	Ser
mutant - DNA	TTA	AAA	AAG	AAA		AGA	AAA	TCA
- aminokys.	Leu	Lys	Lys	Lys		Arg	Lys	Ser
mutant - DNA	TTA	AAA	AAG	AAG		AGA	AAA	TCA
- aminokys.	Leu	Lys	Lys	Lys		Arg	Lys	Ser
mutant - DNA	TTA	AAA	AAG	AAA	AAG	AGA	AAA	TCA
- aminokys.	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Ser

Tab. č. 6: *Inserty RT v pozici 102*

Tyto mutace snižují citlivost na efavirenz a nevirapin. Lze o nich s jistotou říci, že jsou méně časté než inserty v pozici 69. Testování těchto kmenů prokázalo, že inserty mají přímý vliv na citlivost nenukleosidových RT inhibitorů a nemají přímý dopad na nukleosidové RT inhibitory.

Kmeny s jedno aminokyselinovým insertem měla značnou odlišnost ve struktuře enzymu, zatímco u dvou aminokyselinového insertu tomu tak nebylo. V přítomnosti jedno aminokyselinového insertu se ukázala ztráta jedné vodíkové vazby a šestnácti van der Walsových interakcích, což mělo za následek 50x snížení citlivosti na efavirenz v porovnání s kmeny bez insertu. Snížení citlivosti se projevilo i u dvou aminokyselinovém insertu *(19)*.

2.5. HIV proteasa

HIV proteasa je virový enzym, který při posttranslační úpravě štěpí polyproteinové prekurzory Gag a Gag-Pol na devíti místech, čímž vznikají virové strukturní a funkční proteiny. Pokud dojde k zablokování funkce proteasy, formující se virová částice není spávně poskládána a je tak zcela neinfekční.

HIV proteasa patří mezi nejznámější a nestudovanější aspartátové proteasy, mezi které stejně tak patří např. pepsin, kathepsin D a E, chymosin a virové proteasy (př. Virus Rousova Sarcomu). Pro tuto skupinu je typická triáda Asp^{25}, Thr^{26}, Gly^{27} v aktivním centru, kde samotný Asp se účastní hydrolýzy petidové vazby. Bylo zjištěno, že bodovou mutací, kdy byl Asp v aktivním centru nahražen Thr nebo Asn, došlo k úplnému zablokování katalytické funkce tohoto enzymu.

HIV-1 proteasa se shoduje s HIV-2 proteasou přibližně z 50%. HIV-2 proteasa je homologní z 90% s proteasou izolovanou z opičího lentiviru SIV *(11)*.

Struktura HIV-1 proteasy byla rozřešena pomocí rentgenostrukturní analýzy a modelováním již známých eukaryotních struktur. HIV proteasa je dimer, který se skládá z dvou identických řetězců spojených nekovalentní vazbou. Každý z řetězců je sestaven z 99 aminokyselin. Oba monomery obsahují dva cysteiny, jenž v tomto případě netvoří ani v jednom případě disulfidové vazby. Typická funkční triáda se nachází v pozici : Asp^{25}, Thr^{26}, Gly^{27}. Celkové složení monomeru je znázorněno níže.

NH_2 -Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile (15)

Gly Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu **Asp Thr Gly** Ala Asp Asp (30)

Thr Val Leu Glu Glu Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys (45)

Met Ile Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp (60)

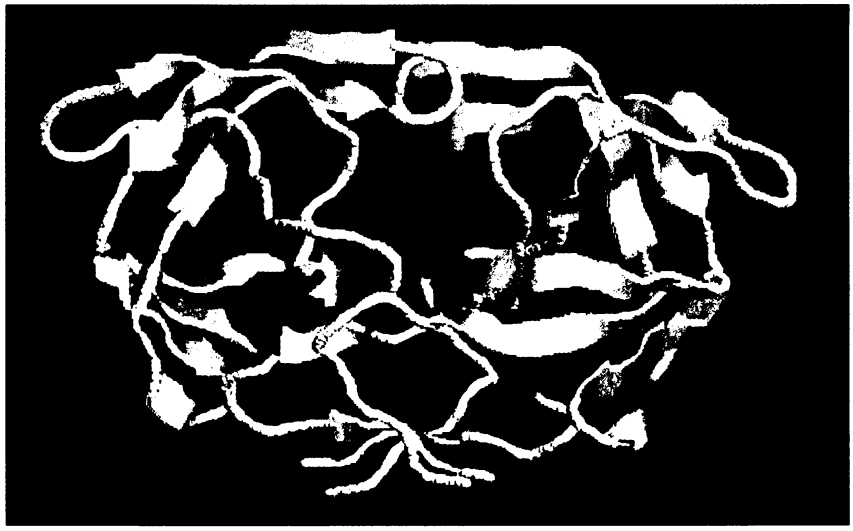
Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val (75)

Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Asr Asn Leu Leu (90)

Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe COOH (99)

Obr. č. 7: *Aminokyselinová sekvence HIV proteasy (20)*

Sekundární struktura zahrnuje jeden α-helix a dva antiparalelní β listy v každém monomeru. Terciální struktura je tvořena vazebou dutinou, dimerizační doménou, flexibilními chlopněmi a katalytickými aspartáty. Je velmi stabilizovaná vodíkovými můstky, jak je to běžné u eukaryotních organismů. Ke stabilizaci také zčásti přispívá interakce zvaná „požárnický chvat“ *(11)*. Struktura je vyobrazena na obr. 8.



Obr. č. 8: *HIV proteasa, převzato podle (7)*

Chlopně jsou tvořeny β-vlásečnicovou strukturou a zakrývají vazebnou dutinu při vazbě substrátu nebo inhibitoru. Jsou velmi flexibilní. Jsou tvořeny z aminokyselin v pořadí 46-54. Při vazbě substrátu (popř. inhibitoru) se stahují dovnitř enzymu.

Aminokyselinové zbytky v této oblasti se významně podílejí na vazebných interakcích s vázaným ligandem.

Dimerizační doména nejvíce přispívá k tvorbě dimerní struktury. Jsou to N a C konce jednotlivých monomerů tvořící antiparalelní skládaný list.

Substrát je do vazebné dutiny vázán pomocí van der Waalsových interakcí a vodíkových vazeb mezi enzymem a substrátem *(7)*.

2.5.1. Problém rezistence u HIV proteasy

K mutacím HIV proteasy dochází díky chybnému přepisu reverzní transkriptasy, která nemá schopnost opravit chyby při přepisu RNA. Díky této vlastnosti a rychlosti replikace viru vzniká denně až 10^5 mutací (1 chybná báze na 10 000 párů bazí). Z těchto mutací se pod selekčním tlakem inhibitorů selektují ty, které zlepšují replikaci viru v přítomnosti inhibitoru.

Rychlý vývoj jednotlivých kmenů během léčby inhibitory reverzní transkriptasy je největší překážkou úspěšné léčebné terapie. Objevení proteasových inhibitorů (PRIs) bylo přivítáno s novou nadějí. Naneštěstí jsou však rezistentní mutanty vyselektovány již během několika týdnů po nasazení PRIs. Během minulých několika let se rezistentní virové kmeny stávají mnohem běžnější *(26)*.

Mutace se vyskytují na mnoha místech. Může být změněno až 49 z 99 aminokyselin. Mutace ve vazebné dutině přímo ovlivňují vazbu inhibitoru, jejich příspěvek k rezistenci je největší. Mutační změny mimo vazebné místo ovlivňují například katalytickou aktivitu nebo stabilitu dimeru *(11)*.

První identifikovaná mutace HIV PR, která zvýšila rezistenci viru, byla V82A ve vazebné dutině. Později se prokázalo rozšířené spektrum mutace V82A, T, F, S, jež bylo nalezeno u pacientů léčených jak indinavirem tak ritonavirem. Je zajímavé, že touto změnou ztratily klinicky používané inhibitory van der Waalsovy interakce na pozici 82, to se však neobjevilo u vaznosti substrátu.

Mutace I84V byla prokázána u kmenů izolovaných z pacientů léčených indinavirem, ritonavirem, saquinavirem a amprenavirem. Prokazuje zvýšenou rezistenci na všechny

PRIs, stejně tak jako I54V, která je lokalizována na chlopních proteinu. Další typy mutací jsou již více specifické. Například D30N vznikla v kmeni po užívání nelfinaviru, I50V zase po léčení amprenavirem.

Dalším krokem vývoje se stal vznik tzv. druhotných mutací, které se začaly tvořit, aby zvýšily replikační schopnost rezistentních kmenů, u nichž došlo vlivem mutace k jejímu snížení. Tento typ mutací nemá většinou přímý dopad na strukturu aktivního centra, ale v kombinaci s původní mutací udělí kmenu vysoký stupeň rezistence. Nachází se v dimerizační doméně nebo též v hydrofobních částech, kde naruší sbalení enzymového jádra. Tyto mutace hrají hlavní roli v zprostředkování vysokého a středního stupně rezistence.

Konečně to nejsou jen mutace v enzymu, ale dochází též ke změnám na jednom či více místech polyproteinových prekurzorů, které napomáhají replikační schopnosti *(26)*. Novinkou ve studiích rezistence jsou dále zmiňované inserty HIV proteasy.

2.5.2. Inserty v HIV protease

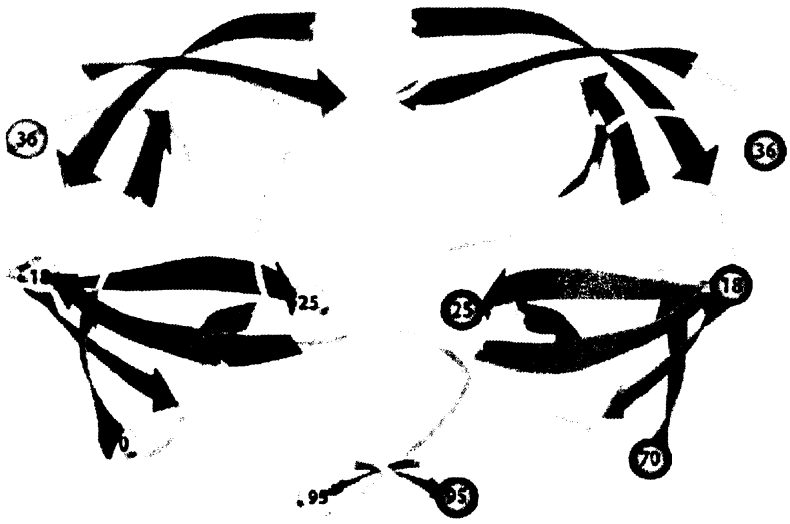
Jak již bylo výše uvedeno, inserty se poměrně často vyskytují v reverzní transkriptase. Na rozdíl od insertů proteasy studie prokazují, že se jedná o specifické mutace vzniklé vlivem terapie používaných inhibitorů. Dále také víme, že tyto inserty způsobují vznik rezistence na dané inhibitory a snižují tak účinnost léčby *(8,19)*. Inserty v HIV protease se zatím vyskytují méně často a ve větší variabilitě. V otázce, zda mají vliv na rezistenci užívaných inhibitorů se názory zdaleka neshodují. Pozdější studie se však kloní k názoru, že inserty rezistenci ovlivňují.

Inserty se v HIV protease (PR) vyskytují na různých místech a v různém počtu. V tomto směru je HIV proteasa více variabilní oproti reverzní transkriptase. Inserty se vyskytují ve všech oblastech HIV proteasy – v chlopních, dimerizační doméně, smyčkách obklopujících vazebnou dutinu i v těsné blízkosti aktivního centra. Dosud byly izolovány vzorky s inserty v polohách mezi kodony : 17-18, 22-25, 31-32, 35-38, 70-71, 95-96. Počet

aminokyselinových insertů se pohybuje v rozmezí 1-6. Největší variabilita se nachází u kodonu 35 *(8,18)*.

Většina insertů se objevila jako duplikace sousedních genetických sekvencí, což přímo dokazují inserty v pozicích 35 a 95. Předpokládaný vznik se shoduje s reverzní transkriptasou a to tak, že při přepisu RNA do DNA došlo k pozastavení a skluzu reverzní transkriptasy. U těchto kmenů se vyskytují i další bodové mutace. S větší frekvencí se objevují mutace I84V, jež se nachází ve vazebném místě a má proto výrazný vliv na vznik rezistence, a L90M, která je mimo vazebné místo a může tedy nepřímo zasáhnout do struktury vazebného místa a snížit tak afinitu enzymu k inhibitoru *(11)*. Typ bodových mutací silně ovlivňuje rezistenci na proteasové inhibitory, takže se nedá obecně říci, jak přesně velký dopad mají samotné inserty. Jejich výskyt je kolem 0,1% vzorků odebraných v rozmezí 1999-2001. Vznik insertů se nedá spojit ani s terapií užívaných inhibitorů, čehož je důkazem pacient s dvou aminokyselinovým insertem v pozici 36, u něhož byl insert nalezen ještě před nasazením léčby proteasových inhibitorů. Byla však prokázána snížená replikační schopnost příslušného viru.

Dosud nebyla publikována žádná krystalová struktura proteasy obsahující inserty. Většina typů insertů se nachází vně struktury. Insert poblíž kodonu 25 však těsně přiléhá na aktivní centrum. Nebylo ale dosud prokázáno, že by tato změna měla dopad na enzymovou funkci *(8,18)*.



Obr. č. 9: *PR s vyznačenými inserty, převzato podle (8)*

Některé konkrétní inserty jsou popsány v tabulkách:

Insert v pozici 17 je na samém okraji struktury enzymu. Virová sekvence izolovaná z pacienta měla navíc tyto mutace: M46I, která přispívá k rezistenci všech klinických inhibitorů kromě saquinaviru. I84V, ke které dochází při léčbě indinavirem, ritonavirem, saquinavirem a amprenavirem. Způsobuje rezistenci ke všem klinickým inhibitorům, jelikož aminokyselina v pozici 84 se nachází ve vazebné dutině enzymu *(11,18)*.

kmen	kodony				
	16	17	insert	18	19
wild type - DNA	GGG	GGG		CAA	CTA
-aminokys.	Gly	Gly		Gln	Leu
mutant - DNA	GGG	GGG	CGG	CAA	CTA
- aminokys.	Gly	Gly	Arg	Gln	Leu

Tab. č. 7: *Inserty PR v pozici 17*

Insert v pozici 25 je přímo ve funkční triádě za katalytickým aspartátem. Není jasné, je-li enzym nadále funkční. V izolátech se vyskytly bodové mutace: M46I, I84V, L90M, jež se objevují při léčbě saquinavirem, nelfinavirem, indinavirem a ritonavirem. Protože je aminokyselina v pozici 90 mimo vazebné místo, není dosud znám mechanismus způsobující rezistenci *(11,18)*.

kmen	kodony							
	21	22	23	24	25	insert	26	27
wild type - DNA	GAA	GCT	CTA	TTA	GAT		ACA	GGA
-aminokys.	Glu	Ala	Leu	Leu	Asp		Thr	Gly
mutant - DNA	GAG	GAT	GTT	CTA	TTA	GAT	ACA	GGA
- aminokys.	Glu	Asp	Val	Leu	Leu	Asp	Thr	Gly
mutant - DNA	GAA	GCC	CTG	CTA	GAC	CAC	ACA	GGA
- aminokys.	Glu	Ala	Leu	Leu	Asp	His	Thr	Gly

Tab. č. 8: *Inserty PR v pozici 25*

Insert v pozici 31 se vyskytl u pacienta léčeného terapií HAART. Léčba byla zahájena roku 1996 a insert se objevil až roku 2003. Koncem roku 2002 byla zahájena léčba Kaletrou v kombinaci s tenofovirem a z předchozích období se pokračovalo ještě v užívání abacaviru. Na konci roku 2003 byl testy prokázaly snížení účinnosti léčby – zvýšení virových jednotek a snížení T_h lymfocytů.

kmen	kodony						
	29	30	31	insert	32	33	34
wild type - DNA	ACA	GTA	TTA		GAA	GAA	ATG
mutant - DNA	ACA	GTA	TTA	TTA	GAG	GAA	ATA

Tab. č. 9: *Inserty PR v pozici 31*

Měření genotypové rezistence prokázalo vysokou úroveň rezistence k většině antivirovým lékům i použitých během léčby. Nebylo však prokázáno, že by kombinace výše zmíněných léků způsobovala selekci insertů. To se podařilo prokázat pouze u 1 z 280 pacientů z celkem 370 genotypových testů. S tímto typem mutace není spojována rezistence k užívaným inhibitorům *(21)*.

Pozice 35 je nejvariabilnější. Bylo zde zatím izolováno 19 různých sekvencí lišících se jak inserty tak bodovými mutacemi. Vyskytují se zde výše uvedené typy mutací a nové typy v různé kombinaci: I54V, jež způsobuje rezistenci ke všem klinickým inhibitorům. Běžná je u pacientů léčených amprenavirem. Isoleucin v pozici 54 se nalézá na chlopních enzymu. Dále je to mutace L10I, V82A, která se vyskytuje u pacientů léčených indinavirem nebo ritonavirem. Aminokyselina 84 je umístěna ve vazebné kapse enzymu. G48V se objevuje při léčbě vyšších dávek saquinaviru, vzácně během léčby indinavirem. Způsobuje desetinásobné snížení citlivosti příslušného viru k saquinaviru a trojnásobné snížení citlivosti k indinaviru, ritonaviru a nelfinaviru. Valin v pozici 48 se nachází v chlopních enzymu a tato mutace způsobí větší pevnost chlopní a tím snižuje jejich flexibilitu *(11,18)*.

kmen	kodony												
	33	34	35	36	37	38	insert	insert	insert	insert	insert	39	40
wild type - DNA	TTA	GAA	GAA	ATG	AAT	TTG						CCA	GGA
-aminokys.	Leu	Glu	Glu	Met	Asn	Leu						Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ACA	GTA	TTA	GAA	GAA	ATA	AAT	TTG	CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Ile	Asn	Leu	Pro	Gly
mutant- DNA	TTA	GAA	GAA	ACG	AAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ACA	AAT	TTA	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAC	ATG	AAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAC	ACA	GAC	ATA	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Asp	Thr	Asp	Ile	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAC	ACG	AAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ACG	GGT	TTA	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Thr	Gly	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	GTA	AAT	TTA	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Val	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ATG	AAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Met	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ATG	GAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Met	Asp	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ACA	AAT	CTA	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAC	ACG	AAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ATG	AAT	TTG	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Met	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	ACA	AAT	TTA	AAT	TTG				CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Asn	Leu				Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	GAT	CTA	AAT	TTG					CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Asp	Ile	Asn	Leu					Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	GAC	ATA	GAT	TTG					CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Asp	Ile	Asp	Leu					Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	GGA	ATA	AGT	TTA					CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Leu					Pro	Gly
mutant - DNA	TTA	GAA	GAA	AAT	ATA	AGT	TTG					CCA	GGA
- aminokys.	Leu	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu					Pro	Gly

Tab. č. 10: *Inserty PR v pozici 3*

Dvou aminokyselinový insert v pozici 36 byl nalezen u pacienta léčeného kombinací zidovudin/zalcitabin po šest měsíců a se stavudinem/lamivudinem po dva týdny. Kromě

přítomnosti insertu nebyla zaznamenána žádná jiná mutace spojována s rezistencí v PR, RT genech ani v místě štěpení proteinu Gag. V této pozici je známa sekundární mutace M36I, která je spojována s rezistencí na indinavir, ritonavir, nelfinavir. Proto byla po tomto zjištění vybrána výše zmíněná kombinace inhibitorů.

kmen	kodony							
	34	35	36	insert	insert	37	38	39
wild type - DNA	AGA	AGA	AAT			AGT	TTG	CCA
-aminokys.	Glu	Glu	Met			Ser	Leu	Pro
mutant - DNA	AGA	AGA	AAC	AAT	TTA	AAT	TTG	CCA
- aminokys.	Glu	Glu	Met	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro

Tab. č. 11: *Inserty PR v pozici 36*

Tato léčba byla úspěšná a později ji vystřídala kombinace stavudinu, lamivudinu, abacaviru. Po této změně postupně rostla koncentrace virových částic v krvi pacienta. Po 31 měsících se opět provedly genotypové a fenotypové analýzy. Navzdory přerušení léčení pomocí indinaviru insert v této pozici PR zůstal i nadále. Navíc se objevila rezistence na lamivudin a to bodovou mutací M184V v reverzní transkriptase. Přítomnost samotného insertu se v tomto případě nemůže přímo spojovat s rezistencí na PR inhibitory *(23)*.

Insert o dvou aminokyselinách v pozici 70 byl izolován z pacienta léčeného několik let. Před genotypovou analýzou se 14 měsíců jeho léčba skládala z inhibitorů saquinavir/ritonavir, tenofovir, lamivudin. Testy prokázaly mutace v RT D67N, K70R, L74L/V, K103N, M184V, G190G/S, T215F, K219Q a G333E svědčící o rozsáhlé léčbě RT inhibitory. Kmeny také obsahovaly proteasové mutace z toho některé spojené s rezistencí: L10I, L24I, M36A, M46L, I54V, L63P, A71V,I93L a níže uvedený insert.

kmen	kodony							
	68	69	70	insert	insert	71	72	73
wild type – DNA	GGA	CAT	AAA			GCT	ATA	GGT
- aminokys.	Gly	His	Lys			Ala	Ile	Gly
mutant - DNA	GAA	TAT	AAA	ATT	AAA	GTT	ATA	GGT
- aminokys.	Glu	Tyr	Lys	Ile	Lys	Val	Ile	Gly

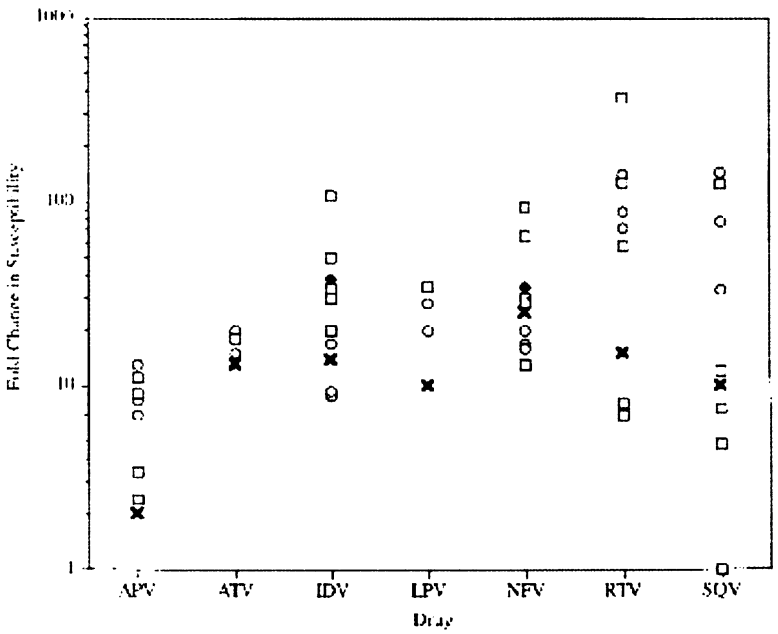
Tab. č. 12: *Inserty PR v pozici 70*

Kmen s tímto insertem a výše uvedenými mutacemi byl podroben testům metodou PhenoSense. Výsledky prokázaly snížení citlivosti na všechny PR inhibitory v rozmezí násobku 2-25 (viz tabulka).

typ inhibitoru	násobek snížení
amprenavir	2
atazanavir	13
indinavir	14
lopinavir	10
nelfinavir	25
ritonavir	15
saquinavir	10

Tab. č. 13: *Násobky snížení citlivosti na uvedené inhibitory PR při insertní mutaci v pozici 70*

Na základě těchto výsledků se v databázi hledaly řetězce se stejnými mutacemi bez insertu. Nepodařilo se najít zcela identický, a tak se prováděly testy s řetězci, které všechny obsahovaly mutace L10I, L24I, M46, I54V, L63P, A71V a navíc následující označené mutace: (□) V82A; (○) V82A a I84V; (◆) V82A a L90M. Výsledek testu je zaznamenaný v grafu:



Obr. č. 10: *Ovlivnění citlivosti virového isolátu na PR inhibitory při různých typech mutací, převzato podle (9)*

Z grafu lze vyčíst, že citlivost těchto kmenů byla v přítomnosti insertové mutace menší než v přítomnosti jedné nebo dvou hlavních bodových mutací.

Ačkoli umístění tohoto insertu není v přímé blízkosti aktivního centra, mohl by mít dopad na selektivitu. Až dosud byl tento genotypový znak zjištěn u 1 z 100 000 testovaných vzorků *(9)*.

Inserty v pozici 95 se nachází v dimerizační doméně. Byly izolovány dva typy kmenů s bodovými mutacemi: L10I, L90M, I54V, I84V popsanými výše.

kmen	kodony									
	94	95	insert	insert	insert	insert	insert	insert	96	97
wild type - DNA	GGT	TGC							ACT	TTA
-aminokys.	Gly	Cys							Thr	Leu
mutant - DNA	GGT	TGC	ACT	TTA	AAT	TTT	CCC	ATT	ACT	TTA
- aminokys.	Gly	Cys	Thr	Leu	Asn	Phe	Pro	Ile	Thr	Leu
mutant - DNA	GGT	TGC	ACT	TTA	AAT	TTT	CCC		ACT	TTA
- aminokys.	Gly	Cys	Thr	Leu	Asn	Phe	Pro		Thr	Leu

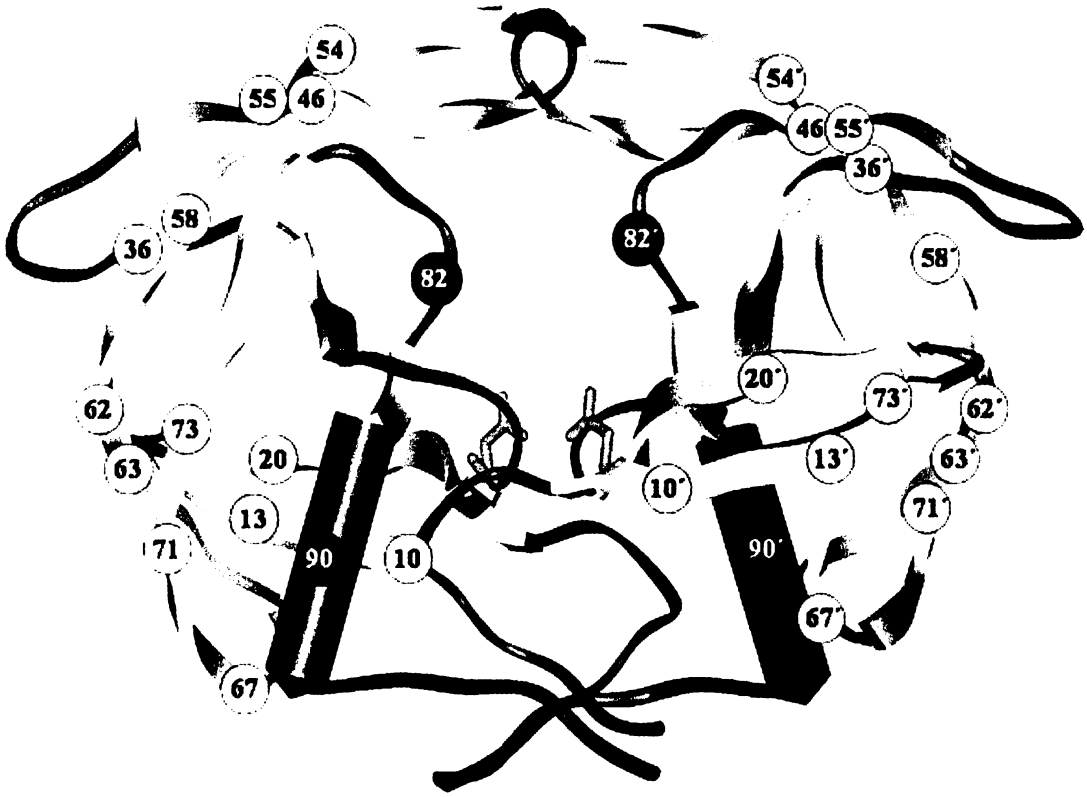
Tab. č. 14: *Inserty PR v pozici 95*

Shrnutím lze říci, že v ani jednom z uvedených případů nedošlo vlivem insertu k narušení funkce HIV proteasy a reverzní transkriptasy. Studie tedy dokazují, že určité insertní mutace v souvislosti s bodovými mutacemi rezistenci na PR inhibitory způsobují a jiné rezistenci významně neovlivňují. Vše závisí na typech a kombinacích insertů a bodových mutacích. Všechny studie se však shodují na tom, že ačkoli dosud není výskyt insertů tak častý, o to více důležitý je jejich výzkum.

3. Cíl práce

3.1. Studovaná HIV-1 proteasa

Mým cílem v předkládané bakalářské práci je vyizolovat HIV-1 proteasu, která byla pracovně označena DB1. Jedná se o uměle připravený enzym, jenž obsahuje mnoho bodových mutací a zároveň z něj byl odstraněn insert. Původně proteasa obsahovala insert v pozici 33, kde došlo ke zdvojení, a místo jedné molekuly leucinu kmen obsahoval dva leuciny v pozici 33. Pomocí PCR byl Milanem Kožíškem na ÚOCHB AV ČR insert z enzymu odstraněn, aby mohl být zjištěn vliv samotného insertu na rezistenci. Studovaný deletovaný protein tedy obsahuje tyto bodové mutace: L10I, I13V, K20I, M36I, M46I, I54V, K55R, Q58E, I62V, L63P, C67F, A71V, G73S, V82A, L90M a pouze jednu molekulu leucinu v pozici 33. Výše uvedené mutace jsou znázorněny na obr. 12.



Obr. č. 12: *HIV-1 proteasa – DB1 s vyznačenými mutacemi, červeně jsou označeny primární mutace, zeleně jsou znázorněny katalytické aspartáty v aktivním místě, (autorem obrázku je M. Lepšík z ÚOCHB AV ČR)*

4. Praktická část

4.1. Materiály a přístroje

4.1.1. Použité chemikálie

akrylamid	USB (Cleveland, USA)
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva (Heidelberg, Německo)
deoxycholát sodný	Fluka (Buchs, Švýcarsko)
EDTA	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
ethanol	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
glycerol	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)	Biosynth AG (Staad, Švýcarsko)
kanamycin	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
laurylsulfát sodný, n-dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
LB medium	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
lysozym	Serva (Heidelberg, Německo)
2-merkaptoethanol	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
MES	USB (Cleveland, USA)
methanol	Lach-Ner (Neratovice, CZ)
persíran amonný	Serva (Heidelberg, Německo)
PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
TEMED	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
thiosíransodný	Penta (Praha, ČR)
TRIS (tris(hydroxymethyl)aminoethan)	USB (Cleveland, USA)
Triton X 100	Serva (Heidelberg, Německo)

4.1.2. Laboratorní přístroje

- rotační inkubátor Innova 4300, New Brunswick Scientific (Německo)
- sonikátor Soniprep 150MSE (USA)
- autokláv MLS-3020U, Sanyo (Japonsko)
- spektrofotometr Helios α, Unicam (USA)
- dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr UNICAM UV 500, Praha (CZ)
- vertikální SDS-PAGE, Sigma (USA)
- centrifuga Beckman J2-MI (USA)

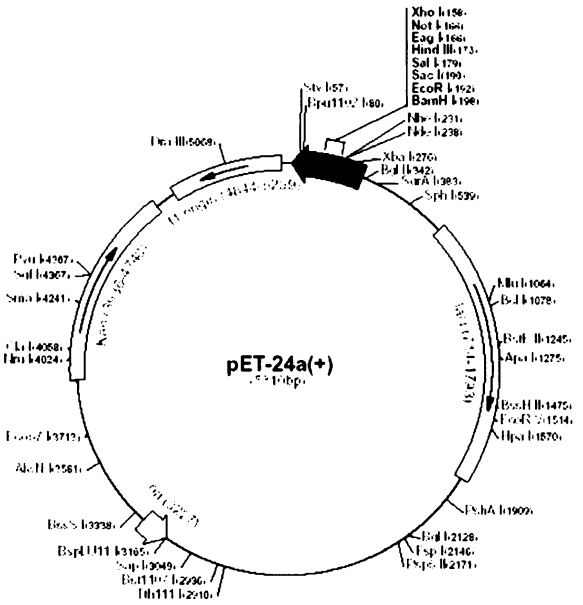
4.1.3. Ostatní použité materiály

- kolona na FPLC: MonoS HR5/5
- dialyzační membrána Spectrapor

- **Bakteriální buňky:** ***Escherichia coli***

BL 21 (DE3) RIL

- **Plazmidy:** pET-24a – vektor pro expresi proteinů v *E.coli*



Obr. č. 11: *Plazmid pET-24a*

4.2. Metody

4.2.1. Transformace

K 150 µl kompetitivních buněk *E.coli* bylo přidáno 2 µl DNA připravené minipreparací a směs byla ponechána 30 min na ledu. Mikrozkumavka se směsí byla inkubována při 42 °C po dobu 90 sekund a poté přenesena na 2 min zpět na led (tzv. „tepelný šok"). Ke směsi byl přidán 1 ml sterilního LB media bez antibiotika a mikrozkumavka byla dána na 1 hod do inkubátoru při 37 °C. Poté byla směs nanesena na misky s agarem, který obsahoval kanamycin. Misky byly ponechány přes noc při teplotě 37 °C.

4.2.2. Exprese HIV-1 PR indukovatelná IPTG

K tomuto typu exprese byl použit kmen *E.coli* BL 21 (DE3) RIL. Ten ve svém genomu obsahuje gen pro T7 RNA polymerasu pod kontrolou promotoru p_{lac}. Přídavek IPTG tak indukuje tvorbu T7 RNA polymerasy, která následně zajistí transkripci genu pro HIV-1 PR, který se nalézá v plazmidu pET24a pod kontrolou T7 promotoru.

150 µl kompetitivních buněk *E.coli* BL 21 (DE3) RIL bylo transformováno 2 µl plazmidové DNA po minipreparaci – expresním plazmidem pET24a obsahujícím gen pro příslušnou HIV-1 PR, T7 promotor a nesoucí rezistenci na kanamycin (kap. 3.2.1.). Narostlé kolonie byly rozsuspendovány v 4 ml sterilního LB-media. 6 dvoulitrových Erlenmayerových baněk s 0,5 l sterilního media LB $^{KAN+}$ (40 µg/ml) byly zaočkovány bakteriální suspenzí po stejných objemech (1ml suspenze/baňku). Baňky byly následně třepány v rotačním inkubátoru při 300 otáček/min a teplotě 37 °C. Během třepání byl sledován růst bakterií v mediu měřením optické hustoty při 595 nm (OD_{595}). Při hodnotě OD 0,8 - 0,9 byla provedena indukce exprese proteinu přídavkem 1 ml 0,4 M IPTG. Po indukci byly bakterie kultivovány 3 hod a po této době byly sklizeny centrifugací při 5400 g, 10 min, za teploty 18 °C. Před přídavkem IPTG a 3 hodiny po indukci byl odebrán 1 ml bakteriální suspenze pro kontrolu na SDS elektroforéze, vzorky byly označeny DB1/1

a DB1/2. Bakterie byly stočeny při 16000 g, 3 min a peleta byla rozsuspendována v 100 µl destilované vody.

4.2.3. Izolace inkluzních tělísek a jejich přečištění

Roztoky:

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

pufr SA : 50 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl, 1 mM EDTA; pH 8,0

pufr TA : 50 mM Tris-HCl, 1 % (v/v) Triton X100, 1 mM EDTA; pH 8,0

Bakterie produkují požadovaný protein v denaturovaném stavu ve formě inkluzních tělísek. Bakteriální peleta byla třikrát zmražena a rozmražena v pufru A (k 7,7 g mokré biomasy bylo přidáno 80 ml pufru A). Následně bylo přidáno 232 µl roztoku 10 mM PMSF, který inhibuje serinové proteasy. Poté byl přidán lysozym (25 mg) a směs byla míchána 30 min při laboratorní teplotě. Poté byl přidán 1 % (w/v) deoxycholát sodný (3,5 ml) a směs byla míchána 20 minut při laboratorní teplotě. Vzniklý viskózní roztok byl sonikován 3x1 min za chlazení a poté odstředěn při 800 g, 12 min a 10 °C. Peleta byla zvážena a rozsuspendována v pufru SA (35 ml) a suspenze byla opět sonikována a odstředěna. Stejný postup byl opakován s pufrem TA a na závěr s pufrem A. Během promývání bylo odebíráno 100 µl supernatantu po odstředění pro kontrolu na SDS elektroforéze. Vzorek izolovaných inkluzí byl získán odebráním 100 µl suspenze pelety v pufru A po sonifikaci, suspenze byla odstředěna při 800 g, 12 min a 10 °C.

4.2.4. Renaturace HIV-1 proteasy

Roztoky:

dialyzační pufr : 0,05 M MES; 0,001 M EDTA; 10 % glycerol; 2 – merkaptoethanol; pH 5,8

K izolovaným inkluzním tělískům bylo přidáno 6 ml koncentrované kyseliny octové a 3 ml destilované vody. Po rozpuštění byla tato suspenze za stálého míchání postupně

přikapávána k 21 ml destil. vody, aby se HIV proteasa sbalila. Takto připravený roztok byl ponechán za stálého míchání 1 hod v chladící místnosti. Nato byl roztok přelit do dialyzačního střeva, které bylo odmočeno v destilované vodě. Dialyzační střevo byla umístěno 2 hodiny ve 2 l destilované vody a poté ponecháno 12 hodin ve 3 l dialyzačního pufru za stálého míchání při teplotě 5 °C. Při dialýze došlo k renaturaci HIV proteasy postupným snižováním koncentrace kyseliny octové.

4.2.5. Ionexová chromatografie na katexové koloně

Roztoky:

pufr A (pH 5,8): 50 mM MES; 10 % glycerol;1 mM EDTA; 0,05 % 2-merkaptoethanol

pufr B (pH 6,7): 50 mM MES; 10 % glycerol; 1 mM EDTA; 0,05 % 2-merkaptoethanol; 2 M NaCl

Vzorek po dialýze obsahující převážně HIV proteasu byl nakonec purifikován na katexové koloně MonoS HR5/5 (Pharmacia) na FPLC přístroji ÄKTA explorer (Amersham Pharmacia Bitech, Švédsko). Nejprve byla kolona promyta gradientem pufrů A a B, následně samotným pufrem A.

Vzorek byl nanesen na kolonu a kolona byla promyta 5 ml pufru A. HIV proteasa byla vymývána z katexové kolony lineárním gradientem iontové síly a pH. Po ukončení gradientu byla kolona promyta pufrem B, pufrem A a 20 % (v/v) ethanolem.

Průběh eluce byl sledován UV detektorem měřením absorbance při 280 nm. U jednotlivých frakcí byla stanovena koncentrace proteinu (kap.3.2.6.), změřena proteolytická aktivita (kap.3.2.7.) a průběh purifikace byl objasněn pomocí SDS elektroforézy (kap.3.2.5.)

4.2.6. SDS elektroforéza

Roztoky:

vzorkový pufr (koncentrovaný 6x): 0,42 g Tris; 3 ml glycerolu; 1 g SDS; 600 µl 2-merkaptoethanolu; 1,2 mg bromfenolové modři; doplnění vodou do 10 ml; pH 6,8

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

44 % akrylamidová směs: 42,8 g akrylamidu; 1,2 g NN`- methylenbisakrylamidu; doplnění vodou do 100 ml

Příprava polyakrylamidových gelů (rozpis pro přípravu dvou gelů):

složení	18% separační gel	5% zaostřovací gel
destilovaná voda	1,1 ml	1,3 ml
1,5 M Tris-HCl	1,25 ml (pH 8,8)	0,625 ml (pH 6,8)
44% akrylamidová směs	2,045 ml	0,285 ml
50% (v/v) glycerol	0,5 ml	0,25 ml
0,2 M EDTA	35 µl	17,5 µl
10% (w/v) SDS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
10% (w/v) APS	45 µl	50 µl

Analýza proteinového složení vzorků byla prováděna pomocí SDS-PAGE v denaturujícím polyakrylamidovém gelu na přístroji Sigma pro vertikální elektroforézu. Byl připraven 18 % separační gel a 5 % zaostřovací gel. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 5:1 a 5 min povařeny na vodní lázni. Elektroforéza probíhala při napětí 150 V přibližně 1 hod. Pro stanovení velikosti proteinů byl použit marker Protein test mixture 4 + 5 od firmy Serva a standard HIV proteasy. Rozdělené proteiny byly obarveny stříbrem.

Průběh barvení SDS gelů stříbrem:

krok č.	použité roztoky	doba působení
1.	12% (v/v) kys. octová, 50% (v/v) methanol, 0,02% (v/v) formaldehyd	nejméně 30 min
2.	50% (v/v) methanol	3 x 15 min
3.	$Na_2S_2O_3.5H_2O$ (0,2g/l)	1 min
4.	destilovaná voda	3 x 20 s
5.	$AgNO_3$ (2g/l), 0,02% (v/v) formaldehyd	20 min
6.	destilovaná voda	3 x 20 s
7.	Na_2CO_3 (60g/l), $Na_2S_2O_3.5H_2O$ (4mg/l), 0,02% (v/v) formaldehyd	do objevení proužků
8.	destilovaná voda	3 x 20 s
9.	12% (v/v) kys. octová, 50% (v/v) methanol	10 min
10.	10% (v/v) kyselina octová	přes noc

4.2.7. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Složení roztoku Commassie blue G-250 od firmy Bio-Rad:

100 mg Commassie briliant blue G-250; 50 ml 96 % ethanolu; 100 ml 85 % kyseliny fosforečné; 850 ml destilované vody

Koncentrace proteinu byla stanovena podle Bradfordové měřením absorbance směsi 50 µl roztoku proteinů, 750 µl destilované vody a 200 µl roztoku Commassie blue G-250 od firmy Bio-Rad při vlnové délce 595 nm. Pro získání kalibrační křivky měření byl použit hovězí sérový albumin o koncentracích 1 – 25 µg/ml.

4.2.8. Kinetická charakterizace

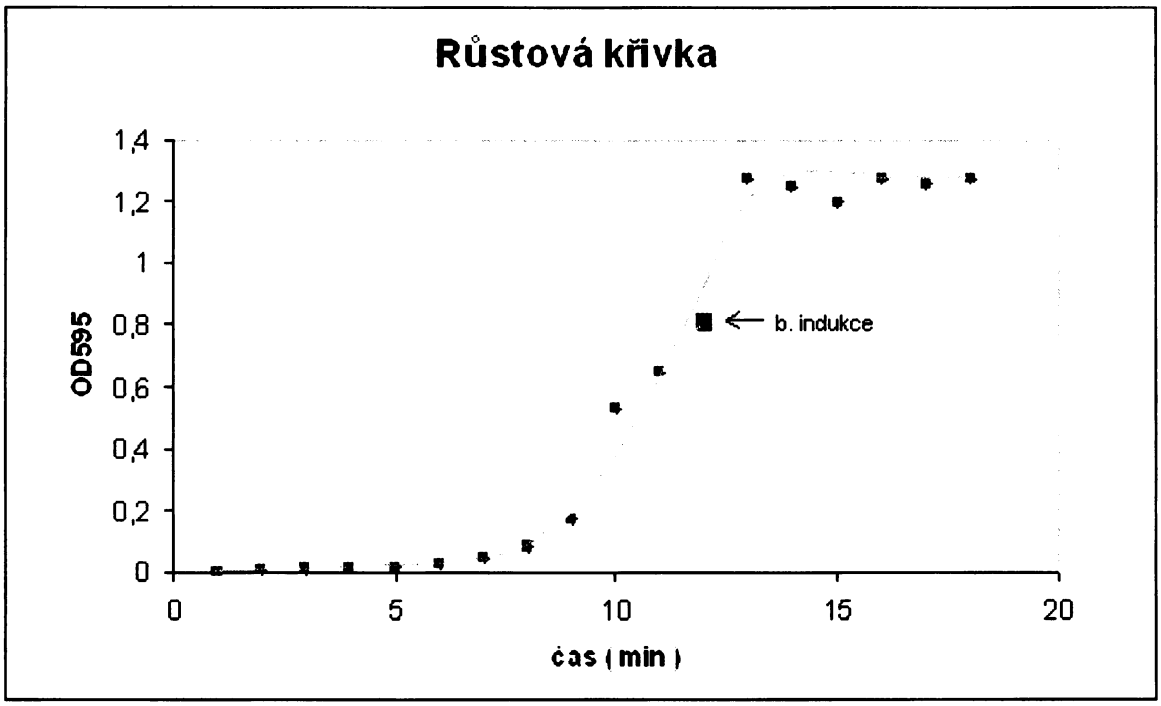
Hodnoty kinetických parametrů pro mutantní HIV proteasu byla změřena spektrofotometricky na dvoupaprskovém UV/VIS spektrofotometru UNICAM UV 500. Jako substrát byl použit Lys-Ala-Arg-Val-Nle~Nph-Glu-Ala-Nle NH_2. Tento chromogenní substrát byl odvozen od štěpného místa Gag a Gag-Pol prekurzoru. Štěpením substrátu dochází k poklesu absorbance při vlnovách délkách kolem 305 nm.

5. Výsledky

5.1. Exprese HIV-1 PR indukovaná IPTG

Kompetentní buňky BL 21 (DE3) RIL byly transformovány plazmidem pET24a, který kódoval gen pro HIV-1 proteasu DB1 pod kontrolou T7 promotoru nesoucí rezistenci na kanamycin. Narostlou bakteriální kulturou bylo naočkováno 3 l příslušného media (0,5 l v šesti dvou litrových Erlenmayerových baňkách). Baňky byly umístěny do rotačního inkubátoru při 300 otáčkách/min a teplotě 37 °C. Při hodnotě OD_{595} 0,81 byla provedena indukce exprese přidáním IPTG na koncentraci 0,75 mM.

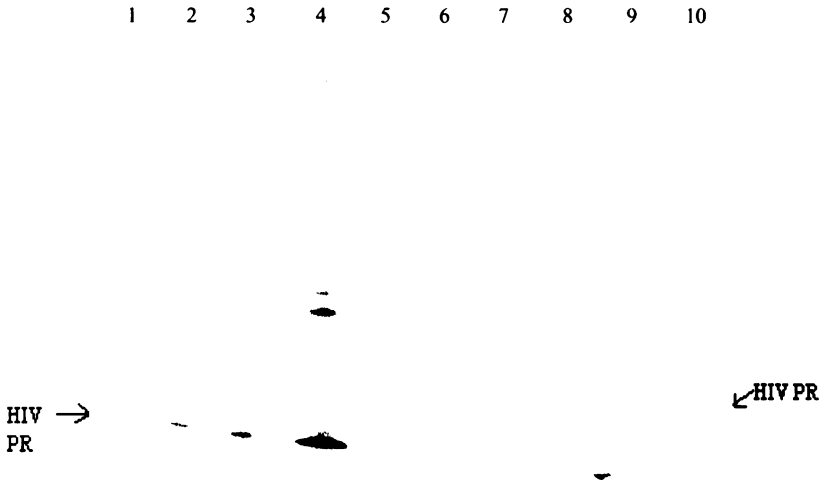
Kultivace v LB mediu



Obr. č. 13: *Růstová křivka kultivace bakterií*

5.2. Izolace inkluzních tělísek a jejich přečištění

U proteasy DB1 bylo ze 3 litrů LB media získáno 7,7 g mokré biomasy. Z bakteriálních buněk byly izolovány inkluze, které byly promývány pufry s rozdílným obsahem soli a detergentu (kap. 3.2.3.). Hmotnost vyizolovaných inkluzí byla 0,4 g.



1	3µl	standard HIV PR
2	6µl	buňky před indukcí
3	4µl	buňky po indukci
4	4µl	buněčný supernatant
5	4µl	promytí inkluzí SA pufrem
6	4µl	promytí inkluzí TA pufrem
7	4µl	promytí inkluzí A pufrem
8	4µl	izolované inkluze
9	4µl	SDS marker
10	3µl	standard HIV PR

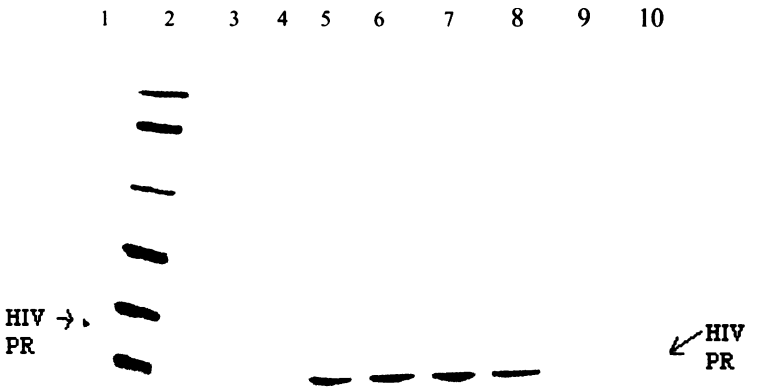
Obr. č. 14: *SDS elektroforetogram znázorňující promývání inkluzí HIV-1 PR DB1 (18 % gel)*

5.3. Renaturace a purifikace HIV-1 PR DB1

Izolované inkluze byly postupně rozpuštěny v 67 % kyselině octové a poté byla proteasa renaturována naředěním a dialýzou. Po dialýze byly nerozpuštěné proteiny odstraněny centrifugací a u supernatantu byla změřena aktivita HIV-1 PR DB1 (kap.3.2.7.).

Supernatant byl nanesen na katexovou kolonu Mono S a zachycené proteiny byly vymývány lineárně vzrůstem gradientu soli. (kap. 3.2.4.). Průběh eluce byl sledován UV detektorem měřením absorbance při 280 nm. Byly jímány frakce, které byly následně kineticky proměřeny (kap. 3.2.6.) a byla určena koncentrace proteinů podle Bradfordové (kap. 3.2.7.).

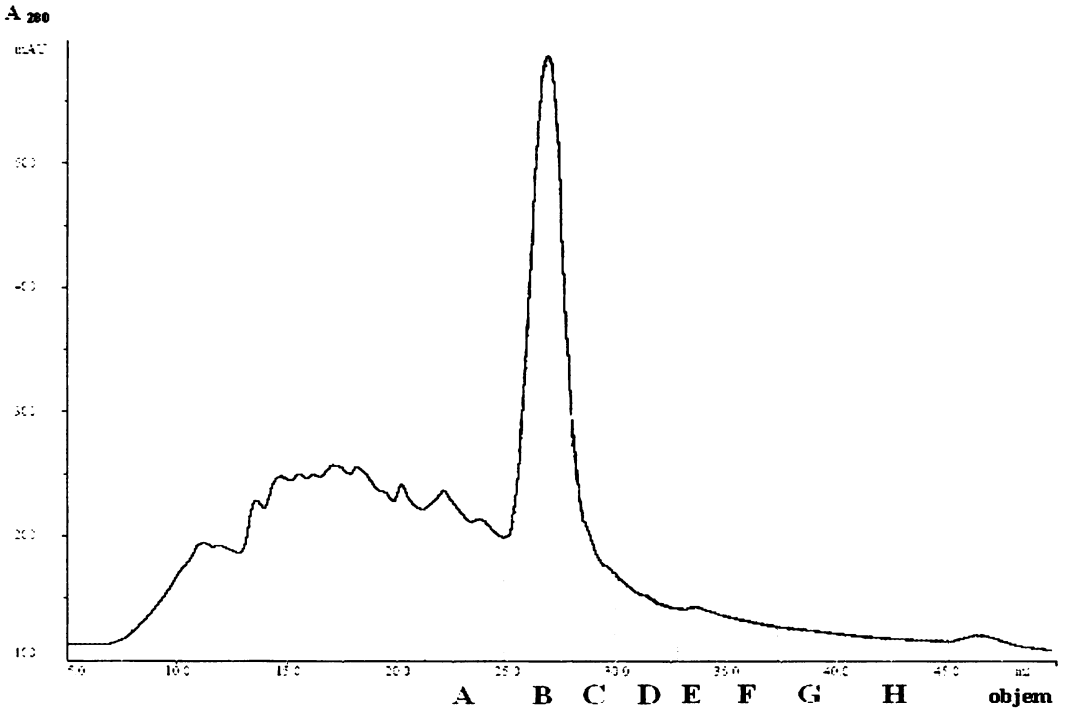
U proteasy DB1 byly poté analyzovány frakce A – H pomocí SDS elektroforézy (kap. 3.2.5.) znázorněné na obrázku č. 15.



1	4µl	HIV marker
2	4µl	SDS marker
3	8µl	vzorek před FPLC
4	5µl	frakce A
5	5µl	frakce B
6	5µl	frakce C
7	5µl	frakce D
8	5µl	frakce E
9	5µl	frakce F
10	5µl	frakce G

Obr. č. 15: *SDS elektroforetogram znázorňující purifikaci HIV-1 PR DB1 ionexovou chromatografi (18 % gel). Frakce odpovídají chromatogramu na obr. 16*

Vymývání kolony je znázorněno na chromatogramu obr. č. 16. Jednotlivé jímané frakce jsou označeny písmeny A – H.



Obr. č. 16: *Průběh eluce HIV-1 PR DB1 z katexové kolonyMonoS, která byla vymývána pufrem B. Červenými písmeny jsou označeny frakce,které byly důkladně charakterizovány*

Z výsledného SDS elektroforetogramu je zřejmé, že nejčistší jsou frakce B, C, D. Frakce E a F by bylo potřeba ještě přečistit.

Následně byla provedena kinetická charakterizace (kap. 3.2.6.) a stanovena koncentrace proteinu podle Bradfordové (kap. 3.2.7.) jímaných frakcí. Pro přehlednost jsou naměřené hodnoty uvedeny v purifikační tabulce. Pro srozumitelnější popis průběhu purifikace byla zavedena " relativní jednotka " (ru) běžně používaná na ÚOCHB AV ČR. Je definována jako aktivita, která při štěpení chromogenního peptidového substrátu způsobí pokles absorbance o 10^{-4} $AU*s^{-1}$.

Purifikační tabulka:

HIV PR DB1	objem [ml]	aktivita [$ABS.s^{-1}.\mu l^{-1}$]	aktivita [ru]	výtěžek [%]	konc.proteinu [μg/ml]	specif.aktivita [ru/μg]	purifikační koeficient
vzorek před FPLC	41	$2,8.10^{-6}$	1143		37,6	0,74	1
frakce A	3,8	$1,6.10^{-6}$	59	5,16	35,2	0,44	0,6
frakce B	3,1	$6,7.10^{-6}$	208	18,2	39,6	1,69	2,3
frakce C	2	$9,4.10^{-6}$	188	16,4	40	2,35	3,2
frakce D	2,5	$10,0.10^{-6}$	252	22	39,2	2,57	3,5
frakce E	1	$12,1.10^{-6}$	121	10,5	108,4	1,12	1,5
frakce F	2,9	$2,3.10^{-6}$	78	6,8	102	0,26	0,4
frakce G	2,4	$1,2.10^{-6}$	28	2,4	73,6	0,15	0,2
frakce H	3	$0,8.10^{-6}$	25	2,2	38,8	0,21	0,3

Tab. č. 15: *Tabulka průběhu purifikace mutantní HIV-1 PR DB1*

6. Závěr

- Na základě literárních údajů jsem ukázala, že inserty v HIV reverzní transkriptase jsou významným mechanismem pro vznik rezistence k virostatikům. Úloha insertů v HIV protease je postupně objasňována. Ukazuje se, že by mohly mít stejný vliv na léčbu jako v případě reverzní transkriptasy.

- V bakteriích *E. coli* jsem připravila rekombinantní HIV-1 proteasu s mutacemi L10I, I13V, K20I, M36I, M46I, I54V, K55R, Q58E, I62V, L63P, C67F, A71V, G73S, V82A, L90M v podobě inkluzí, jež byly následně izolovány a promyty.

- HIV-1 proteasu jsem renaturovala a přečistila pomocí FPLC na katexové koloně.

- Výtěžek čisté HIV-1 proteasy byl 300 μg, dalších 400 μg by bylo nutno v budoucnu přečistit např. pomocí gelové chromatografie. Takto připravený rekombinantní protein bude použit k další kinetické a strukturní charakterizaci.

7. Použitá literatura

(1) http://www.avert.org/pictures/hivvirus1.htm

(2) http://www.avert.org/photos.htm

(3) http://www.avert.org/photos.htm

(4) http://www.psc.edu/science/2000/madrid/getting_a_grip_on_aids.html

(5) http//www.retrovirus.info/rt/PPT_f1.html

(6) http://www.chem.wisc.edu/~newtrad/CurrRef/AIDStopic/AIDStext/AIDSpp1.html

(7) http://www.clunet.edu/BioDev/omm/hiv_protease/molmast.htm (http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/hiv_protease/molmast.htm)

(8) Winters, M. A., Merigan, T. C.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 2575 – 2582 (2005)

(9) Winters, M. A., Kagan R. M., Heseltine, P. N. R., Merigan, T. C.: Aids Research And Human Retroviruses 21, 311 – 313 (2005)

(10) http://www.aids-hiv.cz

(11) Kožíšek, M. : Rezistence u HIV pozitivních pacientů léčených inhibitory HIV proteasy. Diplomová práce PřF UK, Praha (2003)

(12) http://www.alms.cz/aids/

(13) Clercq, E. D. : Journal of Medicinal Chemistry 48, 1297 – 1313 (2005)

(14) http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr1205/sejda.htm

(15) http://www.hivatis.org

(16) Konvalinka, J., Machala, L. : Vesmír 6, 332 – 343 (2001)

(17) http://www.whfreeman.com/kuby/content/mv/hivrt/frames/hivrttxt.htm

(18) Kim, E. Y., Winters, M. A., Kagan, R. M., Merigan, T. C.: Journal of Virology 75, 11227 – 11233 (2001)

(19) Winters, M. A., Kagan, R. M., Kovari, L., Heseltine, P. N. R., Merigan, T. C.: International Medical Press, 363 – 366 (2005)

(20) http://www.chem.wisc.edu/~newtrad/CurrRef/AIDStopic/AIDStext/AIDSpp1.html

(21) Tramuto, F., Bonita, F., Mancuso, S., Romano, N., Vitale, F.: Aids Research And Human Retroviruses 21, 420 – 423 (2005)

(22) Stürmer, M., Staszewski, S., Doerr, H. W., Hertogs, K.: Aids Research And Human Retroviruses 19, 967 – 968 (2003)

(23) Tachedjian, G., Orlova, M., Sarafianos, S. G., Arnold, E., Goff, S. P.: Biochemistry 98, 7188 – 7193 (2001)

(24) Hoffman, R.H., Landovitz, R.J.: Infectious Diseases 9

(25) http://www.hivmedicine.com/textbook/rt.htm

(26) Prejdová, J., Souček, M., Konvalinka, J.: Current Drug Targets – Infectious Disorders 4, 137 – 152

8. Seznam použitých zkratek

3TC	lamivudin
ABC	abacavir
AIDS	syndrom získané imunodeficience
APV	amprenavir
ATV	atazanavir
AV ČR	Akademie Věd České republiky
AZT	zidovudin
d4T	stavudin
ddC	zalcitabin
ddI	didanosin
DF	tenofovir
DLV	delavirdin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFV	efavirenz
env	gen kódující povrchové glykoproteiny viru
fAPV	fosamprenavir
FPLC	fast protein liquid chromatography
FTC	emtricitabin
gag	gen kódující strukturní proteiny viru
HIV	virus lidské deficiente
IDV	indinavir
IPTG	isopropyl -β-D thiogalaktopyranosid
LPV	lopinavir
NFV	nelfinavir
NVP	nevirapin
OD	optická hustota
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerase chain reaction

pol	gen kódující enzymy retrovirů
PR	proteasa
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptasa
RTV	ritonavir
SDS	dodecylsulfát sodný
SQV	saquinavir
TEMED	N, N, M, N, - tetramethylendiamin
TPV	tipranavir
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
v/v	objemový zlomek
w/v	hmotnostní zlomek

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

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka