

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Tereza Zosinčuková**

Proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1

Proteins mimicking epitopes of broadly neutralizing HIV-1 antibodies

**Diplomová práce**

Školitel: RNDr. Petr Malý, CSc.

Praha, 2021

# **Prohlášení**

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

V Praze, 11. 8. 2021

## Poděkování

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří mě po celou dobu práce podporovali, povzbuzovali a věřili ve mě. Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Malému, CSc. za cenné rady, připomínky a konstruktivní zpětnou vazbu, která mi pomohla posunout své schopnosti dále. Rovněž patří velký dík mé konzultantce, Mgr. Veronice Daniel Liškové, Ph.D., za ochotu a trpělivost, se kterou mi v průběhu celé práce pomáhala. Jsem velice vděčná za obrovskou podporu ze strany mých blízkých a kamarádů, bez kterých bych to celé nezvládla.

Děkuji též celému kolektivu Laboratoře inženýrství vazebných proteinů Biotechnologického ústavu AV ČR, v. v. i. Práce byla podporována projektem MŠMT OP VVV (CEREBIT).

# Abstrakt

Virus HIV-1 je nebezpečný retrovirus představující jeden z předních světových zdravotnických problémů. Infekce virem HIV-1 je v současné době nevyléčitelná a bez antiretrovirové terapie v rámci let smrtelná. Navzdory veškeré snaze se zatím nepodařilo připravit účinnou vakcínu proti tomuto patogenu. Ve své práci se proto věnuji zcela novému a unikátnímu přístupu ve vývoji vakcíny, který využívá malých vazebných proteinů (mimotopů) pro vyvolání tvorby ochranných široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1. Stěžejní náplní práce byla identifikace a charakterizace malých vazebných proteinů, které věrně napodobují (mimikují) oblasti povrchových glykoproteinů viru HIV-1, jež jsou rozpoznávány široce neutralizujícími protilátkami PGT121 a PGT126. Mimotopy byly selektovány z vysoce komplexní kombinatoriální proteinové knihovny odvozené od nového typu „scaffoldu“ nazvaného Myomedin. Rozsah proteinové knihovny byl prvně zúžen metodou ribozomálního displeje. Pomocí přímé sendvičové ELISA bylo následně provedeno plošné testování vazby jednotlivých variant Myomedinu na cílové protilátky. Celkem bylo otestováno přes 200 variant, ze kterých vzešlo několik nadějných kandidátů. Tyto varianty Myomedinu byly následně purifikovány, biochemicky a biofyzikálně charakterizovány a nejvhodnější z nich využity pro imunizace myši.

**Klíčová slova:** proteinové inženýrství, HIV-1, široce neutralizující protilátky, mimikující proteiny, malé vazebné proteiny, ELISA

# Abstract

HIV-1 is a dangerous retrovirus which represents one of the world's leading health problems. HIV-1 infection is incurable and without proper treatment by antiretroviral therapy it leads to death within several years. Despite intensive research, no HIV vaccine is currently available. This thesis presents a new and unique approach which has not been used for vaccine development yet. The promising strategy is based on small binding proteins that can elicit broadly neutralizing HIV-1 antibodies by mimicking their epitopes. The aim of this project was to select and characterize small binding proteins that can successfully mimic the surface of viral envelope glycoproteins that is recognized by the broadly neutralizing HIV-1 antibodies PGT121 and PGT126. Proteins were selected from a highly complex combinatorial protein library derived from a new type of scaffold called Myomedin. Firstly, the extent of the protein library was narrowed down using the ribosome display. Then the direct sandwich ELISA screening was applied to select scaffold variants that interact with the target antibodies. In total over 200 variants were tested and several promising candidates were found. These Myomedin variants were purified, biochemically and biophysically characterised and the best ones were used to immunize mice.

**Keywords:** protein engineering, HIV-1, broadly-neutralizing antibodies, protein mimicking, small binding proteins, ELISA

# Obsah

1 Úvod .....	8
2 Cíle práce .....	9
3 Virus lidské imunodeficiency .....	10
3.1 Epidemiologie .....	11
3.2 Stavba viru .....	12
3.2.1 Organizace genomu .....	12
3.2.2 Charakterizace proteinů viru .....	13
3.3 Životní cyklus viru .....	23
3.4 Současná terapie a prevence infekce virem HIV-1 .....	24
4 Vývoj vakcíny proti HIV-1 .....	26
4.1 Faktory komplikující vývoj vakcíny .....	26
4.2 Široce neutralizující protilátky .....	26
4.3 Indukce tvorby široce neutralizujících protilátek .....	31
4.4 Nový přístup pro indukci tvorby široce neutralizujících protilátek .....	36
4.4.1 Malé vazebné proteiny .....	38
4.4.2 Myomedin .....	40
5 Materiál a metody .....	42
5.1 Materiál .....	42
5.2 Metody .....	47
6 Výsledky .....	70
7 Diskuse .....	84
8 Závěr .....	93
9 Seznam použité literatury .....	94

## Seznam zkratek

<b>ABD</b>	albumin-binding domain	doména vázající albumin
<b>ADCC</b>	antibody-dependent cell cytotoxicity	protilátkou zprostředkovaná buněčná toxicita
<b>AIDS</b>	acquired immunodeficiency syndrome	syndrom získané imunodeficiencie
<b>bnAb</b>	broadly neutralizing antibody	široce neutralizující protilátka
<b>bp</b>	base pair	páry bází
<b>cART</b>	combined antiretroviral therapy	kombinovaná antiretrovirová terapie
<b>cDNA</b>	complementary DNA	komplementární DNA
<b>CDRH</b>	complementarity determining region of antibody heavy chain	region určující komplementaritu těžkého řetězce protilátky
<b>CDRL</b>	complementarity determining region of antibody light chain	region určující komplementaritu lehkého řetězce protilátky
<b>CRFs</b>	circulating recombinant forms	cirkulační rekombinantní varianty
<b>dsDNA</b>	double strand DNA	dvouvláknová DNA
<b>Env</b>	envelope	obalový
<b>ER</b>	endoplasmic reticulum	endoplasmatické retikulum
<b>ERAD</b>	endoplasmic reticulum associated degradation	degradace spojená s endoplasmatickým retikulem
<b>HIV</b>	human immunodeficiency virus	virus lidské imunodeficiencie
<b>HR</b>	heptad repeat	heptádová repetice
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase	křenová peroxidasa
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů
<b>LTRs</b>	long terminal repeats	dlouhé terminální repetice
<b>MCS</b>	multiple cloning site	klonovací místo
<b>MPER</b>	membrane proximal external region	membráně blízký, vnější region

<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro biotechnologické informace
<b>NFL</b>	native flexibly linked	přirozeně flexibilně spojené
<b>ORF</b>	open reading frame	otevřený čtecí rámec
<b>ori</b>	origin of replication	počátek replikace
<b>PBS</b>	primer binding site	vazebné místo pro primer
<b>PPT</b>	polypurine tract	polypurinová sekvence
<b>RBS</b>	ribosome binding site	vazebné místo pro ribozom
<b>RRE</b>	Rev-response element	Rev-responsivní element
<b>SHIV</b>	simian/human immunodeficiency virus	virus opičí/lidské imunodeficiencie
<b>SIVcpz</b>	chimpanzee simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficiencie šimpanzů
<b>SIVgor</b>	gorillas simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficiencie goril
<b>SIVsmm</b>	sooty mangabey monkey simian immunodeficiency virus	virus opičí imunodeficiencie mangabeje
<b>ssRNA</b>	single strand RNA	jednovláknová RNA
<b>TAR</b>	Tat-response element	Tat-responsivní element
<b>Tm</b>	melting temperature	teplota tání
<b>UFO</b>	uncleaved prefusion-optimized	neštěpené prefúzně optimalizované
<b>UTR</b>	untranslated region	nepřekládaná oblast
<b>VLPs</b>	virus-like particles	virům podobné částice
<b>wt</b>	wild-type	přirozená (původní) varianta



# 1 Úvod

V dnešní době se derou do centra pozornosti stále nové celosvětové zdravotní hrozby včetně zcela recentně objeveného SARS-CoV 2 a mohlo by se tak zdát, že epidemie viru HIV-1 (human immunodeficiency virus; virus lidské imunodeficiency) ustupuje do pozadí. Nicméně opak je pravdou. Infekce virem HIV-1 je stále jedním z předních světových zdravotnických problémů, a to především v rozvojových zemích. V posledních dvaceti letech se situace značně zlepšila díky objevení kombinované antiretrovirové terapie (combined antiretroviral therapy; cART), která dokáže pacientům značně prodloužit život a zabránit progresi onemocnění do stádia AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome; syndrom získané imunodeficiency), nicméně boj s tímto patogenem není u konce. Snaha vyvinout účinnou vakcínu proti viru HIV-1 provází vědeckou komunitu už nejméně třicet let, avšak stále bez většího úspěchu. Mezi hlavní překážky patří extrémní variabilita viru HIV-1 a jeho značný potenciál rychle mutovat. Další komplikaci představují biologické a biochemické vlastnosti povrchového glykoproteinového komplexu viru HIV-1, který je hlavním cílem pro humorální imunitní odpověď. Naštěstí, nový směr ve výzkumu přinesl objev široce neutralizujících protilátek (broadly neutralizing antibodies; bnAbs), které jsou schopné neutralizovat většinu variant viru HIV-1 a představují cíl, kterého bychom měli při vývoji ochranné vakcíny dosáhnout. S narůstajícím objemem poznatků o struktuře povrchového glykoproteinového komplexu viru HIV-1 a o mechanismech indukujících tvorbu široce neutralizujících protilátek vznikla řada nových konceptů, které mohou potenciálně vést až k vakcíně proti viru HIV-1. Nadějný přístup v tomto ohledu představují malé vazebné proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek. Malé vazebné proteiny (mimotopy) jsou selektovány z vysoce komplexních kombinatoriálních proteinových knihoven, které jsou postaveny na speciálně designovaných proteinových strukturách označovaných jako „scaffoldy“. Mimotopy mohou být využity jako imunogeny nezávislé na povrchových glykoproteinech viru, které mají potenciál stimulovat tvorbu široce neutralizujících protilátek, jejichž epitopy věrně napodobují.

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o vývoji vakcíny proti viru HIV-1, komentuje nové přístupy, jejich dosavadní úspěchy, osvětluje komplikace spojené s přípravou účinné vakcíny a předkládá nový a unikátní přístup pro indukci tvorby široce neutralizujících protilátek. V rámci diplomové práce byly vyvinuty a charakterizovány proteiny odvozené od nového typu „scaffoldu“ nazvaného Myomedin, které mimikují epitopy široce neutralizujících protilátek PGT121 a PGT126.

## 2 Cíle práce

Zde uvádím hlavní cíle mé diplomové práce:

**Identifikovat mimotopy z vysoce komplexní kombinatoriální proteinové knihovny odvozené od Myomedinového proteinového „scaffoldu“, které úspěšně napodobují konzervované oblasti V3-smyčky Env glykoproteinového komplexu viru HIV-1.**

Provést plošné testování proteinové knihovny pomocí široce neutralizující protilátky PGT121 a PGT126 a vytipovat varianty Myomedinového proteinového „scaffoldu“ vhodné pro další analýzu. Zjistit sekvence slibných variant.

**Vybrané varianty proteinů biochemicky, biofyzikálně a funkčně charakterizovat.**

Stanovit teploty tání jednotlivých proteinů, jejich oligomerní stavy a pomocí vazebných a kompetičních studií charakterizovat vlastnosti vazby jednotlivých variant na široce neutralizující protilátku PGT121 a PGT126.

**Vyselektovat takové varianty mimotopů, které mají potenciál účinně navozovat tvorbu široce neutralizujících protilátek v experimentálních myších. Získané protilátky by měly neutralizovat různé varianty HIV-1 pseudovirů.**

Ze získaných dat vyhodnotit, které z variant Myomedinového proteinového „scaffoldu“ je vhodné využít pro imunizační experimenty na myších.

### 3 Virus lidské imunodeficiency

V rámci této a následující kapitoly bych se ráda zaměřila na stručnou charakterizaci viru HIV-1, na jeho stavbu, organizaci genomu, životní cyklus a dále pak na současnou prevenci a terapii infekce tímto virem. Podrobněji se budu věnovat možnostem vývoje vakcíny proti viru HIV-1, komplikacím, které vývoj brzdí, a dosavadnímu poznání v dané oblasti. Část textu bude zaměřena také na široce neutralizující protilátky proti viru HIV-1.

Dle současné klasifikace Mezinárodního výboru pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) patří virus HIV-1 do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae* a rodu *Lentivirus*.

V dnešní době známe čtyři fylogenetické linie viru HIV-1, které jsou označovány M, N, O, P a které vznikly čtyřmi nezávislými mezidruhovými přenosy z primátů na člověka (Sharp a Hahn 2011). Fylogenetickými analýzami bylo zjištěno, že viry HIV-1 skupiny M a N se dostaly do lidské populace ze šimpanze učenlivého *Pan troglodytes troglodytes* (Keele et al. 2006), zatímco viry ze skupiny O a P mají původ v gorile nížinné *Gorilla gorilla* (Plantier et al. 2009; D'arc et al. 2015). Proto také za nejbližší příbuzné viru HIV-1 lze považovat SIVcpz (chimpanzee simian immunodeficiency virus; virus opičí imunodeficiency šimpanzů), pro skupiny M a N, a dále SIVgor (gorillas simian immunodeficiency virus; virus opičí imunodeficiency goril), pro skupiny O a P. Z pohledu celosvětové epidemie viru HIV-1 je významná pouze skupina M (major; hlavní), neboť je rozšířena globálně a tvoří naprostou většinu infekcí virem HIV-1. Skupina M se dále dělí na subtypy A, B, C, D, F, G, H, J, K (Robertson et al. 2000) a nově popsáný subtyp L známý pouze ze třech izolátů (Yamaguchi et al. 2020). Kromě vyjmenovaných subtypů existují ještě tzv. CRFs (circulating recombinant forms; cirkulující rekombinantní varianty), které vznikly rekombinací dvou či více linií ze skupiny M (Robertson et al. 2000). Pro úplnost je vhodné zmínit, že virus HIV-2 je nejpodobnější viru SIVsmm (Chen et al. 1996) a nikoli viru HIV-1, jak by z jeho pojmenování mohlo být mylně vyvozováno. Virus SIVsmm (sooty mangabey monkey simian immunodeficiency virus; virus opičí imunodeficiency mangabeje) pochází z mangabeje kouřového *Cercocebus atys*.

### 3.1 Epidemiologie

Navzdory zvyšující se dostupnosti antiretrovirové léčby patří HIV-1 stále mezi přední světové zdravotnické problémy a dokud nebude dostupná spolehlivá vakcína proti tomuto viru, budeme se potýkat s dopady světové epidemie HIV-1 i nadále. Dle odhadů UNAIDS (The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; Program Organizace spojených národů pro HIV/AIDS) žilo v roce 2019 na světě přibližně 38 milionů lidí infikovaných virem HIV-1, přičemž jen v roce 2019 bylo nově infikováno 1,7 milionu lidí a přibližně 690 000 lidí ten samý rok zemřelo na onemocnění související s AIDS. Díky osvětě, zvýšené diagnostice a lepší dostupnosti antiretrovirové terapie však nových případů infekce virem ubývá a též se v průběhu let snižuje počet úmrtí na onemocnění související s AIDS (UNAIDS; [www.aidsinfo.unaids.org](http://www.aidsinfo.unaids.org)).

HIV-1 se vyznačuje extrémní genetickou variabilitou napříč jednotlivými regiony světa a dynamickým vývojem epidemie, což komplikuje vývoj široce účinné vakcíny a spolehlivých antiretrovirotik. Je to dáno jednak schopností viru velmi rychle mutovat a vytvářet nové varianty, druhak migrací a zvýšenou mobilitou osob napříč regiony. Celosvětově je ze skupiny M nejvíce rozšířen subtyp C, kterým je infikováno 46,6 % HIV-1 pozitivních lidí (Hemelaar et al. 2019). Dále jsou zastoupeny subtypy B (12,1 %), A (10,3 %), G (4,6 %), D (2,7 %) a subtypy F, H, J, K, které dohromady tvoří 0,9 %. Globálně se dostávají do popředí CRFs, kterými je celkem infikováno 16,7 % HIV-1 pozitivních lidí, a unikátní rekombinantní varianty, které tvoří 6,1 % infekcí (Hemelaar et al. 2019). Největší diverzitu HIV-1 variant můžeme detekovat v centrální Africe, naopak v jižní Africe naprosto převládá subtyp C. Stejně tak v Etiopii a jižní Asii je majoritní subtyp C a A. Západní Afrika je typická zvýšeným zastoupením subtypu G a variantou CRF02\_AG (Hemelaar et al. 2019; Giovanetti et al. 2020). Ve východní Evropě a centrální Asii je nejrozšířenější subtyp A, který je také poměrně hojně zastoupen i ve východní Africe (Hemelaar et al. 2019). Severní Afrika je charakteristická přítomností velkého počtu CRFs a také je zde zastoupen subtyp B (Giovanetti et al. 2020). V centrální a západní Evropě, severní Americe a většině jižní Ameriky převládá subtyp B, ačkoliv v západní Evropě vlivem migrace dochází ke zvýšení výskytu ostatních variant viru (Beloukas et al. 2016; Oster et al. 2017). Jihovýchodní a východní Asie je typická rozšířením CRF01\_AE (Wang et al. 2017).

V posledních letech epidemie směřuje ke komplexnějšímu obrazu, kdy se jednotlivé oblasti světa stávají více heterogenní co do zastoupení určitých variant viru HIV-1, a celosvětově narůstá podíl lidí infikovaných CRFs a novými unikátními rekombinantními variantami.

## 3.2 Stavba viru

### 3.2.1 Organizace genomu

Genom viru HIV-1 je tvořen lineární +ssRNA (single strand RNA; jednovláknová RNA), která je po vstupu viru do buňky reverzně transkribována na dsDNA (double strand DNA; dvouvláknová DNA) a integrována do hostitelského genomu. Pro virus HIV-1 je v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information; Národní centrum pro biotechnologické informace) stanoven referenční genom s přístupovým kódem NC\_001802.1. Velikost daného genomu je 9 181 nukleotidů.

Genomová RNA viru HIV-1 má podobu mRNA, a proto nese na svém 5' konci 7-methyl guanosin a 3' konec je polyadenylován (Cherrington a Ganem 1992; Zhou et al. 2003). Lze ji rozdělit na 5' UTR (untranslated region; nepřekládaná oblast), dále pak na kódující oblast tvořící většinu sekvence a na 3' UTR. V 5' UTR se nachází R sekvence, U5 sekvence, PBS (primer binding site; vazebné místo pro primer) a  $\Psi$  enkapsidační signál. 3' UTR tvoří PPT (polypurine tract; polypurinová sekvence), U3 sekvence a opět R sekvence. V kódující oblasti leží 10 ORFs (open reading frames; otevřené čtecí rámce) kódujících proteiny, které jsou vyjmenovány v Tab. 1.

**Tab. 1.** Přehled otevřených čtecích rámců (ORFs), které jsou kódovány virem HIV-1, jejich umístění v referenčním genomu NC\_001802.1 (čísla udávají rozpětí v párech bazí; bp) a výsledné proteiny, které jsou danými ORFs kódovány. \*produkty Gag, Gag-pol a Env jsou polyproteiny, které musí být posttranslačně štěpeny \*\*gen leží na minus vláknu a kóduje tzv. antisense protein (Gholizadeh et al. 2021).

ORF	Pozice v genomu (bp)	Výsledné proteiny
gag	336 - 1838	*Gag = matrixový protein, kapsidový protein, nukleokapsidový protein, protein p6
gag-pol	336 - 4642	*Gag-pol = matrixový protein, kapsidový protein, nukleokapsidový protein, protein p6, aspartátová proteáza, reverzní transkriptáza, integráza
vif	4587 - 5165	Vif
vpr	5105 - 5396	Vpr
tat	5377 - 5591; 7925 - 7970	Tat
rev	5516 - 5591; 7925 - 8199	Rev
vpu	5608 - 5856	Vpu
env	5771 - 8341	*Env = obalový povrchový glykoprotein gp120, obalový transmembránový glykoprotein gp41
nef	8343 - 8963	Nef
asp**	6919 - 7488	Asp

R sekvence je krátká přímá terminální repetice, která hraje klíčovou roli při reverzní transkripci a také při transkripci virové mRNA, neboť zde leží TAR (Tat-response element; Tat-responsivní element). Kromě toho nese polyadenylační signál (AAUAAA). U5 sekvence se podílí na dimerizaci genomové mRNA (Song et al. 2008) a leží zde vazebná místa pro některé hostitelské regulační proteiny důležité pro virovou replikaci (Rabbi et al. 1997). Ke každé molekule genomové RNA je v oblasti PBS navázána tRNA pro lysin, která má komplementární sekvenci s danou oblastí a která je klíčová pro úspěšnou reverzní transkripci, neboť slouží jako primer (Jiang et al. 1993). U3 sekvence obsahuje promotor DNA dependentní RNA polymerázy II včetně TATA boxu, a dále regulační oblasti pro vazbu hostitelských transkripčních faktorů (Gaynor 1992). Po reverzní transkripci genomové RNA na provirovou DNA vzniknou na koncích lineární molekuly tzv. LTRs (long terminal repeats; dlouhé koncové repetice), které jsou tvořeny U3-R-U5 sekvencemi.

Každá virová částice obsahuje dvě, paralelně uspořádané, kopie genomu, které spolu nekovalentně interagují díky krátkým komplementárním úsekům. Molekuly spolu dimerizují v oblasti vlásenky SL1 – tzv. „kissing loop“, která obsahuje 6 nt dlouhý palindrom (Laughrea et al. 1997). Dále se na interakci podílí 5' oblast TAR a k dimerizaci zřejmě přispívá i U5-AUG interakce (Song et al. 2008).

Genom viru HIV-1 se označuje jako pseudodiploidní, ačkoliv nese dvě kompletní kopie virové RNA. Je to proto, že na průběhu reverzní transkripce se podílí obě kopie genomu, mezi kterými často dochází k rekombinaci díky prohození templátového vlákna (tzv. „template switching“) během syntézy mínus vlákna DNA (Hu a Temin 1990; Anderson et al. 1997). Výsledným produktem reverzní transkripce je však pouze jedna virová DNA, které se integruje do hostitelského genomu. Toto pseudodiploidní uspořádání přináší viru několik výhod, například díky rekombinaci může vzniknout funkční provirová DNA, i když je jedna z kopií genomu poškozena, a zároveň je to jeden z hlavních mechanismů, jak může virus HIV-1 udržovat integritu svého genomu (King et al. 2008). Schopnost rekombinace mezi dvěma molekulami genomové RNA umožňuje viru zvyšovat svou variabilitu, urychlovat evoluci a vytvářet nové rekombinantní varianty (Shi et al. 2010). Mohou tak vznikat i kombinované rezistence proti antiretrovirové terapii.

### 3.2.2 Charakterizace proteinů viru

Proteiny viru HIV-1 lze rozdělit na: obalové proteiny (obalový povrchový glykoprotein gp120 a obalový transmembránový glykoprotein gp41), strukturní proteiny (matrixový protein, kapsidový protein, nukleokapsida a protein p6), virové enzymy (aspartátová proteáza, reverzní

transkriptáza a integráza), regulační proteiny (Tat a Rev) a doplňkové proteiny (Vif, Vpr, Vpu, Nef a nově také Asp).

Matrixový protein je N-koncovým proteinem polyproteinů gag a gag-pol a je posttranslačně modifikován na svém N-konci myristovou kyselinou (Veronese et al. 1988). Díky tomu asociuje s cytoplasmatickou membránou a ukotvuje tak celý polyprotein gag/gag-pol do membrány, kde následně probíhá pučení virionů. Pro interakci s buněčnou membránou jsou důležitá i některá další rezidua matrixového proteinu a také pro samotný transport polyproteinů k cytoplasmatické membráně (Spearman et al. 1994). Matrixový protein též nese jaderný lokalizační signál a napomáhá tak transportu preintegračního komplexu do jádra infikované buňky (Haffar et al. 2000). Ovlivňuje i začlenění obalových glykoproteinů do virionů, neboť je v kontaktu s cytoplasmatickou částí gp41 (Tedbury et al. 2016).

Virová kapsida má klínovitý tvar a je tvořena hexamery kapsidového proteinu, které vznikají díky interakcím  $\alpha$ -helixů N-koncových domén, zatímco C-koncové domény spolu vytváří homodimery a spojují tak jednotlivé hexamery k sobě (Ganser-Pornillos et al. 2007). Virová kapsida je schopna interagovat s řadou hostitelských proteinů včetně proteinů jaderného póru nebo isomerasy cyklofilinu A (Campbell a Hope 2015).

Nukleokapsidový protein je malý bazický protein nesoucí dva vysoce konzervované zinkové prsty, které jsou tvořeny sekvencí aminokyselin C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>4</sub>-H-X<sub>4</sub>-C, kde X značí libovolnou aminokyselinu a číslo udává jejich počet (Morellet et al. 1994). Je zodpovědný za vazbu genomové RNA a její začlenění do virionu (Aldovini a Young 1990), neboť interaguje s virovým  $\Psi$  enkapsidačním signálem (Shubsda et al. 2002). Dále se podílí na správném složení virové částice díky interakci s RNA za vzniku tzv. RNA „scaffoldu“ (Cimarelli et al. 2000). Nukleokapsidový protein umožňuje efektivní reverzní transkripci a integraci, neboť plní funkci chaperonu nukleových kyselin (Thomas et al. 2006). Podílí se též na navázání tRNA pro lysin do PBS (Hargittai et al. 2004).

Protein p6 je zapojen do procesu pučení virionů z hostitelské buňky díky interakci s hostitelskými proteiny ALIX (ALG-2-interacting protein X) a TSG101 (tumor susceptibility gene 101) (Garrus et al. 2001; Fisher et al. 2007). Dále zajišťuje inkorporaci Vpr do virových částic (Lu et al. 1995), pro což je důležitá fosforylace proteinu p6 atypickou proteinkinázou C (Kudoh et al. 2014). Dle nových studií se vysokou měrou podílí na specifickém rozpoznání virové genomové RNA a na jejím začlenění do virové částice ve spolupráci s nukleokapsidovým proteinem (Dubois et al. 2018).

Proteáza viru HIV-1 patří do třídy aspartátových proteáz, neboť ve svém aktivním centru nese dva zbytky kyseliny asparagové. Funguje jako homodimer, přičemž každá z podjednotek

poskytuje jeden z katalytických aspartátových zbytků (Navia et al. 1989). Proteáza slouží ke štěpení polyproteinů Gag a Gag-pol v nezralých virionech, což vede ke vzniku infekčních, zralých virových částic (Kohl et al. 1988). Funkční proteáza vzniká autokatalytickým vyštěpením sebe sama z polyproteinu Gag-pol a následnou dimerizací (Navia et al. 1989; Tomasselli et al. 1992).

Reverzní transkriptáza viru HIV-1 je multifunkční enzym, který má jak RNA dependentní DNA polymerázovou aktivitu, tak DNA dependentní DNA polymerázovou aktivitu a také RNasa H aktivitu. Aktivní enzym je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek – větší p66 a menší p51. p66 disponuje polymerázovou i RNasa H aktivitou, zatímco p51 má odštěpenou RNasa H doménu a plní především strukturní roli (Jacobo-Molina et al. 1993). Jedná se o poměrně chybový enzym, neboť postrádá opravnou, 3'→5' exonukleázovou aktivitu a přispívá tak k vysoké mutační rychlosti viru HIV-1 (O'Neil et al. 2002).

Integráza zajišťuje vložení virové cDNA do hostitelského genomu, přičemž místo integrace není zcela náhodné, ale preferovány jsou transkripčně aktivní geny a oblasti poblíž Alu repetice (Mitchell et al. 2004; Cohn et al. 2015). Enzym se skládá ze tří domén: N-terminální doména s motivem zinkových prstů, dále tzv. core doména obsahující aktivní centrum a nakonec C-terminální DNA vazebná doména (Cai et al. 1997; Chen et al. 2000). Integráza rozpoznává LTRs virové cDNA, ze kterých odštěpuje poslední dva nukleotidy 3' konců, čímž se odhalí volné OH skupiny, které mohou být následně spojeny s 5' přesahujícími konci štěpené hostitelské DNA. Okolo místa vložení vznikají krátké, 5 nukleotidů dlouhé, duplikace původní štěpené sekvence (Asante-Appiah a Skalka 1997).

Tat zvyšuje transkripci virové mRNA tím, že se váže na TAR v 5' UTR nově syntetizované mRNA a podporuje její elongaci za pomoci dalších hostitelských proteinů (Wei et al. 1998). Pro vstup do jádra buňky nese vlastní jaderný lokalizační signál interagující přímo s importinem β (Truant a Cullen 1999). Během infekce je Tat sekretován do mezibuněčného prostoru, následně vstupuje do okolních T-lymfocytů klatrinem zprostředkovanou endocytózou a negativně ovlivňuje i neinfikované buňky (Vendeville et al. 2004).

Rev protein hraje klíčovou roli při regulaci exprese virových strukturních proteinů, neboť specificky interaguje s RRE (Rev-response element; Rev-responsivní element) virových nesestřížených a pouze jednou sestřížených mRNA, který se nachází uvnitř sekvence pro Env glykoprotein (Daly et al. 1989; Malim et al. 1990). Díky svému jadernému exportnímu signálu interaguje s exportinem 1 a RanGTP (Askjaer et al. 1998), a tak výrazně zvyšuje transport těchto pozdních, nekompletně sestřížených, mRNA z jádra do cytoplasmy. Stejně jako protein



Tat nese jaderný lokalizační signál, který interaguje přímo s importinem  $\beta$  (Truant a Cullen 1999).

Vif stimuluje ubiquitylaci hostitelského restrikčního faktoru APOBEC3G, která následně vede k jeho degradaci v proteazomu. Pro tento děj je klíčová interakce Vif s transkripčním faktorem CBF- $\beta$  a následný vznik komplexu E3 ubiquitin ligázy, který tvoří cullin 5, elongin B a C, RING-box protein RBX2 a přes Vif vázaný APOBEC3G (Jäger et al. 2011).

Vpr způsobuje zastavení buněčného cyklu infikovaných buněk v G2 fázi prostřednictvím modulace funkce Cul4–DDB1[VprBP] E3 ligázového komplexu přes interakci s jeho VprBP podjednotkou, což v konečném důsledku vede k ATR kinázou zprostředkovanému zastavení buněčného cyklu v G2 fázi (Hrecka et al. 2007). Dále bylo zjištěno, že protein nese nekanonický jaderný lokalizační signál, kterým dokáže interagovat s importinem  $\alpha$  (Miyatake et al. 2016), a podílí se též na transportu preintegračního komplexu do jádra buňky (Popov et al. 1998). Vpr zajišťuje začlenění uracil-DNA glykosylázy do virionu a zvyšuje tak přesnost reverzní transkripce (Mansky et al. 2000).

Vpu nese na svém N-konci transmembránový  $\alpha$ -helix, kterým je zanořen do membrány a který je schopen oligomerizace za vzniku iontového kanálu, zatímco C-konec proteinu směřuje do cytoplasmy (Marassi et al. 1999). Transmembránový helix proteinu interaguje s tetherinem a brání jeho začlenění do virových částic, neboť Vpu zároveň interaguje s adaptorovými proteinovými komplexy AP1 či AP2 a směřuje tak tetherin klatrinem zprostředkovanou endocytózou do endosomů a k následné degradaci (Kueck et al. 2015). Vpu dále zajišťuje zadržení nově syntetizovaných CD4 receptorů v endoplasmatickém retikulu a jejich následné směřování přes modifikovanou ERAD dráhu k degradaci (Magadán et al. 2010).

Nef zvyšuje patogenitu viru, neboť zajišťuje snížení počtu CD4 a MHC-I receptorů na povrchu infikovaných buněk jejich zvýšenou endocytózou (Le Gall et al. 1998; Piguet et al. 1998). Nově bylo ukázáno, že Nef má vliv také na odstranění proteinů SERINC3 a SERINC5 z buněčného povrchu, které jinak mohou fungovat jako restrikční faktory a snižovat infektivitu virionů (Usami et al. 2015). Pro asociaci s buněčnými membránami je Nef posttranslačně modifikován na svém N-konci myristovou kyselinou (Kaminchik et al. 1991). Dále se podílí na modulaci buněčné signalizace, neboť interaguje s kinázami rodiny Src (Trible et al. 2006).

Navzdory faktu, že ORF pro možný Asp (antisense protein) je znám již řadu let, teprve nedávno se podařilo potvrdit přítomnost RNA transkriptů pro Asp u pacientů infikovaných HIV-1 (Mancarella et al. 2019). Také byla detekována humorální odpověď proti tomuto proteinu u části pacientů, kteří přerušili nebo nebyli léčeni cART (Savoret et al. 2020). Dle rozsáhlé studie bylo prokázáno, že Asp kódují především pandemické subtypy viru HIV-1 (Cassan et al. 2016).

Funkce tohoto proteinu v replikačním cyklu viru nebyla zatím popsána, ale ukazuje se, že Asp je asociován s membránami, neboť nese dva transmembránové  $\alpha$ -helixy. V cytoplasmatické membráně kolokalizuje s gp120 a je přítomen na povrchu virionů (Affram et al. 2019).

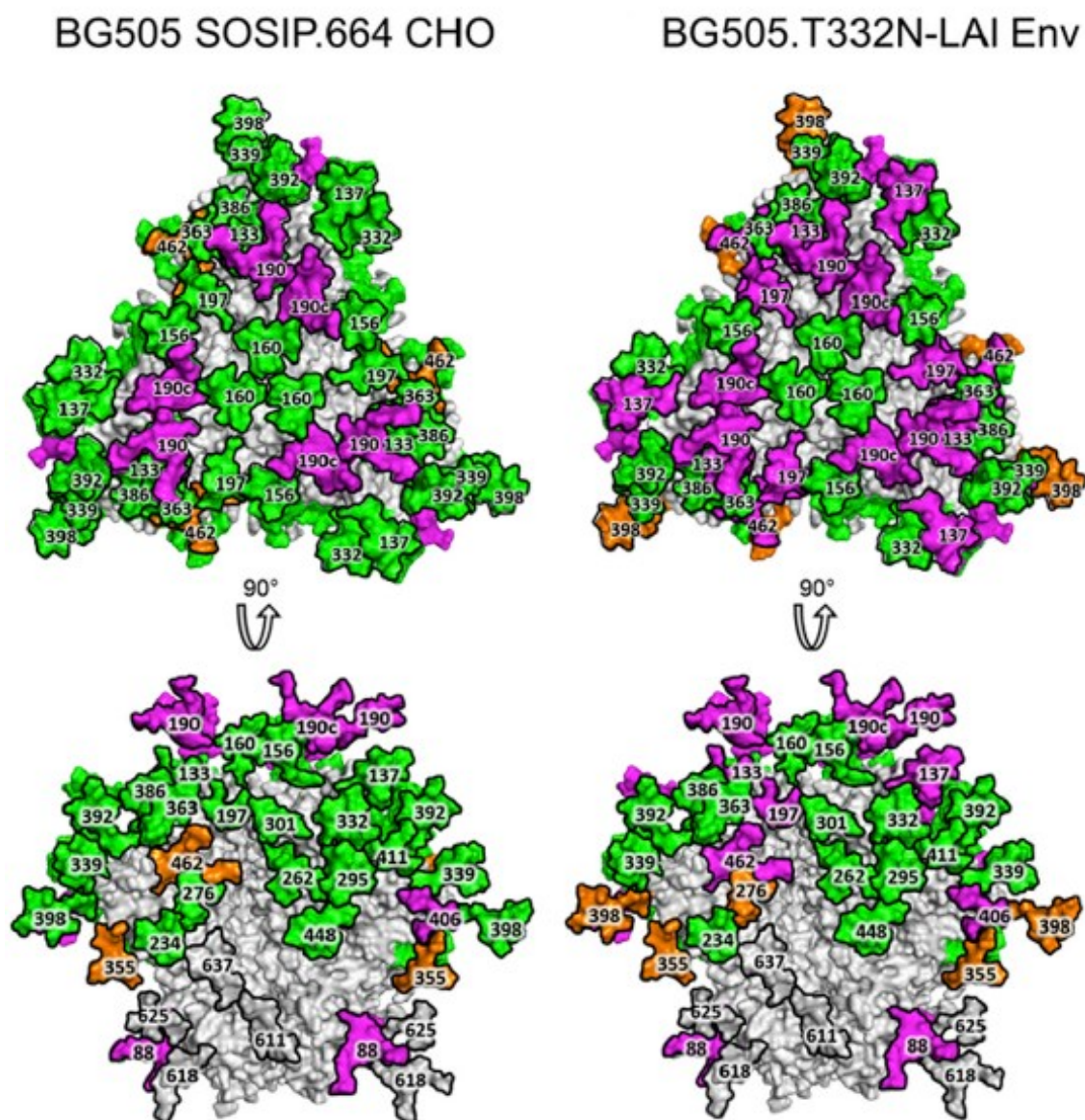
Vzhledem k zaměření této diplomové práce se budu dále detailněji zabývat pouze obalovými glykoproteiny gp120 a gp41, které společně vytvářejí tzv. Env (envelope; obalový) glykoproteinový komplex.

Povrchový glykoproteinový komplex viru HIV-1 je intenzivně studován, neboť zprostředkovává vstup virionů do buněk hostitele díky interakci s cílovým receptorem CD4 a koreceptorem CCR5 nebo CXCR4 (Clapham a McKnight 2001). Navíc, díky své přítomnosti na povrchu virionů, plní úlohu hlavního cíle pro imunitní systém hostitele, čehož lze využít při vývoji ochranné vakcíny proti viru HIV-1.

Env glykoproteinový komplex je tvořen třemi heterodimery proteinů gp120 a gp41, které spolu nekovalentně interagují a které jsou kotveny do membrány transmembránovou doménou proteinu gp41 (Checkley et al. 2011). Transkripce genu pro povrchové glykoproteiny probíhá stejně jako u ostatních genů viru, tedy za účasti hostitelské RNA polymerázy II, buněčných transkripčních faktorů a virového proteinu Tat (Gaynor 1992; Ping a Rana 2001). Následně transkript podléhá alternativnímu sestřihu, přičemž mRNA pro povrchové glykoproteiny patří do třídy tzv. 4 kbp dlouhých mRNA, které si zachovávají RRE (Purcell a Martin 1993). Polyprotein gp160, ze kterého štěpením vznikají gp120 a gp41, patří mezi transmembránové proteiny typu I a je kotranslačně vkládán do membrány ER (endoplasmic reticulum; endoplasmatické retikulum) (Haffar et al. 1988). Směrování polyproteinu gp160 do ER zajišťuje N-terminální signální peptid třiceti nukleotidů a teprve po jeho odštěpení v lumen ER může gp160 získat svou nativní konformaci (Li et al. 2000). V ER dochází k tvorbě disulfidických můstků, ke glykosylaci a následně k zaujetí správné konformace a trimerizaci. V oblasti gp120 vzniká devět intramolekulárních disulfidických můstků (Leonard et al. 1990), zatímco v oblasti gp41 pouze jeden. Každý polyprotein gp160 nese okolo 30 akceptorových míst pro N-glykosylace, která jsou tvořena sekvencí aminokyselin Asn-X-Ser nebo Asn-X-Thr (X je libovolná aminokyselina kromě Pro). Většina z těchto míst se nachází v oblasti gp120 a díky tomu tvoří glykany přibližně 50 % molekulové hmotnosti výsledného proteinu gp120, zatímco gp41 nese jen okolo pěti akceptorových míst v úseku, kde je vystaven na povrchu virionu. Na příslušné asparaginy jsou v ER navázány glykany bohaté na manosu, které následně v Golgiho aparátu podléhají úpravám na komplexní glykany. Architektura trimerního Env glykoproteinového komplexu však neumožňuje plné zpracování všech připojených oligosacharidů (Pritchard et al. 2015). Dle dostupnosti jednotlivých glykosylačních míst pro  $\alpha$ -

manosidázu a další enzymy můžeme rozlišit na Env glykoproteinovém komplexu pozice s plně zpracovanými, komplexními glykany, dále pak oblasti tvořené neúplně zpracovanými glykany bohatými na manosu a také pozice smíšené, kde bývají zastoupeny jak komplexní, tak na manosu bohaté glykany (Behrens et al. 2016). Jako neúplně zpracované glykany jsou označovány ty, které si ve své oligosacharidové kostře zachovávají pět až devět jednotek manosy připojených na dvou jednotkách N-acetylglukosaminu ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  –  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ). Naopak komplexní glykany mají kostru zkrácenou pouze na dvě jednotky N-acetylglukosaminu a tři manosy, na které jsou dále připojeny jednotky galaktosy, N-acetylglukosaminu, fukosy a kyseliny N-acetylneuraminové. Právě z důvodu sterického bránění, ať už samotným proteinem nebo nahloučenými oligosacharidy, dochází ke vzniku konzervovaných oblastí na povrchu Env glykoproteinového komplexu s neúplně zpracovanými glykany, které jsou rozpoznávány některými bnAbs (Garces et al. 2014; Behrens et al. 2016). Zároveň ztráta některých akceptorových míst pro N-glykosylace může značně ovlivnit složení okolních glykanů a může tak narušit vazbu bnAb, které rozpoznávají okolní oligosacharidové epitopy (Behrens et al. 2016). Nově bylo zjištěno, že zastoupení jednotlivých typů glykanů na povrchu přirozeného, do membrány vnořeného, Env glykoproteinového komplexu se poměrně liší od složení glykanů rekombinantního trimeru SOSIP.664, který je jinak široce využíván jako model pro povrchový komplex viru HIV-1 (Struwe et al. 2018), Obr. 1. V případě rekombinantního trimeru SOSIP.664 tvoří glykany bohaté na manosu 63-73 % všech glykanů proteinu gp120, zatímco u gp120 z membránově vázaného trimeru tvoří glykany bohaté na manosu jen 50 % všech glykanů. Rovněž v glykosylaci gp41 jsou patrné rozdíly, kdy gp41 z rekombinantního trimeru SOSIP.664 nese přibližně 75 % komplexních glykanů na svém povrchu, zatímco gp41 z membránově vázaného trimeru nese 96 % komplexních glykanů. Mezi další z posttranslačních modifikací polyproteinu gp160 patří jeho štěpení endopeptidázou furinem, ke kterému dochází v Golgiho aparátu (Hallenberger et al. 1992). Furin rozpoznává konzervovanou sekvenci bazických aminokyselin na C-konci gp120 složenou z Arg<sub>508</sub>-Glu-Lys-Arg<sub>511</sub>, za kterou štěpí a rozdělí tak polyprotein gp160 na gp120 a gp41 (Oliva et al. 2002). Po štěpení zaujímá trimer svou nativní, uzavřenou konformaci (Ringe et al. 2013), bez které nemůže plnit svou funkci jakožto fúzogenní protein, a viriony nesoucí neštěpený trimer gp160 jsou neinfekční (Hallenberger et al. 1992). Navíc bylo prokázáno, že štěpení furinem má vliv na složení glykanů výsledného proteinu, neboť trimery Env glykoproteinového komplexu složené z neštěpených podjednotek nesou na svém povrchu více zpracovaných, komplexních glykanů kvůli své otevřené konformaci a nereflektují tak zastoupení glykanů, jaké je na štěpených komplexech zaujímajících nativní konformaci (Pritchard et al. 2015).

**Obr. 1.** Rozložení glykanů na povrchu Env glykoproteinových komplexů. BG505 SOSIP.664 je rekombinantní Env komplex (zde exprimovaný v CHO buňkách – ovariální buňky křečka čínského). BG505.T332N-LAI je Env komplex vyskytující se přirozeně na povrchu virionů. Oba obrázky mají stejné barevné kódování: zeleně jsou označeny glykany bohaté na manosu, fialově jsou označeny komplexní glykany, oranžově jsou značeny smíšené glykany. Převzato z (Struwe et al. 2018).

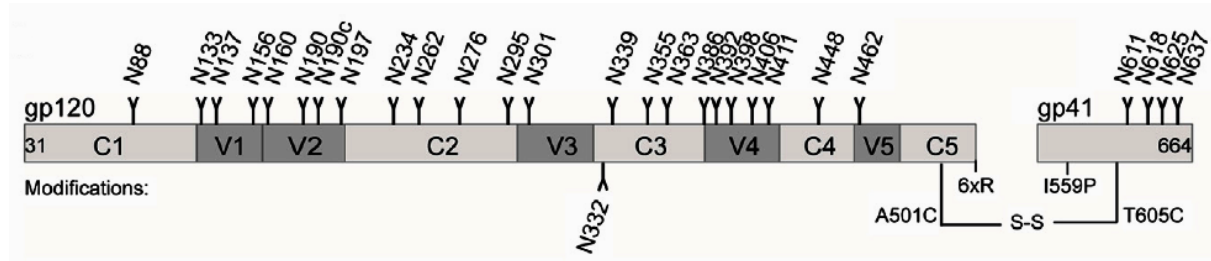


Z Golgiho aparátu je Env glykoproteinový komplex transportován na cytoplasmatickou membránu, kde dochází k jeho inkorporaci do virionů. Přesný proces inkorporace Env komplexu do virionů není zcela znám, avšak ukazuje se, že pro jeho začlenění je nezbytná cytoplasmatická doména proteinu gp41, která zřejmě, přímo či nepřímo, interaguje s matrixovým proteinem (Murphy a Saad 2020). Zároveň bylo zjištěno, že pro tuto interakci je nezbytná trimerizace matrixového proteinu (Tedbury et al. 2016). Dle snímků z elektronové tomografie je patrné, že na povrchu uvolněných virionů se nachází jen velmi malý počet Env komplexů – přibližně 10 molekul na virion (Zhu et al. 2003). Jedním z důvodů tohoto jevu

může být fakt, že cytoplasmatická doména proteinu gp41 interaguje s adaptorovými proteinovými komplexy AP1 a AP2, které zprostředkovávají endocytózu Env komplexu, a napomáhají udržování správné koncentrace Env glykoproteinů na povrchu buňky (Ohno et al. 1997).

Nyní k bližší charakterizaci samotných povrchových glykoproteinů. Gp120 se skládá přibližně z 511 aminokyselin a rozeznáváme u něj pět variabilních (V1 – V5) a pět konzervovaných oblastí (C1 – C5). Rozložení těchto úseků v sekvenci gp120 je zobrazeno na Obr. 2.

**Obr. 2.** Schéma rozložení konzervovaných (C) a variabilních (V) oblastí proteinu gp120 společně s vyznačením akceptorových míst pro N-glykosylace. Schéma vychází ze sekvence BG505 SOSIP.664, která se běžně používá pro strukturní analýzy, avšak obsahuje některé modifikace oproti původní BG505 sekvenci, které jsou ve spodní části obrázku označené termínem „Modifications“. Převzato z (Behrens et al. 2016).



Sekundární strukturu proteinu gp120 tvoří především  $\beta$ -listy společně s pěti  $\alpha$ -helixy a celou molekulu lze rozdělit na tzv. vnější a vnitřní doménu, které jsou na vrcholu propojeny spojovacím úsekem, jehož součástí je i V1/V2 oblast (Kwong et al. 1998). Vazebné místo pro CD4 receptor je tvořeno prohlubní mezi vnější a vnitřní doménou proteinu a z vrchu k němu přiléhá také úsek V1/V2 (Kwong et al. 1998). Pro interakci s CD4 receptorem jsou důležitá aminokyselinová residua Asp368, Glu370, Trp427 a také samotná peptidová kostra proteinu gp120 (Kwong et al. 1998). Shodné výsledky byly získány i mutačními analýzami (Olshevsky et al. 1990). Ze strany CD4 receptoru je pro interakci důležitý Phe43, který přesně pasuje do dutiny ve struktuře gp120 (Kwong et al. 1998). Je zajímavé, že záměna konzervovaného Ser375 za větší, hydrofobní Trp vede k vyplnění kavity pro Phe43, což mimikuje navázání CD4 receptoru, a takto mutovaný gp120 rovnou zaujímá konformaci blízkou té, která je indukována navázáním na CD4 receptor (Finzi et al. 2010). Vazba gp120 na CD4 receptor vede ke změně konformace z uzavřené na otevřenou, což zprostředkovávají konzervovaná aminokyselinová residua v C1 oblasti (Ozorowski et al. 2017). Zároveň dochází k odhalení vazebného místa pro koreceptor, ke vzniku  $\alpha$ 0 helixu v C1 oblasti a ke konformačnímu přeuspořádání fúzního peptidu a  $\alpha$ -helixů gp41 (Ozorowski et al. 2017). Následná vazba na koreceptor je zajišťována V3 smyčkou a k ní přiléhající C4 oblastí zahrnující aminokyseliny v okolí pozic 420 a 440 (Rizzuto et al. 1998). Vazba na koreceptor spouští fúzi virového obalu s membránou cílové

buňky. Fúze je zahájena vnořením fúzního peptidu do cytoplasmatické membrány buňky a následnou tvorbou svazku tří HR1 a HR2 helixů (heptad repeat; heptádová repetice), což přitáhne k sobě virový obal a membránu buňky (Pancera et al. 2014). Spekuluje se, že pro zahájení fúze je důležité odloučení gp120 od gp41, neboť to může napomáhat destabilizaci fúzní domény (Moore et al. 1990; Pancera et al. 2014).

Z variabilních úseků proteinu gp120 zde budou blíže popsány oblasti V1/V2 a V3 smyčka. V1/V2 se nachází na vrcholu Env glykoproteinového komplexu a stericky brání přístup k vazebnému místu pro koreceptor, dokud nedojde k navázání komplexu na CD4 receptor, které změnou konformace způsobí odtažení V1/V2 segmentu a odhalení vazebného místa pro koreceptor (Wang et al. 2016). Nově bylo zjištěno, že úsek V1/V2 zaujímá  $\beta$ -barelovou strukturu tvořenou pěti  $\beta$ -listy, která umožňuje tomuto segmentu fungovat jako částečně samostatná jednotka a dovoluje mu značný pohyb právě při navázání na CD4 receptor a odhalení místa pro vazbu koreceptoru (Pan et al. 2015). V3 smyčka je nezbytná pro vazbu na koreceptor a vysokou měrou ovlivňuje, který koreceptor může daný virus využívat (Jensen et al. 2003). Zároveň jde o jednu z hlavních oblastí rozpoznávaných bnAbs, jak je popsáno dále. Gp41 se skládá přibližně z 345 aminokyselin a dělí se na ektodoménu, transmembránovou doménu a na C-terminální cytoplasmatickou doménu. Ektodoména zahrnuje N-terminální fúzogenní oblast neboli fúzní peptid, který je tvořen převážně hydrofóbními aminokyselinami 512–528 (Freed et al. 1990), dále zahrnuje HR1 a HR2 (heptad repeats)  $\alpha$ -helixy a nakonec MPER oblast (membrane proximal external region; membráně blízký, vnější region). HR1 a HR2  $\alpha$ -helixy jsou součástí až postfúzního uspořádání gp41, v prefúzní konformaci gp41 jsou místo nich čtyři menší  $\alpha$ -helixy tvořící pomyslný kruh okolo N a C-konce proteinu gp120 (Pancera et al. 2014). MPER oblast tvoří posledních 24 aminokyselin ektodomény gp41, které jsou v prefúzní konformaci uspořádány do dvou  $\alpha$ -helixů oddělených ostrou, přibližně 90° otáčkou (Fu et al. 2018). V Env komplexu spolu MPER helixy trimerizují, především díky konzervovaným hydrofóbním residuům (Fu et al. 2018). MPER oblast patří mezi jednu z hlavních oblastí rozpoznávaných bnAbs a zároveň její struktura ovlivňuje celkové uspořádání Env komplexu a expozici epitopů pro ostatní bnAbs (Fu et al. 2018). Transmembránová doména je tvořena jedním  $\alpha$ -helixem zahrnujícím aminokyselinová residua 684 až 707, který v Env komplexu trimerizuje a stabilizuje ho (Dev et al. 2016). Zbylých 150 aminokyselin proteinu gp41 tvoří C-terminální cytoplasmatickou doménu, která se skládá z N-koncové oblasti bez stálé sekundární struktury a následujících tří amfipatických  $\alpha$ -helixů zanořených částečně do membrány (Murphy et al. 2017).

Zde je vhodné zmínit, že pro naprostou většinu strukturních analýz Env glykoproteinového komplexu se využívají modifikované molekuly složené ze zkrácených trimerů gp140. Je to proto, že přirozené a nijak nemodifikované Env glykoproteinové komplexy jsou příliš nestabilní, rozpadají se kvůli nekovalentním interakcím podjednotek a nedařilo se tak stanovit jejich strukturu (Ward a Wilson 2017). Sandersovi a kol. se podařilo připravit stabilní modifikovaný Env komplex, který se nazývá SOSIP a který se stal základem a standardem pro většinu analýz trimerního Env (Sanders et al. 2002). SOSIP zahrnuje celou sekvenci proteinu gp120 a část sekvence gp41, která je zakončena několik pozic před transmembránovou doménou. Dále byl přidán disulfidický můstek mezi pozicí 501 gp120 a pozicí 605 gp41 spojující podjednotky k sobě, čímž je dosaženo soudržnosti celého komplexu. Pro další zvýšení stability prefúzní konformace se ukázala klíčová záměna isoleucinu na pozici 559 za prolin. SOSIP trimery byly připraveny pro řadu subtypů skupiny M viru HIV-1, z nichž nejpoužívanější je BG505 SOSIP.664 (Ward a Wilson 2017). V posledních letech byly navrženy nové modifikované varianty Env glykoproteinového komplexu, jako jsou například NFL trimery (native flexibly linked; přirozeně flexibilně spojené) nebo UFO trimery (uncleaved prefusion-optimized; neštěpené prefúzně optimalizované). NFL trimery nejsou posttranslačně štěpeny, neboť postrádají sekvenci Arg<sub>508</sub>-Glu-Lys-Arg<sub>511</sub>, místo které mají flexibilní linker tvořený 2xGly<sub>4</sub>-Ser sekvencí (Sharma et al. 2015). Zároveň obsahují stabilizační mutaci I559P jako je tomu u SOSIP trimerů. UFO trimery jsou též neštěpené a místo toho jsou podjednotky gp120 a gp41 spojeny flexibilním linkerem a pro vyšší stabilitu je zachován i disulfidický můstek jako u SOSIP trimeru (Kong et al. 2016). Navíc byla upravena N-koncová sekvence HR1 helixu, díky čemuž bylo dosaženo vyšší stability prefúzní konformace a vyššího výtěžku proteinu.

Kromě strukturních analýz jsou tyto modifikované stabilní varianty povrchového glykoproteinového komplexu testovány jako kandidátní molekuly pro přípravu vakcíny proti viru HIV-1, neboť nesou řadu epitopů pro bnAbs (Sanders et al. 2013). V tomto kontextu však vyvstává otázka, jak moc jsou tyto modifikované proteiny skutečně podobné přirozenému Env glykoproteinovému komplexu, co se prezentace epitopů bnAbs týče. Ačkoliv mnohé studie ukazují, že tyto proteiny mají konformaci a prezentaci epitopů téměř shodnou s Env komplexem vyskytujícím se přirozeně na povrchu virionů (Ringe et al. 2019; Torrents de la Peña et al. 2019), studie zabývající se vlivem C-terminální cytoplasmatické domény, transmembránové domény a MPER oblasti proteinu gp41 na celkovou konformaci Env komplexu naznačují, že tyto, ve většině modifikovaných trimerů chybějící, oblasti jsou klíčové pro stabilitu a správnou konformaci Env komplexu (Dev et al. 2016; Fu et al. 2018). Některé práce navíc poukazují na



rozdílné složení glykanů rekombinantních SOSIP trimerů a přirozených Env komplexů, což může ovlivnit vazbu bnAbs, jež mají sacharidovou složku jako součást rozeznávaného epitopu (Cao et al. 2018; Struwe et al. 2018). Do budoucna bude nejspíše potřeba zvážit, zda jsou rekombinantní, k membráně nevázané, varianty Env komplexů vhodnými imunogeny nebo zda bude třeba vyvinout dokonalejší molekuly indukující tvorbu bnAbs.

Podrobné rozebrání role rekombinantních gp140 trimerů mimikujících Env glykoproteinový komplex, jakožto imunogenů ve vývoji potenciální vakcíny proti viru HIV-1, bude probráno dále a rovněž interakce Env glykoproteinového komplexu s bnAbs bude blíže rozebrána v kapitole týkající se přímo bnAbs.

### 3.3 Životní cyklus viru

Pro úplnost a zasazení do kontextu zde krátce zmíním i životní cyklus viru HIV-1.

Virus HIV-1 infikuje především makrofágy a CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, ale byly prokázány i infekce dendritických buněk či mikroglíí (Jordan et al. 1991; MacDougall et al. 2002). Pro vstup do buněk vyžaduje HIV-1 přítomnost CD4 receptoru a jednoho z koreceptorů na povrchu cílových buněk. Varianty viru, které využívají ke vstupu CCR5 koreceptor, se označují jako R5 kmeny a infikují především makrofágy a paměťové CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, zatímco varianty využívající CXCR4 koreceptor se označují jako X4 kmeny, které mnohem úspěšněji infikují širší škálu CD4<sup>+</sup> T-buněčných linií včetně naivních T-lymfocytů (Clapham a McKnight 2001). Existují také tzv. R5X4 kmeny schopné využívat oba typy koreceptorů. X4 a R5X4 kmeny se objevují až v pozdějších fázích infekce a bývají spojovány s rychlejším úbytkem pomocných T-lymfocytů a progresí onemocnění (Jensen et al. 2003).

Vazba Env komplexu na receptor a příslušný koreceptor způsobí konformační změny vedoucí až k fúzi membrány cílové buňky a virového obalu (bližší popis vazby a změny konformace komplexu byl zmíněn v předchozí kapitole). Virus následně vstupuje do cytoplasmy a zahajuje reverzní transkripci svého genomu. Průběh reverzní transkripce zde nebude blíže popsán, neboť je nad rámec této práce. Virová kapsida je mikrotubuly transportována k jadernému póru, přes který neporušená vstupuje do jádra, jak bylo nově prokázáno (Zila et al. 2021). Tam dochází k uvolnění preintegračního komplexu z kapsidy a k následné integraci provirové DNA do hostitelského genomu, jak bylo popsáno dříve při charakterizaci virové integrázy. Transkripce genů probíhá za účasti hostitelské RNA polymerázy II, buněčných transkripčních faktorů a virového proteinu Tat (Gaynor 1992; Ping a Rana 2001). Transkripty v časně fázi infekce podléhají vícenásobnému sestřihu na kratší, přibližně 1,8 kbp dlouhé mRNA, které neobsahují



RRE a které kódují Tat, Rev a Nef. Při navýšení koncentrace Rev proteinu dochází ke zvýšení produkce neúplně sestřižených mRNA obsahujících RRE, které kódují ostatní virové proteiny (Purcell a Martin 1993). Nakonec dochází k hromadění virových strukturních proteinů na cytoplasmatické membráně a následnému pučení nezralých virionů z buňky. Virové proteiny klíčové pro složení virové partikule a její následné pučení z buňky byly popsány v kapitole o virových proteinech.

### 3.4 Současná terapie a prevence infekce virem HIV-1

Ačkoliv se v posledních letech mírně snižuje počet nově nakažených virem HIV-1, což může být způsobeno zvýšenou osvětou a širší dostupností cART, stále se jedná o počet přesahující ročně milion nově infikovaných osob. Proto je nezbytné zaměřit se na zvýšení prevence a zabránit tak dalšímu šíření viru. Neboť stále nebyla objevena účinná vakcína proti viru HIV-1, je v současné době prevence omezena pouze na snížení rizikového chování a včasnou diagnostiku nově infikovaných osob.

Virus HIV-1 se přenáší krví, pohlavním stykem a z matky na dítě (Shaw a Hunter 2012). Přenos krví zahrnuje podání krevních derivátů obsahujících živý virus, popřípadě sdílení injekčních stříkaček s infikovanou osobou. Sexuální přenos se týká jak pohlavního styku muže a ženy, tak styku dvou mužů, přičemž šance přenosu se liší v závislosti na invaznosti daného koitu a na tom, který z partnerů je infikovaný (Shaw a Hunter 2012). K přenosu viru z matky na dítě může dojít několika způsoby, jednak již během těhotenství přes placentu, druhak při samotném porodu a vysokému riziku infekce je dítě vystaveno také při kojení (Kourtis a Bulterys 2010). Virová nálož v krvi infikované osoby též hraje roli v účinnosti přenosu viru na další osobu. Při pravidelném užívání cART, které vede ke snížení virové nálože v krvi pacienta, dochází ke značnému snížení šance sexuálního přenosu infekce z jedné osoby na druhou (Cohen et al. 2011).

Infekce virem HIV-1 je i v současné době stále nevy léčitelná a existující cART slouží pouze k prodloužení života pacientů, neboť nedokáže eradikovat provirus z latentně infikovaných buněk. Antiretrovirotika jsou namířena proti klíčovým krokům replikačního cyklu viru, což zahrnuje inhibitory vazby Env komplexu na koreceptor, inhibitory fúze a inhibitory cílené na virové enzymy, tedy reverzní transkriptázu, integrázu a proteázu. Mezi inhibitory vazby Env komplexu na koreceptor patří Maraviroc, který funguje jako antagonist CCR5 receptoru. Fúzní inhibitor, Enfuvirtide, je 36 aminokyselin dlouhý peptid bránící vytvoření svazku tří HR1, HR2 helixů, který je klíčový pro fúzi virového obalu s membránou. Inhibitory reverzní transkriptázy

se dělí na nukleosidové (Tenofovir, Zidovudine) a nenukleosidové inhibitory (Efavirenz). Nukleosidové inhibitory jsou analogy nukleosidů, které avšak postrádají 3' OH skupinu deoxyribosy a při jejich začlenění do vznikající cDNA dojde k zablokování syntézy. Nenukleosidové inhibitory působí jako alosterické inhibitory reverzní transkriptázy. Mezi inhibitory integrázy patří například Raltegravir, který blokuje její endonukleázovou aktivitu. Inhibitorů virové proteázy je celá řada, obvykle se jedná o peptidomimetika, která zablokují aktivní centrum enzymu. Navíc, stále jsou objevovány nové možné cíle zásahu antiretrovirotik, jako např. zablokování samouspořádání virové kapsidy a následné narušení transportu provirové DNA do jádra buňky molekulou GS-CA1 (Yant et al. 2019). Zcela recentně byl schválen pro terapii pacientů infikovaných rezistentními variantami HIV-1 také nový přípravek Fostemsavir, který se váže na Env glykoproteinový komplex a brání jeho navázání na CD4 receptor (Hiryak a Koren 2021). Řadí se tak do zcela nové kategorie antiretrovirotik cílících přímo na gp120 a bránících vazbě viru na buňku. Rovněž se testuje možnost využití genové terapie pro léčbu infekce virem HIV-1.

Kromě potlačení virové replikace a snížení virové nálože v krvi pacienta, může být cART využívána také jako post-expoziční profylaxe po rizikovém chování, popřípadě se cART podává těhotným HIV<sup>+</sup> ženám, aby se zabránilo přenosu viru na dítě (Hurst et al. 2015).

Ačkoliv zavedení cART do klinické praxe znamenalo velký posun ve zvládnání celosvětové epidemie viru HIV-1, stále se musíme potýkat s řadou nevýhod, které léčba antiretrovirotiky přináší. Mezi nevýhody cART patří především vznik rezistentních variant viru, dále nákladnost těchto terapeutik, jejich vedlejší účinky a nezbytnost je užívat po zbytek života.

## 4 Vývoj vakcíny proti HIV-1

### 4.1 Faktory komplikující vývoj vakcíny

Vývoj ochranné, široce účinné vakcíny proti viru HIV-1 brzdí řada komplikací, které plynou z unikátních vlastností viru a jeho povrchových proteinů. Prim zde hraje vysoká mutační rychlost a schopnost rekombinace vedoucí k enormní variabilitě viru (O'Neil et al. 2002; Shi et al. 2010). Získaná plasticita se uplatňuje především ve variabilních oblastech povrchového glykoproteinového komplexu, které stericky brání konzervované oblasti klíčové pro vazbu na receptor a fúzi viru s cílovou buňkou. Zmíněné variabilní oblasti v průběhu infekce mohou měnit svou délku či počet akceptorových míst pro N-glykosylace a tím i měnit to, jak je Env komplex rozpoznáván imunitním systémem (Curlin et al. 2010; Van Gils et al. 2011). Dalším problémem je masivní glykosylace celého Env glykoproteinového komplexu bránící v přístupu ke konzervovaným epitopům. Proto jsou glykany na povrchu trimeru označovány také jako glykanový štít (glycan shield), který z velké části maskuje proteinovou kostru Env komplexu (Behrens et al. 2016). Samotný glykanový štít je navíc poměrně variabilní a málo imunogenní, což dále podryvá schopnost imunitního systému účinně reagovat na virovou infekci (Seabright et al. 2019). Roli hraje také malé množství trimerů vystavených na povrchu virionů. Navíc, jak již bylo zmíněno v kapitole o epidemiologii, virus HIV-1 má řadu subtypů a cirkulujících rekombinantních variant rozšířených po celém světě a potenciální vakcína proti viru HIV-1 by v ideálním případě měla účinkovat proti všem těmto variantám. Vzhledem k vyjmenovanému množství faktorů komplikujících vývoj vakcíny by se mohlo zdát, že je téměř nemožné získat účinnou vakcínu proti viru HIV-1, nicméně velkou nadějí v tomto směru přinesl objev široce neutralizujících protilátek.

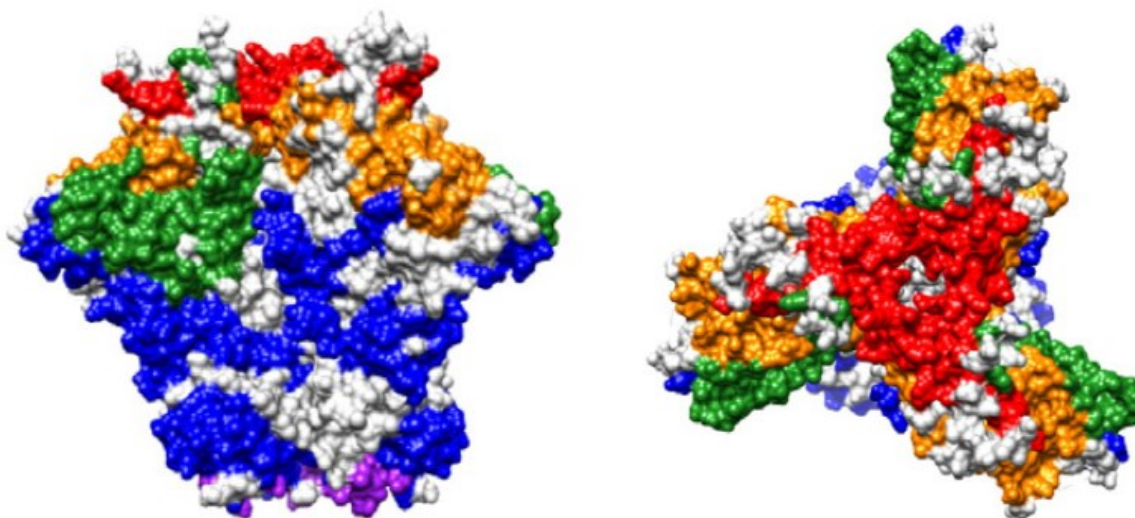
### 4.2 Široce neutralizující protilátky

Nový směr ve vývoji potenciální vakcíny proti viru HIV-1 přinesl objev bnAbs, které jsou schopné neutralizovat širokou škálu variant viru HIV-1. Tyto protilátky byly získány z pacientů označovaných jako „elite neutralizers“, jejichž séra jsou schopna účinně neutralizovat panel pseudovirů složený ze zástupců subtypů A, B, C a CRF01\_AE (Simek et al. 2009). Přibližně 1 % pacientů infikovaných virem HIV-1, kteří nepodstupují cART, patří mezi „elite neutralizers“ a jsou schopni po několika letech od počátku infekce vyvinout široce účinné, zkříženě reaktivní, neutralizující protilátky (Simek et al. 2009). Je tedy usuzováno, že pro vznik

neutralizujících protilátek v séru HIV<sup>+</sup> pacientů je třeba trvalá virová replikace, která umožní dlouhodobou koevoluci virových antigenů a imunitního systému, což může vést ke zvýšení neutralizačního potenciálu protilátek (Sather et al. 2009).

Na povrchu Env glykoproteinového komplexu je možné definovat pět hlavních oblastí, které jsou rozpoznávány naprostou většinou známých bnAbs. Jedná se o vrchol trimeru zahrnující V1/V2 smyčku, dále oblast s vysokým zastoupením nezpracovaných glykanů („high-mannose patch“) zahrnující V3 smyčku a N332 glykan, vazebné místo pro CD4 receptor, oblasti na rozhraní gp120 a gp41 podjednotky a nakonec MPER oblast (McCoy a Burton 2017). Rozložení těchto míst na Env trimeru je vidět na Obr. 3. Navíc byla nově objevena ještě šestá oblast, tzv. „silent face“ gp120 podjednotky, kterou však rozpoznávají pouze dvě známé bnAbs (Schoofs et al. 2019).

**Obr. 3.** Rozložení oblastí rozpoznávaných bnAbs na povrchu Env trimeru. Červená: vrchol trimeru s V1/V2 smyčkou, oranžová: „high-mannose patch“, zelená: CD4 vazebné místo, modrá: gp120-gp41 rozhraní, fialová: MPER oblast. Převzato z (Hua a Ackerman 2016).



Mezi bnAbs rozpoznávající vrchol trimeru patří například PG9, PG16, PGT145, CH01 a CAP256.09 (McCoy a Burton 2017). Tyto protilátky interagují jak s glykany, tak s aminokyselinovými residui V2 smyčky, přičemž glykan na pozici N160 je obecně klíčový pro vazbu všech bnAbs na vrchol trimeru (Andrabi et al. 2015). Protilátka PGT145 je navíc výhradně specifická pro trimerní Env glykoproteinový komplex v nativní konformaci (Sanders et al. 2013). Další z klíčových oblastí pro vazbu bnAbs je CD4 vazebné místo, které je rozpoznáváno například protilátkami VRC01, CH103, VRC03 či 8ANC131 (Zhou et al. 2015). U protilátky VRC01 bylo prokázáno, že její schopnost vazby na protein gp120 je umožněna strukturální podobností variabilní oblasti VRC01 s částí CD4 receptoru, která je zodpovědná za vazbu gp120 (Zhou et al. 2010). Zároveň glykan na pozici N276, který jinak brání přístup

k vazebnému místu na CD4 receptor, protilátka VRC01 naopak využívá pro vazbu a interaguje s ním svým lehkým řetězcem (Zhou et al. 2010). Obecně se ukazuje, že schopnost neutralizovat širokou škálu variant viru závisí na přesném úhlu, kterým bnAb přistupuje k CD4 vazebnému místu proteinu gp120 (Zhou et al. 2015). Velmi variabilní jsou bnAbs rozpoznávající rozhraní mezi gp120 a gp41, neboť jejich epitopy se zcela nepřekrývají a jsou rozmístěny po celé oblasti (McCoy a Burton 2017). Zřejmě nejznámější bnAb této skupiny, PGT151, váže glykany na pozicích N611, N637 a dále interaguje s rezidui v C5 oblasti gp120 a bylo prokázáno, že specificky rozpoznává pouze štěpené, nativně uspořádané, trimery (Blattner et al. 2014). MPER oblast proteinu gp41 je cílem pro bnAbs 10E8, 4E10, Z13 či 2F5 (McCoy a Burton 2017). Ačkoliv bnAbs 10E8 a 4E10 mají extrémně vysoký neutralizační potenciál a dokáží inhibovat širokou škálu pseudovirů různých subtypů (Huang et al. 2012), některé studie ukazují, že mohou být zároveň autoreaktivní, neboť mají součástí rozpoznávaného epitopu také fosfolipidy, jak bylo prokázáno pro 4E10 (Haynes et al. 2005). Jiné práce však ukazují, že ačkoliv určité fosfolipidy jsou součástí epitopů 10E8 a 4E10 bnAbs, jejich reaktivita je odlišná od ostatních autoreaktivních protilátek (Singh et al. 2011). Nově objevené vazebné místo pro bnAbs označované jako „silent face“ gp120 podjednotky interaguje s protilátkami SF12 a VRC-PG05 (Schoofs et al. 2019). Epitop protilátky SF12 tvoří převážně glykany, přičemž klíčové jsou ty na pozicích N262, N295 a N448 (Schoofs et al. 2019). Poslední oblast rozpoznávaná bnAbs bude probrána podrobněji, neboť protilátky PGT121 a PGT126, se kterými bylo pracováno v rámci diplomové práce, se vážou na epitopy právě v této oblasti. Téměř všechny bnAbs interagující s „high-mannose patch“, tedy místem s vysokým zastoupením nezpracovaných glykanů, vyžadují pro svou vazbu přítomnost na manosu bohatého glykanu v pozici N332, nicméně vazbu bnAbs do dané oblasti ovlivňují i okolní glykany, jako například N137, N295, N301, N339, N386 či N392 (Garces et al. 2015; Daniels a Saunders 2019). Zároveň většina těchto protilátek proniká glykanovým štítem a interaguje s aminokyselinami Gly324, Asp325, Ile326 a Arg327 (tzv. GDIR sekvence) (Pejchal et al. 2011; Garces et al. 2015). Z bnAbs, které rozpoznávají „high-mannose patch“, jsou dnes známé rodiny protilátek PGT121, PGT128 a PGT135 (McCoy a Burton 2017). Dále pak existuje protilátka 2G12, jejíž epitop tvoří pouze glykany (pozice N295, N332, N392 a částečně i N339), což je unikátní v porovnání s ostatními bnAbs, které pro svou vazbu potřebují jak proteinovou část gp120, tak povrchové glykany (Murin et al. 2014). Je zajímavé, že ačkoliv 2G12 váže glykany s vysokou afinitou, nevykazuje téměř žádnou reaktivitu proti typickým autoantigenům (Singh et al. 2011). Později byly objeveny také protilátky BF520, DH270 či PCDN33 (Daniels a Saunders 2019). PGT121, PGT123, PGT126 a PGT128 patří mezi jedny z neúčinnějších

bnAbs neutralizujících většinu testovaných variant pseudovirů (Walker et al. 2011). 3D struktura PGT121 v komplexu s Env trimerem zatím bohužel nebyla vyřešena, avšak je dostupná alespoň struktura časného prekurzoru linie rodiny protilátek PGT121, kde jsou již hlavní rysy interakce Env komplexu a protilátek této rodiny patrné (PDB kód: 5CEZ). Interakce s glykanem na pozici N332 a s GDIR sekvencí se u rodiny protilátek PGT121 ustanovuje již časně ve vývoji dané linie a následné fáze vývoje už jsou zaměřeny především na optimalizaci interakcí s okolními glykany (Garces et al. 2015). Bylo zjištěno, že PGT121-123 interagují s komplexním glykanem na pozici N137, který se jinak podílí na bránění epitopů V3 smyčky (Garces et al. 2015). Vazba rodiny protilátek PGT121 na Env komplex alostericky inhibuje následnou vazbu Env komplexu na CD4 receptor, nejspíše díky tomu, že brání konformačním změnám, které trimer podstupuje při navázání na CD4 receptor (Julien et al. 2013). PGT126 patří do rodiny protilátky PGT128 a nemá známou 3D strukturu, nicméně struktura PGT128 i v komplexu s gp120 již vyřešena byla (PDB kód: 5ACO) a lze usuzovat, že PGT126 bude interagovat s trimerem obdobným způsobem. Rodina protilátky PGT128 interaguje se svým epitopem jiným způsobem než rodina protilátky PGT121. Liší se úhlem, pod kterým přistupují k trimernu, a především svou interakcí s okolními glykany, neboť PGT128 váže kromě glykanu N332 také glykan N301 a naopak nepřichází do kontaktu s glykanem N137 (Julien et al. 2013; Pejchal et al. 2011).

Možnost využití bnAbs pro ochranu před infekcí virem HIV-1 byla testována na modelech makaka rhesus (*Macaca mulatta*), kdy byla experimentální zvířata pasivně imunizována bnAbs a následně vystavena infekci rekombinantním virem SHIV (simian/human immunodeficiency virus; virus opičí/lidské imunodeficiency) (Moldt et al. 2012; Pegu et al. 2014). Testované bnAbs VRC01 a 10E8 podané zvířatům v dávce 20 mg/kg či 5 mg/kg dokázaly zvířata ochránit před jednorázově rektálně podanou, vysokou dávkou SHIV, avšak při dávce 0,3 mg/kg byla zaznamenána jen částečná ochrana (Pegu et al. 2014). Ve stejné práci byla rovněž prokázána ochrana před vaginální infekcí virem SHIV protilátkou VRC01. PGT121 se v obdobném experimentu ukázala ještě účinnější, když i dávka 1 mg/kg poskytla plnou ochranu před vaginální infekcí jednorázovou dávkou SHIV (Moldt et al. 2012). Navíc bylo prokázáno, že podání vysoce účinných bnAbs v dávce 20 mg/kg dokáže ochránit makaky před opakovanými nízkými dávkami SHIV až na několik měsíců, dokud nedojde k poklesu koncentrace ochranných protilátek v plazmě zvířat (Gautam et al. 2016). Navzdory slibným výsledkům, klinické zkoušky NCT02568215 a NCT02716675 testující vliv opakované pasivní imunizace protilátkou VRC01 na prevenci infekce virem HIV-1 u rizikových osob prokázala pouze minimální ochranu (Corey et al. 2021). V průběhu klinické zkoušky NCT02716675 byla

zjištěna efektivita prevence přibližně 26 %, zatímco efektivita prevence u klinické zkoušky NCT02568215 byla jen 8,8 % (Corey et al. 2021). Nicméně analýza vzorků odebraných od účastníků v průběhu klinických zkoušek ukázala, že pasivní imunizace protilátkou VRC01 dokáže poměrně účinně ochránit před infekcí variantami viru, které jsou na bnAb VRC01 citlivé, neboť incidence infekcí těmito variantami viru byla značně snížena (Corey et al. 2021). Efektivita prevence proti VRC01-senzitivním virům byla přibližně 75 %. Tyto výsledky potvrzují, že imunizace bnAbs může být účinná, ale bude potřeba využít kombinace více bnAbs cílících na různé epitopy a neutralizující různé subtypy viru HIV-1, aby bylo dosaženo kýženého výsledku. To ostatně prokázala i studie na makacích, kde podání dvou bnAbs cílících na odlišné epitopy Env komplexu dokázalo ochránit jedince před kombinovanou infekcí více variantami SHIV, zatímco každá z testovaných protilátek podaná samostatně nedokázala experimentální zvířata před kombinovanou infekcí ochránit (Julg et al. 2017).

Kromě profylaxe byly bnAbs testovány také jako možná náhrada nebo podpora současné terapie pomocí cART. Podání bnAbs HIV<sup>+</sup> jedincům s detekovatelnou virovou náloží v krvi vede k přechodnému snížení virové nálože, dále může podání bnAbs oddálit opětovné objevení viru po přerušení cART, dochází k podpoře imunitního systému a zvýšení ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity; protilátkou zprostředkovaná buněčná toxicita) a spekuluje se o možném snížení virového rezervoáru při léčbě infikovaných pacientů pomocí bnAbs (Liu et al. 2020). Bylo prokázáno, že po jednorázovém podání VRC01 v množství 40 mg/kg dochází u jedinců infikovaných virem citlivými k dané bnAb ke značnému snížení virové nálože, která se však do 56 dní vrátí zpět na původní hladinu (Lynch et al. 2015). Zároveň často dochází po opětovném navýšení virové nálože v krvi k objevení rezistentních variant viru k dané bnAb (Lynch et al. 2015; Scheid et al. 2016). Opakované podání protilátky 3BNC117 (30 mg/kg, 4x v odstupu dvou týdnů) při přerušení cART vedlo k prodloužení průměrné doby do zvýšení virové nálože v krvi nad 200 kopií/ml na 9,9 týdne, což je značný rozdíl v porovnání s průměrnou dobou 2,6 týdne u pacientů, kteří nedostávali protilátku 3BNC117 (Scheid et al. 2016). Ještě lepších výsledků bylo dosaženo při využití kombinace dvou bnAbs, 3BNC117 a 10-1074, podávaných 3x v odstupu 3 týdnů, kdy byla průměrná doba oddálení navýšena na 21 týdnů po přerušení cART (Mendoza et al. 2018). Navíc při využití kombinace dvou protilátek nedošlo při navýšení virové nálože v krvi k objevení rezistentních variant viru k oběma protilátkám (Mendoza et al. 2018). Ačkoliv první studie neprokázaly vliv bnAbs na snížení virového rezervoáru v buňkách pacientů (Lynch et al. 2015), nová studie na makacích využívající kombinaci protilátky PGT121 a agonisty TLR7, který silně aktivuje CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty v makacích, ukázala, že podávání bnAb společně s aktivátorem imunitního systému

vedlo ke snížení virového rezervoáru v testovaných zvířatech a k oddálení nárůstu virové nálože v krvi po přerušení cART (Borducchi et al. 2018). Souhrnně proběhlé klinické studie ukazují, že bnAbs jsou bezpečné a jejich využití při terapii HIV<sup>+</sup> pacientů může být přínosné.

### 4.3. Indukce tvorby široce neutralizujících protilátek

Proč bnAbs vznikají tak málo a proč je těžké navodit jejich tvorbu u zdravých jedinců?

Předně je to dáno samotnými vlastnostmi těchto protilátek (Seabright et al. 2019). Většina bnAbs nese velké množství neobvyklých somatických hypermutací, často spojených s delecemi či insercemi (Klein et al. 2013). Zároveň mívají tyto protilátky prodlouženou CDRH3 smyčku (complementarity determining region of antibody heavy chain; region určující komplementaritu těžkého řetězce protilátky), kterou dokáží interagovat s těžko přístupnými epitopy, jako je tomu např. u bnAb PGT121, jejíž CDRH3 smyčka je dlouhá 24 aminokyselin (Briney et al. 2012; Julien et al. 2013). Tyto vlastnosti naznačují, proč je vývoj bnAbs postupný a zdoluhavý. Druhý faktor bránící vývoji vakcíny, která by indukovala tvorbu bnAbs, je ten, že stále nebyl připraven vhodný imunogen, který by účinně vyvolával tvorbu bnAbs v imunizovaných jedincích.

V rámci prvních klinických zkoušek byly testovány monomerní gp120 jako imunogenní složka vakcíny, avšak ukázalo se, že tyto zjednodušené formy Env glykoproteinového komplexu nedokážou úspěšně mimikovat epitopy přítomné na nativním trimernu. Například zcela postrádají vazebná místa pro protilátky PGT151 a PGT145, které jsou výhradně specifické pro nativní Env trimer, jak bylo zmíněno výše. Placebem kontrolovaná, dvojitě zaslepená, klinická studie fáze 3 testující efektivitu vakcíny založené na dvou rekombinantních gp120 monomerech odvozených ze subtypů B, neprokázala téměř žádnou ochranu proti infekci virem HIV-1 (Flynn et al. 2005). Navíc následné porovnání virových náloží v krvi a časnost zahájení cART u pacientů infikovaných během studie virem HIV-1 z placebo skupiny a ze skupiny očkovaných neprokázalo žádný rozdíl (Flynn et al. 2005). Bylo zjištěno, že nízká efektivita vakcíny byla způsobena nedostatečnou produkcí protilátek schopných neutralizovat tzv. viry úrovně 2 („tier-2 viry“) neboli obtížně neutralizovatelné varianty viru, a to dokonce i když v neutralizační studii byly testovány pouze varianty viru subtypu B (Gilbert et al. 2010). Obdobné výsledky byly získány i při klinické studii fáze 3 prováděné v Thajsku mezi uživateli injekčně podávaných drog s vakcínou založenou na rekombinantních gp120 monomerech odvozených ze subtypů B a E (Pitisuttithum et al. 2006).

Jako další možné imunogeny byly testovány zkrácené stabilizované gp140 trimery typu SOSIP, které by měly na svém povrchu prezentovat řadu epitopů pro bnAbs (Sanders et al. 2013).



Pokusy s Env trimery nesoucí SOSIP modifikace vedly u experimentálních zvířat k tvorbě autologních neutralizačních protilátek druhého řádu (tzv. „tier-2“ NAbs), avšak nedokázaly indukovat tvorbu bnAbs (Sanders a Moore 2017). Imunizace králíků trimerem BG505 SOSIP.664 vedla k produkci protilátek, které dokázaly neutralizovat autologní virus úrovně 2 BG505.T332N a zároveň úspěšně neutralizovaly heterologní viry úrovně 1 („tier-1“ viry), což bylo následně prokázáno i pro druhý testovaný trimer B41 SOSIP.664, který též indukoval protilátky proti autolognímu viru úrovně 2 (Sanders et al. 2015). Bohužel však protilátky z imunizovaných králíků nedokázaly neutralizovat heterologní viry úrovně 2. Zároveň zde bylo prokázáno, že imunizace neštěpenými Env trimery nevyvolává produkci autologních NAbs druhého řádu a při použití monomerních gp120 dochází jen k velmi omezené produkci NAbs (Sanders et al. 2015). Obdobné výsledky byly tou samou studií získány i pro imunizace makaků trimerem BG505 SOSIP.664. S autologními NAbs je problém, že bývají jen úzce zaměřeny, často proti „dírámu“ v glykanovém štítu a nedokážou pak neutralizovat heterologní viry úrovně 2, leda že by nesly shodné mezery v glykanovém štítu (Klasse et al. 2016; Sanders a Moore 2017). Navíc, ačkoliv se trimery nesoucí SOSIP modifikace nachází preferenčně v prefúzní konformaci, může u nich docházet k občasné expozici epitopů vedoucích k produkci neneutralizujících protilátek (non-NAbs), především těch proti V3 oblasti (Sanders et al. 2015). Proto byly vyvinuty trimery, u kterých byla podpořena stabilizace prefúzní konformace dalšími substitucemi, přidáním disulfidického můstku nebo byly purifikované trimery vystaveny chemickým sloučeninám (např. glutaraldehydu), které způsobí propojení aminoskupin proteinu a zafixování konformace (Sanders a Moore 2017). Takto modifikované trimery mají sníženou expozici epitopů pro non-NAbs. Dále bylo testováno, zda imunizace více trimery z různých subtypů povede k dosažení širšího spektra produkovaných NAbs. Králíci byli, postupně nebo najednou, imunizováni SOSIP trimery odvozenými ze dvou/tří různých subtypů viru a ukázalo se, že zvířata vyvinula autologní NAbs druhého řádu proti všem použitým trimerům, a dokonce byla zjištěna u části jedinců přítomnost protilátek schopných do jisté míry neutralizovat jeden nebo více heterologních virů úrovně 2 (Klasse et al. 2016).

Je nutné si uvědomit, že ačkoliv nesou trimery gp140 na svém povrchu velkou část epitopů pro bnAbs, postrádají MPER oblast, které je cílem hned několika vysoce účinných bnAbs (McCoy a Burton 2017). Tento problém by mohly vyřešit nové přístupy k prezentaci nativních Env komplexů imunitnímu systému prostřednictvím inkorporace Env trimerů do VLPs (virus-like particles; virům podobné částice), liposomů nebo na konstrukty složené z 24 monomerů ferritinu (Sanders a Moore 2017).

Mezi nové přístupy, které též využívají rekombinantní gp140 trimery, patří tzv. vakcíny odvozené z přirozených linií („natural lineage vaccine“) a vakcíny odvozené z designovaných linií („designed lineage vaccine“). První jmenované jsou založeny na sekvencích env genů získaných z dlouhodobě sledovaných pacientů, kteří po letech infekce vyvinuli bnAbs. Tento soubor genů může být využit jako předloha pro přípravu setu rekombinantních Env trimerů, které povedou ke stimulaci prekurzorů linií B-lymfocytů schopných produkovat bnAbs (Bhiman et al. 2015). V práci Saunderse a kol. byla testována postupná imunizace makaků Env glykoproteiny odvozenými z průběžných sekvencí *env* genů pacienta, který vyvinul CH103 bnAbs (Saunders et al. 2017). Jednalo se o CH505 Env glykoproteiny, kdy v první dávce byla podána varianta odpovídající původnímu viru na počátku infekce a dále byla imunizovaná zvířata stimulována variantami z týdne 53, 78 a 100 (Saunders et al. 2017). U jednoho ze čtyř imunizovaných makaků došlo k indukci tvorby bnAbs. Obdobný princip využívají přístupy založené na designovaných liniích Env proteinů. V těchto případech je snaha vyvinout takové rekombinantní Env trimery, které interagují s prekurzory B-lymfocytů schopných, při správné stimulaci, vytvořit bnAbs (Sanders a Moore 2017). Potvrzení tohoto konceptu ukázala nedávná studie využívající speciálně designované Env trimery, které interagovaly s prekurzory B-lymfocytů a podporovaly u nich získání jinak málo pravděpodobných mutací, které bývají hlavní překážkou v produkci bnAbs (Saunders et al. 2019). Vybrané Env trimery byly designovány tak, aby se silněji vázaly na B-lymfocyty, které již získaly patřičné mutace. Jeden z Env trimerů byl navrhnout pro indukci linie B-lymfocytů vedoucí k produkci bnAbs proti CD4 vazebnému místu, zatímco druhý byl navrhnout pro indukci linie B-lymfocytů směřující k produkci bnAbs proti V3 smyčce. Imunizace humanizovaných knock-in myši jednou i druhou variantou Env trimery vedla k indukci některých mutací klíčových pro bnAbs daných linií a některé izolované protilátky dokázaly neutralizovat autologní virus úrovně 2 a část heterologních virů úrovně 1b a 2 skoro stejně úspěšně, jako odpovídající protilátka z vývojové řady vedoucí k bnAbs (Saunders et al. 2019). Při imunizaci makaků Env trimery designovaným na indukci linie B-lymfocytů vedoucí k produkci bnAbs proti CD4 vazebnému místu došlo k tvorbě autologních neutralizačních protilátek druhého řádu proti použitému imunogenu u všech testovaných zvířat, nicméně tyto protilátky jen velmi slabě neutralizovaly autologní virus úrovně 2 (Saunders et al. 2019). Společně jsou však tyto výsledky povzbudivé. Rovněž studie využívající speciálně designovaný Env trimer RC1 pro aktivaci co největšího množství B-lymfocytů nesoucích prekurzory V3-specifických protilátek se ukázala jako nadějná (Escolano et al. 2019). Imunizace experimentálních zvířat, včetně makaků, trimery RC1 nebo jeho variantou RC1-4fill připojenou na VLPs vedla k produkci protilátek specificky

interagujících s V3 oblastí a okolními glykany. Protilátky svými strukturními a neutralizačními vlastnostmi připomínaly odpovídající protilátku z vývojové řady vedoucí k V3-specifickým bnAbs (Escolano et al. 2019). Tyto výsledky naznačují, že RC1 trimer může být vhodný vstupní imunogen pro sekvenční vakcinační strategie.

Zatím největšího úspěchu s vyvoláním produkce bnAbs v experimentálních zvířatech, včetně makaků, dosáhla studie, která jako imunogen využívala N-koncovou část fúzního peptidu připojenou k proteinovému nosiči (Xu et al. 2018). N-koncová část fúzního peptidu byla vybrána jako vhodný imunogen, neboť byla nově objevena linie bnAbs (VRC34.01), která rozpoznává tento lineární, dobře konzervovaný peptid. Imunizace N-koncovou sekvencí fúzního peptidu byla následně podpořena stimulační dávkou Env trimery BG505 SOSIP, která umožnila selekci těch protilátek, které byly produkovány předchozí imunizací a zároveň rozpoznávaly fúzní peptid v kontextu Env trimery (Xu et al. 2018). Imunizované myši vyvinuly monoklonální protilátky schopné neutralizovat až 31 % kmenů viru z panelu složeného z 208 kmenů různých subtypů, nicméně neutralizace byla pozorována pouze u těch variant viru, které nesou stejnou nebo podobnou sekvenci fúzního peptidu, jako byla ta použitá pro imunizace. Imunizace makaků a morčat též vedla u většiny jedinců k produkci heterologních NAbs schopných neutralizovat varianty viru z různých subtypů, ačkoliv zdaleka ne tak účinně, jako vzorová protilátka VRC34.01.

Klinické zkoušky vakcín založených na rekombinantních gp140 trimerech jsou nyní teprve v počátcích a na první výsledky hodnotící efektivitu těchto vakcín a neutralizační schopnosti produkováných protilátek si budeme muset počkat. Nyní je registrováno pět klinických zkoušek fáze I, z nichž tři testují bezpečnost a imunogenicitu BG505 SOSIP gp140 trimerů (NCT03699241; NCT04224701; NCT04177355), jedna bezpečnost a imunogenicitu ConM SOSIP.v7 gp140 trimery (NCT03961438) a jedna testuje hned pět různých rekombinantních gp140 trimerů (NCT03816137). Posledně jmenovaná studie zjišťuje efektivitu tvorby bnAbs u očkovaných jedinců pro různé kombinace pěti modelových Env trimery. Jedná se o trimery ConM SOSIP gp140, EDC ConM SOSIP gp140, ConS UFO gp140, EDC ConS UFO gp140 a Mosaic SOSIPs gp140 (ConM = konsensus sekvence všech HIV-1 izolátů skupiny M, EDC označuje chemicky stabilizované trimery, ConS = modifikovaná konsensus sekvence všech HIV-1 izolátů skupiny M, Mosaic SOSIPs = kombinace tří různých SOSIP trimerů).

Z klinických zkoušek vakcín cílících na prekuzory B-lymfocytů právě probíhá studie fáze I (NCT03547245), která je založena na designovaných vnějších doménách proteinu gp120 prezentovaných na povrchu nanočástic (eOD-GT8 60 mer vaccine). Dále probíhá také první klinická zkouška vakcíny odvozené z přirozených linií *env* genů, která se nazývá EnvSeq-1

(NCT03220724). Půjde o postupnou imunizaci účastníků variantami Env gp120 odvozenými z průběžných sekvencí CH505 Env trimeru pacienta, který následně vyvinul CH103 bnAbs. Účinnost této strategie bude porovnána se skupinou účastníků, kteří budou imunizováni pouze sekvencí CH505 M5 gp120, která interaguje s CH103 bnAb, ale ne s jejími prekurzory.

Pro vyvolání tvorby bnAbs společně s komplexní imunitní odpovědí zahrnující i CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty jsou testovány tzv. mozaikové viry. Na základě úspěšné klinické zkoušky NCT02315703, která dokázala indukovat komplexní imunitní odpověď včetně tvorby neutralizačních protilátek (nikoliv však bnAbs) pomocí adenovirového vektoru 26 společně se stimulací v podobě Env gp140 subtypu C (Barouch et al. 2018), byly zahájeny další dvě studie fáze IIb a III (NCT03060629; NCT03964415). Ty již testují tetravalentní vakcínu Ad26.Mos4.HIV, která exprimuje dvě mozaikové sekvence Env proteinu a dvě mozaikové sekvence Gag-Pol pomocí adenovirového vektoru 26. Pro stimulaci je následně podána vakcína Env gp140 subtypu C, popřípadě bivalentní vakcína Env gp140 subtypu C a mozaikového Env. V klinických zkouškách jsou testovány též vakcíny založené na adenovirových vektorech, které exprimují konzervované oblasti HIV-1 genomu, což vede především k T-buněčné odpovědi, avšak netvoří se bnAbs (např. NCT02099994).

Pro úplnost bych zde ráda zmínila ještě čtyři, již dříve proběhlé, klinické zkoušky vakcín proti HIV-1, z nichž dvě byly spíše odstrašující příklady, jedna byla neúčinná a jedna naopak doposud nejúčinnější testovaná vakcína proti HIV-1.

Vakcíny HVTN 502 a 503 založené na prezentaci HIV-1 proteinů Gag, Pol a Nef pomocí adenovirového vektoru (Ad5) pro stimulaci HIV-specifických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů se ukázaly jako neúčinné, a dokonce v případě studie HVTN 502 bylo zjištěno, že očkovaní jedinci měli vyšší náchylnost k infekci virem HIV-1 než jedinci v placebo skupině (Buchbinder et al. 2008; Gray et al. 2011). Klinická zkouška DNA vakcíny složené ze 6 plasmidů exprimujících Gag, Pol a Nef proteiny subtypu B a dále Env glykoproteiny subtypů A, B a C, která byla následně stimulována rekombinantním adenovirovým vektorem 5 exprimujícím Gag-Pol fúzní protein subtypu B a Env glykoproteiny ze subtypů A, B a C, také nevedla k ochraně očkovaných před infekcí virem HIV-1 a ani nevedla k produkci ochranných protilátek (Hammer et al. 2013). Z proběhlých klinických zkoušek je nutné vyzdvihnout klinickou zkoušku fáze III provedenou v Thajsku, která jako jediná vedla alespoň k částečné ochraně očkovaných jedinců před infekcí virem HIV-1 (Rerks-Ngarm et al. 2009). Vakcína byla založena na oslabeném rekombinantním poxviru (ALVAC-HIV), který expimoval Env glykoprotein subtypu E a proteinové produkty genů gag a virové proteázy, a její účinnost byla dále stimulována vakcínou AIDSVAX B/E tvořenou monomerními gp120 odvozenými ze subtypů B a E (viz NCT00223080).

U očkovaných byla vyvolána tvorba protilátek, které dokázaly účinně indukovat ADCC a protilátkami zprostředkovanou fagocytózu a které korelovaly s částečnou účinností vakcíny, avšak nebylo dosaženo produkce bnAbs, které by zřejmě mohly vést k vyšší efektivitě vakcíny (Tomaras a Plotkin 2017). Při porovnání protilátek přítomných v plazmě očkovaných jedinců, kteří po očkování byli infikováni HIV-1 a těch, kteří po očkování infikováni nebyli, se ukázalo, že ochránění jedinci disponovali protilátkami, které rozpoznávaly V1/V2 region více subtypů viru, tedy že přítomnost protilátek reagujících s širším spektrem HIV-1 variant korelovala se sníženým rizikem infekce (Zolla-Pazner et al. 2014). Ačkoliv předběžné výsledky naznačovaly, že by efektivita této vakcíny mohla být okolo 60 %, v delším časovém odstupu se ukázalo, že efektivita této vakcíny je okolo 31 % a to zřejmě proto, že účinnost vakcíny s postupem času klesala, jak docházelo k poklesu NAbs. To ukazuje, proč je důležité vyvinout při očkování proti HIV-1 co nejširší a nejdéle trvající humorální imunitní odpověď, a to i při užití vakcíny cílící primárně na stimulaci HIV-specifických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Na základě povzbudivých výsledků této klinické zkoušky byla zahájena v Jihoafrické republice klinická zkouška stejné vakcíny, pouze upravené pro subtyp C, který je v oblasti nejrozšířenější (NCT02968849). Čím dál více je patrné, že pro účinnou obranu proti infekci virem HIV-1 je potřeba indukovat komplexní imunitní reakci, která bude zahrnovat jak T-buněčnou odpověď, tak ochranné, široce neutralizující protilátky (Tomaras a Plotkin 2017).

#### 4.4 Nový přístup pro indukci tvorby široce neutralizujících protilátek

Vzhledem k výše popsaným komplikacím s vývojem účinné vakcíny proti viru HIV-1 a se získáním vhodných imunogenů vedoucích k indukci tvorby bnAbs, přišla naše laboratoř s novým řešením, které obchází většinu dosavadních problémů. Místo snahy vyvinout co nejoptimálnější Env glykoproteinový komplex pro prezentaci epitopů bnAbs se nový přístup vydává úplně opačnou cestou, kde je složitý Env komplex zcela vynechán a je nahrazen mnohem jednodušším malým vazebným proteinem. Metoda využívá postupů řízené evoluce proteinů, kdy jsou malé vazebné proteiny (mimotopy) selektovány z vysoce komplexních proteinových knihoven na základě své schopnosti úspěšně mimikovat epitopy široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1. Zvolená strategie je inspirována existencí tzv. idiotypových a anti-idiotypových protilátek, kdy paratop idiotypové protilátky je rozpoznáván B buněčným receptorem jiného B-lymfocyty, který proti němu začne tvořit anti-idiotypové protilátky. Při imunizaci zvířat anti-idiotypovou protilátkou, jejíž paratop do jisté míry mimikuje strukturu antigenu, který idiotypová protilátka rozpoznávala, může docházet

k produkci tzv. anti-anti-idiotypových protilátek, které svou specifitou odpovídají původní idiotypové protilátce. Tímto způsobem lze teoreticky nahradit epitopy patogenu anti-idiotypovými protilátkami, které svým paratopem strukturně připomínají původní epitop (Klasse 2019). Tento postup byl již dříve testován pro vyvolání specifických protilátek proti viru HIV-1 u experimentálních zvířat, kdy byla makakům podána anti-idiotypová protilátka, která vážala široce neutralizující protilátky cílící na CD4 vazebné místo (Kang et al. 1992). Jedinci imunizovaní anti-idiotypovou protilátkou vyvinuli anti-anti-idiotypové protilátky s téměř stejnými vlastnostmi, jako měla původní idiotypová protilátka specifická pro CD4 vazebné místo (Kang et al. 1992).

V návaznosti na velký rozmach malých vazebných proteinů v posledních dvaceti letech, které mohou v některých ohledech úspěšně nahradit monoklonální protilátky jako terapeutické nástroje v biomedicíně, vznikly první dvě studie využívající malé vazebné proteiny jako náhradu za anti-idiotypové protilátky pro vyvolání tvorby bnAbs u experimentálních zvířat (Kosztyu et al. 2019; Kuchař et al. 2021). První z prací selektovala vazebné proteiny z vysoce komplexní kombinatoriální proteinové knihovny odvozené od ABD „scaffoldu“ (albumin-binding domain; doména vázající albumin) a hledala takové varianty mimotopů, které jsou schopné silně a specificky interagovat s široce neutralizující protilátkou VRC01 (Kosztyu et al. 2019). Vyselektované varianty ABD „scaffoldu“ dokázaly v imunizovaných myších vyvolat tvorbu bnAbs schopných neutralizovat až 8 z 12 pseudovirů úrovně 2 subtypů B a C. Schopnost vybraných variant mimikovat strukturu epitopu protilátky VRC01 byla prokázána také pomocí dokování struktury mimotopů do krystalové struktury protilátky VRC01 s Env komplexem. Vazebné proteiny dokázaly věrně napodobit interakční rozhraní VRC01 jak s proteinem gp120, tak s glykanem v pozici N276, který je pro vazbu dané protilátky klíčový (Kosztyu et al. 2019). Druhá práce byla zaměřena na proteiny mimikující epitopy široce neutralizující protilátky 10E8, která interaguje s MPER oblastí proteinu gp41. Místo využití ABD „scaffoldu“ pro přípravu proteinové knihovny, jako tomu bylo u předchozí práce, byl v této studii představen zcela nový „scaffoldový“ protein nazvaný Myomedin, který je odvozen od desáté domény lidského myomesinu-1 (Kuchař et al. 2021). Struktura Myomedinu je vidět na Obr. 4. Tento protein umožnil lepší napodobení poměrně rozsáhlé interakční oblasti protilátky 10E8 s MPER, než by mohlo být dosaženo pomocí ABD. Varianty Myomedinu byly selektovány z vysoce komplexní kombinatoriální proteinové knihovny pomocí ribozomálního displeje a jejich vazba na protilátku 10E8 byla následně testována pomocí ELISA. Takto bylo identifikováno osm slibných variant, které byly použity pro imunizace myší. Hyperimunní séra získaná z očkovaných myší dokázala neutralizovat až 54 % z testovaných pseudovirů úrovně 2 subtypů

A, B, C, D a AE (Kuchař et al. 2021). Schopnost nejlepších variant mimikovat strukturu epitopu protilátky 10E8 byla prokázána také pomocí dokování Myomedinových variant do krystalové struktury protilátky 10E8 s MPER oblastí. Téměř všechny vazebné proteiny dokázaly věrně napodobit interakční rozhraní mezi protilátkou 10E8 a jejím epitopem, které se skládá ze třech hlavních interakčních oblastí, kdy většina variant mimikovala interakční oblast 1 a 2 a dvě varianty dokonce napodobily i oblast 3 (Kuchař et al. 2021).

Obě výše popsané studie dosáhly zatím nejlepších výsledků při indukci tvorby bnAbs v myších modelech a vedly k produkci protilátek schopných neutralizovat řadu pseudovirů úrovně 2 *in vitro*. Využití malých vazebných proteinů mimikujících epitopy bnAbs přítomných na povrchu Env komplexu se ukázalo jako nadějná strategie, jak dosáhnout produkce široce neutralizujících protilátek *in vivo*. Výše popsaná strategie navíc skýtá jednu zásadní výhodu při indukci produkce bnAbs oproti ostatním přístupům a to, že není ovlivněna nepříznivými biologickými a biochemickými vlastnostmi Env glykoproteinového komplexu, jako jsou enormní variabilita povrchových antigenů, masivní glykosylace tvořící glykanový štít, sterické bránění konzervovaných epitopů a strukturní nestabilita rekombinantních variant Env komplexů. Kombinovanou aplikací vazebných proteinů mimikujících epitopy několika různých bnAbs by mohlo být teoreticky docíleno produkce spektra ochranných protilátek v imunizovaných jedincích, kteří by tak získali schopnost neutralizovat širší škálu varianty viru HIV-1.

#### 4.4.1 Malé vazebné proteiny

Malé vazebné proteiny mají v dnešní době široké použití v oblasti biomedicíny, kde jsou využívány jako diagnostické markery, agonisté či antagonisté medicínsky významných receptorů či jako nástroje pro cílené doručení biologicky aktivních molekul (Gebauer a Skerra 2020). Jaké výhody však poskytují malé vazebné proteiny oproti monoklonálním protilátkám? Velkou předností malých vazebných proteinů, jak už jejich název napovídá, je jejich malá velikost, obvykle do 200 aminokyselin, která jim zajišťuje větší tkáňovou prostupnost a variabilnější možnosti doručení do organismu. Díky své malé velikosti navíc snáze dosáhnou optimálního poměru aplikované koncentrace a vazebného účinku, neboť mají lepší poměr molekulové hmotnosti ku počtu vazebných míst, než mají protilátky. Oproti velkým a složitým molekulám protilátek složených z lehkých a těžkých řetězců a obsahujících disulfidické vazby mají malé vazebné proteiny obvykle jednoduchou strukturu bez disulfidických můstků a většinou nevyžadují posttranslační modifikace. Díky jednoduché stavbě bez nutnosti modifikací se snadněji produkují v prokaryotických expresních systémech, které bývají levnější a dostupnější. Obvykle se snáze purifikují a je možné je spojovat dohromady a získat tak

bispecifické molekulové nástroje. Další velkou předností malých vazebných proteinů je stabilita, neboť jsou odvozeny od prověřených proteinových „scaffoldů“. Samozřejmě, jejich malá velikost má i některé nevýhody. Předně se jedná o jejich krátký poločas setrvání v krevní plazmě, neboť jsou rychle odfiltrány ledvinami. Proto bývají fúzovány s PEG (polyethylenglykolem), biopolymery nebo je k nim připojena Fc doména (Gebauer a Skerra 2020).

Vazebné proteiny se obvykle skládají ze dvou částí – variabilní a konstantní oblasti. Variabilní oblast je tvořena pozicemi aminokyselin, které mohou být randomizovány, a slouží pro vytvoření požadovaného vazebného místa. Konstantní část proteinu zajišťuje stabilitu celé struktury.

Malé vazebné proteiny jsou selektovány z rozsáhlých proteinových knihoven, které jsou odvozeny od různých proteinových „scaffoldů“. Randomizaci variabilních úseků proteinových „scaffoldů“ lze provádět například pomocí tzv. error-prone PCR, kde dochází ke vkládání náhodných mutací do vymezeného úseku DNA, nebo pomocí kontrolované randomizace, kde jsou přesně dány pozice, ve kterých má dojít k vložení náhodných aminokyselin. Většina novějších knihoven využívá přístupu kontrolované randomizace, který vyžaduje složení genu *in vitro* pomocí přidávání náhodných tripletů nukleotidů kódujících jednu z 19 aminokyselin na zvolené pozice v sekvenci. Tím je dosaženo vyrovnaného zastoupení všech aminokyselin na randomizovaných pozicích (nehraje zde roli degenerovaný genetický kód) a navíc je tak vyloučeno začlenění cysteinu nebo stop kodonu do vzniklé sekvence. Tento přístup byl použit také pro přípravu Myomedinové knihovny, kde byly randomizované kodony optimalizovány pro expresi knihovny v bakteriích *Escherichia coli* (Kuchař et al. 2021).

Pro selekci těch variant mimotopů, které specificky interagují s terčovou molekulou, se využívají vysoce výkonná plošná testování („screening“), mezi které patří: fágový displej, ribozomální displej, mRNA displej, kvasinkový a bakteriální povrchový displej (Gebauer a Skerra 2020). Neboť proteinová knihovna, se kterou se pracovalo v této diplomové práci, byla prvně selektována pomocí ribozomálního displeje, než bylo přistoupeno k metodám popsaným v kapitole Materiál a metody, v krátkosti bych zde zmínila princip ribozomálního displeje.

Ribozomální displej patří mezi tzv. bezbuněčné selekční techniky a je založen na *in vitro* transkripci a translaci proteinové knihovny pomocí přečištěného cytosolického extraktu z *E. coli* a následné selekci komplexů protein-ribozom-mRNA na základě specifity daného proteinu k terčové molekule (Lipovsek a Plückthun 2004). V prvním kroku je proteinová knihovna transkribována do mRNA, kterou následně naváže ribozom a spustí translaci vazebného proteinu. Knihovny pro ribozomální displej jsou konstruovány tak, že za sekvencí vazebného

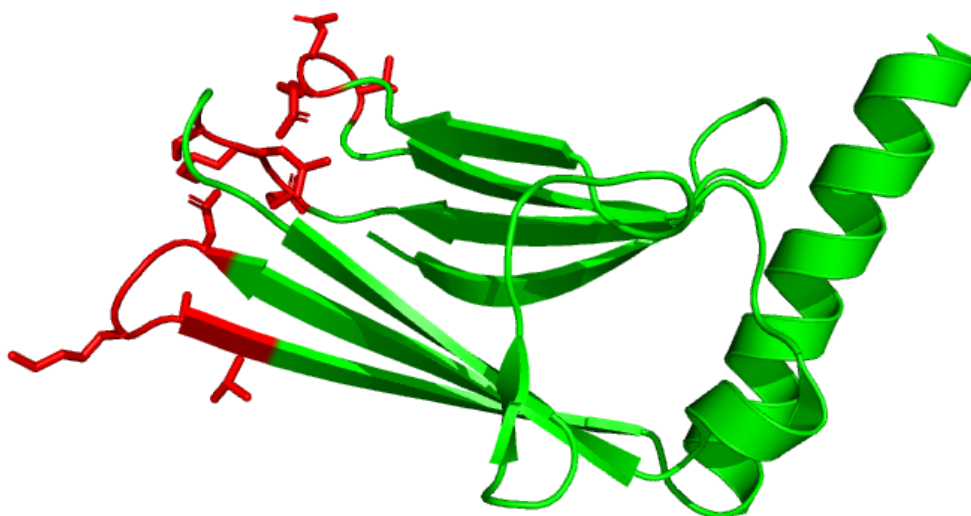


proteinu je připojena další proteinová sekvence, obvykle se používá gen *tolA*, sloužící jako flexibilní spojovník umožňující samovolné sbalení („folding“) proteinové domény po vystoupení z ribozomu. Protože sekvence je designovaná tak, aby neobsahovala žádný stop kodon, ribozom se jednoduše zastaví na konci *tolA* sekvence a nedisociuje z mRNA. Tak vzniká klíčový komplex vazebného proteinu a příslušné mRNA, která jej kóduje. Vazebné proteiny, stále v komplexu s ribozomem a mRNA jsou podrobeny selekci pro vazbu na cílovou molekulu (v případě vazebných proteinů použitých v diplomové práci byly selektovány varianty interagující s příslušnými bnAbs). Proteiny, které se nevážou na cílovou molekulu, jsou odmyty. Ribozomální komplex je následně destabilizován a uvolněná mRNA je izolována. Nakonec je získaná mRNA reverzně transkribována do cDNA, která může být použita k dalšímu kolu ribozomálního displeje a po posledním kole selekce je vložena do expresního vektoru. V každém následujícím kole ribozomálního displeje bývají použity přísnější selekční mechanismy, aby byly získány jen ty molekuly, které se silně vážou na terčovou molekulu. Součástí ribozomálního displeje je i negativní selekce, která vyřadí vazebné proteiny interagující s nechtěnými epitopy. V případě selekce Myomedinových variant se využívá pre-selekce pomocí izotypové kontroly IgG  $\lambda$ , jak je popsáno v práci Kuchaře a kol.

#### 4.4.2 Myomedin

Jak již bylo zmíněno výše, Myomedin je zcela nový proteinový „scaffold“ odvozený od desáté domény lidského myomesinu-1. Jedná se o protein o délce 111 aminokyselin a molekulové hmotnosti 16 kDa. Struktura je tvořena sedmi antiparalelními  $\beta$ -listy a terminálním  $\alpha$ -helixem, jak je vidět na Obr. 4. Tři vrcholové smyčky spojující  $\beta$ -listy představují variabilní oblast Myomedinu složenou ze 12 randomizovaných pozic. Jedná se o pozice 21–23 první variabilní smyčky, pozice 50–52 druhé variabilní smyčky a pozice 76–80 třetí variabilní smyčky. Oproti ABD vazebným proteinům tvořeným třemi  $\alpha$ -helixy má Myomedin hned několik výhod. Předně jde o lidský protein, proti kterému existuje vrozená tolerance, a imunitní systém se tak může zaměřit na reakci proti antigenní variabilní oblasti (Kuchař et al. 2021). Dále je výhodou, že myomedinový „scaffold“ strukturně připomíná imunoglobulinovou variabilní doménu. Vzhledem k malé velikosti ABD vazebných proteinů (5 kDa), musely být tyto mimotopy spojeny s podpůrným proteinem (Kosztu et al. 2019), což v případě Myomedinu není třeba. Díky 12 randomizovatelným pozicím může komplexní kombinatoriální proteinová knihovna odvozená od Myomedinového „scaffoldu“ teoreticky obsahovat až  $2 \times 10^{15}$  variant.

**Obr. 4.** Krystalová struktura Myomedinu (PDB kód: 6T3O). Červeně jsou vyznačeny aminokyseliny randomizovaných pozic variabilních smyček (zde pro sekvenci Myomedinu wild-type (Myo wt), tedy původní nemutované varianty).



# 5 Materiál a metody

## 5.1 Materiál

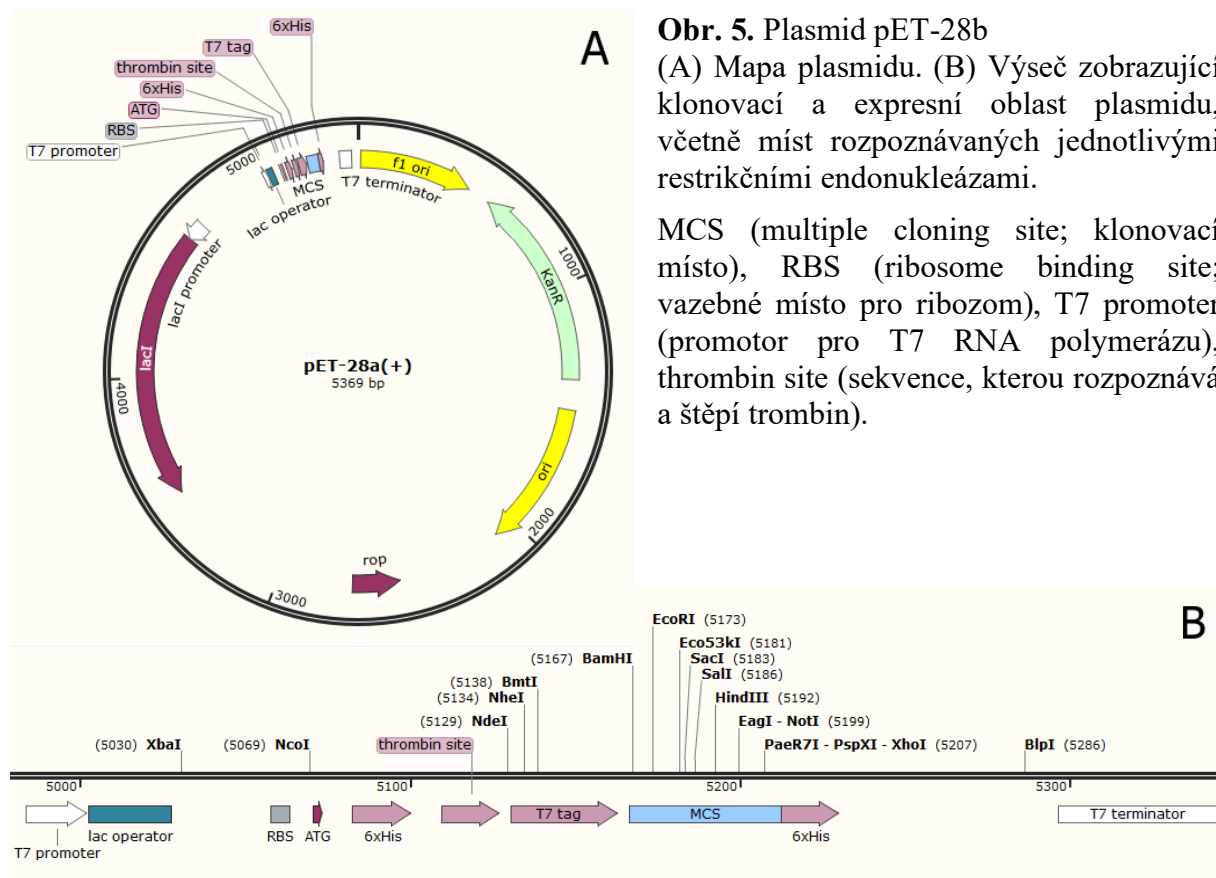
### Plasmidy

**pET-28b** (Novagen® od firmy Sigma-Aldrich)

Vektor byl použit k expresi rekombinantních proteinů. Mapa plasmidu je vidět na Obr. 5(A), detailní popis klonovací a expresní oblasti je pak na Obr. 5(B).

**pGro7** (Chaperon plasmid set od firmy TaKaRa Bio)

Plasmid kóduje chaperon groES-groEL, který napomáhá správnému složení rekombinantních proteinů a může tak zvýšit jejich rozpustnost a produkci v expresním systému *E. coli*.



**Obr. 5.** Plasmid pET-28b

(A) Mapa plasmidu. (B) Výšeč zobrazující klonovací a expresní oblast plasmidu, včetně míst rozpoznávaných jednotlivými restričními endonukleázami.

MCS (multiple cloning site; klonovací místo), RBS (ribosome binding site; vazebné místo pro ribozom), T7 promoter (promotor pro T7 RNA polymerázu), thrombin site (sekvence, kterou rozpoznává a štěpí trombin).

### Bakteriální kmeny

Pro produkci studovaných proteinů byl využit expresní systém bakterie *Escherichia coli*.

V diplomové práci byly používány následující kmeny:

#### BL21(DE3)

Genotyp kmene: *E. coli* F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm gal λ(DE3)

Jedná se o expresní kmen od firmy Thermo Fisher Scientific uzpůsobený k produkci velkého množství rekombinantních proteinů využívajících promotor T7 RNA polymerázy. Buňky byly skladovány při -80 °C.

### BL21-Gold(DE3)

Genotyp kmene: *E. coli* F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte

Jedná se o expresní kmen od firmy Agilent Technologies uzpůsobený k produkci velkého množství rekombinantních proteinů využívajících promotor T7 RNA polymerázy. Je odvozen od kmene BL21(DE3), avšak má vyšší transformační účinnost (Hte fenotyp) a má inaktivovaný gen pro endonukleázu I (endA), díky čemuž se dá využít jak pro izolaci plasmidu, tak pro expresi. Buňky byly skladovány při -80 °C.

### XL1-Blue

Genotyp kmene: *E. coli* recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 ::Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

Jedná se o klonovací kmen od firmy Agilent Technologies uzpůsobený k namnožení a dlouhodobému uchování plasmidů. Buňky byly skladovány při -80 °C.

### Primery

**Tab. 2.** Primery použité v diplomové práci. Sekvence jsou zapsány ve směru od 5' ke 3' konci.

Název	Sekvence
Myo-TEV-SLIC-F	AGCAGCGGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATATGGGCAAAGCGAGCTGG CCGTGGAA
Myo-V5-SLIC-R	CCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCGGATCCACCCTGTTTACGAATCC ATTCTT
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pET UP	ATGCGTCCGGCGTAG
Join-F	CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACATATGAAAAGCGAGCTGGCCG
Join-R	GAACCGACCGCGGATCCACCCTGTTTACGAATCCATTCTT
His-Myo-F	CAGTCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCAAAGC GAGCTGGCCG
Myo-V5-R	CTCGAGTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC GGATCCACCCTGTTTACGAATCCATTCTT
Myo-FLAG-R	TTTCCCCTCGAGCTACTTGTCATCGTCATCTTTATAATCGCTGGATCCCGGAC CCTGTTTACGAATCCATTCTTGG

### Varianty HIV-1 povrchových glykoproteinů

Rekombinantní Env trimery byly dar od Prof. MUDr. Mgr. Milana Rašky, Ph.D. vedoucího výzkumné skupiny Imunomodulace z Univerzity Palackého v Olomouci.

gp140 SOSSIP trimery byly produkovány sekrecí z transfektovaných HEK293 F buněk a následně z média purifikovány pomocí proteinové afinitní chromatografie přes His-tag.

gp120 P4 trimery byly produkována sekrecí z transfektovaných HEK293 F buněk a následně z média purifikovány pomocí proteinové afinitní chromatografie přes His-tag.

### **Protilátky**

V diplomové práci byly používány dvě široce neutralizující protilátky proti viru HIV-1 pro selekci variant Myomedinového „scaffoldu“ a jedna isotypová kontrola. Dále byly používány tři detekční protilátky, kdy každá rozpoznává jednu krátkou, uměle vytvořenou, peptidovou sekvenci, tzv. tag.

### **PGT121**

Lidská monoklonální protilátka (subtyp IgG1  $\lambda$ ) rozpoznávající V3 smyčku obalového glykoproteinu gp120. Protilátka byla získána prostřednictvím NIH AIDS Reagent Program, Oddělení pro AIDS, NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), NIH (National Institutes of Health), US.

### **PGT126**

Lidská monoklonální protilátka (subtyp IgG1  $\lambda$ ) rozpoznávající V3 smyčku obalového glykoproteinu gp120. Protilátka byla získána prostřednictvím NIH AIDS Reagent Program, Oddělení pro AIDS, NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), NIH (National Institutes of Health), US.

### **IgG $\lambda$**

Jedná se o směs lidských IgG1 protilátek s  $\lambda$  lehkým řetězcem, které pochází z lidských buněk myelomu. Materiál byl testován negativně na přítomnost specifických protilátek proti HIV a je tedy možné ho používat jako isotypovou kontrolu při ELISA. Výrobce: Sigma-Aldrich; I5029.

### **Anti-V5**

Králíčí polyklonální protilátka proti V5-tag konjugovaná s HRP (horseradish peroxidase; křenová peroxidasa). Výrobce: Abcam; ab1325.

### **Anti-His**

Myší monoklonální protilátka proti His-tag konjugovaná s HRP. Výrobce: Novus Biologicals; NBP2-31055H.

### **Anti-FLAG®-tag**

Myší monoklonální protilátka rozpoznávající DDDDK peptidovou sekvenci, FLAG®-tag, a je konjugována s HRP. Výrobce: Abcam; [M2].

## Enzymy

Veškeré enzymy použité v diplomové práci jsou od firmy New England Biolabs.

Q5 polymeráza (Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase; M0491S)

One Taq polymeráza (OneTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase; M0480S)

NcoI restriční endonukleáza (NcoI; R0193S)

NdeI restriční endonukleáza (NdeI; R0111S)

BamHI – HF restriční endonukleáza (BamHI-HF<sup>®</sup>; R3136S)

XhoI restriční endonukleáza (XhoI; R0146S)

Alkalická fosfatáza (Alkaline Phosphatase Calf Intestinal – CIP; M0290S)

T4 DNA ligáza (T4 DNA Ligase; M0202S)

## Média

LB 2% (w/v) LB Broth (Sigma-Aldrich)

SOB 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5% (w/v) Yeast extract (Oxoid), 2% (w/v) Bacto<sup>™</sup> Tryptone (Thermo Fisher Scientific), až po autoklávování média přidat roztok Mg<sup>2+</sup> na výslednou koncentraci 10 mM

SOC 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5% (w/v) Yeast extract (Oxoid), 2% (w/v) Bacto<sup>™</sup> Tryptone (Thermo Fisher Scientific), až po autoklávování média přidat glukózu na výslednou koncentraci 20 mM a roztok Mg<sup>2+</sup> na výslednou koncentraci 10 mM

## Pufry a roztoky

Katodový pufr 0,1 M tricine, 0,1 M tris, 0,1% (w/v) SDS, dH<sub>2</sub>O

Anodový pufr 0,2 M tris, dH<sub>2</sub>O, pH 8,9

10x TAE pufr 0,4 M tris, 0,2 M kyselina octová, 10 mM EDTA, dH<sub>2</sub>O, pH 8,5

1x TAE pufr 0,1% (v/v) 10x TAE pufr, dH<sub>2</sub>O

1x TB pufr 10 mM HEPES, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,25 M KCl, ddH<sub>2</sub>O pH 6,7, po úpravě pH ještě doplnit 86 mM MnCl<sub>2</sub> (roztok sterilizovat filtrací)

Roztok Mg<sup>2+</sup> 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 M MgSO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O (roztok sterilizovat filtrací)

PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O, pH 7,4

PBS 0,05T 0,05% (v/v) Tween 20, PBS

1% BSA v PBS 0,05T 0,05% (v/v) Tween 20, PBS, 1% (w/v) Albumin fraction V biotin-free (Roth; 0163.2)

5% mléko v PBS 0,1T 5% (w/v) odtučněné mléko, 0,1% (v/v) Tween 20, PBS

T50 N100	50 mM tris, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, dH <sub>2</sub> O, pH 8
T50 N300	50 mM tris, 300 mM NaCl, dH <sub>2</sub> O, pH 8
T50 N300 I20	50 mM tris, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, dH <sub>2</sub> O, pH 8
T50 N300 I250	50 mM tris, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, dH <sub>2</sub> O, pH 8
60% isopropanol T50	50 mM tris, 60% (v/v) isopropanol, dH <sub>2</sub> O
Vazebný roztok	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 35 mM NaHCO <sub>3</sub> , dH <sub>2</sub> O, pH 9,6
Bradfordův roztok	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,9% (v/v) ethanol, 8,5% (w/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , dH <sub>2</sub> O (vodu přidat až po úplném rozpuštění barvy a výsledný roztok přefiltrovat)
Biotin v bicinovém pufru	10 mM bicin, 5 mM d-biotin, dH <sub>2</sub> O, pH 8,3
Lyzační pufr	2 mM EDTA, 1 mM PMSF, lysozim 1mg/ml, T50 N100
Coomassie blue barva	0,005% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 53 mM kyselina octová, dH <sub>2</sub> O (výsledný roztok přefiltrovat)
Sample buffer 5x	10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,2 M tris pH 6,8 (pH upravit pomocí HCl), dH <sub>2</sub> O, 0,05% (w/v) Bromophenol blue, 10 mM beta-mercaptoethanol
Loading dye 6x	30% (v/v) glycerol, 150 mM EDTA, 0,03% (w/v) Bromophenol blue, 0,03% (w/v) Xylene Cyanol, dH <sub>2</sub> O
Tris-Cl/SDS	2,1 M tris pH 8,45 (pH upravit pomocí HCl), dH <sub>2</sub> O, roztok přefiltrovat a přidat 10 mM SDS
Zaostřovací gel	12,8% (v/v) Acrylamide/Bis Solution, 24,4% (v/v) Tris-Cl/SDS, 8 mM APS, 16 mM TEMED, dH <sub>2</sub> O
Rozdělovací gel	32,6% (v/v) Acrylamide/Bis Solution, 10,5% (v/v) glycerol, 33,2% (v/v) Tris-Cl/SDS, 2,7 mM APS, 16 mM TEMED, dH <sub>2</sub> O
0,8% agarosový gel	0,8% (w/v) agarosa, 1x TAE pufr, 0,005% (v/v) Hydra Green <sup>TM</sup> (přidat až těsně před naléváním roztoku do formy)
Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1, 30% (w/v) (SERVA; 10688.01)	
B-PER <sup>TM</sup> Reagent (Thermo Fisher Scientific; 78243)	
TMB – complete 2 (TestLine Clinical Diagnostics; TMB0L1)	
Clarity <sup>TM</sup> Western ECL Substrate (BioRad; 1705061)	
Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Standards, Dual color (BioRad; 161-0374)	
Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Standards, All blue (BioRad; 161-0373)	
Quick-Load <sup>®</sup> Purple 1kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs; N0550S)	
MassRuler Express LR Forward DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific; SM1263)	

Gel Loading Dye Purple (6x) (New England Biolabs; B7024S)  
Hydra Green™ (ACTGene; ACT-IDMG04)  
CutSmart® Buffer (New England Biolabs; B7204S)  
Q5® Reaction Buffer (New England Biolabs; B9027S)  
Standard Taq Reaction Buffer (New England Biolabs; B9014S)  
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs; B0202S)  
Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific; 21134)

### **Antibiotika**

Kanamycin (Sigma-Aldrich; K4000)  
Chloramfenikol (Sigma-Aldrich; R0378)

### **Petriho misky s LB médiem**

Petriho misky s LB médiem: 3,5% (w/v) LB Agar (Sigma-Aldrich; L2897), dH<sub>2</sub>O  
Petriho misky s LB médiem + kanamycin 60 µg/ml (přidat až těsně před naléváním)  
Petriho misky s LB médiem + chloramfenikol 20 µg/ml (přidat až těsně před naléváním)

## **5.2 Metody**

### **Složení kombinatoriální proteinové knihovny a ribozomální displej**

Tyto metody NEBYLY provedeny v rámci diplomové práce, avšak byly nezbytné pro získání vstupní proteinové knihovny, se kterou bylo následně pracováno. Postup složení kombinatoriální proteinové knihovny a provedení ribozomálního displeje je vysvětleno v práci Kuchař et al. 2021.

### **Úpravy a štěpení vektoru pET-28b před vložením proteinové knihovny**

Úpravy plasmidu pET-28b NEBYLY provedeny v rámci diplomové práce, neboť níže zmíněné varianty plasmidu byly již předem připraveny v naší laboratoři.

Vektor pro PGT121 knihovnu – vložení sekvencí pro His-tag a V5-tag oddělených univerzálním inzertem (Myo-10-11).

Vektor pro PGT126 knihovnu – vložení sekvence pro His-tag, TEV místa, univerzálního inzertu (Myo-10-11) a sekvence pro V5-tag = vektor pET-28b-SLIC.

Vektor pro PGT121 knihovnu byl restriktivně štěpen restriktivními endonukleázami NcoI a BamHI – HF. Složení reakční směsi:



- NcoI (0,2 U/μl)
- BamHI – HF (0,4 U/μl)
- CutSmart® Buffer (10x ředěný)
- vektor (50 ng/μl)
- alkalická fosfatáza (0,13 U/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala 2 hodiny při 37 °C. Restriční endonukleázy byly po reakci inaktivovány přidáním Gel Loading Dye Purple (6x) ke vzorku. Produkty reakce byly nanесeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj: PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragment o velikosti 5 282 bp byl vyříznut z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch® DNA gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch® PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

Vektor pro PGT126 knihovnu byl restričně štěpen restričními endonukleázami NdeI a BamHI – HF. Složení reakční směsi:

- NdeI (0,4 U/μl)
- BamHI – HF (0,4 U/μl)
- CutSmart® Buffer (10x ředěný)
- vektor (50 ng/μl)
- alkalická fosfatáza (0,13 U/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala 2 hodiny při 37 °C. Restriční endonukleázy byly po reakci inaktivovány přidáním Gel Loading Dye Purple (6x) ke vzorku. Produkty reakce byly nanесeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj: PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragment o velikosti 5 345 bp byl vyříznut z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch® DNA gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch® PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

### **Vložení knihovny Myomedinových variant do vektoru pET-28b**

Jednovláknové cDNA, které byly získány reverzní transkripcí molekul mRNA z třetího kola ribozomálního displeje, byly převedeny na dsDNA pomocí PCR. Složení PCR reakce pro PGT121 knihovnu:

- Q5<sup>®</sup> Reaction Buffer (5x ředěný)
- His-Myo-F (výsledná koncentrace 500 nM)
- Myo-V5-R (výsledná koncentrace 500 nM)
- dNTPs (výsledná koncentrace 200 μM každého z dNTPs)
- cDNA
- Q5 polymeráza (0,02 U/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Pro PGT126 knihovnu bylo použito stejné složení PCR reakce, akorát byly použity primery Join-F a Join-R (výsledná koncentrace 500 nM každého z nich).

Reakce probíhala na přístroji c1000Touch<sup>™</sup> Thermal cycler (BioRad) dle programu:

iniciace: 98 °C - 30 sekund

cyklus (35x): 98 °C - 10 sekund (denaturace)

65 °C - 30 sekund (nasedání primerů)

72 °C - 20 sekund (syntéza DNA)

ukončení: 72 °C - 20 sekund

Produkty PCR byly smíchány s loading dye 6x tak, aby se barva 6x naředila. Vzorky byly naneseny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj: PowerPac<sup>™</sup> Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragment o velikosti 435 bp (421 bp v případě PGT126 knihovny) byl vyříznut z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch<sup>®</sup> DNA gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch<sup>®</sup> PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

Inzert (PGT121 knihovna) byl následně restriktivně štěpen restriktivními endonukleázami NcoI a BamHI – HF. Složení reakční směsi:

- BamHI – HF (0,4 U/μl)
- NcoI (0,2 U/μl)
- CutSmart<sup>®</sup> Buffer (10x ředěný)
- inzert - 435 bp (20 ng/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Inzert (PGT126 knihovna) byl následně restriktivně štěpen restriktivními endonukleázami NdeI a BamHI – HF. Složení reakční směsi:

- BamHI – HF (0,4 U/μl)
- NdeI (0,4 U/μl)

- CutSmart<sup>®</sup> Buffer (10x ředěný)
- inzert - 421 bp (20 ng/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala v obou případech 2 hodiny při 37 °C. Restriční endonukleázy byly po reakci inaktivovány přidáním Gel Loading Dye Purple (6x) ke vzorku. Produkty reakce byly nanášeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj PowerPac<sup>™</sup> Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragment o velikosti 375 bp (341 bp v případě PGT126 knihovny) byl vyříznut z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch<sup>®</sup> DNA gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch<sup>®</sup> PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

Následovala ligace štěpeného inzertu se štěpeným vektorem (viz výše). Složení ligační reakce:

- vektor (50 ng)
- inzert (takové množství, aby výsledný poměr vektor [mol]:inzert [mol] byl 1:3)
- T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x ředěný)
- T4 DNA ligáza (20 U/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě a následně byla DNA ligáza inaktivována v 65 °C po dobu 10 minut.

### **Transformace bakterií XL1-Blue produktem ligační reakce a následná izolace plasmidové DNA z transformovaných bakterií**

Ke 100 μl XL1-Blue chemokompetentních bakterií udržovaných na ledu bylo přidáno 5 μl produktu ligační reakce. Vzorky byly dále inkubovány na ledu po dobu 25 minut, následně byly přeneseny na 42 sekund do 42 °C, vráceny zpět na led a inkubovány ještě 5 minut na ledu. Poté bylo k buňkám přidáno 900 μl SOC média a byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Transformované buňky byly vysety po 250 μl na čtyři Petriho misky s LB médiem + kanamycin a inkubovány přes noc při 37 °C v inkubátoru EN 120 (Nüve).

Následující den byl do každé misky přidán 1 ml LB média s kanamycinem (60 μg/ml), narostlé kolonie byly v médiu resuspendovány a médium s buňkami odebráno. Z buněk byla izolována plasmidová DNA pomocí Monarch<sup>®</sup> Plasmid miniprep kit (New England Biolabs; T1010L).

Vyizolovaná plasmidová DNA představuje knihovnu Myomedinových variant vyselektovaných při ribozomálním displeji.

### **Transformace bakterií BL21-Gold(DE3) knihovnou Myomedinových variant**

Ke 100  $\mu$ l BL21-Gold(DE3) chemokompetentních bakterií udržovaných na ledu bylo přidáno 150 ng vyizolované plasmidové DNA (knihovna Myomedinových variant). Vzorčky byly dále inkubovány na ledu po dobu 25 minut, následně byly přeneseny na 20 sekund do 42 °C, vráceny zpět na led a inkubovány ještě 5 minut na ledu. Poté bylo k buňkám přidáno 900  $\mu$ l SOC média a byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Transformované buňky byly vysety na Petriho misky s LB médiem + kanamycin a inkubovány přes noc při 37 °C v inkubátoru EN 120 (Nüve). Na 1. misku bylo vyseto 100  $\mu$ l transformovaných bakterií, na 2. misku 200  $\mu$ l a na 3. misku byly vysety buňky ze zbylých 700  $\mu$ l transformační reakce.

Následující den byly jednotlivé klony přečárkovány na novou Petriho misku s LB médiem + kanamycin, která nesla číselnou mřížku, a tím pádem získal každý jednotlivý klon číslo, pod kterým byl dále označován v ELISA plošném testování a dalších experimentech.

### **Colony PCR**

Zároveň, během přečárkování jednotlivých klonů na novou Petriho misku (viz výše), byla provedena i tzv. colony PCR, aby se zjistila přítomnost správně vloženého inzertu u jednotlivých klonů. Po samotném přečárkování každé kolonie na novou Petriho misku byla špička nástroje namočena do předem připravené směsi na PCR a reziduum bakterií ulpělých na povrchu se uvolnilo do PCR směsi. Složení PCR směsi:

- Q5<sup>®</sup> Reaction Buffer (5x ředěný)
- Myo-TEV-SLIC-F (výsledná koncentrace 500 nM)
- Myo-TEV-SLIC-R (výsledná koncentrace 500 nM)
- dNTPs (výsledná koncentrace 200  $\mu$ M každého z dNTPs)
- Q5 polymeráza (0,02 U/ $\mu$ l)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala na přístroji c1000Touch<sup>™</sup> Thermal cycler (BioRad) dle programu:

iniciace: 98 °C - 2 minuty (lýza bakteriálních buněk)

cyklus (35x): 98 °C - 10 sekund (denaturace)

72 °C - 20 sekund (nasedání primerů a syntéza DNA)

ukončení: 72 °C - 20 sekund

Produkty PCR byly smíchány s loading dye 6x tak, aby se barva 6x naředila. Vzorky byly nanášeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Výsledný gel byl snímán na přístroji Azure c280 (Azure biosystems) při vlnové délce 302 nm, čas expozice: autoexposure. Byla zjišťována přítomnost fragmentu o velikosti 407 bp.

Ve výsledcích se však ukázalo, že množství klonů obsahujících požadovaný inzert bylo nečekaně malé, jak je vidět na Obr. 6(A). Proto bylo provedeno ověření výsledků z colony PCR pomocí restriční štěpení:

Do zkumavek se 4 ml LB média + kanamycin (60 µg/ml) bylo zaočkováno malé množství buněk stejných klonů použitých v colony PCR a pěstováno přes noc při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Další den byla z buněk izolována plasmidová DNA pomocí Monarch® Plasmid miniprep kit (New England Biolabs; T1010L). Koncentrace plasmidové DNA byla změřena na spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Složení reakční směsi pro restriční štěpení:

- NcoI (0,2 U/µl)
- BamHI – HF (0,4 U/µl)
- CutSmart® Buffer (10x ředěný)
- vektor (20 ng/µl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala 1 hodinu při 37 °C. Produkty štěpení byly smíchány s loading dye 6x tak, aby se barva 6x naředila. Vzorky byly nanášeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj: PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Výsledný gel byl snímán na přístroji Azure c280 (Azure biosystems) při vlnové délce 302 nm, čas expozice: autoexposure. Byla zjišťována přítomnost fragmentů o velikosti 5 282 bp a 374 bp. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 6(B).

Proto byla navržena optimalizace colony PCR, kterou pak byla analyzována většina vzorků. Složení PCR reakce:

- Standard Taq Reaction Buffer (5x ředěný)
- primer pETup (výsledná koncentrace 250 nM)
- primer T7 terminator (výsledná koncentrace 250 nM)
- dNTPs (výsledná koncentrace 200 µM každého z dNTPs)
- One Taq polymeráza (0,025 U/µl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala na přístroji c1000Touch™ Thermal cycler (BioRad) dle programu:

iniciace: 94 °C - 2 minuty (lýza bakteriálních buněk)

cyklus (35x): 94 °C - 30 sekund (denaturace)

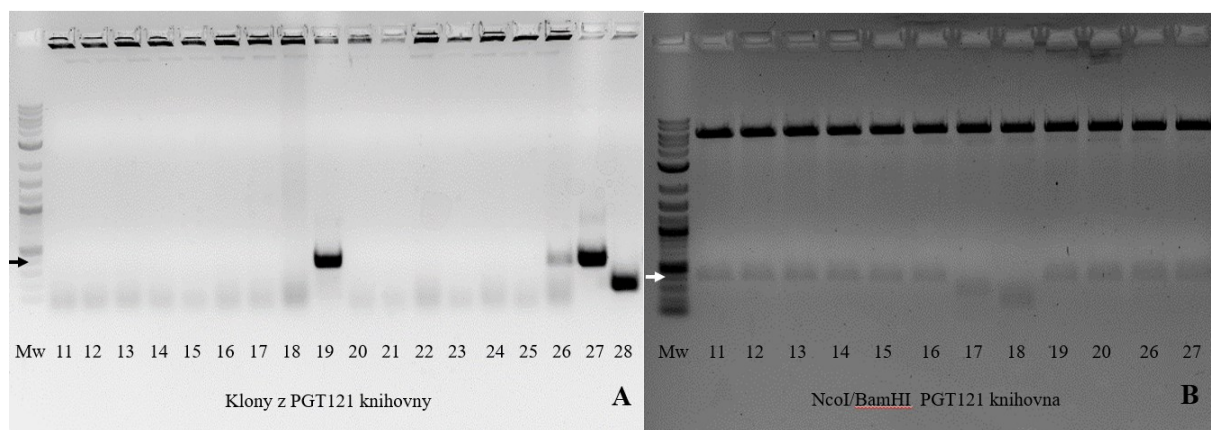
53 °C - 30 sekund (nasedání primerů)

68 °C - 45 sekund (syntéza DNA)

ukončení: 68 °C - 5 minut

Produkty PCR byly smíchány s loading dye 6x tak, aby se barva 6x naředila. Vzorky byly nanášeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Výsledný gel byl snímán na přístroji Azure c280 (Azure biosystems) při vlnové délce 302 nm, čas expozice: autoexposure. Byla zjišťována přítomnost fragmentu o velikosti 647 bp (v případě klonů z PGT121 knihovny), nebo 677 bp (v případě klonů z PGT126 knihovny).

**Obr. 6.** (A) Snímek gelu elektroforézy produktů colony PCR (Myo-TEV-SLIC-F, Myo-TEV-SLIC-R, Q5 polymeráza). Číslo náleží jednotlivým klonům z PGT121 knihovny; Mw = žebříček Quick-Load® Purple 1kb Plus DNA Ladder; černá šipka označuje fragment o velikosti 400 bp. (B) Snímek gelu elektroforézy produktů restriktivního štěpení (NcoI, BamHI, vektor s vloženou PGT121 knihovnou). Číslo náleží jednotlivým klonům z PGT121 knihovny; Mw = žebříček Quick-Load® Purple 1kb Plus DNA Ladder; bílá šipka označuje fragment o velikosti 400 bp. Produkty o velikosti přibližně 5,3 kbp představují štěpený vektor. Je patrné, že pouze klony 17 a 18 nekódují inzert o požadované délce.



### Pěstování bakteriálních kultur pro následné plošné testování pomocí ELISA

Do 2 ml zkumavek s 400 µl LB média + kanamycin (60 µg/ml) bylo zaočkováno malé množství buněk jednotlivých klonů a pěstováno přes noc při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm.

Následující den bylo 200 µl\* kultury zaočkováno do zkumavek s 4 ml LB média + kanamycin (60 µg/ml) a inkubováno na třepačce Incu-Shaker™ 10LR (Benchmark Scientific) při 37 °C a 250 rpm dokud nebylo dosaženo  $OD_{600} = 0,6$ . Jakmile bylo dosaženo požadované optické

denzity, ke kulturám bylo přidáno IPTG, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM, a teplota kultivace se snížila na 30 °C. Kultury byly takto inkubovány následující 4 hodiny. Poté byla každá kultura rozdělena do dvou 2 ml zkumavek a centrifugována 15 min. na 6 000g při 4 °C (centrifuga Microfuge® 22R od firmy Beckman Coulter). Ze vzorků byl odstraněn supernatant a pelety byly uchovány při -80 °C.

\* Ke zbylým 200 µl kultury bylo přidáno 200 µl vychlazeného 50% (v/v) glycerolu v LB médiu a vzorky byly uchovány při -80 °C.

### Plošné testování Myomedinových variant

Pro odhad míry afinity jednotlivých variant Myomedinu k terčovým bnAb PGT121 a PGT126 byla provedena přímá sendvičová ELISA.

Den předem byly na ELISA destičku Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates PolySorp™ (Thermo Fisher Scientific; 475094) nanášeny protilátky ve vazebném roztoku – rozložení a koncentrace je popsána v Tab. 3. Destička byla umístěna přes noc do 4 °C a tmy.

**Tab. 3.** Nanesení protilátky PGT121 (5µg/ml) a IgG λ (5µg/ml) ve vazebném roztoku. Objem 75µl/jamka. Pro plošné testování Myomedinových variant cílicích na PGT126 byly použity stejné koncentrace protilátek i stejné rozložení.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
B	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
C	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
D	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
E	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
F	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
G	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml
H	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml

Destička byla promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300 µl každá jamka (tento i následující promývací kroky byly prováděny pomocí promývačky TECAN HydroFlex™ microplate washer od firmy Schoeller). Po promytí bylo přidáno do každé jamky 300 µl blokačního roztoku 1% BSA v PBS 0,05T a inkubováno 2 hodiny při pokojové teplotě. Mezitím byly přichystány bakteriální lyzáty. Pelety ze 2 ml kultur byly vyndány z -80 °C a ponechány na ledu, dokud neroztály. Dále se příprava vzorků lišila:

Klony z PGT121 knihovny byly lyzovány komerčním lyzačním pufrům B-PER™ reagent. Pelety byly resuspendovány ve 100 µl lyzačního pufru B-PER™ reagent a inkubovány 30 minut při pokojové teplotě a třepány na přístroji Orbital Skaker PSU-10i (bioSan). Následně byly vzorky centrifugovány 15 min. na 16 000g při 4 °C (centrifuga Microfuge® 22R od firmy Beckman Coulter). Supernatant každého vzorku byl převeden do nové zkumavky a uchován na ledu.

Klony z PGT126 knihovny byly lyzovány lyzačním pufrům, jak je popsán v seznamu pufrů a roztoků. Pelety byly resuspendovány ve 150 µl lyzačního pufru a vzorky byly inkubovány 20 minut při 30 °C a třepány (Mixing Block MB-102 od firmy Bioer). Následně byly vzorky centrifugovány 20 min. na 16 000g při 4 °C (centrifuga Microfuge® 22R od firmy Beckman Coulter). Supernatant každého vzorku byl převeden do nové zkumavky a uchován na ledu.

Po uplynutí 2 hodin blokace byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300 µl každá jamka. Vzorky bakteriálních lyzátů byly naředěny 100x roztokem 1% BSA v PBS 0,05T a nanášeny po 75 µl v triplicátech na PGT121 (PGT126 respektive) a v triplicátech na IgG λ. Jako negativní kontrola byl nanášen 100x ředěný lyzát z Myomedinu wt (Myo wt), který byl připraven stejně, jako ostatní analyzované lyzáty. Jako pozitivní kontrola byl nanášen buď gp140 Sossip (0,36 µg/ml) nebo gp120 P4 (0,7 µg/ml). Destička se vzorky byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě a poté promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300 µl každá jamka. Do jamek bylo přidáno 75 µl detekční protilátky Anti-V5 o koncentraci 0,1 µg/ml (ředěno roztokem 1% BSA v PBS 0,05T) a inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300 µl každá jamka a do každé jamky bylo přidáno 75 µl TMB – complete 2. Reakce byla zastavena po 20 minutách (výjimečně po 30 minutách) přidáním 40 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Výsledky byly snímány na přístroji Epoch™ 2 microplate spectrophotometer od firmy BioTek při 450 nm.

## **Sekvenace**

Z klonů, které měly slibné výsledky při plošném testování, bylo potřeba izolovat plasmidovou DNA a zjistit sekvence konkrétních variant Myomedinů, které jednotlivé klony kódují.

Do zkumavek se 4 ml LB média + kanamycin (60 µg/ml) bylo zaočkováno malé množství buněk vybraných klonů a pěstováno přes noc při 37 °C na třepače (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Další den byla z buněk izolována plasmidová DNA pomocí Monarch® Plasmid miniprep kit (New England Biolabs; T1010L). Koncentrace plasmidové DNA byla změřena na spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Složení sekvenační reakce:



- plasmidová DNA (150 ng/μl)
- primer T7 terminator nebo primer T7 promotor (625 nM)
- ddH<sub>2</sub>O

Sekvence byla provedena metodou Sangerova sekvenování v laboratoři OMICS Genomika (Core facility – Genomika, PřF UK, Biocev, Průmyslová 595, Vestec, 252 50).

Získané sekvence byly analyzovány pomocí programu SnapGene<sup>®</sup> Viewer (verze 4.3.5).

### **Transformace bakterií BL21(DE3) pro expresi variant vybraných v plošném testování**

Plasmidová DNA z klonů, které měly sekvence v pořádku, byla transformována do bakterií BL21(DE3), které sloužily výhradně k expresi Myomedinových variant pro vazebné studie.

Ke 100 μl BL21(DE3) chemokompetentních bakterií udržovaných na ledu bylo přidáno 50 ng vyizolované plasmidové DNA (ze sekvenací). Vzorky byly dále inkubovány na ledu po dobu 25 minut, následně byly přeneseny na 42 sekund do 42 °C, vráceny zpět na led a inkubovány ještě 5 minut na ledu. Poté bylo k buňkám přidáno 900 μl SOC média a byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Transformované buňky byly vysety po 200 μl na Petriho misky s LB médiem + kanamycin a inkubovány přes noc při 37 °C v inkubátoru EN 120 (Nüve).

### **Pěstování bakteriálních kultur pro následnou purifikaci a vazebné studie**

Do zkumavek se 4 ml LB média + kanamycin (60 μg/ml) bylo zaočkováno malé množství buněk vybraných klonů a pěstováno přes noc při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Následující den byly 2 ml kultury zaočkovány do 200 ml LB média + kanamycin (60 μg/ml) a inkubovány na třepačce Incu-Shaker<sup>™</sup> 10LR (Benchmark Scientific) při 37 °C a 250 rpm dokud nebylo dosaženo OD<sub>600</sub> = 0,6. Jakmile bylo dosaženo požadované optické denzity, ke kulturám bylo přidáno IPTG, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM, a teplota kultivace se snížila na 30 °C. Kultury byly takto inkubovány následující 4 hodiny. Poté byla každá kultura rozdělena po 100 ml a centrifugována 15 min. na 6 000g při 4 °C (centrifuga Alegra<sup>™</sup> X-22R od firmy Beckman Coulter). Ze vzorků byl odstraněn supernatant a pelety byly uchovány při -80 °C.

### **Proteinová afinitní chromatografie**

Pelety ze 100 ml kultur byly vyndány z -80 °C a ponechány na ledu, dokud neroztály. Dále byly resuspendovány v 8 ml T50 N300 pufru a sonikovány (sonikátor S3000 od firmy Misonix nebo sonikátor Q700 od firmy Qsonica). Sonikace: 10 minut pulzů po 5 sekundách oddělených

10 sekundami pauzy, amplituda 3, sonda 4420. Vzorky byly během sonikace chlazeny směsí vody a ledu. Vzorky po sonikaci byly převedeny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány 25 min. na 40 000g při 4 °C (centrifuga Avanti J-26S XPI centrifuge od firmy Beckman Coulter). Supernatant ze vzorků byl převeden do nové zkumavky a uchován na ledu. Dále byly přichystány 20 ml kolony pro proteinovou afinitní chromatografii. Nové kolony byly propláchnuty 2x 20 ml dH<sub>2</sub>O, následně byl na kolony nanesen 0,5 ml matrice Ni-NTA Agarose (QIAGEN; 30210). Matrice byla promyta 2x 20 ml dH<sub>2</sub>O a 2x 10 ml T50 N300 pufru. Následně byl na kolonu nanesen 3x supernatant (3x se nechal celý objem protéct skrz matici, aby se veškeré proteiny s His-tag mohly navázat). Matrice i s navázanými proteiny byla promyta 3x 5 ml T50 N300 a dále 3x 5 ml T50 N300 I20 (počet opakování promytí se mohl lišit v návaznosti na to, jak moc se z matrice do protékajícího roztoku uvolňovaly nespecificky navázané proteiny, což bylo detekováno mírou zabarvení Bradfordova roztoku). Následovalo promytí 3x 4 ml 60% isopropanolem T50 a 3x 5 ml T50 N300 připraveného ve vodě pro tkáňové kultury (neobsahuje LPS). Po promývání byly proteiny našeho zájmu vytěsněny z matrice a postupně po 400 µl vymyty elučním pufrem T50 N300 I250. Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích (elucích) byla stanovena změřením absorbance při 280 nm na přístroji NanoDrop 1000 spectrometer (Thermo Fisher Scientific) a dopočtena dle vzorečku níže, kde  $c$  = koncentrace [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ],  $A_{280\text{nm}}$  = absorbance při 280 nm,  $d$  = délka dráhy světla [ $\text{cm}$ ],  $E_k$  = extinkční koeficient [ $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ],  $M$  = molární hmotnost [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ],  $D_f$  = dilution factor (faktor ředění). Molární hmotnost a extinkční koeficient byly vypočteny pro každý vzorek zvlášť dle sekvence konkrétní varianty Myomedinu. Koncentrace v  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla následně převedena na koncentraci v  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

$$c = \frac{A_{280\text{nm}}}{E_k \cdot d} \cdot M \cdot D_f$$

Složení jednotlivých elucí bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE. Vzorek z každé eluce byl smíchán se Sample buffer 5x tak, aby se pufr 5x naředil, dále byl zahřát na 95 °C po dobu 10 minut v termobloku Mixing Block MB-102 (Bioer) a následně nanesen na polyakrylamidový gel (složení zaostřovacího i rozdělovacího gelu je uvedeno v seznamu pufrů a roztoků). Elektroforéza probíhala na přístroji PowerPac™ Basic Power Supply a Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad), čas: 55 minut, proud: 35 mA (v případě analýzy dvou gelů byl proud zvýšen na 70 mA). Gel byl po elektroforéze krátce povařen v dH<sub>2</sub>O, voda byla následně vyměněna a gel byl krátce povařen ještě jednou a umístěn na kývačku po dobu

30 minut. Poté byla voda odstraněna a gel byl umístěn do Coomassie blue barvy, ve které byl 2 minuty povařen. Barva byla odstraněna a gel ještě jednou propláchnut a povařen v dH<sub>2</sub>O. Výsledný gel byl nafocen přístrojem Azure c280 (Azure biosystems).

### Vazebné studie

Pro stanovení afinity a specificity vazby vybraných variant Myomedinu k terčovým bnAb PGT121 a PGT126 byla provedena přímá sendvičová ELISA s proteiny získanými proteinovou afinitní chromatografií.

Den předem byly na ELISA destičku Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates PolySorp™ (Thermo Fisher Scientific; 475094) nanoseny protilátky ve vazebném roztoku – rozložení a koncentrace je popsána v Tab. 4. Destička byla umístěna přes noc do 4 °C a tmy.

**Tab. 4.** Nanosení protilátky PGT121 (5µg/ml) a IgG λ (5µg/ml) ve vazebném roztoku. Objem 75µl/jamka. Jamky označené BSA neobsahovaly žádnou protilátku a sloužily k testování, zda protein zájmu neinteraguje s roztokem 1% BSA v PBS 0,05T. Pro plošné testování Myomedinových variant cílicích na PGT126 byly použity stejné koncentrace protilátek i stejné rozložení.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
B	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
C	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
D	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
E	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
F	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
G	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA
H	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA	PGT121 5 µg/ml	PGT121 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	IgG λ 5 µg/ml	BSA	BSA

Destička byla promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300 µl každá jamka (tento i následující promývací kroky byly prováděny pomocí promývačky TECAN HydroFlex™ microplate washer od firmy Schoeller). Po promytí bylo přidáno do každé jamky 300 µl blokačního roztoku 1% BSA v PBS 0,05T a inkubováno 2 hodiny při pokojové teplotě. Mezitím byly přichystány ředící řady vypořizovaných proteinů:

Pro každou z testovaných variant Myomedinu byla vybrána taková frakce z proteinové afinitní chromatografie, která obsahovala nejvyšší koncentraci proteinu. Tato frakce byla nejméně 2x naředěna, čímž byla získána vstupní koncentrace proteinu pro vazebnou studii. Tato

koncentrace byla dále ředěna pětkovou ředící řadou (v případech, kdy vstupní koncentrace proteinu byla příliš nízká, byla použita čtyřková nebo trojková ředící řada). Celkem bylo připraveno 8 vzorků ředící řady od každé z variant. Vzorky před nanesením byly uchovávány na ledu.

Po uplynutí 2 hodin blokace byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300  $\mu$ l každá jamka. Vzorky byly nanесeny po 75  $\mu$ l v duplikátech na PGT121 (PGT126 respektive), IgG  $\lambda$  i do jamek bez protilátek. Destička se vzorky byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě a poté promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300  $\mu$ l každá jamka. Do jamek bylo přidáno 75  $\mu$ l detekční protilátky Anti-V5 o koncentraci 0,1  $\mu$ g/ml (ředěno roztokem 1% BSA v PBS 0,05T) a inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300  $\mu$ l každá jamka a do každé jamky bylo přidáno 75  $\mu$ l TMB – complete 2. Reakce byla zastavena po 12–32 minutách (dle rychlosti vybarvení reakce) přidáním 40  $\mu$ l 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Výsledky byly snímány na přístroji Epoch<sup>TM</sup> 2 microplate spectrophotometer od firmy BioTek při 450 nm.

### **Příprava vybraných variant Myomedinu s FLAG-tag nebo Avi-tag na C-konci proteinu**

Na základě vazebných studií a předběžných výsledků získaných z imunizací myší (nejsou součástí diplomové práce) byly některé z variant Myomerinu vybrány pro následné competiční studie. Proto bylo u těchto variant potřeba nahradit V5-tag na C-konci proteinu za FLAG-tag, popřípadě Avi-tag, aby bylo možné v experimentu odlišit navázaný Myomedinový „scaffold“ od virového proteinu gp120 P4.

Příprava variant Myomedinu s FLAG-tag:

Variety Myomedinu z PGT121 knihovny neobsahovaly restriční místo pro restriční endonukleázu NdeI, a proto bylo nejprve třeba provést PCR reakci s primery, které k sekvenci Myomedinu připojily NdeI restriční místo na 5'konec a sekvenci FLAG-tag na 3'konec.

Složení PCR reakce:

- Q5<sup>®</sup> Reaction Buffer (5x ředěný)
- Myo-TEV-SLIC-F (výsledná koncentrace 500 nM)
- Myo-FLAG-R (výsledná koncentrace 500 nM)
- dNTPs (výsledná koncentrace 200  $\mu$ M každého z dNTPs)
- cDNA
- Q5 polymeráza (0,02 U/ $\mu$ l)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala na přístroji c1000Touch™ Thermal cycler (BioRad) dle programu:

iniciace: 98 °C - 30 sekund

cyklus (35x): 98 °C - 10 sekund (denaturace)

72 °C – 15 sekund (nasedání primerů a syntéza DNA)

ukončení: 72 °C – 5 minut

Produkty PCR byly smíchány s loading dye 6x tak, aby se barva 6x naředila. Vzorky byly nanесeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj: PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragment o velikosti 423 bp byl vyříznut z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch® DNA gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch® PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

Inzert byl následně restriktivně štěpen restriktivními endonukleázami NdeI a XhoI. Složení reakční směsi:

- NdeI (0,4 U/μl)
- XhoI (0,4 U/μl)
- CutSmart® Buffer (10x ředěný)
- inzert - 423 bp (20 ng/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Vektor pET-28b-SLIC (popsaných na začátku této kapitoly) byl restriktivně štěpen restriktivními endonukleázami NdeI a XhoI. Složení reakční směsi:

- NdeI (0,4 U/μl)
- XhoI (0,4 U/μl)
- CutSmart® Buffer (10x ředěný)
- plasmid (50 ng/μl)
- alkalická fosfatáza (0,13 U/μl)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala v obou případech 2 hodiny při 37 °C. Restriktivní endonukleázy byly po reakci inaktivovány přidáním Gel Loading Dye Purple (6x) ke vzorku. Produkty reakce byly nanесeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj PowerPac™ Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragменты o velikosti 387 bp (inzert) a 5 292 bp (vektor) byly vyříznuty z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch® DNA gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch® PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

Ligace štěpeného vektoru a inzertu. Složení ligační reakce:

- vektor (50 ng)
- inzert (takové množství, aby výsledný poměr vektor [mol]:inzert [mol] byl 1:3)
- T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x ředěný)
- T4 DNA ligáza (20 U/ $\mu$ l)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Reakce probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě a následně byla DNA ligáza inaktivována v 65 °C po dobu 10 minut.

Varianty Myomedinu z PGT126 knihovny již obsahovaly restriční místo pro restriční endonukleázu NdeI, a proto bylo možné rovnou izolovanou plasmidovou DNA vybraných klonů restričně štěpit restričními endonukleázami NdeI a BamHI – HF. Složení reakční směsi:

- NdeI (0,4 U/ $\mu$ l)
- BamHI – HF (0,4 U/ $\mu$ l)
- CutSmart<sup>®</sup> Buffer (10x ředěný)
- plasmidová DNA (50 ng/ $\mu$ l)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Jako vektor byl použit výše zmíněný vektor pET-28b-SLIC s již vloženým inzertem, který nesl FLAG-tag, a proto stačilo tento upravený vektor naštěpit restričními endonukleázami NdeI a BamHI – HF. Složení reakční směsi:

- NdeI (0,4 U/ $\mu$ l)
- BamHI – HF (0,4 U/ $\mu$ l)
- CutSmart<sup>®</sup> Buffer (10x ředěný)
- vektor (50 ng/ $\mu$ l)
- alkalická fosfatáza (0,13 U/ $\mu$ l)
- ddH<sub>2</sub>O (sterilní)

Obě reakce (štěpení plasmidové DNA klonu z PGT126 knihovny a štěpení vektoru) probíhaly 2 hodiny při 37 °C. Restriční endonukleázy byly po reakci inaktivovány přidáním Gel Loading Dye Purple (6x) ke vzorku. Produkty reakce byly nanесeny na 0,8% agarosový gel a analyzovány pomocí elektroforézy. Přístroj: PowerPac<sup>™</sup> Basic Power Supply a Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad), čas: 55 minut, napětí: 70 V. Fragmenty o velikosti 341 bp (inzert) a 5 345 bp (vektor) byly vyříznuty z gelu. Pro izolaci DNA z gelu byl použit Monarch<sup>®</sup> DNA

gel extraction kit (New England Biolabs; T1020L) a pro následné přečištění získané DNA Monarch® PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs; T1030S).

Ligační reakce probíhala stejně, jak je popsáno výše.

Příprava variant Myomedinu s Avi-tag:

Tyto varianty Myomedinu byly připraveny jiným pracovníkem laboratoře, a proto zde není uveden detailní postup celé přípravy.

### **Transformace bakterií BL21(DE3) variantami s FLAG-tag a BL21(DE3) nesoucích plasmid BirA variantami s Avi-tag pro expresi variant Myomedinu na kompetiční studie**

Transformace chemokompetentních bakterií BL21(DE3) vektory s variantami Myomedinu s FLAG-tag byla provedena stejně, jak je popsáno výše pro transformace BL21(DE3) bakterií pro pěstování proteinů na vazebné studie.

Bakterie BL21(DE3) nesoucí plasmid BirA (BL21(DE3)BirA buňky), jsou uzpůsobeny k expresi proteinů biotinylovaných na připojeném Avi-tag. BL21(DE3)BirA buňky byly v laboratoři připraveny již dříve, a proto zde jejich příprava není detailně popsána. Transformace chemokompetentních bakterií BL21(DE3)BirA vektory s variantami Myomedinu s Avi-tag byla rovněž provedena dle postupu, který byl popsán výše pro BL21(DE3).

### **Kultivace buněk BL21(DE3) a BL21(DE3)BirA pro expresi proteinů na kompetiční studie**

BL21(DE3) buňky byly kultivovány stejně, jak bylo popsáno dříve pro vazebné studie.

BL21(DE3)BirA buňky byly kultivovány následovně:

Do zkumavek se 4 ml LB média s kanamycinem (60 µg/ml) a chloramfenikolem (20 µg/ml) bylo zaočkováno malé množství buněk vybraných klonů a pěstováno přes noc při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Následující den byly 2 ml kultury zaočkovány do 200 ml LB média s kanamycinem (60 µg/ml) a chloramfenikolem (20 µg/ml) a inkubovány na třepačce Incu-Shaker™ 10LR (Benchmark Scientific) při 37 °C a 250 rpm dokud nebylo dosaženo  $OD_{600} = 0,6$ . Jakmile bylo dosaženo požadované optické denzity, byly kultury zchlazeny na 20 °C a ke kulturám byl přidán biotin v bicinovém pufru, aby se roztok 100x naředil (výsledná koncentrace biotinu je tedy 50 µM). Po 10 minutách byla teplota kultivace zvýšena na 30 °C a bylo ke kulturám přidáno IPTG, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1,5 mM. Kultury byly takto inkubovány následující 4 hodiny. Poté byla kultura převedena do centrifugační nádoby a centrifugována 15 min. na 6 000g při 4 °C (centrifuga Avanti J-26S XPI centrifuge od firmy Beckman Coulter). Peleta byla resuspendována ve 40 ml

studeného PBS a opět centrifugována 10 min. na 6 000g při 4 °C (centrifuga Alegra™ X-22R od firmy Beckman Coulter). Ze vzorků byl odstraněn supernatant a pelety byly uchovány při -80 °C.

### **Testování variant Myomedinu s FLAG-tag nebo Avi-tag**

Než bylo přistoupeno ke kompetičním studiím bylo otestováno, zda připojení FLAG-tag či Avi-tag neovlivnilo vazebné vlastnosti jednotlivých variant.

Proteiny byly získávány z pelet z 200 ml kultur. Peleta byla proto resuspendována v 15 ml T50 N300 pufru a pro účinnější sonikaci byla suspenze rozdělena do dvou zkumavek a sonikována samostatně. Před stáčením byly vzorky opět spojeny a postupovalo se dále dle popisu proteinové afinitní chromatografie.

Testování vazby bylo provedeno stejně, jak je popsáno pro vazebné studie. Rozdíl byl pouze v použitých detekčních protilátkách. V kroku přidání detekční protilátky bylo do jamek přidáno 75 µl detekční protilátky Anti-FLAG®-tag o koncentraci 15 ng/ml (ředěno roztokem 1% BSA v PBS 0,05T), popřípadě 75 µl Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP o koncentraci 200 ng/ml (ředěno roztokem 1% BSA v PBS 0,05T).

### **Kompetiční studie**

V těchto experimentech byla testována schopnost vybraných variant Myomedinu kompetovat s gp120 P4 o vazbu na bnAb PGT121 a PGT126. Kompetice byla měřena metodou přímé sendvičové ELISA.

Testované proteiny byly pěstovány i purifikovány stejně, jak bylo popsáno dříve pro potřeby vazebných studií. Jediná odchylka spočívala v tom, že zde byly proteiny při proteinové afinitní chromatografii získávány z pelet z 200 ml kultur. Peleta byla proto resuspendována v 15 ml T50 N300 pufru a pro účinnější sonikaci byla suspenze rozdělena do dvou zkumavek a sonikována samostatně. Před stáčením byly vzorky opět spojeny a postupovalo se dále, jak je uvedeno u popisu proteinové afinitní chromatografie.

Den předem bylo na ELISA destičku Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates PolySorp™ (Thermo Fisher Scientific; 475094) nanášeno 75 µl protilátky PGT121 (respektive PGT126) ve vazebném roztoku o výsledné koncentraci 2,5 µg/ml. Destička byla umístěna přes noc do 4 °C a tmy.

Destička byla promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300 µl každá jamka (tento i následující promývací kroky byly prováděny pomocí promývačky TECAN HydroFlex™ microplate



washer od firmy Schoeller). Po promytí bylo přidáno do každé jamky 300  $\mu$ l blokačního roztoku 1% BSA v PBS 0,05T a inkubováno 2 hodiny při pokojové teplotě. Příprava vzorků:

Každá z testovaných variant Myomedinu byla naředěna v blokačním roztoku 1% BSA v PBS 0,05T tak, aby výsledná koncentrace proteinu byla přibližně  $2 \cdot 10^{-6}$  M. Tento roztok byl dále použit pro přípravu ředící řady proteinu gp120 P4. Vstupní koncentrace proteinu gp120 P4 byla  $8,1 \cdot 10^{-7}$  M a následně byla ředěna devítkovou ředící řadou až na koncentraci  $1,52 \cdot 10^{-13}$  M. Celkem bylo připraveno 8 vzorků ředící řady proteinu gp120 P4 pro každou z variant. K tomu byl vždy ponechán jeden vzorek zcela bez proteinu gp120 P4 a sloužil jako pozitivní kontrola. Vzorky před nanesením byly uchovávány na ledu.

Po uplynutí 2 hodin blokace byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300  $\mu$ l každá jamka. Vzorky byly nanесeny v duplikátech po 75  $\mu$ l do jamek s PGT121 (PGT126 respektive) a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300  $\mu$ l každá jamka. Pokud byly testovány varianty Myomedinu s FLAG-tag, bylo do jamek přidáno 75  $\mu$ l detekční protilátky Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag o koncentraci 12,5 ng/ml (ředěno roztokem 1% BSA v PBS 0,05T) a inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Pokud byly testovány varianty s biotinylovaným Avi-tag, bylo do jamek přidáno 75  $\mu$ l Pierce<sup>™</sup> High Sensitivity Streptavidin-HRP o koncentraci 200 ng/ml (ředěno roztokem 1% BSA v PBS 0,05T) a inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byla destička promyta roztokem PBS 0,05T – 3x 300  $\mu$ l každá jamka a do každé jamky bylo přidáno 75  $\mu$ l TMB – complete 2. Reakce byla zastavena po 9–20 minutách (dle rychlosti vybarvení reakce) přidáním 40  $\mu$ l 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Výsledky byly snímány na přístroji Epoch<sup>™</sup> 2 microplate spectrophotometer od firmy BioTek při 450 nm.

### **Western blot**

Pro některá ověření či doplňující analýzy byl několikrát v diplomové práci použit Western blot, dle níže uvedeného postupu:

Proteinové vzorky byly nejprve rozděleny pomocí SDS-PAGE. Vzorky o známé koncentraci proteinů (například po purifikaci proteinovou afinitní chromatografií) byly připraveny tak, aby výsledná koncentrace proteinů byla 0,1 mg/ml a Sample buffer 5x byl 5x naředěn. Vzorky z bezbuněčných extraktů proteinů byly 4x naředěny sterilní dH<sub>2</sub>O a Sample buffer 5x byl 5x naředěn. Dále byly vzorky zahřáty na 95 °C po dobu 10 minut v termobloku Mixing Block MB-102 (Bioer) a následně nanесeny na polyakrylamidový gel (složení zaostřovacího i rozdělovacího gelu je uvedeno v seznamu pufrů a roztoků). Elektroforéza probíhala na přístroji PowerPac<sup>™</sup> Basic Power Supply a Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis

Cell (BioRad), čas: 55 minut, proud: 35 mA (v případě analýzy dvou gelů byl proud zvýšen na 70 mA). Po elektroforéze byl gel přenesen na nitrocelulosovou membránu Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (BioRad; 1704159) dle přiloženého protokolu výrobce a celá soustava umístěna do přístroje Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad). Program přebílení byl nastaven na 7 minut při konstantním proudu 1,3 A a napětí 25 V. Po přenesení proteinů na membránu byla membrána 3x propláchnuta PBS a umístěna do roztoku 5% mléka v PBS 0,1T, kde byla blokována po dobu 2 hodin při pokojové teplotě na kývačce, popřípadě byla blokace provedena přes noc při 4 °C. Následně byl blokační roztok odstraněn a na membránu byla nanášena detekční protilátka v roztoku 5% mléka v PBS 0,1T. Použitá koncentrace závisela na konkrétní protilátce a na doporučení od výrobce – anti-V5 byla nanášena v koncentraci 50 ng/ml, anti-His byla nanášena v koncentraci 170 ng/ml, anti-FLAG-tag byla nanášena v koncentraci 12,5 ng/ml. Membrána byla s protilátkou inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě na kývačce. Poté byl roztok s protilátkou odstraněn a membrána byla 3x důkladně promyta PBS (membrána byla umístěna do čistého PBS, ponechána na kývačce po dobu 10 minut a následně bylo PBS odstraněno – proces byl 3x opakován). Promytá membrána byla lehce vysušena filtračním papírem a byl na ni nanášen substrát Clarity™ Western ECL Substrate. Inkubace probíhala 5 minut při pokojové teplotě. Nakonec byla membrána vysušena filtračním papírem a okamžitě snímána přístrojem Azure c280 (Azure biosystems) v programu „chemiluminiscence“, čas expozice byl nastaven na „autoexposure“.

### **Dot blot**

Pro některá ověření či doplňující analýzy byla v diplomové práci několikrát použita metoda Dot blot, která slouží k detekci proteinů v nativní konformaci pomocí specifické protilátky. Metoda je principiálně podobná Western blotu, avšak nejsou zde provedeny kroky zahrnující přípravu vzorků na SDS-PAGE, samotná SDS-PAGE a přebílení proteinů z gelu na membránu. Místo toho byl čistý vzorek obsahující protein zájmu nanášen v objemu 2 – 5 µl přímo na nitrocelulosovou membránu. Kapka se nechala dokonale zaschnout a následující kroky byly provedeny stejně, jako v případě proteinů přebílených na nitrocelulosovou membránu při Western blotu (blokování, vazba detekčních protilátek, snímání).

### **Gelová permeační chromatografie**

Pěstování bakteriálních kultur pro gelovou permeační chromatografii bylo provedeno dle stejného postupu, který byl popsán výše pro pěstování bakteriálních kultur pro následnou purifikaci a vazebné studie. Akorát zde byla při sklizení buněk z celé 200 ml kultury vytvořena

pouze jedna peleta, neboť i následná purifikace proteinů pomocí proteinové afinitní chromatografie byla prováděna z 200 ml kultur. Jinak se však postup purifikace nelišil.

Všechny eluce konkrétní varianty Myomedinu získané při proteinové afinitní chromatografii, vyjma první eluce, byly spojeny dohromady a byla k nim přidána EDTA o výsledné koncentraci 2 mM. Následně byly proteinové vzorky převedeny do kolon Pierce<sup>TM</sup> Protein Concentrator PES, 3K MWCO, 2-6 ml (Thermo Fisher Scientific; 88514) a zakoncentrovány opakovanou centrifugací na 9 000g při 4 °C (centrifuga Alegra<sup>TM</sup> X-22R od firmy Beckman Coulter), dokud v koloně nezbylo 0,5 ml výsledného, koncentrovaného, vzorku. Ten byl převeden do nové zkumavky a centrifugován 15 min. na 18 000g při 4 °C (centrifuga Microfuge<sup>®</sup> 22R od firmy Beckman Coulter). Připravené vzorky proteinů byly uchovány na ledu.

Rovněž bylo pro gelovou permeační chromatografii připraveno odvzdušněné PBS a odvzdušněná dH<sub>2</sub>O pomocí Nalgene<sup>TM</sup> Reusable Bottle Top Filters (Thermo Fisher Scientific; DS0320-5045). Obě kapaliny byly navíc přefiltrovány přes Glass microfiber filter (Thermo Fisher Scientific; DS0281-5000).

Gelová permeační chromatografie byla provedena na přístroji GE AKTA Purifier 100 FPLC (Marshall Scientific) s automatickým sběračem frakcí GE AKTA Frac-920 Fraction Collector (Marshall Scientific), kolona Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (Merck; 17-5175-01).

Celá aparatura včetně kolony byla promyta 1,5 objemem kolony rychlostí 1,25 ml/min. nejprve odvzdušněnou dH<sub>2</sub>O a následně odvzdušněným PBS. Pumpa byla také promyta odvzdušněnou dH<sub>2</sub>O a následně odvzdušněným PBS. Smyčka pro nanášení vzorků byla promyta 1 ml odvzdušněného PBS. Vzorky byly nanášeny v objemu 0,5 ml, ventil v pozici „load“. Nastavení programu: ekvilibrace odvzdušněným PBS (0,15 objemu kolony), přepnutí ventilu do pozice „inject“, rychlost průtoku je 0,75 ml/min. Prvních 8 ml představovalo mrtvý objem a nesbíralo se. Poté začal automatický sběrač frakcí odebírat frakce po 0,5 ml. Celkem bylo získáno 30 frakcí z každého vzorku. Byla měřena absorbance protékajícího roztoku UV detektorem při 280 nm a dále byla měřena konduktivita, průtok a tlak.

Vybrané frakce z gelové permeační chromatografie byly analyzovány na SDS-PAGE. Příprava vzorků, nastavení elektroforézy i následné barvení gelů bylo totožné s postupem popsáním u proteinové afinitní chromatografie.

Frakce, které měly být následně použity na DLS (dynamic light scattering) a pro měření teploty tání proteinů, byly zakoncentrovány pomocí kolon Pierce<sup>TM</sup> Protein Concentrator PES, 3K MWCO, 2-6 ml stejným postupem, jak je popsáno výše.

## **DLS**

Metoda slouží ke zjišťování hydrodynamických poloměrů částic v roztoku, a tedy i k zjištění čistoty roztoku.

Vzorek o objemu 40  $\mu\text{l}$  byl nanesen do křemenné kyvety o objemu 200  $\mu\text{l}$  a umístěn do přístroje Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical), kde probíhalo měření. Nastavení přístroje: mód: back scatter (zpětný rozptyl), teplota: 25 °C, dispersant: voda, materiál: protein. Počet opakování měření jednoho vzorku byl automaticky nastaven přístrojem.

## **Měření teploty tání vybraných variant Myomedinu**

Teploty tání jednotlivých variant Myomedinu byly měřeny na přístroji Prometheus NT.48 od firmy Nano Temper. Princip metody spočívá v měření změny intenzity fluorescence tryptofanů proteinu při zvyšující se teplotě, neboť emisní vlnové délky tryptofanu jsou ovlivněny bezprostředním okolím molekuly, které se u složených a denaturovaných proteinů liší.

Vzorky byly umístěny do skleněné kapiláry a vloženy do přístroje. Pro každou skupinu vzorků byla nastavena individuální intenzita excitačního záření. Program byl nastaven na zvyšování teploty o 1 °C za 1 minutu, výchozí teplota byla 20 °C, konečná teplota byla 80 °C.

## **Transformace bakterií BL21(DE3) plasmidem pGro7**

Ke 100  $\mu\text{l}$  BL21(DE3) chemokompetentních bakterií udržovaných na ledu bylo přidáno 8  $\mu\text{l}$  pGro7 plasmidové DNA. Vzorky byly dále inkubovány na ledu po dobu 25 minut, následně byly přeneseny na 42 sekund do 42 °C, vráceny zpět na led a inkubovány ještě 5 minut na ledu. Poté bylo k buňkám přidáno 900  $\mu\text{l}$  SOC média a byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Transformované buňky byly vysety po 200  $\mu\text{l}$  na Petriho misky s LB médiem + chloramfenikol a inkubovány přes noc při 37 °C v inkubátoru EN 120 (Nüve).

## **Příprava chemokompetentních bakterií**

Do Erlenmeyerovy baňky s 50 ml SOC média (kam již byla přidána glukosa i  $\text{Mg}^{2+}$  ionty) bylo přidáno příslušné antibiotikum dle návodu výrobce a bakterií, které byly pěstovány (například při přípravě bakterií BL21(DE3) s pGro7 plasmidem nesoucím chloramfenikolovou rezistencí byl k SOC médiu přidán chloramfenikol o výsledné koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Do média byla zaočkována jedna kolonie příslušných buněk a kultura byla třepána (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek) přes noc při 30 °C a 250 rpm.

Následující den bylo 400  $\mu\text{l}$  buněk z kultury zaočkováno do 100 ml SOB média (s  $\text{Mg}^{2+}$  ionty i příslušným antibiotikem) v Erlenmeyerově baňce o objemu 1 litr. Kultura byla následně

třepána při 30 °C na třepačce Incu-Shaker™ 10LR (Benchmark Scientific), 250 rpm, dokud nebylo dosaženo  $OD_{600} = 0,6$ . Jakmile bylo dosaženo požadované optické denzity, kultura byla přenesena na led a dobře chlazená následujících 10 minut. Následně byla kultura rozdělena po 50 ml do dvou centrifugačních zkumavek a centrifugována 10 min. na 2 500g při 4 °C (centrifuga Alegra™ X-22R od firmy Beckman Coulter). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, peleta byla velmi opatrně a za stálého chlazení resuspendována ve 20 ml vychlazeného 1x TB pufru a ponechána 10 minut na ledu. Buňky byly opět centrifugovány 10 min. na 2 500g při 4 °C (centrifuga Alegra™ X-22R od firmy Beckman Coulter), supernatant byl odstraněn a peleta byla velmi opatrně a za stálého chlazení resuspendována ve 4 ml vychlazeného 1x TB pufru. Roztoky resuspendovaných buněk byly spojeny dohromady (v tomto případě výsledný objem 8 ml), udržovány na ledu a po kapkách a za stálého míchání k nim bylo přidáno vychlazené DMSO o výsledné koncentraci 7 % (v/v). Po přidání DMSO byly buňky ponechány 10 minut na ledu a následně dávkovací pipetou pipetovány po 100 µl do vychlazených zkumavek a okamžitě umístěny do tekutého dusíku. Výsledné kompetentní buňky byly uchovány v -80 °C.

### **Transformace bakterií BL21(DE3) nesoucích plasmid pGro7 plasmidovou DNA klonu 49 z PGT126 knihovny**

Pro otestování, zda by exprese varianty Myomedinu z klonu 49 v bakteriálních buňkách nesoucích chaperonový plasmid pGro7 zvýšila výtěžky proteinu, byly buňky BL21(DE3) s pGro7 plasmidem transformovány plasmidovou DNA klonu 49 z PGT126 knihovny.

Postup transformace chemokompetentních bakterií BL21(DE3) s plasmidem pGro7 byl totožný s postupem popsaným dříve pro transformaci bakterií BL21(DE3) pro expresi variant vybraných při plošném testování.

### **Pěstování bakterií BL21(DE3) s pGro7 transformovaných plasmidovou DNA klonu 49**

Do zkumavky se 4 ml LB média s kanamycinem (60 µg/ml) a chloramfenikolem (20 µg/ml) bylo zaočkováno malé množství buněk BL21(DE3) s pGro7 nesoucích plasmidovou DNA klonu 49 a pěstováno přes noc při 37 °C na třepačce (Shaking Incubator NB-205 od firmy N-Biotek), 250 rpm. Následující den byly 2 ml kultury zaočkovány do 200 ml LB média s kanamycinem (60 µg/ml) a chloramfenikolem (20 µg/ml) a rovněž byla přidána L-arabinoza o výsledné koncentraci 0,5 mg/ml pro indukci exprese chaperonů z plasmidu pGro7. Kultura byla inkubována na třepačce Incu-Shaker™ 10LR (Benchmark Scientific) při 37 °C a 250 rpm dokud nebylo dosaženo  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ . Jakmile bylo dosaženo požadované optické denzity,

ke kultuře bylo přidáno IPTG, aby výsledná koncentrace IPTG byla 1 mM, a teplota kultivace se snížila na 32 °C. Kultura byla takto inkubována následující 4 hodiny. Poté byla kultura převedena do centrifugační nádoby a centrifugována 15 min. na 6 000g při 4 °C (centrifuga Avanti J-26S XPI centrifuge od firmy Beckman Coulter). Peleta byla resuspendována ve 40 ml studeného PBS a opět centrifugována 10 min. na 6 000g při 4 °C (centrifuga Alegra™ X-22R od firmy Beckman Coulter). Ze vzorků byl odstraněn supernatant a pelety byly uchovány při -80 °C.

### **Hmotnostní spektrometrie**

Analýza vzorků na hmotnostním spektrometru byla zajišťována Centrem molekulární struktury (Strukturní hmotnostní spektrometrie, Centrum molekulární struktury, Biocev, Průmyslová 595, Vestec, 252 50).

## 6 Výsledky

### **Příprava plasmidových DNA knihoven kódujících vazebné proteiny selektované proti neutralizujícím protilátkám PGT121 a PGT126**

Po 3. kole ribozomálního displeje byly získané mRNA reverzně transkribovány na cDNA, ty následně na dsDNA a vloženy do připraveného vektoru pET-28b. Výsledná podoba PGT121 knihovny je vidět na Obr. 7 a PGT126 knihovny na Obr. 8.

### **Identifikace Myomedinových variant cílených proti bnAbs PGT121 a PGT126**

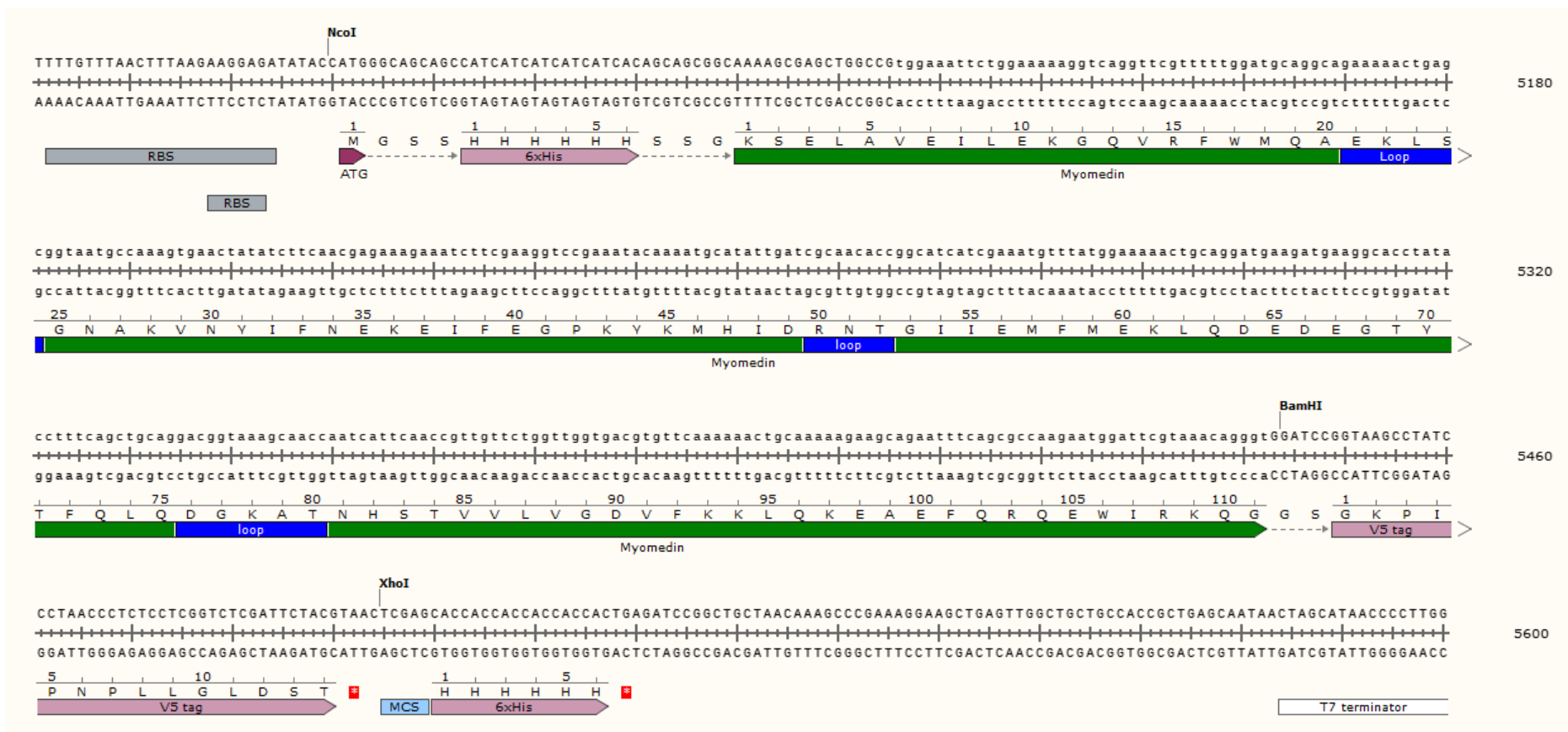
Pomocí přímé sendvičové ELISA bylo provedeno plošné testování („screening“) variant Myomedinů z PGT121 a PGT126 knihovny. Z PGT121 knihovny bylo celkem otestováno 147 variant, z nichž bylo vytipováno 14 variant, které byly dále ověřeny z hlediska sekvence DNA. Z PGT126 knihovny bylo otestováno celkem 57 variant, z nichž bylo vybráno 10 variant, které byly dále ověřeny z hlediska sekvence DNA. Příklady výsledků z plošných testování jsou zobrazeny na Obr. 9 a Obr. 10.

Ze 14 osekvenovaných variant z PGT121 knihovny mělo sekvenci v pořádku 12 variant. Ze zbylých dvou variant obsahovala jedna delecí a jedna nonsense mutaci vedoucí ke stop kodonu v pozici 23. Žádná ze sekvencí nebyla zastoupena vícekrát. Kromě randomizovaných pozic ve smyčkách se sekvence shodovaly se sekvencí Myo wt. Jedinou výjimkou byl klon 117, který měl záměnu glutamové kyseliny v pozici 56 na glycin. Na vazebné studie bylo použito 9 variant, které jsou uvedeny v Tab. 5, společně s aminokyselinami, které se nachází ve variabilních smyčkách daných proteinů.

Z 10 osekvenovaných variant z PGT126 knihovny mělo sekvenci v pořádku 8 variant. Dvě z variant obsahovaly delece vedoucí následně ke vzniku stop kodonu. Dále dvě ze sekvencí byly zastoupeny vícekrát, konkrétně klon 64 se shodoval se sekvencí klonu 30 a klon 67 se sekvencí klonu 41. Proto nebyly klony 64 a 67 dále testovány. Kromě randomizovaných pozic ve smyčkách se sekvence shodovaly se sekvencí Myo wt. Na vazebné studie bylo použito 6 variant, které jsou uvedeny v Tab. 5, společně s aminokyselinami, které se nachází ve variabilních smyčkách daných proteinů.

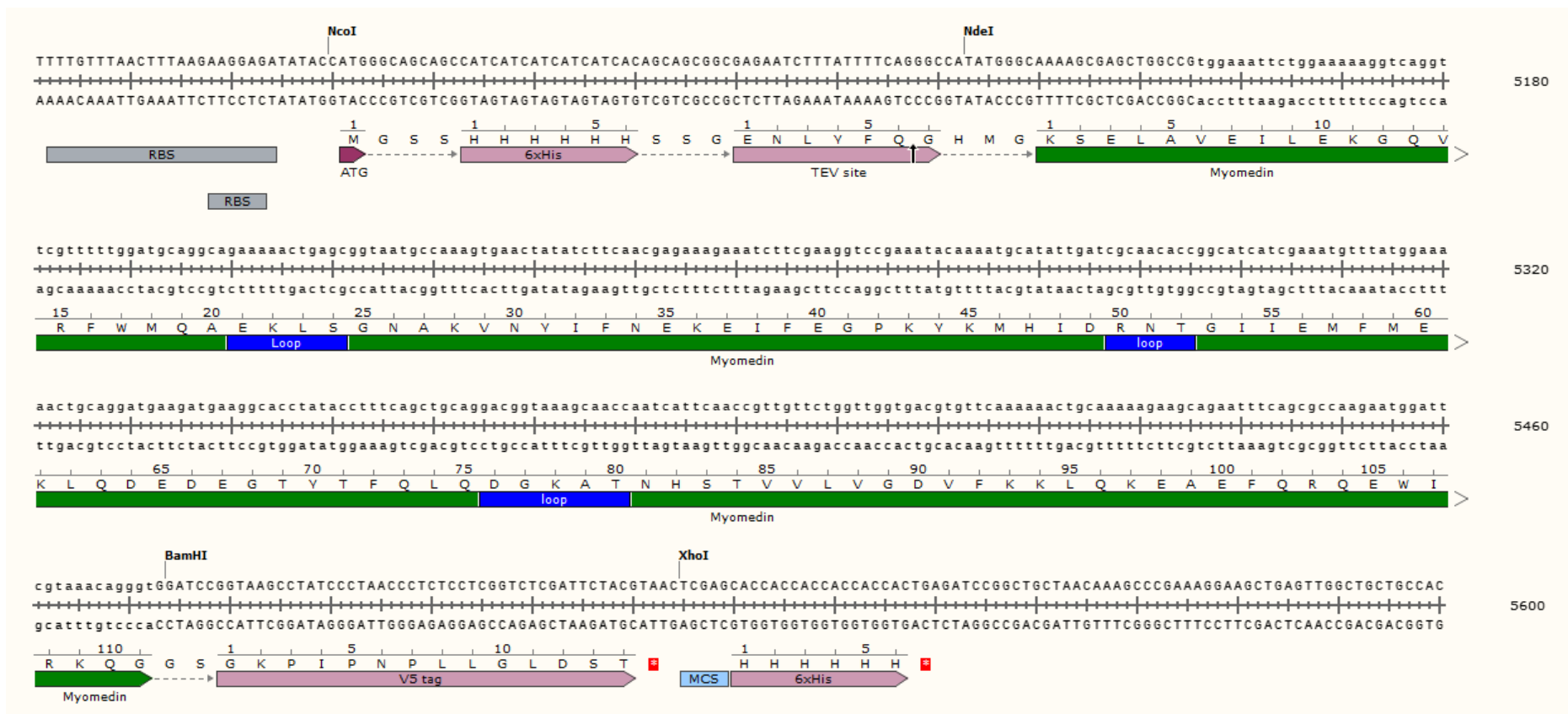
### **Exprese proteinů**

Velmi dobře se produkovaly varianty Myomedinu z klonů 3, 5, 20 a 90 z PGT121 knihovny a klonu 36 z PGT126 knihovny. Ty byly pravidelně získávány v množství 0,5 – 1 mg proteinu ze 100 ml kultury.



**Obr. 7.** PGT121 knihovna variant Myomedinu vložená do upraveného vektoru pET-28b. RBS = ribosome binding site (vazebné místo pro ribozom); ATG = start kodon; 6xHis = sekvence pro His-tag; V5 tag = sekvence V5-tag; MCS = multiple cloning site (zde pouze zbytek). Sekvence T7 terminátoru je zobrazena jen částečně. Červená hvězdička značí stop kodon. Zeleně je označena sekvence Myomedinu, ve které jsou modře vyznačeny variabilní smyčky (loop), které byly randomizovány při vytváření kombinatoriální proteinové knihovny. Zde jsou ve variabilních smyčkách zapsány aminokyseliny náležící Myo wt. V sekvenci jsou označena také místa pro restriční endonukleázy NcoI, BamHI a XhoI.





**Obr. 8.** PGT126 knihovna variant Myomedinu vložená do upraveného vektoru pET-28b. RBS = ribosome binding site (vazebné místo pro ribozom); ATG = start kodon; 6xHis = sekvence pro His-tag; TEV site = sekvence rozpoznávaná a štěpená TEV proteázou; V5 tag = sekvence V5-tag; MCS = multiple cloning site (zde pouze zbytek). Červená hvězdička značí stop kodon. Zeleně je označena sekvence Myomedinu, ve které jsou modře vyznačeny variabilní smyčky (loop), které byly randomizovány při vytváření kombinatoriální proteinové knihovny. Zde jsou ve variabilních smyčkách zapsány aminokyseliny náležící Myo wt. V sekvenci jsou označena také místa pro restriční endonukleázy NcoI, NdeI, BamHI a XhoI.

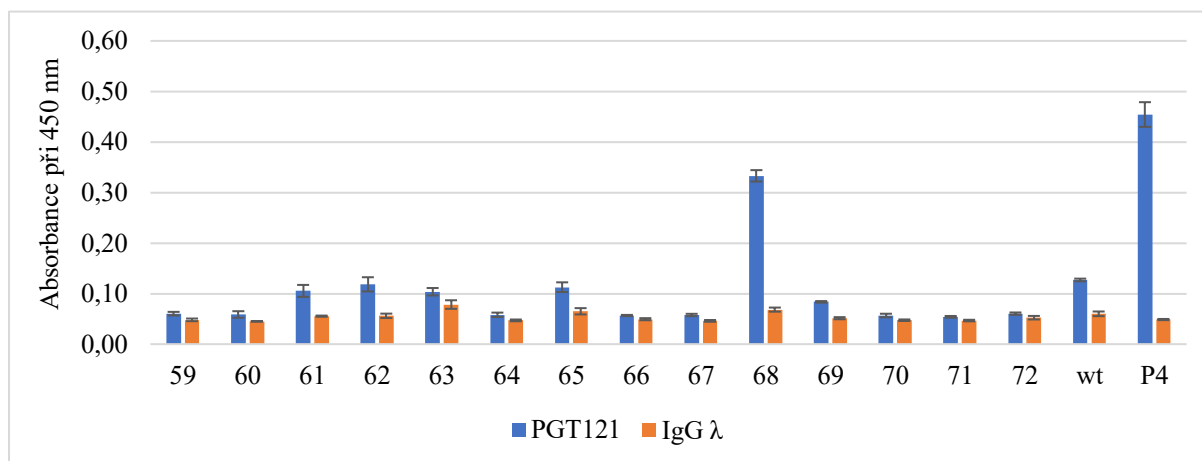
V množství 0,1 – 0,5 mg proteinu na 100 ml kultury byly produkovány varianty Myomedinu z klonů 29, 33, 68 a 94 z PGT121 knihovny a klonů 24, 30, 32 a 41 z PGT126 knihovny.

Velmi špatně se produkovaly varianty Myomedinu z klonu 118 z PGT121 knihovny a klonu 49 z PGT126 knihovny. Ty byly pravidelně získávány v množství 0,02 – 0,1 mg proteinu ze 100 ml kultury.

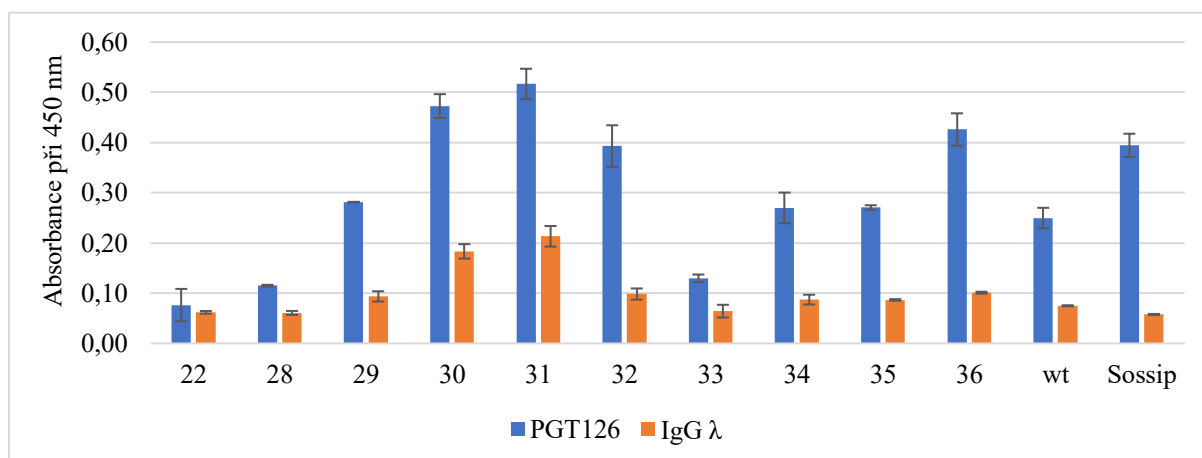
Myo wt byl získáván ve velkém množství, přibližně 3 mg proteinu na 100 ml kultury.

Snímky obarvených SDS-PAGE gelů se vzorky po proteinové afinitní chromatografii některých z výše zmíněných klonů jsou vidět na Obr. 11.

**Obr. 9.** Plošné testování variant z PGT121 knihovny, klony 59–72. Modré sloupce zobrazují hodnoty naměřené při vazbě na bnAb PGT121, zatímco oranžové sloupce odpovídají hodnotám naměřeným při vazbě na izotypovou kontrolu IgG  $\lambda$ . Úsečky udávají směrodatnou odchylku ze třech opakování. P4 = trimer gp120 P4; wt = Myo wt.



**Obr. 10.** Plošné testování variant z PGT126 knihovny, klony 22–36. Modré sloupce zobrazují hodnoty naměřené při vazbě na bnAb PGT126, zatímco oranžové sloupce odpovídají hodnotám naměřeným při vazbě na izotypovou kontrolu IgG  $\lambda$ . Úsečky udávají směrodatnou odchylku ze třech opakování. Sossip = trimer gp140 SOSIP; wt = Myo wt.



**Tab. 5.** Přehled aminokyselin ve variabilních smyčkách Myomedinu jednotlivých klonů, se kterými byly následně provedeny vazebné studie. Aminokyseliny jsou zapsány jednopísmenným kódem. Myo wt (původní typ, ze kterého se při randomizacích pozic vycházelo).

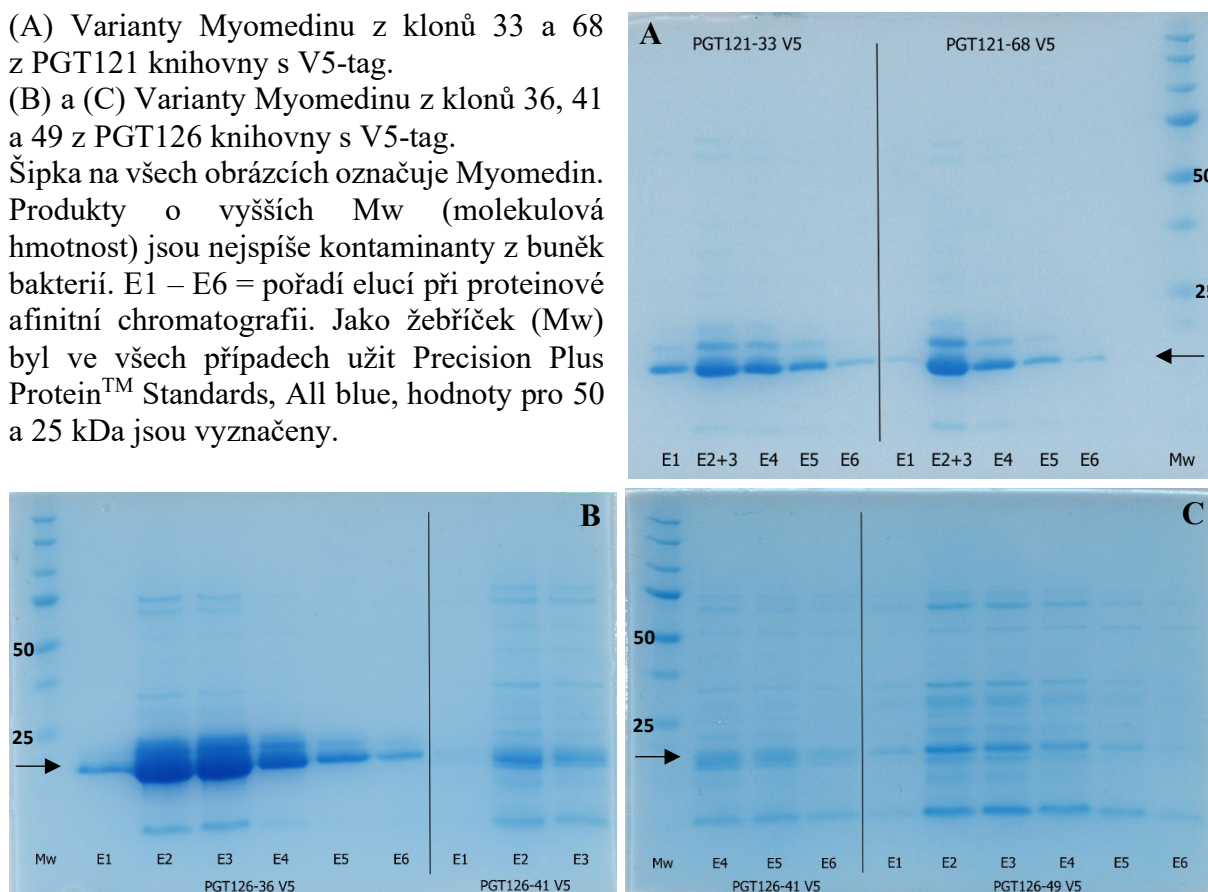
Knihovna	Klon	Aminokyseliny ve variabilních smyčkách Myomedinu												
		21	22	23	24	50	51	52	76	77	78	79	80	
PGT121	3	D	G	Q	W	P	Q	V	A	V	L	A	P	
PGT121	5	Q	S	A	K	R	N	T	F	M	L	M	M	
PGT121	20	A	I	E	M	G	G	F	G	R	P	Q	I	
PGT121	29	H	D	W	S	A	W	L	Y	W	L	P	E	
PGT121	33	H	W	Q	F	Q	G	E	P	Q	L	W	L	
PGT121	68	Y	A	G	N	V	Q	Y	E	P	I	F	L	
PGT121	90	P	A	S	C	A	T	W	A	Q	W	S	A	
PGT121	94	Q	L	N	Q	M	F	L	N	M	L	L	P	
PGT121	118	S	R	H	N	Q	G	E	I	I	W	Q	T	
PGT126	24	Q	Y	E	A	W	L	W	H	L	A	Q	G	
PGT126	30	Q	Y	E	A	W	L	W	I	V	T	P	L	
PGT126	32	V	M	F	N	V	P	V	Q	N	Y	F	W	
PGT126	36	M	W	R	N	R	N	T	W	M	T	Q	T	
PGT126	41	I	M	M	E	D	M	R	I	V	T	P	L	
PGT126	49	K	H	Q	L	W	L	W	I	V	T	P	L	
	Myo wt	E	K	L	S	R	N	T	D	G	K	A	T	

**Obr. 11.** Snímky SDS-PAGE gelů

(A) Varianty Myomedinu z klonů 33 a 68 z PGT121 knihovny s V5-tag.

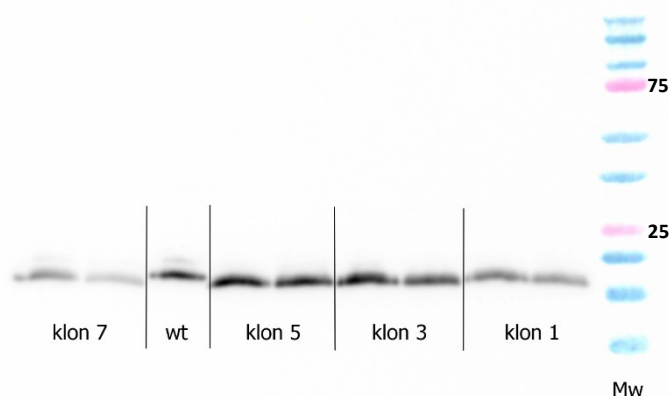
(B) a (C) Varianty Myomedinu z klonů 36, 41 a 49 z PGT126 knihovny s V5-tag.

Šipka na všech obrázcích označuje Myomedin. Produkty o vyšších Mw (molekulová hmotnost) jsou nejspíše kontaminanty z buněk bakterií. E1 – E6 = pořadí elucí při proteinové afinitní chromatografii. Jako žebříček (Mw) byl ve všech případech užit Precision Plus Protein™ Standards, All blue, hodnoty pro 50 a 25 kDa jsou vyznačeny.



Pro potvrzení toho, že proteiny označené jako Myomedin na SDS-PAGE gelech na Obr. 11 jsou skutečně vybrané varianty Myomedinu, byl proveden kontrolní Western blot. Výsledek je zobrazen na Obr. 12.

**Obr. 12.** Detekce variant Myomedinu v buněčném lyzátu z klonů 1, 3, 5, 7 z PGT121 knihovny a Myo wt pomocí Western blotu. Proteiny byly vizualizovány detekční protilátkou proti V5-tag, která je konjugována s křenovou peroxidázou. Jako žebříček (Mw) byl použit Precision Plus Protein™ Standards, Dual color, hodnoty 75 a 25 kDa jsou vyznačeny.



### Vazebné studie

Stanovení afinity a specificity vazby vybraných variant Myomedinu z PGT121 knihovny k bnAb PGT121 bylo provedeno celkem u 9 variant. Rovněž byla otestována i vazba Myo wt. Výsledky ukázaly, že pouze 4 z 9 testovaných variant Myomedinu mělo průkaznou afinitu k bnAb PGT121. Vazebné křivky těchto 4 variant společně s Myo wt jsou zobrazeny na Obr. 13.

Stanovení afinity a specificity vazby vybraných variant Myomedinu z PGT126 knihovny k bnAb PGT126 bylo provedeno celkem u 6 variant. Rovněž byla otestována i vazba Myo wt. Vazebné křivky všech 6 variant společně s Myo wt jsou zobrazeny na Obr. 14.

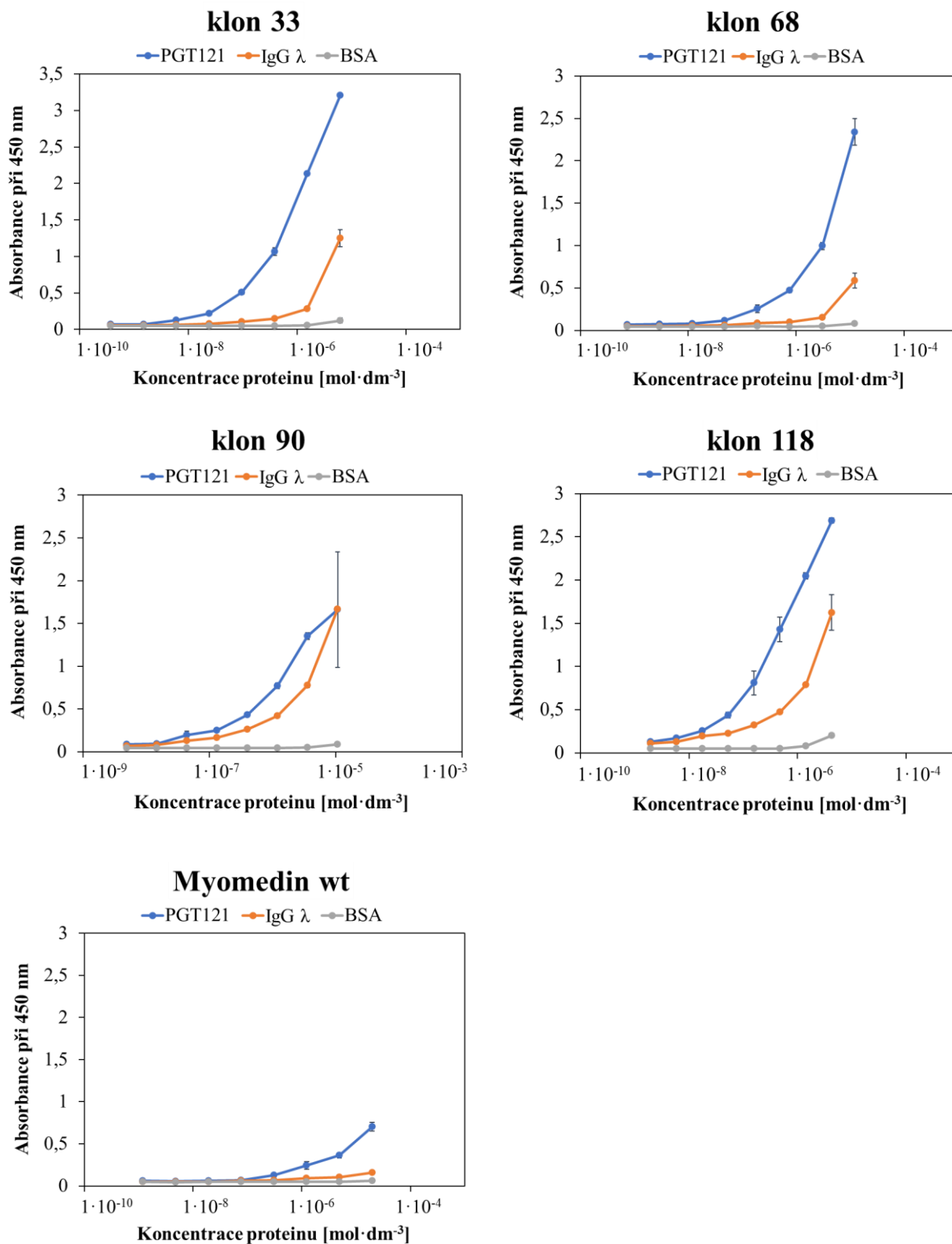
### Kompetiční studie

Byly provedeny dvě kompetiční studie, kdy vybrané varianty Myomedinu z PGT121 knihovny soutěžily spolu s gp120 P4 o vazbu na bnAb PGT121. Jednalo se o varianty Myomedinu z klonů 33 a 68, přičemž varianta 33 měla na C-konci proteinu připojený FLAG-tag, zatímco varianta 68 měla na svém C-konci připojený Avi-tag. Tento nesoulad vznikl proto, že dříve připravená varianta 68 s FLAG-tag na C-konci proteinu byla v testovací přímé sendvičové ELISA téměř nedetekovatelná, a proto nemohla být použita do kompetičních studií. Zřejmě k tomu došlo kvůli špatné přístupnosti FLAG-tag pro detekční protilátku v důsledku špatného složení produkovaného proteinu. Varianta 68 s Avi-tag tento problém již neměla.

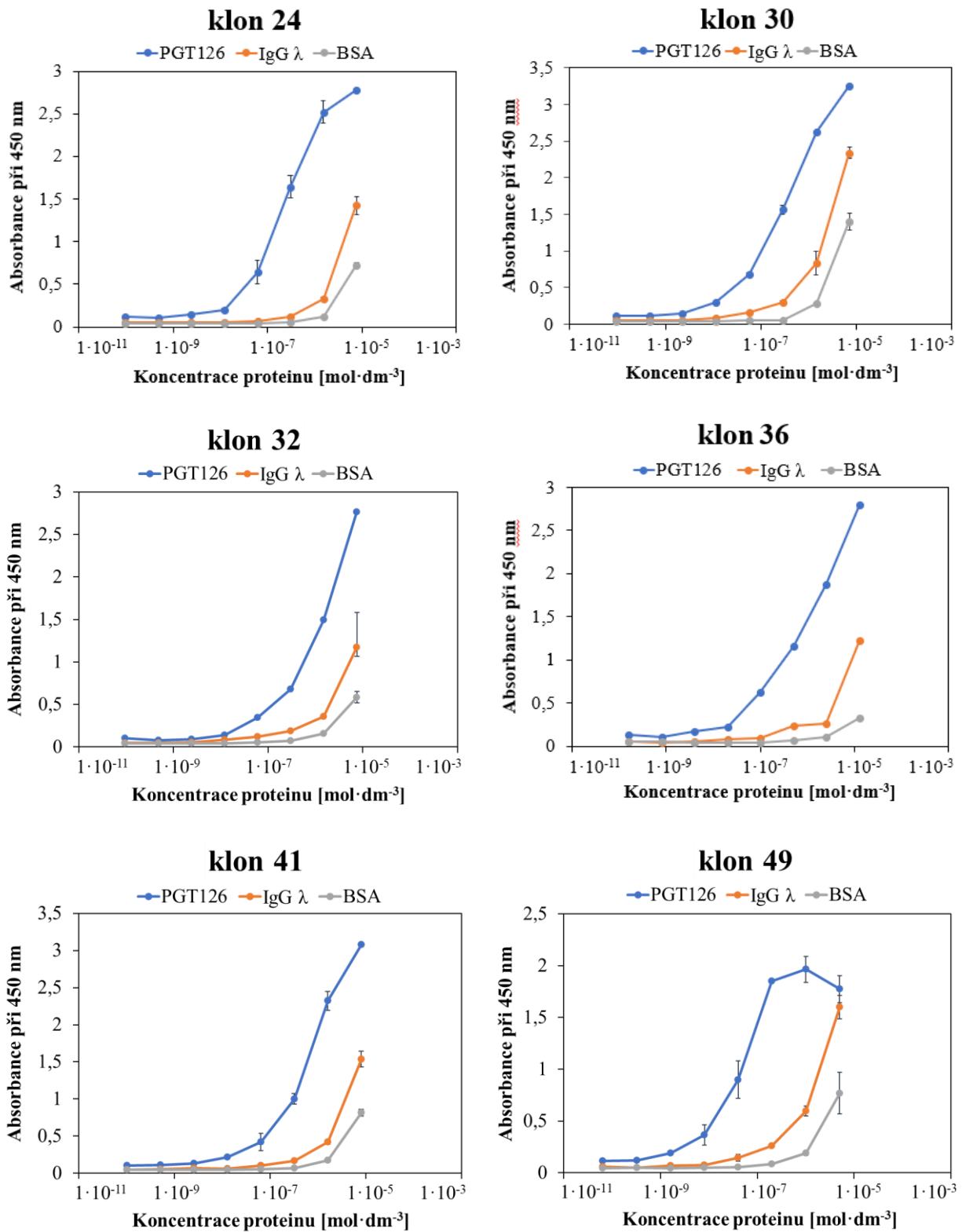
Dále byly provedeny tři kompetiční studie, kdy vybrané varianty Myomedinu z PGT126 knihovny soutěžily spolu s gp120 P4 o vazbu na bnAb PGT126. Jednalo se o varianty Myomedinu z klonů 36, 41 a 49, přičemž varianty 36 a 41 měly na C-konci proteinu připojený FLAG-tag, zatímco varianta 49 měla na svém C-konci připojený Avi-tag. Příčina tohoto rozdílu

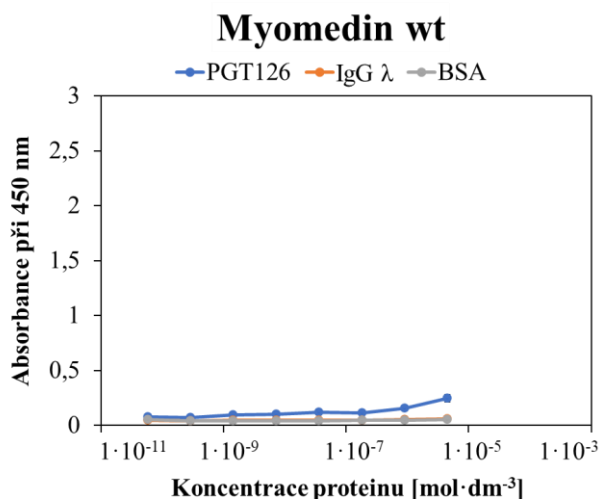
byla stejná, jako u varianty 68 z PGT121 knihovny popsaná výše. Výsledky kompetičních studií jsou zobrazeny na Obr. 15.

**Obr. 13.** Vazebné studie klonů 33, 68, 90, 118 z PGT121 knihovny a Myo wt. Byla testována vazba na bnAb PGT121 a dále na isotypovou kontrolu IgG  $\lambda$  a na samotný blokační roztok obsahující 1% BSA. Úsečky udávají směrodatnou odchylku ze dvou opakování.

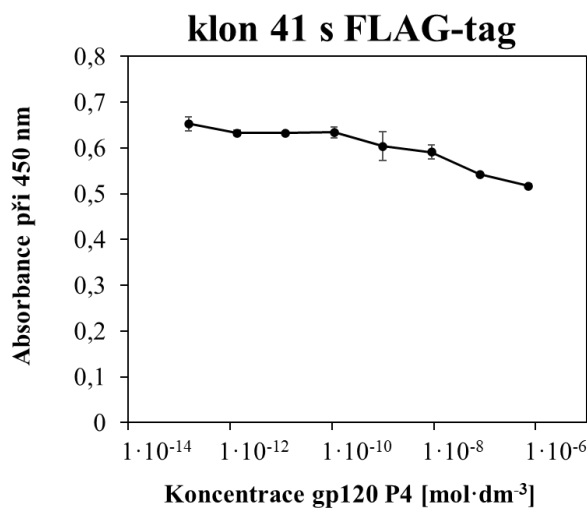
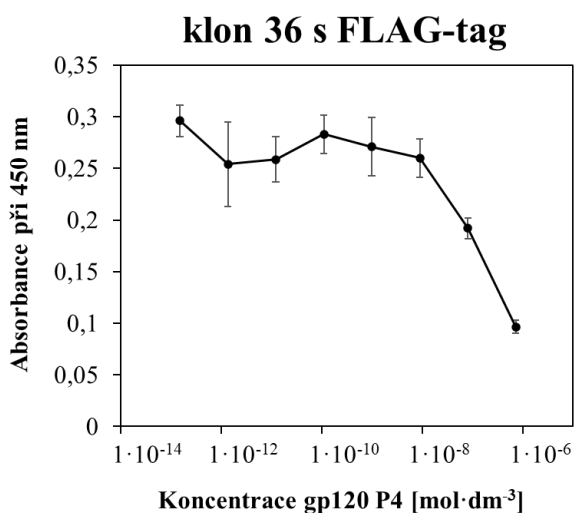
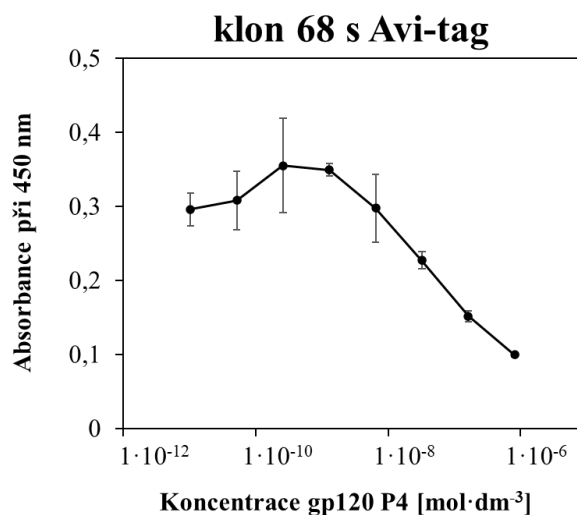
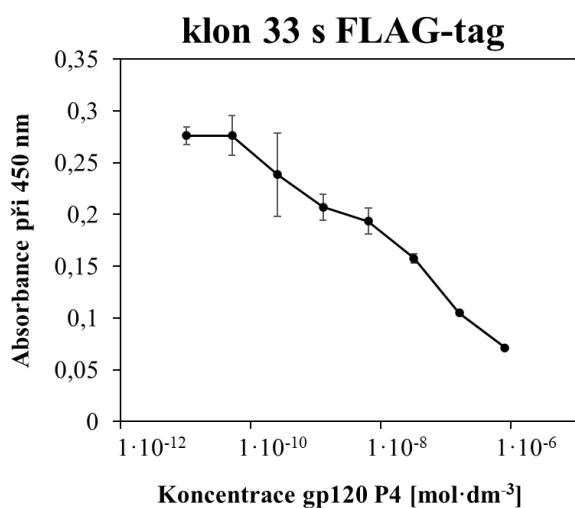


**Obr. 14.** Vazebné studie klonů 24, 30, 32, 36, 41, 49 z PGT126 knihovny a Myo wt (následující strana). Byla testována vazba na bnAb PGT126 a dále na isotypovou kontrolu IgG  $\lambda$  a na samotný blokační roztok obsahující 1% BSA. Úsečky udávají směrodatnou odchylku ze dvou opakování.

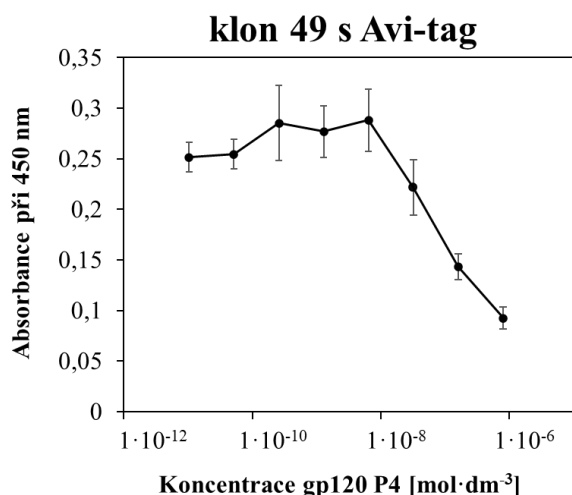




**Obr. 15.** Kompetiční studie variant Myomedinu 33 s FLAG-tag a 68 s Avi-tag z PGT121 knihovny a dále variant Myomedinu 36 s FLAG-tag, 41 s FLAG-tag a 49 s Avi-tag (následující strana) z PGT126 knihovny. Byla testována schopnost vazby vybraných variant na příslušnou bnAb (PGT121 či PGT126) v přítomnosti snižující se koncentrace glykoproteinu gp120 P4. Úsečky udávají směrodatnou odchylku ze dvou opakování.



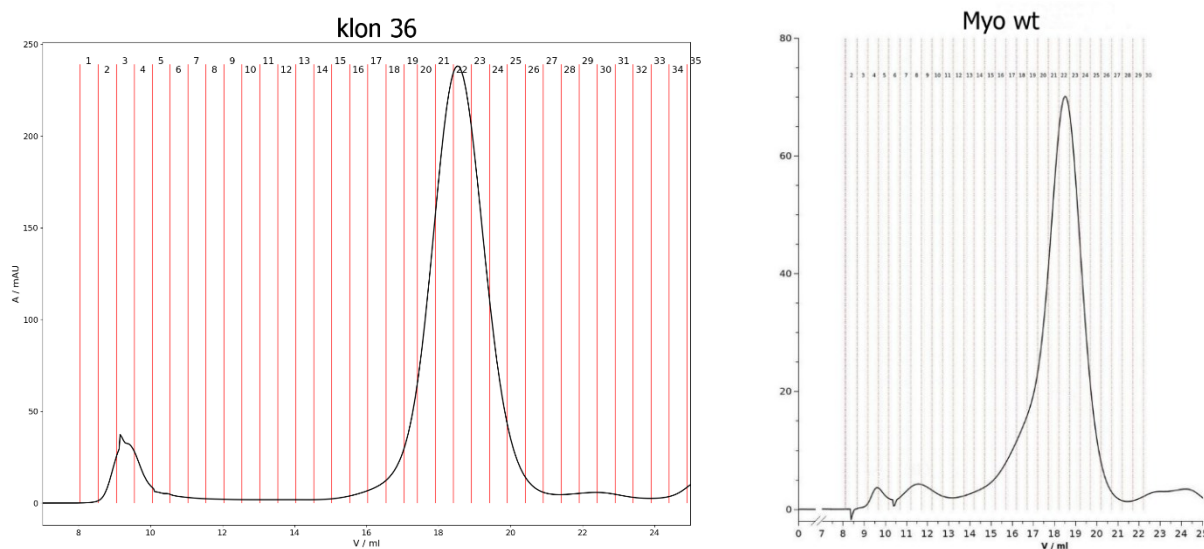




### Gelová permeační chromatografie

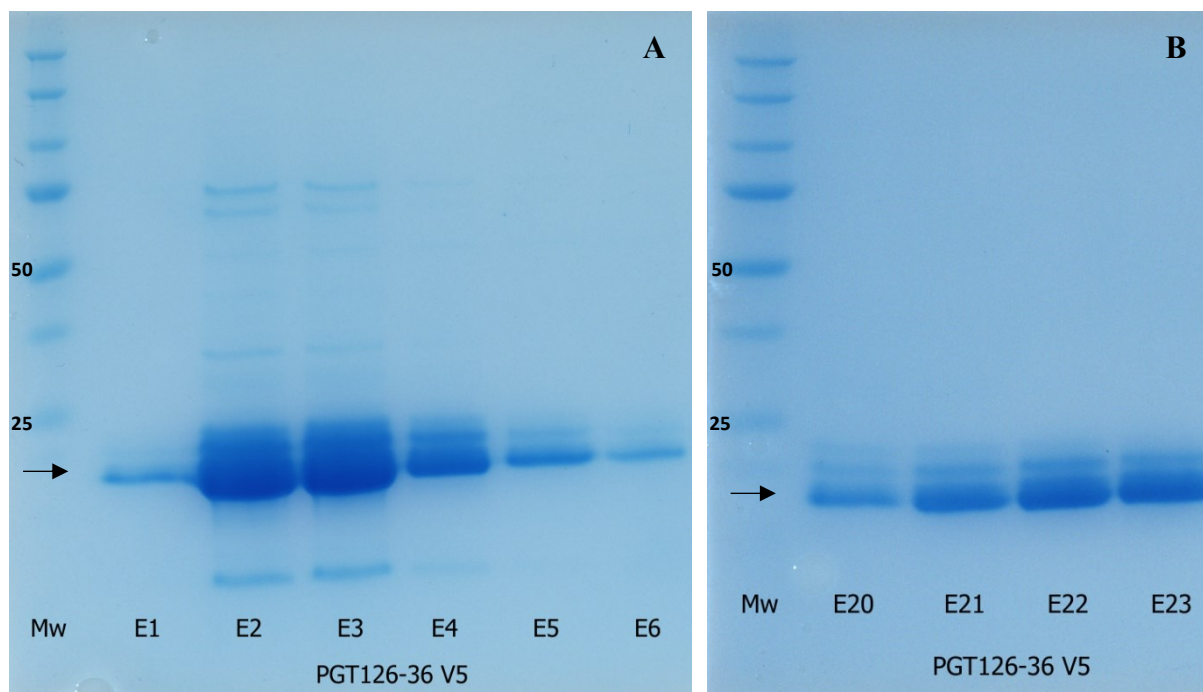
Před měřením teploty tání a před použitím DLS byly vybrané varianty Myomedinu získané proteinovou afinitní chromatografií analyzovány pomocí gelové permeační chromatografie. Ta sloužila k rozdělení proteinů dle jejich hydrodynamických poloměrů, a tak bylo možné oddělit kontaminující proteiny z bakterií, které se v určité míře vyskytují i v elucích po proteinové afinitní chromatografii, od monomerního Myomedinu. Příklad získaných výsledků je vidět na Obr. 16. Porovnání SDS-PAGE gelů před a po gelové permeační chromatografii je na Obr. 17.

**Obr. 16.** Výsledky gelové permeační chromatografie varianty Myomedinu z klonu 36 z PGT126 knihovny a Myomedinu wt. Na ose x je u obou grafů vynesena objem [ml] průtoku mobilní fáze (PBS). Na ose y je u obou grafů vynesena absorbance při 280 nm. Svislé čáry oddělují jednotlivé eluce. Menší pík/y v levé části grafu nebyly blíže určeny, avšak může se jednat o agregované proteiny nebo o multimerní formy Myomedinu. Hlavní pík mezi elucemi 19-24 představuje monomerní Myomedin.





**Obr. 17.** (A) Snímek SDS-PAGE gelu vzorku z klonu 36 z PGT126 knihovny po proteinové afinitní chromatografii; E1 – E6 = pořadí elucí. (B) Snímek SDS-PAGE gelu vzorku z klonu 36 z PGT126 knihovny po gelové permeační chromatografii; E20 – E23 = pořadí elucí. Jako žebříček (Mw) byl v obou případech užit Precision Plus Protein™ Standards, All blue, hodnoty pro 50 a 25 kDa jsou vyznačeny. Šipka na obou snímcích označuje Myomedin.

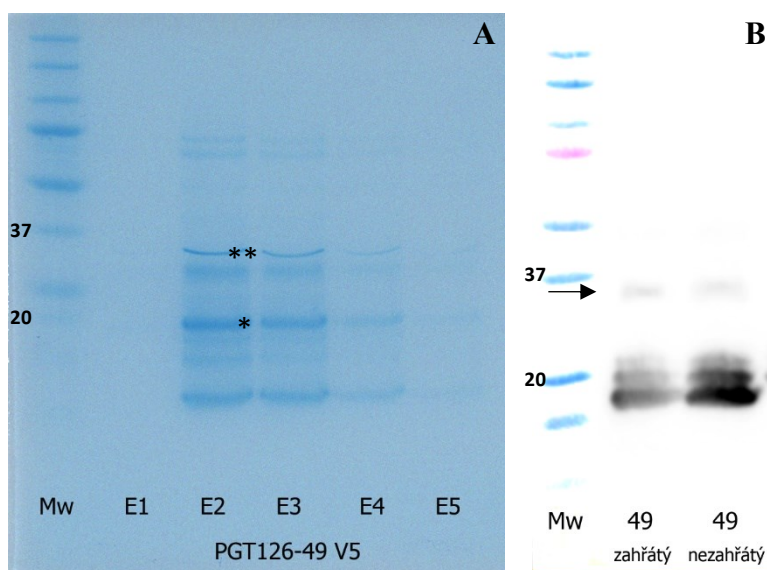


Výsledky předběžné analýzy klonu 49 s V5-tag z PGT126 knihovny (nejsou zde zobrazeny) naznačovaly, že by tato varianta Myomedinu mohla tvořit dimery. K této domněnce vedly také výsledky získané při SDS-PAGE frakci z gelové permeační chromatografie klonu 49, které zobrazovaly velmi slabé pruhy v oblasti molekulové hmotnosti potenciálního dimeru. Nezřetelnost pruhů byla dána velmi nízkými koncentracemi proteinu nanášenými na SDS-PAGE, neboť klon 49 se velice špatně produkoval a po gelové permeační chromatografii nebyl nikdy získán v dostatečném množství pro následné analýzy.

Pro ověření, zda klon 49 skutečně tvoří dimery, byly z SDS-PAGE gelu, který je vidět na Obr. 18(A), vyříznuty dva pruhy (jeden z oblasti odpovídající molekulovou hmotností monomeru a druhý představující domnělý dimer) a poslány na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Zároveň byl proveden Western blot se vzorkem 49 s V5-tag z proteinové afinitní chromatografie, jehož výsledek je na Obr. 18(B).

Výsledek Western blotu potvrdil, že varianta Myomedinu 49 s V5-tag z PGT126 knihovny se v malé míře vyskytuje také jako dimer. Rovněž stejný výsledek byl obdrženo z hmotností spektrometrie, kde bylo potvrzeno, že sekvence varianty 49 se ve vyříznutém pruhu z SDS-PAGE gelu nachází.

**Obr. 18.** (A) SDS-PAGE gel varianty Myomedinu 49 s V5-tag z PGT126 knihovny po proteinové afinitní chromatografii, ze kterého byly získány vzorky pro hmotností spektrometrii. Z gelu byly vyříznuty dva pruhy – monomerní Myomedin označený hvězdičkou a domnělý dimer Myomedinu označený dvěma hvězdičkami. Jako žebříček (Mw) byl použit Precision Plus Protein™ Standards, All blue, hodnoty pro 37 a 20 kDa jsou vyznačeny. (B) Zjištění přítomnosti domnělého dimeru varianty 49 s V5-tag pomocí Western blotu. Šipka označuje slabě viditelné pruhy dimeru varianty 49. Silnější pruhy představují monomerní Myomedin. Vzorek označen jako „zahřátý“ byl při přípravě vzorku na SDS-PAGE tepelně denaturován (jak je popsáno v kapitole Materiál a metody), zatímco u vzorku označeném jako „nezahřátý“ byl tento krok vynechán. Jako žebříček (Mw) byl použit Precision Plus Protein™ Standards, Dual color, hodnoty pro 37 a 20 kDa jsou vyznačeny.



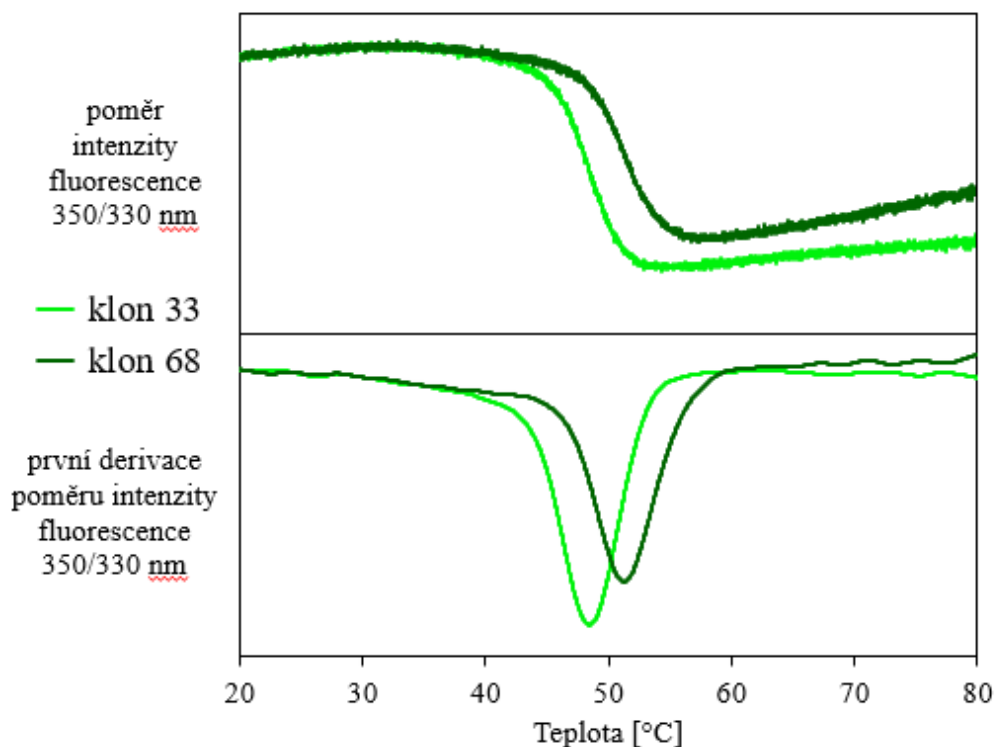
### Dynamický rozptyl světla (DLS)

Měření DLS bylo potvrzeno, že vzorky proteinů získané z gelové permeační chromatografie jsou čisté, bez kontaminace proteiny o vyšších či nižších hydrodynamických poloměrech než je Myomedin. Měřeny byly varianty Myomedinu 33 a 68 z PGT121 knihovny a varianty 36 a 41 z PGT126 knihovny.

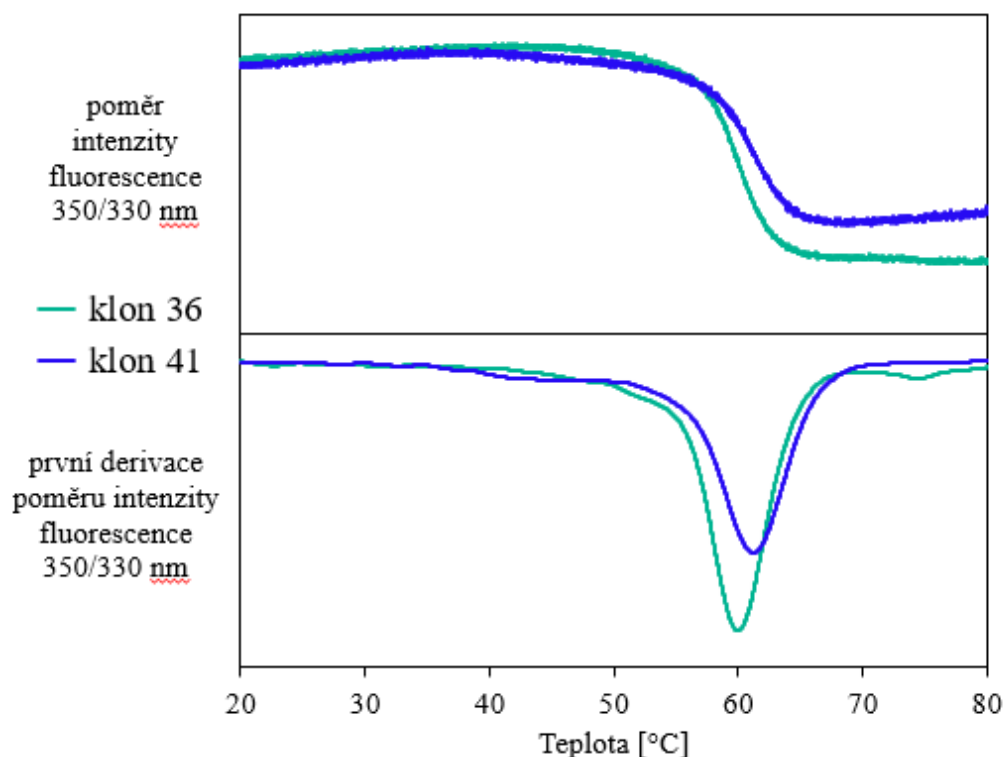
### Teplota tání

Teplota tání byla změřena pro varianty Myomedinu 33 a 68 z PGT121 knihovny a pro varianty 36 a 41 z PGT126 knihovny. Varianta 49 z PGT126 knihovny nebyla nikdy získána po gelové permeační chromatografii v takové koncentraci, která by byla potřebná pro měření DLS a teploty tání proteinu. Proto nebyla  $T_m$  u této varianty Myomedinu stanovena. Výsledky měření jsou zobrazeny na Obr. 19 a 20. Získané teploty tání jsou uvedeny v Tab. 6, kde je zároveň zahrnuta i teplota tání Myo wt.

**Obr. 19.** Průběh stanovení teploty tání variant Myomedinu z klonů 33 a 68 z PGT121 knihovny. Vrchní graf zobrazuje změnu intenzity fluorescence tryptofanů jako poměr hodnot naměřených pro vlnové délky 350 a 330 nm za zvyšující se teploty. Spodní graf zachycuje ty samé hodnoty po první derivaci.



**Obr. 20.** Průběh stanovení teploty tání variant Myomedinu z klonů 36 a 41 z PGT126 knihovny. Vrchní graf zobrazuje změnu intenzity fluorescence tryptofanů jako poměr hodnot naměřených pro vlnové délky 350 a 330 nm za zvyšující se teploty. Spodní graf zachycuje ty samé hodnoty po první derivaci.



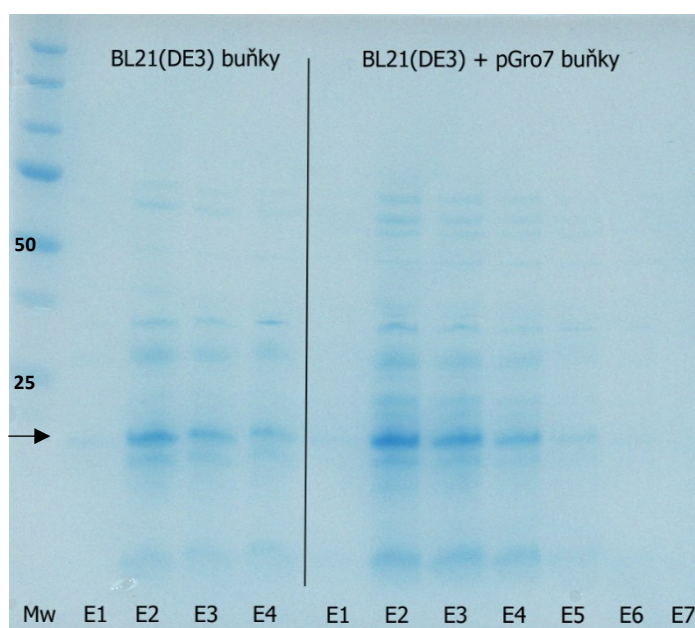
**Tab. 6.** Teploty tání jednotlivých variant Myomedinu.

Knihovna	Klon	teplota tání [°C]
PGT121	33	48,4
PGT121	68	51,3
PGT126	36	60,0
PGT126	41	61,1
	Myo wt	78,3

### Produkce varianty Myomedinu z klonu 49 v buňkách BL21(DE3) s pGro7

Ačkoliv měla varianta Myomedinu z klonu 49 z PGT126 knihovny velmi dobré výsledky ve vazebných i kompetičních studiích, bylo velmi obtížné ji naprodukovat v dostatečných koncentracích pro jakékoliv analýzy. Proto byly připraveny buňky BL21(DE3) nesoucí plasmid pGro7 s chaperonem a do nich byl vložen vektor kódující variantu 49 s V5-tag. Dále byla pěstována varianta Myomedinu 49 jak v původních BL21(DE3) buňkách, tak v nově připravených BL21(DE3) s pGro7 a výtěžky proteinu získaného při následné proteinové afinitních chromatografiích byly porovnány. První výsledky naznačují, že použitím BL21(DE3) buněk s pGro7 došlo ke zvýšení výtěžku proteinu, což je mírně patrné i na snímku SDS-PAGE gelu po proteinové afinitní chromatografii klonu 49 s V5-tag na Obr. 21. V přepočtu na 100 ml kultury byla varianta 49 s V5-tag z BL21(DE3) buněk získána v množství 0,02 mg proteinu, zatímco z BL21(DE3) buněk s pGro7 v množství 0,065 mg proteinu. Z časových důvodů bohužel nebylo možné otestovat, zda by došlo ke stejnému zvýšení výtěžku i při opakování experimentu, a rovněž nebylo možné zjistit vliv buněk BL21(DE3) s pGro7 na produkci ostatních variant Myomedinu.

**Obr. 21.** Snímek SDS-PAGE gelu, na kterém jsou porovnány eluce z proteinové afinitní chromatografie klonu 49 z buněk BL21(DE3) a buněk BL21(DE3) s pGro7. V obou případech byl protein izolován z pelet získaných ze stejného objemu kultury. Šipka označuje monomerní Myomedin. Jako žebříček (Mw) byl použit Precision Plus Protein™ Standards, All blue, hodnoty pro 50 a 25 kDa jsou vyznačeny.



## 7 Diskuse

Navzdory velkému úsilí mnoha vědeckých skupin stále nebyla připravena vysoce účinná vakcína, která by umožnila efektivní boj s celosvětovou epidemií viru HIV-1. Příliv nových poznatků o struktuře Env glykoproteinového komplexu a o jeho interakcích se široce neutralizujícími protilátkami však umožnil velký posun ve vývoji imunogenů, které by měly účinně stimulovat tvorbu ochranných, HIV-1 neutralizujících, protilátek. Vznikla řada nových přístupů, mezi které patří například: imunizace rekombinantními Env trimery typu SOSIP nebo UFO, imunizace N-koncovou částí fúzního peptidu s následnou stimulací rekombinantními trimery, sekvenční vakcinační strategie zahrnující vakcíny postavené na designovaných liniích Env komplexů („designed lineage vaccines“) a vakcíny odvozené z přirozených linií Env komplexů („natural lineage vaccines“) (Klasse et al. 2016; Saunders et al. 2017; Xu et al. 2018; Saunders et al. 2019). Ačkoliv se zmíněné postupy jeví nadějně, zatím dosáhly pouze dílčích úspěchů s indukcí tvorby neutralizačních protilátek v experimentálních zvířatech (Sanders a Moore 2017; Saunders et al. 2019). Nejlepších výsledků v tomto ohledu docílila práce, která jako imunogen využívala N-koncovou část fúzního peptidu připojenou k proteinovému nosiči (Xu et al. 2018).

Velkou nevýhodou všech výše zmíněných experimentálních přístupů je jejich závislost na struktuře Env glykoproteinového komplexu. Proto byla navržena nová, pro vývoj vakcín dosud nepoužitá, strategie obcházející nutnost použití Env glykoproteinů pro indukcii tvorby bnAbs. Tento unikátní přístup využívá malých vazebných proteinů, které jsou selektovány z vysoce komplexních kombinatoriálních knihoven a které díky tvarové komplementaritě ke struktuře variabilní oblasti imunoglobulinu mimikují epitopy široce neutralizujících protilátek. První takto identifikované vazebné proteiny cílené na paratop vysoce neutralizující protilátky VRC01 byly odvozeny od ABD „scaffoldu“ a v imunizovaných myších dokázaly vyvolat tvorbu bnAbs neutralizujících až osm z dvanácti pseudovirů úrovně 2 (Kosztyu et al. 2019). V následující práci byly selektovány malé vazebné proteiny interagující s protilátkou 10E8, které měly věrně napodobit její epitop v MPER oblasti (Kuchař et al. 2021). Za tímto účelem byl vyvinut nový „scaffoldový“ protein nazvaný Myomedin disponující řadou výhodných vlastností, mezi které patří například jeho značná stabilita, schopnost produkce v prokaryotních expresních systémech a jednoduchá struktura bez disulfidických můstků nevyžadující posttranslační modifikace. Dále je výhodou, že je odvozen od lidského proteinu a že strukturně připomíná imunoglobulinovou variabilní doménu s možností randomizace tří smyček. Výsledky studie ukázaly, že imunizace myši vybranými variantami Myomedinu vedly k produkci bnAbs, které dokázaly slabě nebo

středně neutralizovat až 54 % z testovaných pseudovirů úrovně 2 (Kuchař et al. 2021). Tato diplomová práce koncepčně navazuje na zmíněné předchozí studie a zaměřuje se na identifikaci Myomedinových variant schopných interagovat s bnAbs rozpoznávajícími „high mannose patch“ a V3-smyčku Env glykoproteinu. Cílem této práce bylo vyvinout nové nadějně proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek PGT121 a PGT126, které budou moci být využity pro imunizační experimenty na myších.

Selekci Myomedinových variant pomocí přímé sendvičové ELISA předcházela tři kola ribozomálního displeje se zpřísňujícími se podmínkami vazby, aby bylo docíleno dostatečného zúžení výběru variant vazebných proteinů vstupujících do „screeningu“. V tom bylo následně z PGT121 knihovny vybráno 14 slibných variant ze 147 testovaných, které byly nazvány Myomediny řady MLD. Z PGT126 knihovny bylo vybráno 10 slibných variant z 57 testovaných, které byly nazvány Myomediny řady MLB. Označení MLD pro varianty Myomedinu z PGT121 knihovny a MLB pro varianty z PGT126 knihovny je přejato z nově připravovaného článku a umožňuje snazší orientaci při pojmenování jednotlivých variant.

Je zajímavé, že ze 14 variant z PGT121 knihovny se žádné dvě neshodovaly svou sekvencí, zatímco z 10 variant vybraných z PGT126 knihovny se hned dvě a dvě svou sekvencí shodovaly. Tento nepoměr mezi množstvím testovaných variant v přímé sendvičové ELISA (147 vs. 57) mezi oběma knihovnami a vyšší redundance sekvencí pozorovaná v PGT126 knihovně naznačují, že při ribozomálním displeji namířeném proti PGT126 protilátce byly vhodněji zvoleny selekční podmínky a došlo ke značnému zúžení množství variant MLB Myomedinu, které vstupovaly do ELISA „screeningu“. Obdobný jev byl pozorován v práci Kuchaře a kol. z roku 2014, kde knihovna vazebných proteinů REX po ribozomálním displeji též vykazovala vyšší stupeň redundance a bylo tak snazší nalézt varianty vazebných proteinů s vysokou afinitou k terčové molekule (Kuchař et al. 2014).

Při porovnání aminokyselin ve variabilních smyčkách MLD proteinů z PGT121 knihovny je patrné, že dané pozice jsou značně variabilní, co se zastoupení jednotlivých aminokyselin týče, a není možné nalézt nějaký obecný vzor, který by dané proteiny sjednocoval. Pouze varianty Myomedinu MLD033 a MLD118 mají shodné aminokyseliny v druhé variabilní smyčce (Gln<sub>50</sub>-Gly-Glu<sub>52</sub>). Zajímavostí je, že varianta Myomedinu MLD090 má na pozici 24 cystein, ačkoliv kodon pro cystein byl vyloučen při syntéze DNA sekvence pro randomizované pozice ve variabilních smyčkách, a tudíž musel vzniknout až náhodnou mutací v některém z PCR kroků přípravy a selekce knihovny. Naopak při porovnání aminokyselin ve variabilních smyčkách MLB proteinů z PGT126 knihovny je možné pozorovat některé opakující se motivy hned mezi několika proteiny. Varianty Myomedinu MLB024 a MLB030 spolu sdílejí shodné

aminokyseliny v první i druhé variabilní smyčce (Gln<sub>21</sub>-Tyr-Glu-Ala<sub>24</sub>; Trp<sub>50</sub>-Leu-Trp<sub>52</sub>), ale liší se sekvencí ve třetí variabilní smyčce. Zároveň varianta Myomedinu MLB049 s nimi též sdílí shodnou sekvenci aminokyselin ve druhé variabilní smyčce (Trp<sub>50</sub>-Leu-Trp<sub>52</sub>). Varianty MLB z klonů 30, 41 a 49 spolu sdílejí sekvenci aminokyselin Ile<sub>76</sub>-Val-Thr-Pro-Leu<sub>80</sub> ve třetí variabilní smyčce. Celkem tedy dvě ze šesti variant Myomedinu MLB nesou shodné aminokyseliny v první variabilní smyčce (klony 24 a 30), hned tři ze šesti variant vazebného proteinu nesou shodné aminokyseliny ve druhé variabilní smyčce (klony 24, 30 a 49) a tři ze šesti variant mají shodné aminokyseliny ve třetí variabilní smyčce (klony 30, 41 a 49). Shody aminokyselin na jednotlivých pozicích variabilních smyček mohou poukazovat na obdobný způsob interakce těchto variant Myomedinu s protilátkou PGT126. Naopak varianty Myomedinu MLD z PGT121 knihovny budou pravděpodobně interagovat s protilátkou PGT121 v rozdílných orientacích a budou zřejmě využívat odlišné pozice variabilních smyček pro napodobení jejího epitopu. Pro bližší charakterizaci interakčního rozhraní mezi vybranými variantami Myomedinu a danými protilátkami by bylo třeba využít přístupů molekulárního modelování a dokovat slibné varianty Myomedinu do struktury Env glykoproteinu v komplexu s protilátkou. Bohužel, pro protilátku PGT121 není vyřešena její struktura v komplexu s gp120 či Env trimerem, a pro protilátku PGT126 není dokonce známa ani její samotná krystalová struktura. Nicméně v případě protilátky PGT121 je známa alespoň struktura časného prekursoru linie rodiny protilátek PGT121 s Env komplexem, ze které lze odvodit, které oblasti paratopu jsou klíčové pro interakci s epitopem (Garces et al. 2015). Protilátky z rodiny PGT121 nesou dvě interakční rozhraní s Env glykoproteinem. První rozhraní je označováno jako „elongated face“ a tvoří jej CDRL1, CDRL3 a částečně CDRH3, které zajišťují kontakt s GDIR sekvencí gp120 a s glykanem na pozici N332 (Garces et al. 2015). Druhá oblast se nazývá „open face“ a je tvořena CDRH1, CDRH2 a CDRH3, které interagují s glykanem na pozici N137 (Garces et al. 2015). Myomediny z PGT121 knihovny budou muset napodobit obě zmíněná interakční rozhraní, aby mohly úspěšně mimikovat epitop protilátky PGT121 a indukovat tvorbu bnAbs. Pokud by PGT126 interagovala se svým epitopem obdobně, jako protilátka PGT128, bylo by možné na základě vyřešené struktury komplexu PGT128 s gp120 předpovědět tři interakční rozhraní mezi protilátkami rodiny PGT128 a jejich vazebným místem (Pejchal et al. 2011). Rozhraní pro interakci s glykanem na pozici N332 zprostředkovávají CDRL3, CDRH2, CDRH3 a FR2 (framework region; ohraničující region). Pro interakci s glykanem na pozici N301 jsou klíčové aminokyseliny v CDRH2 a FR3 a pro interakci s C-koncovou oblastí V3 smyčky CDRH3 (Pejchal et al. 2011). Myomedinové varianty MLB z PGT126 knihovny by pravděpodobně mohly mimikovat tato tři zmíněná rozhraní, která jsou důležitá pro vazbu



bnAbs z rodiny protilátek PGT125-PGT128, strukturně i funkčně reprezentovaných protilátkou PGT128. Přesnou odpověď znát nebudeme, dokud nebude vyřešena struktura protilátky PGT126 v komplexu s Env glykoproteinem. Je však možné vytvořit homologní model PGT128/PGT126 a zkoumat dokováním a dynamickou simulací nejpravděpodobnější interakční módy. Výsledky takové *in silico* analýzy interakcí MLB a MLD proteinů budou představeny v připravované publikaci (Veronika Daniel Lišková et al., rukopis v přípravě). Každopádně schopnost Myomedinových „scaffoldů“ úspěšně mimikovat epitopy bnAbs již byla dokázána pro varianty Myomedinů z 10E8 knihovny v práci Kuchaře a kol., kde bylo molekulárním modelováním ukázáno, že většina vybraných variant věrně napodobila interakční rozhraní mezi protilátkou a MPER oblastí (Kuchař et al. 2021).

Ve vazebných studiích byla testována afinita a specifita vazby vybraných variant Myomedinu k cílovým protilátkám. Proteiny byly izolovány pomocí proteinové afinitní chromatografie a nanášeny v ředící řadě pro analýzu pomocí přímé sendvičové ELISA. Z devíti testovaných variant Myomedinu z PGT121 knihovny měly průkaznou afinitu k protilátce PGT121 jen čtyři z nich. Varianty MLD033 a MLD118 dosáhly nejlepších výsledků a vázaly protilátku PGT121 s průkaznou afinitou i při nízkých koncentracích, nicméně ani při nejvyšší nanášené koncentraci nedosáhly vrchního maxima signálu. Rovněž Myomedin MLD068 vázal protilátku PGT121 s průkaznou afinitou. MLD090 dosáhl pouze suboptimálního výsledku, avšak to může být dáno velkým rozdílem mezi naměřenými hodnotami v jednotlivých opakováních a výsledná průměrná hodnota zanesená v grafu má tak značnou směrodatnou odchylku. Proto není možné objektivně zhodnotit výsledek vazebné studie varianty z klonu 90. Myo wt se na protilátku PGT121 vázal, avšak jen při nejvyšších měřených koncentracích. Ze šesti testovaných variant Myomedinu z PGT126 knihovny měly průkaznou afinitu k protilátce PGT126 všechny varianty. Ačkoliv jsou výsledky těchto variant Myomedinu poměrně srovnatelné, asi nejlepšího výsledku dosáhl klon 49, který vázal protilátku PGT126 i při velmi nízkých koncentracích (okolo  $10^{-8}$  M). Myo wt se na protilátku PGT126 téměř nevázal.

Z výsledků vazebných studií je patrné, že mnohé z testovaných variant Myomedinu výrazně interagovaly také s izotypovou kontrolou IgG  $\lambda$ , což by implikovalo, že jejich vazba na bnAb je nespecifická. Nicméně některé výsledky naznačují, že signál naměřený pro izotypovou kontrolu IgG  $\lambda$  by mohly způsobovat špatně složené proteiny, které nezískaly svou stabilní terciální strukturu a mohou tak nespecificky interagovat s ostatními proteiny svým odhaleným hydrofobním jádrem. Pak by mohlo docházet k pozorovanému signálu pro nespecifickou interakci při zvyšující se koncentraci nanášených proteinů. Čím větší frakce dané varianty Myomedinu je špatně složená, tím více je pozorována nespecifická interakce s IgG  $\lambda$ , a naopak



frakce obsahující proteiny se správnou terciální strukturou zajišťuje pozorovanou specifitu vazby na PGT121/126. Ten samý jev byl pozorován také u Myomedinů z 10E8 knihovny, kde i ty nejlepší varianty indukující tvorbu bnAbs rovněž vázaly izotypovou kontrolu IgG  $\lambda$  (Kuchař et al. 2021). V doplňujících materiálech (Supplementary materials) ke zmíněné práci jsou prezentovány výsledky vazebných studií, kde ty samé varianty Myomedinu, které původně silně interagovaly s IgG  $\lambda$ , mají nově značně sníženou vazbu na izotypovou kontrolu. Pro tyto dodatečné vazebné studie byly použity stejné varianty Myomedinu, které byly popsány v článku, avšak tentokrát byly exprimovány v bakteriích *E. coli* BL21(DE3) nesoucích plasmid pGro7. Tento plasmid kóduje chaperon groES-groEL, který napomáhá zaujetí správné konformace rekombinantních proteinů a může tak zvýšit jejich rozpustnost a produkci v expresním systému *E. coli*. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost chaperonu snížila množství špatně složených proteinů, což se následně projevilo snížením nespecifické vazby na IgG  $\lambda$ . Bohužel, v diplomové práci nebylo možné vazebné studie s proteiny exprimovanými v bakteriích BL21(DE3) s pGro7 zopakovat, aby mohlo být ověřeno, zda by i v tomto případě došlo ke snížení vazby na izotypovou kontrolu. Bylo však zjištěno, že exprese Myomedinu v bakteriích BL21(DE3) nesoucích plasmid pGro7 může vést ke zvýšení výtěžku proteinu, jak bylo pozorováno u varianty MLB049. Tato varianta Myomedinu se vždy obtížně produkovala, avšak při využití expresního systému *E. coli* BL21(DE3) s pGro7 došlo k navýšení výtěžku tohoto proteinu ze 100 ml kultury.

Schopnost vybraných variant Myomedinu soutěžit s Env glykoproteiny o vazbu na bnAb byla testována pomocí kompetičních studií. V těch byla nanášena snižující se koncentrace Env trimerů gp120 P4 společně se stálou koncentrací jednotlivých variant Myomedinu a detekovala se schopnost mimotopů vytěsnit Env trimery z jejich vazebného místa na protilátce. Varianty Myomedinu MLB036 a MLB049 úspěšně kompetovaly s Env trimery o vazbu na PGT126 a rovněž Myomediny MLD033 a MLD068 prokázaly schopnost soutěžit s Env trimery o vazbu na PGT121, ačkoliv varianta MLD033 nebyla tolik úspěšná v tomto ohledu jako ostatní varianty Myomedinu. Schopnost zmíněných variant Myomedinu kompetovat o vazbu na cílovou protilátku naznačuje sdílení stejného vazebného motivu těchto proteinů s Env trimery. Díky tomu lze předpokládat, že tyto varianty Myomedinu prezentují vazebný povrch velmi podobný tomu, jaký je rozpoznáván příslušnou protilátkou na povrchu Env trimerů. Odlišný výsledek kompetiční studie byl obdržen v případě varianty Myomedinu MLB041, jehož vazba na PGT126 téměř nebyla omezena přítomností Env trimerů. Tento výsledek je možné vysvětlit existencí dvou odlišných vazebných míst varianty MLB041, díky kterým může tento protein interagovat s protilátkou ve dvou různých vazebných módech. Primární vazebné místo

mimikuje interakční rozhraní Env glykoproteinů s protilátkou a dokáže kompetovat s Env trimery, pokud jsou přítomny v nižší koncentraci. Při vyšších koncentracích Env trimerů dochází k vytěsnění varianty MLB041 z jejího primárního vazebného místa a v tom případě interaguje s protilátkou PGT126 v jiné orientaci pomocí sekundárního vazebného místa, které není bráněno navázaným Env trimerem. To, že varianta Myomedinu MLB041 dokáže mimikovat vazebný povrch protilátky PGT126, bylo následně potvrzeno při imunizacích myši danou variantou, kde předběžné výsledky ukazují, že séra z myši imunizovaných touto variantou Myomedinu úspěšně neutralizovala část testovaných pseudovirů. Přítomnost alternativního vazebného místa tedy zřejmě neovlivnila schopnost mimotopu indukovat tvorbu bnAbs (Veronika Daniel Lišková et al., rukopis v přípravě).

Předběžná analýza varianty MLB049 pomocí gelové permeační chromatografie naznačovala, že by tato varianta Myomedinu mohla tvořit dimery, což bylo v souladu s výsledky získanými při následné analýze frakcí z gelové permeační chromatografie na SDS-PAGE, kde byly detekovatelné velmi slabé pruhy v oblasti molekulové hmotnosti potenciálního dimeru (nezřetelnost pruhů byla dána velmi nízkými koncentracemi proteinu získanými po gelové permeační chromatografii). Proto byly zpětně z SDS-PAGE gelu po proteinové afinitní chromatografii toho samého vzorku z klonu 49 vyříznuty oblasti odpovídající monomeru a domnělému dimeru a jejich složení bylo určeno pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky z hmotnostní spektrometrie potvrdily, že v oblasti molekulové hmotnosti dimeru se skutečně nachází sekvence Myomedinu MLB049, což souhlasí s výsledky získanými pomocí Western blotu. Bohužel však není jasné, jakým způsobem dimer MLB049 může vznikat. V sekvenci tohoto proteinu nejsou přítomny cysteiny, aby mohl vznikat kovalentně spojený dimer, na druhou stranu, tento dimer je detekovatelný na SDS-PAGE za denaturačních podmínek a nemělo by se tedy jednat o nekovalentní interakci. Dimer byl detekovatelný pomocí Western blotu, ať už byly vzorky před nanášením na SDS-PAGE gel zahřáty po dobu 10 minut na 95 °C, nebo zahřáty nebyly. Pro zjištění mechanismu, kterým dimer MLB049 vzniká, by bylo třeba dalších experimentů, které však již byly nad rámec diplomové práce. Je možné, že i některé další varianty Myomedinu by mohly tvořit dimery, neboť při analýzách grafů z gelové permeační chromatografie je u některých vzorků patrná asymetričnost píku pro monomerní Myomedin s vychýlením do větších hydrodynamických poloměrů, které by odpovídaly domnělým dimerům. Navíc, některé varianty Myomedinu by teoreticky mohly tvořit tetramery, soudě dle zatím nepublikovaných výsledků.

Pro varianty Myomedinu MLD033 a MLD068 z PGT121 knihovny a MLB036 a MLB041 z PGT126 knihovny byly stanoveny teploty tání. Byla snaha zjistit teplotu tání také pro slibnou

variantu MLB049, avšak ta nebyla nikdy získána v dostatečné koncentraci pro tento experiment. Varianty Myomedinu MLB z PGT126 knihovny se ukázaly jako teplotně stabilnější, neboť vypočtená hodnota bodu tání ( $T_m$ ) byla stanovena pro variantu MLB036 na 60,0 °C a MLB041 na 61,1 °C, zatímco hodnota  $T_m$  pro variantu MLD068 byla stanovena na 51,3 °C a MLD33 pouze na 48,4 °C. Modifikované proteiny si tedy nezachovaly původní vysokou termální stabilitu rodičovské nemutované verze Myomedinu (Myo wt), jejíž  $T_m$  dosahovala hodnot téměř 80 °C. V práci Kuchaře a kol. z roku 2021 bohužel nejsou stanoveny  $T_m$  pro varianty Myomedinu z 10E8 knihovny, a tudíž není možné získané teploty tání proteinů porovnat s jinými variantami Myomedinu. Lze pouze srovnat teploty tání Myo wt, pro který byla ve zmíněné práci zjištěna  $T_m$  72 °C. Pozorovaný rozdíl v naměřených teplotách tání může být dán využitím odlišných metod pro stanovení  $T_m$  a také přítomností V5-tag na Myo wt použitým v této diplomové práci, který Myo wt analyzovaný v předchozí studii postrádal. Problém s nižšími teplotami tání u variant Myomedinu MLD z PGT121 knihovny by mohl být vyřešen následnou optimalizací jejich termostability *in silico* molekulárním designem nebo opětovnou aplikací metod řízené evoluce, kde budou pro identifikaci stabilnějších variant využity přísnější selekční podmínky (Gebauer a Skerra 2020).

Pro imunizace myši byly vybrány následující varianty Myomedinu: MLB klony 24, 30, 32, 36, 41 a 49 z PGT126 knihovny a MLD klony 33 a 68 z PGT121 knihovny. Dle předběžných výsledků imunizačních experimentů na myších bylo zjištěno, že varianty MLB024, MLB030 a MLB032 nedokázaly indukovat tvorbu bnAbs, a proto nebyly blíže biochemicky a biofyzikálně charakterizovány, na rozdíl od variant MLB036, MLB041 a MLB049, které prokázaly schopnost indukovat tvorbu bnAbs v séru imunizovaných myši (Veronika Daniel Lišková et al., rukopis v přípravě).

Malé vazebné proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek představují nový a nadějný přístup pro vývoj potenciální vakcíny proti viru HIV-1. Jednoduchost malých vazebných proteinů umožňuje imunitnímu systému soustředit se pouze na prezentovaný epitop, kterému nekonkurují ostatní potenciální epitopy na povrchu Env trimeru. Složení a přítomnost glykanů na jednotlivých pozicích gp120 a gp41 je proměnlivé mezi různými variantami viru HIV-1, což znesnadňuje vývoj univerzálního Env glykoproteinového komplexu pro prezentaci epitopů bnAbs, které vyžadují přítomnost určitých glykanů na konkrétních pozicích (Seabright et al. 2019). Složení glykanů může být navíc ovlivněno i použitou buněčnou linií pro produkci rekombinantních Env trimerů (Struwe et al. 2018; Seabright et al. 2019). Vzhledem k tomu je využití mimotopů pro prezentaci epitopů v oblasti V3 smyčky ideální, neboť mají potenciál věrně napodobit jak proteinovou, tak glykanovou složku vazebného místa a zajistit konstantní

prezentaci cílových epitopů. Samozřejmě z toho však plynou i jisté nevýhody. Je možné očekávat, že pokud budou pro imunizace myší využity varianty Myomedinu mimikující epitopy bnAbs cílících na V3 smyčku a okolní glykany, budou takto indukované bnAbs v séru myší účinně neutralizovat pouze ty varianty pseudovirů, které nesou příslušné glykany na svém povrchu. Varianty viru s pozmeněným vazebným místem nebudou těmito protilátkami rozpoznávány a neutralizovány. Proto je vhodné uvažovat o možnosti kombinace více variant mimotopů pro rozšíření neutralizačního potenciálu produkovaných protilátek.

Jak bylo ukázáno při klinických zkouškách NCT02568215 a NCT02716675 testujících vliv opakované pasivní imunizace protilátkou VRC01 na prevenci infekce virem HIV-1, bude třeba zapojit kombinaci více bnAbs cílících na různé oblasti Env trimeru, aby mohlo být dosaženo efektivní ochrany před infekcí virem HIV-1 (Corey et al. 2021). Mimotopy jsou v tomto ohledu užitečný nástroj, neboť při využití kombinace hned několika malých vazebných proteinů mimikujících epitopy různých bnAbs může být docíleno produkce širšího spektra ochranných neutralizujících protilátek. Výhodou tohoto konceptu je jistá modulárnost takovéto vakcíny, která může být modifikována dle potřeby pro vakcinaci v různých oblastech světa, neboť lze ovlivnit, které bnAbs budou produkovány a vybrat takové, které jsou účinné proti variantám viru vyskytujícím se v dané oblasti světa. Nutnost dosáhnout produkce širšího spektra bnAbs ukazují i některé imunizační experimenty na makacích, kdy pouze pasivní imunizace kombinací bnAbs dokázala zvířata ochránit před infekcí více variantami SHIV (Julg et al. 2017). Rovněž testování speciálně designovaných trispecifických široce neutralizujících protilátek prokázalo, že kombinace bnAbs dokáže účinněji ochránit experimentální zvířata před smíšenou infekcí SHIV (Xu et al. 2017). Proto bude vhodné do budoucna provést imunizační experimenty na myších s kombinací nejlepších doposud popsaných mimotopů, kde by se testovalo, zda dojde k rozšíření neutralizačního potenciálu produkovaných protilátek. Jednalo by se o směs malých vazebných proteinů složenou z: VRA177 (produkce bnAbs proti CD4 vazebnému místu), MLA092 nebo MLA132 či MLA158 (produkce bnAbs proti MPER oblasti) a nakonec varianty Myomedinu z PGT121 nebo PGT126 knihovny, která bude mít největší potenciál stimulovat tvorbu bnAbs proti epitopu V3 smyčky (Kosztyu et al. 2019; Kuchař et al. 2021). Současná produkce široce neutralizujících protilátek rozpoznávajících tři různé neutralizační cíle (CD4 vazebné místo, MPER a V3 smyčku) by zamezila ztrátě vakcinační účinnosti z důvodu vzniku únikových variant viru.

Rovněž bude do budoucna třeba otestovat nové přístupy, jak dosáhnout produkce vyšších titrů protilátek v séru imunizovaných myší, protože titry protilátek u myší imunizovaných variantami Myomedinu z 10E8 knihovny byly poměrně nízké (Kuchař et al. 2021). To samé

ostatně naznačují i předběžné výsledky pro imunizační experimenty s Myomediny z PGT121 a PGT126 knihovny. Jako možné řešení se jeví změna použitého adjuvant, avšak to by vyřešilo problém pouze částečně. Pro stimulaci imunitní reakce je velmi důležitá správná prezentace antigenů, a proto by bylo ideální připojit mimotopy na vhodně zvolený nosič. Může se jednat o nanočástice složené z molekul ferritinu, o nanoliposomy s připojenými proteiny na svém povrchu nebo lze užít připojení mimotopů na biopolymery. Přístup využívající prezentace virových antigenů na povrchu nanočástic složených z 24 monomerů ferritinu se ukázal jako účinný pro stimulaci imunitní odpovědi proti hemaglutininu viru chřipky (Kanekiyo et al. 2013). V této studii bylo dosaženo vyšších titrů protilátek u experimentálních zvířat imunizovaných antigenem připojeným na nanočásticích oproti zvířatům imunizovaným komerčně dostupnou vakcínou (Kanekiyo et al. 2013). V práci Ingale a kol. vedlo využití nanoliposomů pro prezentaci Env trimerů k vyšší aktivaci B-lymfocytů, než bylo pozorováno pro solubilní Env trimery (Ingale et al. 2016). Pro připojení antigenů na liposomy byly využity modifikované lipidy, které ve své polární části chelatují nikelnaté ionty, přes které lze připojit libovolný protein nesoucí His-tag (Ingale et al. 2016). Malé vazebné proteiny mohou být připojeny také na různé polymery, přičemž dříve běžně užívaný PEG (polyethylenglykol) dnes častěji nahrazují nové biopolymery, jako je například hydrofilní nenabíý polypeptid PAS tvořený aminokyselinami prolinem, alaninem a serinem (Schlapschy et al. 2013). Další možností, jak prezentovat mimotopy imunitnímu systému, je například spojení dvou molekul vazebného proteinu flexibilním linkerem, popřípadě vytvoření bispecifických vazebných proteinů spojením dvou odlišných mimotopů.

Do budoucna by bylo možné využít malé vazebné proteiny také pro vývoj vakcín postavených na designovaných liniích („designed lineage vaccines“), neboť je teoreticky možné připravit takové varianty mimotopů, které budou interagovat s B-lymfocyty nesoucími prekurzory bnAbs a stimulovat jejich vývoj. Zároveň, proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek se ukázaly jako nadějná strategie pro vývoj potenciální vakcíny proti viru HIV-1, a proto je možné uvažovat o přenesení tohoto konceptu pro přípravu vakcín i proti jiným patogenům.

## 8 Závěr

Cíle stanovené v úvodu diplomové práce se podařilo splnit a kolekce proteinů mimikujících epitopy široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1 byla rozšířena o nové varianty mimotopů, které věrně napodobují oblast V3 smyčky Env glykoproteinového komplexu.

Pomocí přímé sendvičové ELISA byly identifikovány varianty Myomedinu, které specificky a s průkaznou afinitou vázaly protilátky PGT121 a PGT126. U vytipovaných variant byla následně zjištěna sekvence DNA. Pro další analýzy byly vybrány varianty Myomedinu nesoucí unikátní sekvenci aminokyselin ve svých variabilních smyčkách. Takto bylo nalezeno 12 variant z PGT121 knihovny a 6 variant z PGT126 knihovny.

Zvolené varianty Myomedinu byly dále biochemicky, biofyzikálně a funkčně charakterizovány, což zahrnovalo především provedení vazebných a kompetičních studií a stanovení teploty tání vybraných proteinů. V kompetičních studiích byla testována schopnost vybraných variant Myomedinu soutěžit s trimery gp120 o vazbu na protilátku a prokázat tak, že tyto proteiny sdílejí shodné vazebné místo. To bylo dokázáno pro čtyři z pěti analyzovaných variant a pro zbylou variantu byla interakce prokázána nepřímou. Teploty tání proteinů byly stanoveny pro čtyři z pěti slibných variant Myomedinu.

Na základě provedených experimentů byly vybrány dvě varianty Myomedinu z PGT121 knihovny pro imunizace myši (MLD033 a MLD068). Z PGT126 knihovny bylo vybráno šest variant Myomedinu pro imunizace myši, ze kterých hned tři varianty (MLB036, MLB041 a MLB049) prokázaly schopnost indukovat tvorbu bnAbs v séru imunizovaných myši (Veronika Daniel Lišková et al., rukopis v přípravě).

Kromě cílů vytyčených na začátku práce byly navíc získány i některé další poznatky. Především bylo ukázáno, že pro produkci Myomedinových „scaffoldů“ bude třeba optimalizovat expresní systém *E. coli* přidáním chaperonů, které zvýší produkci a správné složení proteinů. Dále byla prokázána tvorba dimeru u jedné z analyzovaných variant (MLB049), což bude třeba do budoucna ověřit i v případě ostatních Myomedinových variant.

V závěru práce byly navrženy další možné směry výzkumu, kterými by bylo vhodné se do budoucna zabývat.

## 9 Seznam použité literatury

**Affram Y.**, Zapata J.C., Gholizadeh Z., Tolbert W.D., Zhou W., Iglesias-Ussel M.D., Pazgier M., Ray K., Latinovic O.S., Romerio F. (2019) The HIV-1 Antisense Protein ASP Is a Transmembrane Protein of the Cell Surface and an Integral Protein of the Viral Envelope. *Journal of Virology*, 93(21):e00574-19.

**Aldovini A.**, Young R.A. (1990) Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *Journal of Virology*, 64(5):1920-6.

**Anderson J.A.**, Teufel R.J. 2nd, Yin P.D., Hu W.S. (1997) Correlated template-switching events during minus-strand DNA synthesis: a mechanism for high negative interference during retroviral recombination. *Journal of Virology*, 72(2):1186-94.

**Andrabi R.**, Voss J.E., Liang C.H., Briney B., McCoy L.E., Wu C.Y., Wong C.H., Poignard P., Burton D.R. (2015) Identification of Common Features in Prototype Broadly Neutralizing Antibodies to HIV Envelope V2 Apex to Facilitate Vaccine Design. *Immunity*, 43(5):959-73.

**Asante-Appiah E.**, Skalka A.M. (1997) Molecular mechanisms in retrovirus DNA integration. *Antiviral Research*, 36(3):139-56.

**Askjaer P.**, Jensen T.H., Nilsson J., Englmeier L., Kjems J. (1998) The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50):33414-22.

**Barouch D.H.**, Tomaka F.L., Wegmann F., Stieh D.J., Alter G., Robb M.L., Michael N.L., Peter L., Nkolola J.P., Borducchi E.N., Chandrashekar A., Jetton D., Stephenson K.E., Li W., Korber B., Tomaras G.D., Montefiori D.C., Gray G., Frahm N., McElrath M.J., Baden L., Johnson J., Hutter J., Swann E., Karita E., Kibuuka H., Mpendo J., Garrett N., Mngadi K., Chinyenze K., Priddy F., Lazarus E., Laher F., Nitayapan S., Pitisuttithum P., Bart S., Campbell T., Feldman R., Lucksinger G., Borremans C., Callewaert K., Roten R., Sadoff J., Scheppeler L., Weijtens M., Feddes-de Boer K., van Manen D., Vreugdenhil J., Zahn R., Lavreys L., Nijs S., Tolboom J., Hendriks J., Euler Z., Pau M.G., Schuitemaker H. (2018) Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial and in rhesus monkeys. *Lancet*, 392(10143):232-243.

**Behrens A.J.**, Vasiljevic S., Pritchard L.K., Harvey D.J., Andev R.S., Krumm S.A., Struwe W.B., Cupo A., Kumar A., Zitzmann N., Seabright G.E., Kramer H.B., Spencer D.I., Royle L., Lee J.H., Klasse P.J., Burton D.R., Wilson I.A., Ward A.B., Sanders R.W., Moore J.P., Doores K.J., Crispin M. (2016) Composition and Antigenic Effects of Individual Glycan Sites of a Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein. *Cell Reports*, 14(11):2695-706.

**Beloukas A.**, Psarris A., Giannelou P., Kostaki E., Hatzakis A., Paraskevis D. (2016) Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infection, Genetics and Evolution*, 46:180-189.

**Bhiman J.N.**, Anthony C., Doria-Rose N.A., Karimanzira O., Schramm C.A., Khoza T., Kitchin D., Botha G., Gorman J., Garrett N.J., Abdool Karim S.S., Shapiro L., Williamson C., Kwong P.D., Mascola J.R., Morris L., Moore P.L. (2015) Viral variants that initiate and drive

maturation of V1V2-directed HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Nature Medicine*, 21(11):1332-6.

**Blattner C.**, Lee J.H., Sliепен K., Derking R., Falkowska E., de la Peña A.T., Cupo A., Julien J.P., van Gils M., Lee P.S., Peng W., Paulson J.C., Poignard P., Burton D.R., Moore J.P., Sanders R.W., Wilson I.A., Ward A.B. (2014) Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 Env trimers. *Immunity*, 40(5):669-80.

**Borducchi E.N.**, Liu J., Nkolola J.P., Cadena A.M., Yu W.H., Fischinger S., Broge T., Abbink P., Mercado N.B., Chandrashekar A., Jetton D., Peter L., McMahan K., Moseley E.T., Bekerman E., Hesselgesser J., Li W., Lewis M.G., Alter G., Geleziunas R., Barouch D.H. (2018) Antibody and TLR7 agonist delay viral rebound in SHIV-infected monkeys. *Nature*, 563(7731):360-364.

**Briney B.S.**, Willis J.R., Crowe J.E. Jr. (2012) Human peripheral blood antibodies with long HCDR3s are established primarily at original recombination using a limited subset of germline genes. *PLoS One*, 7(5):e36750.

**Buchbinder S.P.**, Mehrotra D.V., Duerr A., Fitzgerald D.W., Mogg R., Li D., Gilbert P.B., Lama J.R., Marmor M., Del Rio C., McElrath M.J., Casimiro D.R., Gottesdiener K.M., Chodakewitz J.A., Corey L., Robertson M.N.; Step Study Protocol Team. (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*, 372(9653):1881-1893.

**Cai M.**, Zheng R., Caffrey M., Craigie R., Clore G.M., Gronenborn A.M. (1997) Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4(7):567-77.

**Campbell E.M.**, Hope T.J. (2015) HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8):471-83.

**Cao L.**, Pauthner M., Andrabi R., Rantalainen K., Berndsen Z., Diedrich J.K., Menis S., Sok D., Bastidas R., Park S.R., Delahunty C.M., He L., Guenaga J., Wyatt R.T., Schief W.R., Ward A.B., Yates J.R. 3rd, Burton D.R., Paulson J.C. (2018) Differential processing of HIV envelope glycans on the virus and soluble recombinant trimer. *Nature Communications*, 9(1):3693.

**Cassan E.**, Arigon-Chifolleau A.M., Mesnard J.M., Gross A., Gascuel O. (2016) Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 113(41):11537-11542.

**Cimarelli A.**, Sandin S., Höglund S., Luban J. (2000) Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *Journal of Virology*, 74(7):3046-57.

**Clapham P.R.**, McKnight A. (2001) HIV-1 receptors and cell tropism. *British Medical Bulletin*, 58:43-59.

**Cohen M.S.**, Chen Y.Q., McCauley M., Gamble T., Hosseinipour M.C., Kumarasamy N., Hakim J.G., Kumwenda J., Grinsztejn B., Pilotto J.H., Godbole S.V., Mehendale S., Chariyalertsak S., Santos B.R., Mayer K.H., Hoffman I.F., Eshleman S.H., Piwowar-Manning E., Wang L., Makhema J., Mills L.A., de Bruyn G., Sanne I., Eron J., Gallant J., Havlir D., Swindells S., Ribaud H., Elharrar V., Burns D., Taha T.E., Nielsen-Saines K., Celentano D.,



Essex M., Fleming T.R.; HPTN 052 Study Team. (2011) Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *The New England Journal of Medicine*, 365(6):493-505.

**Cohn L.B.**, Silva I.T., Oliveira T.Y., Rosales R.A., Parrish E.H., Learn G.H., Hahn B.H., Czartoski J.L., McElrath M.J., Lehmann C., Klein F., Caskey M., Walker B.D., Siliciano J.D., Siliciano R.F., Jankovic M., Nussenzweig M.C. (2015) HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*, 160(3):420-32.

**Corey L.**, Gilbert P.B., Juraska M., Montefiori D.C., Morris L., Karuna S.T., Edupuganti S., Mgodi N.M., deCamp A.C., Rudnicki E., Huang Y., Gonzales P., Cabello R., Orrell C., Lama J.R., Laher F., Lazarus E.M., Sanchez J., Frank I., Hinojosa J., Sobieszczyk M.E., Marshall K.E., Mukwekwerere P.G., Makhema J., Baden L.R., Mullins J.I., Williamson C., Hural J., McElrath M.J., Bentley C., Takuva S., Gomez Lorenzo M.M., Burns D.N., Espy N., Randhawa A.K., Kochar N., Piwowar-Manning E., Donnell D.J., Sista N., Andrew P., Kublin J.G., Gray G., Ledgerwood J.E., Mascola J.R., Cohen M.S.; HVTN 704/HPTN 085 and HVTN 703/HPTN 081 Study Teams. (2021) Two Randomized Trials of Neutralizing Antibodies to Prevent HIV-1 Acquisition. *The New England Journal of Medicine*, 384(11):1003-1014.

**Curlin M.E.**, Zioni R., Hawes S.E., Liu Y., Deng W., Gottlieb G.S., Zhu T., Mullins J.I. (2010) HIV-1 envelope subregion length variation during disease progression. *PLoS Pathogens*, 6(12):e1001228.

**Daly T.J.**, Cook K.S., Gray G.S., Maione T.E., Rusche J.R. (1989) Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature*, 342(6251):816-9.

**Daniels C.N.**, Saunders K.O. (2019) Antibody responses to the HIV-1 envelope high mannose patch. *Advances in Immunology*, 143:11-73.

**D'arca M.**, Ayoubaa A., Estebana A., Learn G.H., Bouéa V., Liegeois F., Etienne L., Tagge N., Leendertz F.H., Boeschg Ch., Madindaf N.F., Robbins M.M., Grayi M., Cournila A., Oomsj M., Letkoj M., Simonj V.A., Sharp P.M., Hahn B.H., Delaporte E., Ngolen E.M., Peeters M. (2015) Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 112(11): E1343-52.

**Dev J.**, Park D., Fu Q., Chen J., Ha H.J., Ghantous F., Herrmann T., Chang W., Liu Z., Frey G., Seaman M.S., Chen B., Chou J.J. (2016) Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike. *Science*, 353(6295):172-175.

**Dubois N.**, Khoo K.K., Ghossein S., Seissler T., Wolff P., McKinstry W.J., Mak J., Paillart J.C., Marquet R., Bernacchi S. (2018) The C-terminal p6 domain of the HIV-1 Pr55<sup>Gag</sup> precursor is required for specific binding to the genomic RNA. *RNA Biology*, 15(7):923-936.

**Escolano A.**, Gristick H.B., Abernathy M.E., Merckenschlager J., Gautam R., Oliveira T.Y., Pai J., West A.P. Jr., Barnes C.O., Cohen A.A., Wang H., Golijanin J., Yost D., Keeffe J.R., Wang Z., Zhao P., Yao K.H., Bauer J., Nogueira L., Gao H., Voll A.V., Montefiori D.C., Seaman M.S., Gazumyan A., Silva M., McGuire A.T., Stamatatos L., Irvine D.J., Wells L., Martin M.A., Bjorkman P.J., Nussenzweig M.C. (2019) Immunization expands B cells specific to HIV-1 V3 glycan in mice and macaques. *Nature*, 570(7762):468-473.

**Finzi A.**, Xiang S.H., Pacheco B., Wang L., Haight J., Kassa A., Danek B., Pancera M., Kwong P.D., Sodroski J. (2010) Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Molecular Cell*, 37(5):656-67.

- Fisher R.D.**, Chung H.Y., Zhai Q., Robinson H., Sundquist W.I., Hill C.P. (2007) Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*, 128(5):841-52.
- Flynn N.M.**, Forthal D.N., Harro C.D., Judson F.N., Mayer K.H., Para M.F.; rgp120 HIV Vaccine Study Group. (2005) Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(5):654-65.
- Freed E.O.**, Myers D.J., Risser R. (1990) Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(12):4650-4.
- Fu Q.**, Shaik M.M., Cai Y., Ghantous F., Piai A., Peng H., Rits-Volloch S., Liu Z., Harrison S.C., Seaman M.S., Chen B., Chou J.J. (2018) Structure of the membrane proximal external region of HIV-1 envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115(38):E8892-E8899.
- Ganser-Pornillos B.K.**, Cheng A., Yeager M. (2007) Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell*, 131(1):70-9.
- Garces F.**, Lee J.H., de Val N., de la Pena A.T., Kong L., Puchades C., Hua Y., Stanfield R.L., Burton D.R., Moore J.P., Sanders R.W., Ward A.B., Wilson I.A. (2015) Affinity Maturation of a Potent Family of HIV Antibodies Is Primarily Focused on Accommodating or Avoiding Glycans. *Immunity*, 43(6):1053-63.
- Garces F.**, Sok D., Kong L., McBride R., Kim H.J., Saye-Francisco K.F., Julien J.P., Hua Y., Cupo A., Moore J.P., Paulson J.C., Ward A.B., Burton D.R., Wilson I.A. (2014) Structural evolution of glycan recognition by a family of potent HIV antibodies. *Cell*, 159(1):69-79.
- Garrus J.E.**, von Schwedler U.K., Pornillos O.W., Morham S.G., Zavitz K.H., Wang H.E., Wettstein D.A., Stray K.M., Côté M., Rich R.L., Myszka D.G., Sundquist W.I. (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 107(1):55-65.
- Gautam R.**, Nishimura Y., Pegu A., Nason M.C., Klein F., Gazumyan A., Golijanin J., Buckler-White A., Sadjadpour R., Wang K., Mankoff Z., Schmidt S.D., Lifson J.D., Mascola J.R., Nussenzweig M.C., Martin M.A. (2016) A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature*, 533(7601):105-109.
- Gaynor R.** (1992) Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS*, 6(4):347-63.
- Gebauer M.**, Skerra A. (2020) Engineered Protein Scaffolds as Next-Generation Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60:391-415.
- Gholizadeh Z.**, Iqbal M.S., Li R., Romerio F. (2021) The HIV-1 Antisense Gene ASP: The New Kid on the Block. *Vaccines*, 9(5):513.
- Gilbert P.**, Wang M., Wrin T., Petropoulos C., Gurwith M., Sinangil F., D'Souza P., Rodriguez-Chavez I.R., DeCamp A., Giganti M., Berman P.W., Self S.G., Montefiori D.C. (2010) Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4):595-605.
- Giovanetti M.**, Ciccozzi M., Parolin C., Borsetti A. (2020) Molecular Epidemiology of HIV-1 in African Countries: A Comprehensive Overview. *Pathogens*, 9(12):1072.

**Gray G.E.**, Allen M., Moodie Z., Churchyard G., Bekker L.G., Nchabeleng M., Mlisana K., Metch B., de Bruyn G., Latka M.H., Roux S., Mathebula M., Naicker N., Ducar C., Carter D.K., Puren A., Eaton N., McElrath M.J., Robertson M., Corey L., Kublin J.G.; HVTN 503/Phambili study team. (2011) Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(7):507-15.

**Haffar O.K.**, Dowbenko D.J., Berman P.W. (1988) Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *Journal of Cell Biology*, 107(5):1677-87.

**Haffar O.K.**, Popov S., Dubrovsky L., Agostini I., Tang H., Pushkarsky T., Nadler S.G., Bukrinsky M. (2000) Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Journal of Molecular Biology*, 299(2):359-68.

**Hallenberger S.**, Bosch V., Angliker H., Shaw E., Klenk H.D., Garten W. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*, 360(6402):358-61.

**Hammer S.M.**, Sobieszczyk M.E., Janes H., Karuna S.T., Mulligan M.J., Grove D., Koblin B.A., Buchbinder S.P., Keefer M.C., Tomaras G.D., Frahm N., Hural J., Anude C., Graham B.S., Enama M.E., Adams E., DeJesus E., Novak R.M., Frank I., Bentley C., Ramirez S., Fu R., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Montefiori D.C., Kublin J., McElrath M.J., Corey L., Gilbert P.B.; HVTN 505 Study Team. (2013) Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 369(22):2083-92.

**Hargittai M.R.S.**, Gorelick R.J., Rouzina I., Musier-Forsyth K. (2004) Mechanistic insights into the kinetics of HIV-1 nucleocapsid protein-facilitated tRNA annealing to the primer binding site. *Journal of Molecular Biology*, 337(4):951-68.

**Haynes B.F.**, Fleming J., St Clair E.W., Katinger H., Stiegler G., Kunert R., Robinson J., Searce R.M., Plonk K., Staats H.F., Ortel T.L., Liao H.X., Alam S.M. (2005) Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*, 308(5730):1906-8.

**Hemelaar J.**, Elangovan R., Yun J., Dickson-Tetteh L., Fleminger I., Kirtley S., Williams B., Gouws-Williams E., Ghys P.D. (2019) Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 19(2):143-155.

**Hiryak K.**, Koren D.E. (2021) Fostemsavir: A Novel Attachment Inhibitor for Patients With Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *Annals of Pharmacotherapy*, 55(6):792-797.

**Hrecka K.**, Gierszewska M., Srivastava S., Kozaczekiewicz L., Swanson S.K., Florens L., Washburn M.P., Skowronski J. (2007) Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104(28):11778-83.

**Hu W.S.**, Temin H.M. (1990) Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(4):1556-60.

- Hua C.K.**, Ackerman M.E. (2016) Engineering broadly neutralizing antibodies for HIV prevention and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 103:157-173.
- Huang J.**, Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., Alam S.M., Wang T., Yang Y., Zhang B., Migueles S.A., Wyatt R., Haynes B.F., Kwong P.D., Mascola J.R., Connors M. (2012) Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*, 491(7424):406-12.
- Hurst S.A.**, Appelgren K.E., Kourtis A.P. (2015) Prevention of mother-to-child transmission of HIV type 1: the role of neonatal and infant prophylaxis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(2):169-81.
- Checkley M.A.**, Lutge B.G., Freed E.O. (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of Molecular Biology*, 410(4):582-608.
- Chen J.C.**, Krucinski J., Miercke L.J., Finer-Moore J.S., Tang A.H., Leavitt A.D., Stroud R.M. (2000) Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(15):8233-8.
- Chen Z.**, Telfier P., Gettie A., Reed P., Zhang L., Ho D.D., Marx P.A. (1996) Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *Journal of Virology*, 70(6): 3617–3627.
- Cherrington J.**, Ganem D. (1992) Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *EMBO Journal*, 11(4):1513-24.
- Ingale J.**, Stano A., Guenaga J., Sharma S.K., Nemazee D., Zwick M.B., Wyatt R.T. (2016) High-Density Array of Well-Ordered HIV-1 Spikes on Synthetic Liposomal Nanoparticles Efficiently Activate B Cells. *Cell Reports*, 15(9):1986-99.
- Jacobo-Molina A.**, Ding J., Nanni R.G., Clark A.D. Jr., Lu X., Tantillo C., Williams R.L., Kamer G., Ferris A.L., Clark P., Hizi A., Hughes S.H., Arnold E. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90(13):6320-4.
- Jäger S.**, Kim D.Y., Hultquist J.F., Shindo K., LaRue R.S., Kwon E., Li M., Anderson B.D., Yen L., Stanley D., Mahon C., Kane J., Franks-Skiba K., Cimermanic P., Burlingame A., Sali A., Craik C.S., Harris R.S., Gross J.D., Krogan N.J. (2011) Vif hijacks CBF- $\beta$  to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature*, 481(7381):371-5.
- Jensen M.A.**, Li F.S., van 't Wout A.B., Nickle D.C., Shriner D., He H.X., McLaughlin S., Shankarappa R., Margolick J.B., Mullins J.I. (2003) Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *Journal of Virology*, 77(24):13376-88.
- Jiang M.**, Mak J., Ladha A., Cohen E., Klein M., Rovinski B., Kleiman L. (1993) Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 67(6):3246-53.

- Jordan C.A.**, Watkins B.A., Kufta C., Dubois-Dalcq M. (1991) Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *Journal of Virology*, 65(2):736-42.
- Julg B.**, Liu P.T., Wagh K., Fischer W.M., Abbink P., Mercado N.B., Whitney J.B., Nkolola J.P., McMahan K., Tartaglia L.J., Borducchi E.N., Khatiwada S., Kamath M., LeSuer J.A., Seaman M.S., Schmidt S.D., Mascola J.R., Burton D.R., Korber B.T., Barouch D.H. (2017) Protection against a mixed SHIV challenge by a broadly neutralizing antibody cocktail. *Science Translational Medicine*, 9(408):eaao4235.
- Julien J.P.**, Sok D., Khayat R., Lee J.H., Doores K.J., Walker L.M., Ramos A., Diwanji D.C., Pejchal R., Cupo A., Katpally U., Depetris R.S., Stanfield R.L., McBride R., Marozsan A.J., Paulson J.C., Sanders R.W., Moore J.P., Burton D.R., Poignard P., Ward A.B., Wilson I.A. (2013) Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathogens*, 9(5):e1003342.
- Kaminchik J.**, Bashan N., Itach A., Sarver N., Gorecki M., Panet A. (1991) Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene products translated in vitro and expressed in mammalian cells. *Journal of Virology*, 65(2):583-8.
- Kanekiyo M.**, Wei C.J., Yassine H.M., McTamney P.M., Boyington J.C., Whittle J.R., Rao S.S., Kong W.P., Wang L., Nabel G.J. (2013) Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, 499(7456):102-6.
- Kang C.Y.**, Nara P., Chamat S., Caralli V., Chen A., Nguyen M.L., Yoshiyama H., Morrow W.J., Ho D.D., Köhler H. (1992) Anti-idiotypic monoclonal antibody elicits broadly neutralizing anti-gp120 antibodies in monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(7):2546-50.
- Keele B.F.**, Van Heuverswyn F., Li Y., Bailes E., Takehisa J., Santiago M.L., Bibollet-Ruche F., Chen Y., Wain L.V., Liegeois F., Loul S., Ngole E.M., Bienvenue Y., Delaporte E., Brookfield J.F.Y., Sharp P.M., Shaw G.M., Peeters M., Hahn B.H. (2006) Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786): 523–526.
- King S.R.**, Duggal N.K., Ndongmo C.B., Pacut C., Telesnitsky A. (2008) Pseudodiploid genome organization AIDS full-length human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis. *Journal of Virology*, 82(5):2376-84.
- Klasse P.J.** (2019) Non-cognate ligands of Procrustean paratopes as potential vaccine components. *EBioMedicine*, 47:6-7.
- Klasse P.J.**, LaBranche C.C., Ketas T.J., Ozorowski G., Cupo A., Pugach P., Ringe R.P., Golabek M., van Gils M.J., Guttman M., Lee K.K., Wilson I.A., Butera S.T., Ward A.B., Montefiori D.C., Sanders R.W., Moore J.P. (2016) Sequential and Simultaneous Immunization of Rabbits with HIV-1 Envelope Glycoprotein SOSIP.664 Trimers from Clades A, B and C. *PLoS Pathogens*, 12(9):e1005864.
- Klein F.**, Diskin R., Scheid J.F., Gaebler C., Mouquet H., Georgiev I.S., Pancera M., Zhou T., Incesu R.B., Fu B.Z., Gnanapragasam P.N., Oliveira T.Y., Seaman M.S., Kwong P.D., Bjorkman P.J., Nussenzweig M.C. (2013) Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell*, 153(1):126-38.

- Kohl N.E.**, Emini E.A., Schleif W.A., Davis L.J., Heimbach J.C., Dixon R.A., Scolnick E.M., Sigal I.S. (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85(13):4686-90.
- Kong L.**, He L., de Val N., Vora N., Morris C.D., Azadnia P., Sok D., Zhou B., Burton D.R., Ward A.B., Wilson I.A., Zhu J. (2016) Uncleaved prefusion-optimized gp140 trimers derived from analysis of HIV-1 envelope metastability. *Nature Communications*, 7:12040.
- Koszytu P.**, Kuchar M., Cerny J., Barkocziava L., Maly M., Petrokova H., Czernekova L., Liskova V., Raskova Kafkova L., Knotigova P., Masek J., Turanek J., Maly P., Raska M. (2019) Proteins mimicking epitope of HIV-1 virus neutralizing antibody induce virus-neutralizing sera in mice. *EBioMedicine*, 47:247-256.
- Kourtis A.P.**, Bulterys M. (2010) Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways. *Clinics in Perinatology*, 37(4):721-37, vii.
- Kudoh A.**, Takahama S., Sawasaki T., Ode H., Yokoyama M., Okayama A., Ishikawa A., Miyakawa K., Matsunaga S., Kimura H., Sugiura W., Sato H., Hirano H., Ohno S., Yamamoto N., Ryo A. (2014) The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*, 11:9.
- Kueck T.**, Foster T.L., Weinelt J., Sumner J.C., Pickering S., Neil S.J. (2015) Serine Phosphorylation of HIV-1 Vpu and Its Binding to Tetherin Regulates Interaction with Clathrin Adaptors. *PLoS Pathogens*, 11(8):e1005141.
- Kuchař M.**, Koszytu P., Daniel Lišková V., Černý J., Petroková H., Vróblová E., Malý M., Vaňková L., Křupka M., Rašková Kafková L., Turánek Knotigová P., Dušková J., Dohnálek J., Mašek J., Turánek J., Raška M., Malý P. (2021) Myomedin scaffold variants targeted to 10E8 HIV-1 broadly neutralizing antibody mimic gp41 epitope and elicit HIV-1 virus-neutralizing sera in mice. *Virulence*. 12(1):1271-1287.
- Kuchař M.**, Vaňková L., Petroková H., Cerný J., Osička R., Pelák O., Sípová H., Schneider B., Homola J., Sebo P., Kalina T., Malý P. (2014) Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent ex vivo expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins*, 82(6):975-89.
- Kwong P.D.**, Wyatt R., Robinson J., Sweet R.W., Sodroski J., Hendrickson W.A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686):648-59.
- Laughrea M.**, Jetté L., Mak J., Kleiman L., Liang C., Wainberg M.A. (1997) Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *Journal of Virology*, 71(5):3397-406.
- Le Gall S.**, Erdtmann L., Benichou S., Berlioz-Torrent C., Liu L., Benarous R., Heard J.M., Schwartz O. (1998) Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity*, 8(4):483-95.
- Leonard C.K.**, Spellman M.W., Riddle L., Harris R.J., Thomas J.N., Gregory T.J. (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18):10373-82.

- Li Y., Luo L., Thomas D.Y., Kang C.Y. (2000)** The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology*, 272(2):417-28.
- Lipovsek D., Plückthun A. (2004)** In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *Journal of Immunological Methods*, 290(1-2):51-67.
- Liu Y., Cao W., Sun M., Li T. (2020)** Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1):194-206.
- Lu Y.L., Bennett R.P., Wills J.W., Gorelick R., Ratner L. (1995)** A leucine triplet repeat sequence (LXX)<sub>4</sub> in p6<sub>gag</sub> is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology*, 69(11):6873-9.
- Lynch R.M., Boritz E., Coates E.E., DeZure A., Madden P., Costner P., Enama M.E., Plummer S., Holman L., Hendel C.S., Gordon I., Casazza J., Conan-Cibotti M., Migueles S.A., Tressler R., Bailer R.T., McDermott A., Narpala S., O'Dell S., Wolf G., Lifson J.D., Freemire B.A., Gorelick R.J., Pandey J.P., Mohan S., Chomont N., Fromentin R., Chun T.W., Fauci A.S., Schwartz R.M., Koup R.A., Douek D.C., Hu Z., Capparelli E., Graham B.S., Mascola J.R., Ledgerwood J.E.; VRC 601 Study Team. (2015)** Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Science Translational Medicine*, 7(319):319ra206.
- MacDougall T.H., Shattock R.J., Madsen C., Chain B.M., Katz D.R. (2002)** Regulation of primary HIV-1 isolate replication in dendritic cells. *Clinical & Experimental Immunology* 127(1):66-71.
- Magadán J.G., Pérez-Victoria F.J., Sougrat R., Ye Y., Strebel K., Bonifacino J.S. (2010)** Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. *PLoS Pathogens*, 6(4):e1000869.
- Malim M.H., Tiley L.S., McCarn D.F., Rusche J.R., Hauber J., Cullen B.R. (1990)** HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell*, 60(4):675-83.
- Mancarella A., Procopio F.A., Achsel T., De Crignis E., Foley B.T., Corradin G., Bagni C., Pantaleo G., Graziosi C. (2019)** Detection of antisense protein (ASP) RNA transcripts in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Journal of General Virology*, 100(5):863-876.
- Mansky L.M., Preveral S., Selig L., Benarous R., Benichou S. (2000)** The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *Journal of Virology*, 74(15):7039-47.
- Marassi F.M., Ma C., Gratkowski H., Straus S.K., Strebel K., Oblatt-Montal M., Montal M., Opella S.J. (1999)** Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(25):14336-41.
- McCoy L.E., Burton D.R. (2017)** Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunological Reviews*, 275(1):11-20.
- Mendoza P., Gruell H., Nogueira L., Pai J.A., Butler A.L., Millard K., Lehmann C., Suárez I., Oliveira T.Y., Lorenzi J.C.C., Cohen Y.Z., Wyen C., Kümmerle T., Karagounis T., Lu C.L., Handl L., Unson-O'Brien C., Patel R., Ruping C., Schlotz M., Witmer-Pack M., Shimeliovich**

I., Kremer G., Thomas E., Seaton K.E., Horowitz J., West A.P. Jr., Bjorkman P.J., Tomaras G.D., Gulick R.M., Pfeifer N., Fätkenheuer G., Seaman M.S., Klein F., Caskey M., Nussenzweig M.C. (2018) Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature*, 561(7724):479-484.

**Mitchell R.S.**, Beitzel B.F., Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C.C., Ecker J.R., Bushman F.D. (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biology*, 2(8):E234.

**Miyatake H.**, Sanjoh A., Murakami T., Murakami H., Matsuda G., Hagiwara K., Yokoyama M., Sato H., Miyamoto Y., Dohmae N., Aida Y. (2016) Molecular Mechanism of HIV-1 Vpr for Binding to Importin- $\alpha$ . *Journal of Molecular Biology*, 428(13):2744-57.

**Moldt B.**, Rakasz E.G., Schultz N., Chan-Hui P.Y., Swiderek K., Weisgrau K.L., Piaskowski S.M., Bergman Z., Watkins D.I., Pognard P., Burton D.R. (2012) Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(46):18921-5.

**Moore J.P.**, McKeating J.A., Weiss R.A., Sattentau Q.J. (1990) Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science*, 250(4984):1139-42.

**Morellet N.**, de Rocquigny H., Mély Y., Jullian N., Déméné H., Ottmann M., Gérard D., Darlix J.L., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P. (1994) Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by 1H NMR. *Journal of Molecular Biology*, 235(1):287-301.

**Murin C.D.**, Julien J.P., Sok D., Stanfield R.L., Khayat R., Cupo A., Moore J.P., Burton D.R., Wilson I.A., Ward A.B. (2014) Structure of 2G12 Fab2 in complex with soluble and fully glycosylated HIV-1 Env by negative-stain single-particle electron microscopy. *Journal of Virology*, 88(17):10177-88.

**Murphy R.E.**, Saad J.S. (2020) The Interplay between HIV-1 Gag Binding to the Plasma Membrane and Env Incorporation. *Viruses*, 12(5):548.

**Murphy R.E.**, Samal A.B., Vlach J., Saad J.S. (2017) Solution Structure and Membrane Interaction of the Cytoplasmic Tail of HIV-1 gp41 Protein. *Structure*, 25(11):1708-1718.e5.

**Navia M.A.**, Fitzgerald P.M., McKeever B.M., Leu C.T., Heimbach J.C., Herber W.K., Sigal I.S., Darke P.L., Springer J.P. (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*, 337(6208):615-20.

**Ohno H.**, Aguilar R.C., Fournier M.C., Hennecke S., Cosson P., Bonifacino J.S. (1997) Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology*, 238(2):305-15.

**Oliva R.**, Leone M., Falcigno L., D'Auria G., Dettin M., Scarinci C., Di Bello C., Paolillo L. (2002) Structural investigation of the HIV-1 envelope glycoprotein gp160 cleavage site. *Chemistry*, 8(6):1467-73.

**Olshevsky U.**, Helseth E., Furman C., Li J., Haseltine W., Sodroski J. (1990) Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *Journal of Virology*, 64(12):5701-7.



- O'Neil P.K.**, Sun G., Yu H., Ron Y., Dougherty J.P., Preston B.D. (2002) Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41):38053-61.
- Oster A.M.**, Switzer W.M., Hernandez A.L., Saduvala N., Wertheim J.O., Nwangwu-Ike N., Ocfemia M.C., Campbell E., Hall H.I. (2017) Increasing HIV-1 subtype diversity in seven states, United States, 2006-2013. *Annals of Epidemiology*, 27(4):244-251.e1.
- Ozorowski G.**, Pallesen J., de Val N., Lyumkis D., Cottrell C.A., Torres J.L., Capps J., Stanfield R.L., Cupo A., Pugach P., Moore J.P., Wilson I.A., Ward A.B. (2017) Open and closed structures reveal allostery and pliability in the HIV-1 envelope spike. *Nature*, 547(7663):360-363.
- Pan R.**, Gorny M.K., Zolla-Pazner S., Kong X.P. (2015) The V1V2 Region of HIV-1 gp120 Forms a Five-Stranded Beta Barrel. *Journal of Virology*, 89(15):8003-10.
- Pancera M.**, Zhou T., Druz A., Georgiev I.S., Soto C., Gorman J., Huang J., Acharya P., Chuang G.Y., Ofek G., Stewart-Jones G.B., Stuckey J., Bailer R.T., Joyce M.G., Louder M.K., Tumba N., Yang Y., Zhang B., Cohen M.S., Haynes B.F., Mascola J.R., Morris L., Munro J.B., Blanchard S.C., Mothes W., Connors M., Kwong P.D. (2014) Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature*, 514(7523):455-61.
- Pegu A.**, Yang Z.Y., Boyington J.C., Wu L., Ko S.Y., Schmidt S.D., McKee K., Kong W.P., Shi W., Chen X., Todd J.P., Letvin N.L., Huang J., Nason M.C., Hoxie J.A., Kwong P.D., Connors M., Rao S.S., Mascola J.R., Nabel G.J. (2014) Neutralizing antibodies to HIV-1 envelope protect more effectively in vivo than those to the CD4 receptor. *Science Translational Medicine*, 6(243):243ra88.
- Pejchal R.**, Doores K.J., Walker L.M., Khayat R., Huang P.S., Wang S.K., Stanfield R.L., Julien J.P., Ramos A., Crispin M., Depetris R., Katpally U., Marozsan A., Cupo A., Malveste S., Liu Y., McBride R., Ito Y., Sanders R.W., Ogohara C., Paulson J.C., Feizi T., Scanlan C.N., Wong C.H., Moore J.P., Olson W.C., Ward A.B., Poignard P., Schief W.R., Burton D.R., Wilson I.A. (2011) A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science*, 334(6059):1097-103.
- Piguet V.**, Chen Y.L., Mangasarian A., Foti M., Carpentier J.L., Trono D. (1998) Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *The EMBO Journal*, 17(9):2472-81.
- Ping Y.H.**, Rana T.M. (2001) DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16):12951-8.
- Pitisuttithum P.**, Gilbert P., Gurwith M., Heyward W., Martin M., van Griensven F., Hu D., Tappero J.W., Choopanya K.; Bangkok Vaccine Evaluation Group. (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(12):1661-71.
- Plantier J.Ch.**, Leoz M., Dickerson J.E., De Oliveira F., Cordonnier F., Leme´e V., Damond F., Robertson D.L., Simon F. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, Vol. 15(8): 871-872.

- Popov S.**, Rexach M., Ratner L., Blobel G., Bukrinsky M. (1998) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21):13347-52.
- Pritchard L.K.**, Vasiljevic S., Ozorowski G., Seabright G.E., Cupo A., Ringe R., Kim H.J., Sanders R.W., Doores K.J., Burton D.R., Wilson I.A., Ward A.B., Moore J.P., Crispin M. (2015) Structural Constraints Determine the Glycosylation of HIV-1 Envelope Trimers. *Cell Reports*, 11(10):1604-13.
- Purcell D.F.**, Martin M.A. (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of Virology*, 67(11):6365-78.
- Rabbi M.F.**, Saifuddin M., Gu D.S., Kagnoff M.F., Roebuck K.A. (1997) U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology*, 233(1):235-45.
- Reks-Ngarm S.**, Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Prem Sri N., Namwat C., de Souza M., Adams E., Benenson M., Gurunathan S., Tartaglia J., McNeil J.G., Francis D.P., Stablein D., Birx D.L., Chunsuttiwat S., Khamboonruang C., Thongcharoen P., Robb M.L., Michael N.L., Kunasol P., Kim J.H.; MOPH-TAVEG Investigators. (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine*, 361(23):2209-20.
- Ringe R.P.**, Colin P., Torres J.L., Yasmeen A., Lee W.H., Cupo A., Ward A.B., Klasse P.J., Moore J.P. (2019) SOS and IP Modifications Predominantly Affect the Yield but Not Other Properties of SOSIP.664 HIV-1 Env Glycoprotein Trimers. *Journal of Virology*, 94(1):e01521-19.
- Ringe R.P.**, Sanders R.W., Yasmeen A., Kim H.J., Lee J.H., Cupo A., Korzun J., Derking R., van Montfort T., Julien J.P., Wilson I.A., Klasse P.J., Ward A.B., Moore J.P. (2013) Cleavage strongly influences whether soluble HIV-1 envelope glycoprotein trimers adopt a native-like conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 110(45):18256-61.
- Rizzuto C.D.**, Wyatt R., Hernández-Ramos N., Sun Y., Kwong P.D., Hendrickson W.A., Sodroski J. (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*, 280(5371):1949-53.
- Robertson D.L.**, Anderson J.P., Bradac J.A., Carr J.K., Foley B., Funkhouser R.K., Gao F., Hahn B.H., Kalish M.L., Kuiken C., Learn G.H., Leitner T., McCutchan F., Osmanov S., Peeters M., Pieniazek D., Salminen M., Sharp P.M., Wolinsky S., Korber B., (2000) HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, 288(5463): 55-6.
- Sanders R.W.**, Derking R., Cupo A., Julien J.P., Yasmeen A., de Val N., Kim H.J., Blattner C., de la Peña A.T., Korzun J., Golabek M., de Los Reyes K., Ketas T.J., van Gils M.J., King C.R., Wilson I.A., Ward A.B., Klasse P.J., Moore J.P. (2013) A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathogens*, 9(9):e1003618.
- Sanders R.W.**, Moore J.P. (2017) Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. *Immunological Reviews*, 275(1):161-182.

**Sanders R.W.**, van Gils M.J., Derking R., Sok D., Ketas T.J., Burger J.A., Ozorowski G., Cupo A., Simonich C., Goo L., Arendt H., Kim H.J., Lee J.H., Pugach P., Williams M., Debnath G., Moldt B., van Breemen M.J., Isik G., Medina-Ramírez M., Back J.W., Koff W.C., Julien J.P., Rakasz E.G., Seaman M.S., Guttman M., Lee K.K., Klasse P.J., LaBranche C., Schief W.R., Wilson I.A., Overbaugh J., Burton D.R., Ward A.B., Montefiori D.C., Dean H., Moore J.P. (2015) HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science*, 349(6244):aac4223.

**Sanders R.W.**, Vesananen M., Schuelke N., Master A., Schiffner L., Kalyanaraman R., Paluch M., Berkhout B., Maddon P.J., Olson W.C., Lu M., Moore J.P. (2002) Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 76(17):8875-89.

**Sather D.N.**, Armann J., Ching L.K., Mavrantoni A., Sellhorn G., Caldwell Z., Yu X., Wood B., Self S., Kalams S., Stamatatos L. (2009) Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 83(2):757-69.

**Saunders K.O.**, Verkoczy L.K., Jiang C., Zhang J., Parks R., Chen H., Housman M., Bouton-Verville H., Shen X., Trama A.M., Searce R., Sutherland L., Santra S., Newman A., Eaton A., Xu K., Georgiev I.S., Joyce M.G., Tomaras G.D., Bonsignori M., Reed S.G., Salazar A., Mascola J.R., Moody M.A., Cain D.W., Centlivre M., Zurawski S., Zurawski G., Erickson H.P., Kwong P.D., Alam S.M., Levy Y., Montefiori D.C., Haynes B.F. (2017) Vaccine Induction of Heterologous Tier 2 HIV-1 Neutralizing Antibodies in Animal Models. *Cell Reports*, 21(13):3681-3690.

**Saunders K.O.**, Wiehe K., Tian M., Acharya P., Bradley T., Alam S.M., Go E.P., Searce R., Sutherland L., Henderson R., Hsu A.L., Borgnia M.J., Chen H., Lu X., Wu N.R., Watts B., Jiang C., Easterhoff D., Cheng H.L., McGovern K., Waddicor P., Chapdelaine-Williams A., Eaton A., Zhang J., Rountree W., Verkoczy L., Tomai M., Lewis M.G., Desaire H.R., Edwards R.J., Cain D.W., Bonsignori M., Montefiori D., Alt F.W., Haynes B.F. (2019) Targeted selection of HIV-specific antibody mutations by engineering B cell maturation. *Science*, 366(6470):eaay7199.

**Savoret J.**, Chazal N., Moles J.P., Tuailon E., Boufassa F., Meyer L., Lecuroux C., Lambotte O., Van De Perre P., Mesnard J.M., Gross A. (2020) A Pilot Study of the Humoral Response Against the AntiSense Protein (ASP) in HIV-1-Infected Patients. *Frontiers in Microbiology*, 11:20.

**Seabright G.E.**, Doores K.J., Burton D.R., Crispin M. (2019) Protein and Glycan Mimicry in HIV Vaccine Design. *Journal of Molecular Biology*, 431(12):2223-2247.

**Sharma S.K.**, de Val N., Bale S., Guenaga J., Tran K., Feng Y., Dubrovskaya V., Ward A.B., Wyatt R.T. (2015) Cleavage-independent HIV-1 Env trimers engineered as soluble native spike mimetics for vaccine design. *Cell Reports*, 11(4):539-50.

**Sharp P.M.**, Hahn B.H. (2011) Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1): a006841.

**Shaw G.M.**, Hunter E. (2012) HIV transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11):a006965.

**Shi B.**, Kitchen C., Weiser B., Mayers D., Foley B., Kemal K., Anastos K., Suchard M., Parker M., Brunner C., Burger H. (2010) Evolution and recombination of genes encoding HIV-1 drug resistance and tropism during antiretroviral therapy. *Virology*, 404(1):5-20.

**Shubsda M.F.**, Paoletti A.C., Hudson B.S., Borer P.N. (2002) Affinities of packaging domain loops in HIV-1 RNA for the nucleocapsid protein. *Biochemistry*, 41(16):5276-82.

**Scheid J.F.**, Horwitz J.A., Bar-On Y., Kreider E.F., Lu C.L., Lorenzi J.C., Feldmann A., Braunschweig M., Nogueira L., Oliveira T., Shimeliovich I., Patel R., Burke L., Cohen Y.Z., Hadrigan S., Settler A., Witmer-Pack M., West A.P. Jr., Juelg B., Keler T., Hawthorne T., Zingman B., Gulick R.M., Pfeifer N., Learn G.H., Seaman M.S., Bjorkman P.J., Klein F., Schlesinger S.J., Walker B.D., Hahn B.H., Nussenzweig M.C., Caskey M. (2016) HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. *Nature*, 535(7613):556-60.

**Schlapschy M.**, Binder U., Börger C., Theobald I., Wachinger K., Kisling S., Haller D., Skerra A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Engineering Design and Selection*, 26(8):489-501.

**Schoofs T.**, Barnes C.O., Suh-Toma N., Golijanin J., Schommers P., Gruell H., West A.P. Jr., Bach F., Lee Y.E., Nogueira L., Georgiev I.S., Bailer R.T., Czartoski J., Mascola J.R., Seaman M.S., McElrath M.J., Doria-Rose N.A., Klein F., Nussenzweig M.C., Bjorkman P.J. (2019) Broad and Potent Neutralizing Antibodies Recognize the Silent Face of the HIV Envelope. *Immunity*, 50(6):1513-1529.e9.

**Simek M.D.**, Rida W., Priddy F.H., Pung P., Carrow E., Laufer D.S., Lehrman J.K., Boaz M., Tarragona-Fiol T., Miiro G., Birungi J., Pozniak A., McPhee D.A., Manigart O., Karita E., Inwoley A., Jaoko W., Dehovitz J., Bekker L.G., Pitisuttithum P., Paris R., Walker L.M., Poignard P., Wrin T., Fast P.E., Burton D.R., Koff W.C. (2009) Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *Journal of Virology*, 83(14):7337-48.

**Singh H.**, Henry K.A., Wu S.S., Chruscinski A., Utz P.J., Scott J.K. (2011) Reactivity profiles of broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies are distinct from those of pathogenic autoantibodies. *AIDS*, 25(10):1247-57.

**Song R.**, Kafaie J., Laughrea M. (2008) Role of the 5' TAR stem-loop and the U5-AUG duplex in dimerization of HIV-1 genomic RNA. *Biochemistry*, 47(10):3283-93.

**Spearman P.**, Wang J.J., Vander Heyden N., Ratner L. (1994) Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *Journal of Virology*, 68(5):3232-42.

**Struwe W.B.**, Chertova E., Allen J.D., Seabright G.E., Watanabe Y., Harvey D.J., Medina-Ramirez M., Roser J.D., Smith R., Westcott D., Keele B.F., Bess J.W. Jr., Sanders R.W., Lifson J.D., Moore J.P., Crispin M. (2018) Site-Specific Glycosylation of Virion-Derived HIV-1 Env Is Mimicked by a Soluble Trimeric Immunogen. *Cell Reports*, 24(8):1958-1966.e5.

**Tedbury P.R.**, Novikova M., Ablan S.D., Freed E.O. (2016) Biochemical evidence of a role for matrix trimerization in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 113(2):E182-90.

- Thomas J.A.**, Gagliardi T.D., Alvord W.G., Lubomirski M., Bosche W.J., Gorelick R.J. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology*, 353(1):41-51.
- Tomaras G.D.**, Plotkin S.A. (2017) Complex immune correlates of protection in HIV-1 vaccine efficacy trials. *Immunological Reviews*, 275(1):245-261.
- Tomasselli A.G.**, Bannow C.A., Deibel M.R. Jr., Hui J.O., Zurcher-Neely H.A., Reardon I.M., Smith C.W., Henrikson R.L. (1992) Chemical synthesis of a biotinylated derivative of the simian immunodeficiency virus protease. Purification by avidin affinity chromatography and autocatalytic activation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(15):10232-7.
- Torrents de la Peña A.**, Rantalainen K., Cottrell C.A., Allen J.D., van Gils M.J., Torres J.L., Crispin M., Sanders R.W., Ward A.B. (2019) Similarities and differences between native HIV-1 envelope glycoprotein trimers and stabilized soluble trimer mimetics. *PLoS Pathogens*, 15(7):e1007920.
- Trible R.P.**, Emert-Sedlak L., Smithgall T.E. (2006) HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37):27029-38.
- Truant R.**, Cullen B.R. (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2):1210-7.
- Usami Y.**, Wu Y., Gottlinger H.G. (2015) SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*, 526:218–223.
- Van Gils M.J.**, Bunnik E.M., Boeser-Nunnink B.D., Burger J.A., Terlouw-Klein M., Verwer N., Schuitemaker H. (2011) Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 85(14):6986-95.
- Vendeville A.**, Rayne F., Bonhoure A., Bettache N., Montcourrier P., Beaumelle B. (2004) HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5):2347-60.
- Veronese F.D.**, Copeland T.D., Oroszlan S., Gallo R.C., Sarngadharan M.G. (1988) Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *Journal of Virology*, 62(3):795-801.
- Walker L.M.**, Huber M., Doores K.J., Falkowska E., Pejchal R., Julien J.P., Wang S.K., Ramos A., Chan-Hui P.Y., Moyle M., Mitcham J.L., Hammond P.W., Olsen O.A., Phung P., Fling S., Wong C.H., Phogat S., Wrin T., Simek M.D.; Protocol G Principal Investigators, Koff W.C., Wilson I.A., Burton D.R., Poignard P. (2011) Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*, 477(7365):466-70.
- Wang H.**, Cohen A.A., Galimidi R.P., Gristick H.B., Jensen G.J., Bjorkman P.J. (2016) Cryo-EM structure of a CD4-bound open HIV-1 envelope trimer reveals structural rearrangements of the gp120 V1V2 loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 113(46):E7151-E7158.
- Wang X.**, He X., Zhong P., Liu Y., Gui T., Jia D., Li H., Wu J., Yan J., Kang D., Han Y., Li T., Yang R., Han X., Chen L., Zhao J., Xing H., Liang S., He J., Yan Y., Xue Y., Zhang J.,

Zhuang X., Liang S., Bao Z., Li T., Zhuang D., Liu S., Han J., Jia L., Li J., Li L. (2017) Phylodynamics of major CRF01\_AE epidemic clusters circulating in mainland of China. *Scientific Reports*, 7(1):6330.

Ward A.B., Wilson I.A. (2017) The HIV-1 envelope glycoprotein structure: nailing down a moving target. *Immunological Reviews*, 275(1):21-32.

Wei P., Garber M.E., Fang S.M., Fischer W.H., Jones K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92(4):451-62.

Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G.Y., Liu K., Louder M.K., O'Dell S., Rawi R., Sastry M., Shen C.H., Zhang B., Zhou T., Asokan M., Bailer R.T., Chambers M., Chen X., Choi C.W., Dandey V.P., Doria-Rose N.A., Druz A., Eng E.T., Farney S.K., Foulds K.E., Geng H., Georgiev I.S., Gorman J., Hill K.R., Jafari A.J., Kwon Y.D., Lai Y.T., Lemmin T., McKee K., Ohr T.Y., Ou L., Peng D., Rowshan A.P., Sheng Z., Todd J.P., Tsybovsky Y., Viox E.G., Wang Y., Wei H., Yang Y., Zhou A.F., Chen R., Yang L., Scarpio D.G., McDermott A.B., Shapiro L., Carragher B., Potter C.S., Mascola J.R., Kwong P.D. (2018) Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nature Medicine*, 24(6):857-867.

Xu L., Pegu A., Rao E., Doria-Rose N., Beninga J., McKee K., Lord D.M., Wei R.R., Deng G., Louder M., Schmidt S.D., Mankoff Z., Wu L., Asokan M., Beil C., Lange C., Leuschner W.D., Kruij J., Sendak R., Kwon Y.D., Zhou T., Chen X., Bailer R.T., Wang K., Choe M., Tartaglia L.J., Barouch D.H., O'Dell S., Todd J.P., Burton D.R., Roederer M., Connors M., Koup R.A., Kwong P.D., Yang Z.Y., Mascola J.R., Nabel G.J. (2017) Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. *Science*, 358(6359):85-90.

Yamaguchi J., Vallari A., McArthur C., Sthresley L., Cloherty G.A., Berg M.G., Rodgers M.A. (2020) Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 83(3):319-322.

Yant S.R., Mulato A., Hansen D., Tse W.C., Niedziela-Majka A., Zhang J.R., Stepan G.J., Jin D., Wong M.H., Perreira J.M., Singer E., Papalia G.A., Hu E.Y., Zheng J., Lu B., Schroeder S.D., Chou K., Ahmadyar S., Liclican A., Yu H., Novikov N., Paoli E., Gonik D., Ram R.R., Hung M., McDougall W.M., Brass A.L., Sundquist W.I., Cihlar T., Link J.O. (2019) A highly potent long-acting small-molecule HIV-1 capsid inhibitor with efficacy in a humanized mouse model. *Nature Medicine*, 25(9):1377-1384.

Zhou M., Deng L., Kashanchi F., Brady J.N., Shatkin A.J., Kumar A. (2003) The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(22):12666-71.

Zhou T., Georgiev I., Wu X., Yang Z.Y., Dai K., Finzi A., Kwon Y.D., Scheid J.F., Shi W., Xu L., Yang Y., Zhu J., Nussenzweig M.C., Sodroski J., Shapiro L., Nabel G.J., Mascola J.R., Kwong P.D. (2010) Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*, 329(5993):811-7.

Zhou T., Lynch R.M., Chen L., Acharya P., Wu X., Doria-Rose N.A., Joyce M.G., Lingwood D., Soto C., Bailer R.T., Ernandes M.J., Kong R., Longo N.S., Louder M.K., McKee K., O'Dell S., Schmidt S.D., Tran L., Yang Z., Druz A., Luongo T.S., Moquin S., Srivatsan S., Yang Y.,

Zhang B., Zheng A., Pancera M., Kirys T., Georgiev I.S., Gindin T., Peng H.P., Yang A.S.; NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin J.C., Gray M.D., Stamatatos L., Burton D.R., Koff W.C., Cohen M.S., Haynes B.F., Casazza J.P., Connors M., Corti D., Lanzavecchia A., Sattentau Q.J., Weiss R.A., West A.P. Jr., Bjorkman P.J., Scheid J.F., Nussenzweig M.C., Shapiro L., Mascola J.R., Kwong P.D. (2015) Structural Repertoire of HIV-1-Neutralizing Antibodies Targeting the CD4 Supersite in 14 Donors. *Cell*, 161(6):1280-92.

**Zhu P.**, Chertova E., Bess J. Jr., Lifson J.D., Arthur L.O., Liu J., Taylor K.A., Roux K.H. (2003) Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(26):15812-7.

**Zila V.**, Margiotta E., Turoňová B., Müller T.G., Zimmerli C.E., Mattei S., Allegretti M., Börner K., Rada J., Müller B., Lusic M., Kräusslich H.G., Beck M. (2021) Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell*, 184(4):1032-1046.e18.

**Zolla-Pazner S.**, deCamp A., Gilbert P.B., Williams C., Yates N.L., Williams W.T., Howington R., Fong Y., Morris D.E., Soderberg K.A., Irene C., Reichman C., Pinter A., Parks R., Pitisuttithum P., Kaewkungwal J., Rerks-Ngarm S., Nitayaphan S., Andrews C., O'Connell R.J., Yang Z.Y., Nabel G.J., Kim J.H., Michael N.L., Montefiori D.C., Liao H.X., Haynes B.F., Tomaras G.D. (2014) Vaccine-induced IgG antibodies to V1V2 regions of multiple HIV-1 subtypes correlate with decreased risk of HIV-1 infection. *PLoS One*, 9(2):e87572.