

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Možnosti využití programovatelných nukleáz pro genovou terapii
HIV pozitivních pacientů**

Bakalářská práce

Libor Hejduk

Školitel: doc. RNDr. Daniel Růžek, PhD

České Budějovice 2015

Hejduk L., 2015: Možnosti využití programovatelných nukleáz pro genovou terapii HIV pozitivních pacientů. [Possibilities of usage of programmable nucleases for gene therapy of HIV positive patients. Bc. Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

Programmable nucleases are specific are designed proteins which are capable to cut deoxyribonucleic acid at specific site in genome of target organism. Programmable nucleases are commonly used for targeting genes in model organisms and they can be used for gene editing in human cells – gene therapy. HIV infection is serious disease and its terminal stage AIDS is still lethal illness. Modern pharmacological therapy cans elongate active life of HIV positive patients. Gene therapy is considered to be a possible successor of pharmacotherapy and programmable nucleases are used in HIV gene therapy research.

Klíčová slova: Programovatelné nukleázy, Zinc finger nukleázy, TALEN, CRISPR, editace genomu HIV, AIDS, genová terapie

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

6. 12. 2015

Podpis studenta

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. Danielu Růžkovi, že mi umožnil napsat tuto práci a že moji práci vede. Dále nesmím zapomenout na své rodiče, kteří mě v plné míře podporují ve studiu, a to i finančně. Poděkování patří i mé sestře Markétě za sourozeneckou podporu. Za celoživotní podporu posílám poděkování i babičce, která za mnou vždy stála a dokázala mě za všech okolností posouvat dál. Děkuji svým nejbližším přátelům z mého rodného města i z fakulty. Závěrečné a speciální poděkování patří mé nejbližší kamarádce Věře Gajduškové.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Programovatelné nukleázy | 1 |
| 1.1 Úvod..... | 1 |
| 1.2 Zinc fingers..... | 1 |
| 1.3 Transcription activator like effectors..... | 4 |
| 1.4 CRISPR/Cas systém..... | 6 |
| 2. HIV..... | 10 |
| 2.1 Úvod..... | 10 |
| 2.2 Virus HIV-2..... | 10 |
| 2.3 Genom HIV..... | 11 |
| 2.4 Replikace viru HIV..... | 11 |
| 2.5 Proteiny kódované geny HIV..... | 12 |
| 2.5.1 Strukturní proteiny..... | 12 |
| 2.5.2 Regulační proteiny..... | 14 |
| 2.5.3 Pomocné proteiny..... | 15 |
| 2.6 Stavba virionu HIV..... | 16 |
| 2.7 Farmakoterapie HIV..... | 18 |
| 2.7.1 Úvod a historie farmakoterapie..... | 18 |
| 2.7.2 Nukleotidové a nukleosidové inhibitory RT..... | 19 |
| 2.7.3 Nenukleosidové inhibitory RT..... | 19 |
| 2.7.4 Inhibitory proteáz..... | 20 |
| 2.7.5 Inhibitory fúze..... | 20 |
| 2.7.6 Inhibitory vstupu..... | 20 |
| 2.7.7 Inhibitory integráz..... | 21 |
| 2.7.8 Kombinované preparáty..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8 Průběh infekce virem HIV..... | 21 |
| 2.8.1 Časná fáze infekce virem HIV..... | 21 |
| 2.8.2 Primární infekce virem HIV..... | 22 |
| 2.8.3 Stádium bezpříznakového nosičství viru HIV..... | 23 |
| 2.8.4 Stádium AIDS..... | 24 |
| 2.9 Genová terapie HIV..... | 26 |
| 3. Diskuse..... | 31 |
| 4. Závěr..... | 34 |
| 5. Seznam zkratk..... | 35 |
| 6. Seznam literatury..... | 37 |

1. Programovatelné nukleázy

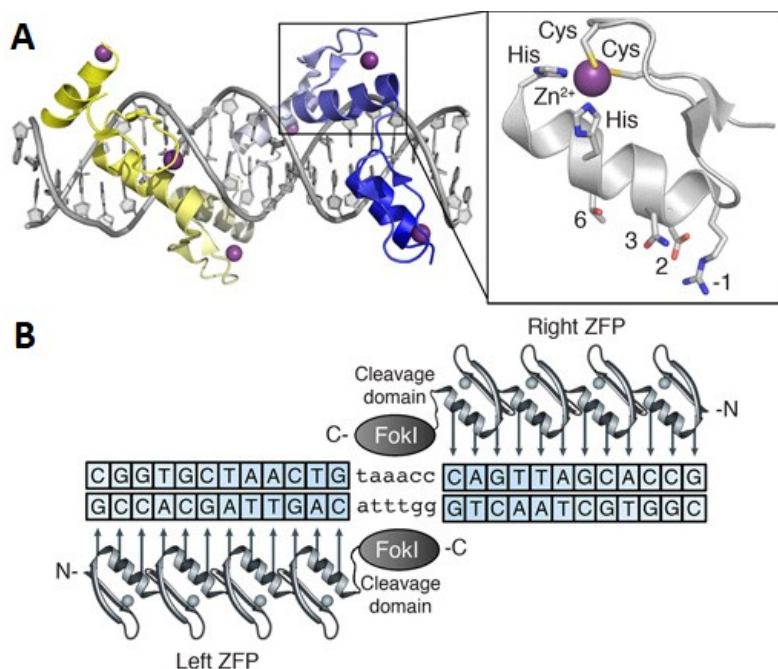
1.1 Úvod

Programovatelné nukleázy jsou relativně novým, ale již hojně využívaným nástrojem molekulární genetiky. Jejich hlavní výhodou je vysoká specifita. Na rozdíl od běžných nukleáz jsou programovatelné nukleázy schopny štěpit DNA na přesně určeném místě, což vyplývá z jejich pojmenování. Jsme schopni si určit jakoukoli oblast genomu organismu, v ní navrhnout místo pro štěpení a vytvořenou nukleázou dané místo editovat dvouřetězcovým zlomem, kdy je z obou řetězců DNA vyštěpeno několik nukleotidů. K editaci je možno použít dva základní přístupy. Většinou je dvouřetězcový zlom buněčnými nástroji spojen zase zpět, ovšem s chybou, která spočívá právě v delecii několika bází, posunu čtecího rámce a tím pádem tvorbou defektního a nefunkčního proteinu, který je daným genem kódován. Druhou možností editace je homologní rekombinace. Pro homologní rekombinaci je nutná přítomnost DNA homologní k úseku, kde byl proveden zlom. Tato DNA může být buněčného původu, kdy sama buňka je schopna opravit zlom a uvést řetězec DNA do původního stavu, většinou je ale DNA cíleně dodána. Toho se využívá pro vnesení různých proteinů, především signálních molekul, díky nimž je možno defektní protein detekovat. Tímto způsobem je možno vyřazovat z funkce jednotlivé proteiny, receptory a součásti různých signálních kaskád, sledovat patologické chování buněk s těmito defekty, jakožto i reakce buněk s defektními receptory na jejich ligandy. Rychlý rozvoj metod molekulární genetiky založených na programovatelných nukleázách umožnil rozvoj výzkumu zaměřený na boji proti nejruznějším chorobám, především nádorovým onemocněním nebo diabetu.

1.2 Zinc fingers (ZF)

DNA rozpoznávající domény těchto nukleáz jsou založeny na principu zinkových prstů. Termín zinkové prsty byl poprvé použit v souvislosti s jejich objevem. Byly poprvé popsány u africké žáby Drápatky vodní (*Xenopus laevis*), kde jsou součástí transkripčního faktoru IIIA (Miller et al., 1985). Tohoto objevu bylo dosaženo na základě biochemických studií komplexu transkripčního faktoru IIIA s 5S ribosomální RNA. Tyto domény jsou u

vyšších mnohobuněčných živočichů jedny z nejvíce se vyskytujících DNA vázajících domén a jejich výskyt v lidském genomu zaujímá dokonce 3% (Klug, 2010).



Obr. 1: Struktura Zinc finger nukleázy.

(A) Komplex zinkového prstu navázaný na DNA. Struktura zinkového prstu s vyznačenými postranními řetězci aminokyselin vázajícími se na DNA (ve výřezu).

(B) Komplex dimeru ZFN navázaný na DNA. ZFN vazebné místo se skládá ze dvou míst rozpoznávaných zinkovými prsty a tzv. spacerem, 5 až 7 b velké místo, kde působí štěpící podjednotka FokI nukleázy navázaná na ZF. (Gaj et al. 2013)

Prvně objevený typ zinkového prstu Cis2-His2 je zároveň hojně používaný pro konstrukci ZFN. Na základě porovnání již známých domén metaloproteinů a sekvence shodné ve většině již pozorovaných prstových domén TF IIIA byl předpovězen model domény ZF (Berg, 1988). Tento model byl následně potvrzen díky nukleární magnetické rezonanci (NMR) v roztoku jednotlivého ZF (Lee et al., 1989), tak i analýzou peptidu složeného ze dvou ZF domén. Tím byla potvrzena nezávislost jednotlivých domén a jejich spojení flexibilními můstky (Nakaseko et al., 1992; Neuhaus et al., 1992). Jedná se o polypeptid o délce cca 30 aminokyselin skládající se ze dvou antiparalelně orientovaných beta řetězců a jednoho alfa helixu. Tyto beta řetězce vytváří strukturu skládaného listu se smyčkou obsahující dva cysteiny. Alfa helix obsahuje smyčku s dvěma histidiny. Tyto dvě sekundární struktury mají zásadní vliv na vytvoření terciární struktury ZF, která je stabilizovaná atomem zinku včleněným mezi páry histidinu a cysteinu. Analýzou komplexu

Zif268-DNA pomocí rentgenové krystalografie s rozlišením 2,1 Angström byla určena struktura alfa helixu a jeho funkci při tvorbě komplexu s DNA. Ten se váže do velkého žlábků dvoušroubovice DNA primární interakcí vodíkových můstků alfa helixu aminokyselinami na pozicích -1, 3, 6. Tyto aminokyseliny jsou variabilní a určují specifitu domény pro určitý triplet. K těmto interakcím se přidává ještě jedna sekundární interakce: aminokyselina na pozici 2 se váže k opačnému vlákně DNA. Vyskytují se ale i další slabší sekundární interakce (Pavletich and Pabo, 1991).

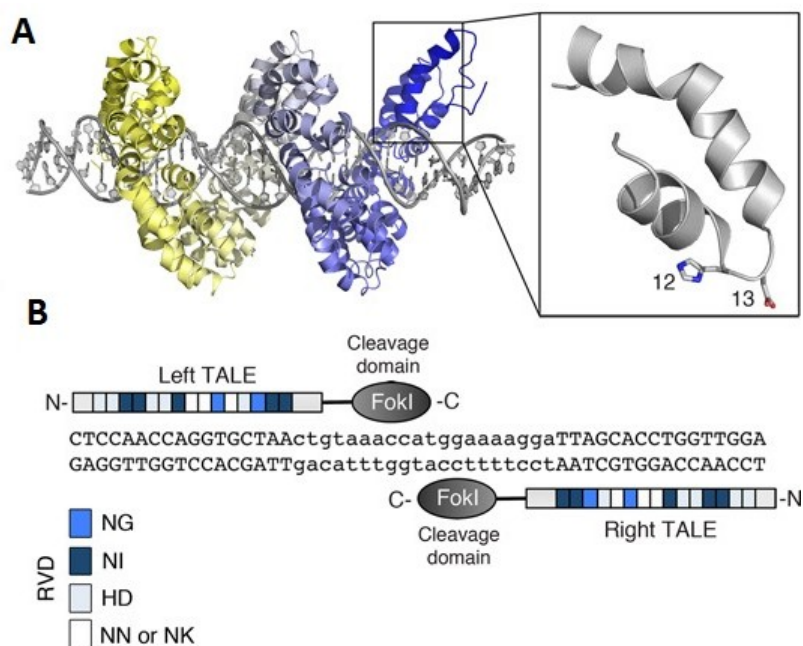
Při použití přirozeně se vyskytujících domén je možné vytvořit řetězec maximálně o třech doménách. Pokud propočteme frekvenci výskytu oligonukleotidu o délce 9bp (4^9 tj. jeden oligonukleotid každých 262144 bp) a porovnáme ho s velikostí genomu člověka (cca $3,3 \cdot 10^9$ bp), tak již na první pohled vidíme, že pro takto velkou ZF doménu bude v lidském genomu existovat celá řada oligonukleotidů se stejnou sekvencí. Z tohoto důvodu bylo třeba vyvinout způsob, jakým by bylo možné tuto doménu vytvořit. Na základě informací ze struktury zinkového prstu a jejich vzájemného propojení linkery byl navržen a zkonstruován tzv. polydaktylní ZF. Ten byl vytvořen ze dvou triplet-ZF spojením pomocí uměle vytvořeného linkeru v délce pěti aminokyselin. Pro otestování afinity těchto ZF k DNA bylo využito metody EMSA (electroforetic mobility shift assay). Specifita vazby byla otestována na HeLa buňkách, kde byl fuzní ZF spojen a aktivátorem, resp. represorem transkripce. (Liu et al., 1997)

Pro zjednodušení konstrukce polydaktylních ZF bylo sestrojeno několik knihoven modulů (Carrol et al., 2006; Wright et al., 2006). První protokol popisuje metodu založenou na spojování již hotových peptidů z knihovny čítající na 140 ZF modulů ze Zinc Finger Consortium modular Assembly Kit. Zato protokol Carrol et al. používá PCR pro vytvoření DNA konstruktů. Oba přístupy jsou použitelné pro konstrukci umělých na míru navrhovaných ZF, avšak tyto knihovny neobsahují domény reprezentující všechny možné kombinace nukleotidů v cílové sekvenci. Další zjednodušení přišlo s vytvořením knihovny plasmidů nesoucích moduly pro všechny domény vázající GNN, CNN a ANN. Tento systém nazvaný SuperZif funguje jako stavebnice. Na každém modulu jsou restriční místa XhoI a XmaI na 5' konci a AgeI a SpeI na 3' konci. To značně zlepšilo možnosti syntetizovat ZF dle potřeby. Pro tuto knihovnu byly použity domény na základě Sp1C TF, který na rozdíl od

Zif268 vykazuje zvýšenou stabilitu, afinitu a lepší expresi. Samozřejmostí je též selekční systém pomocí antibiotik (Gonzales et al., 2010).

1.3 Transcription activator like effectors (TAL effectors)

TAL effector proteiny byly poprvé objeveny u fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas*, které tento systém využívají pro zvýšení patogenity, proliferace a snadnějšímu osídlení a rozšíření uvnitř hostitelské rostliny. Klíčem k jejich patogenitě je Hrp III sekreční (T3S) systém, kterým vpouštějí efektorové proteiny do buněk hostitele. Nejhojnější skupinou efektorových proteinů jsou AvrB3/PthA a právě TAL proteiny, které působí jako aktivátory transkripce v jádře rostliny. Jejich specificita je dána do té doby nepoznaným systémem DNA vazebných domén (Boch et al., 2010).

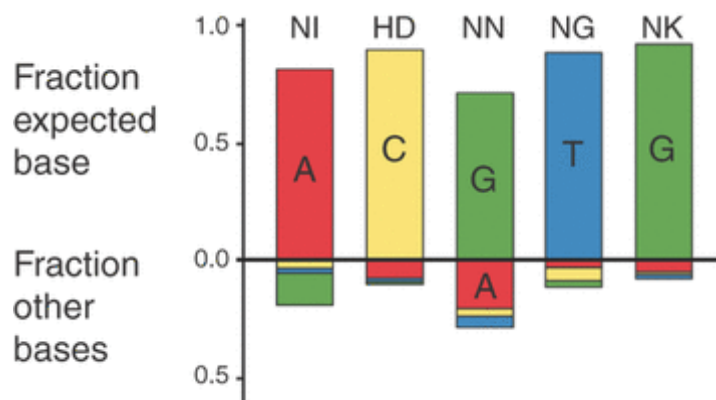


Obr. 2: Struktura TAL effector nukleázy.

(A) Vazba TAL proteinového komplexu na DNA. Struktura podjednotky TAL effector s vyznačenými RVD (ve výřezu).

(B) Vazba TALEN dimeru na DNA. Vazebná místa jednotlivých TALEN jsou oddělena spacerv o délce 12 až 20 bp. (Gai et al. 2013).

TAL effector protein se skládá ze tří hlavních částí, N-terminální části, centrální DNA vazebné části a C-terminální části. N-terminální konec původně (u TAL efektoru *Xanthomonas*) obsahoval translokační signál, který byl ale pro potřeby využití TAL efektorů k editaci DNA odstraněn (Sanjana et al., 2012). Zásadní úlohu v N-terminálním konci hraje část, kterou se TAL efektor váže k thyminu na vláknu DNA. Absence této vazby by vedla ke snížení aktivity TAL efektoru při použití jako nukleázy (TALEN) desetkrát a při použití TAL efektoru jako transkripčního faktoru dokonce více než tisíckrát (Lamb et al, 2013). Na ni následně navazuje prostřední část. C-terminální konec obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS), který je nezbytný pro transport hotového proteinu do jádra. Také obsahuje efektorovou doménu, u *Xanthomonas* jde o aktivátor transkripce. Pro specifickost a navázání na DNA je podstatná prostřední část. Ta seskládá ze série vazebných domén. Tyto domény mají délku 34 aminokyselin a jejich sekvence je vysoce konzervovaná. Pouze na pozicích 12 a 13 leží tzv. RVD (repeat-variable diresidues) oblast, která je vysoce polymorfní a na základě svého obsazení AMK určuje specifickou afinitu k nukleotidům. Jde o zcela nový systém, kde jedna domén váže jeden nukleotid (Cermak et al., 2011). Bylo identifikováno přes 20 RVD oblastí, ale nejpoužívanější jsou HD, NG, NI a NN se specifickostí pro C, T, A a G nebo A (Mak et al., 2012). Tato specifickost ale není jasně definována pouze pro jeden daný nukleotid, ale s různě vysokou pravděpodobností pro několik nukleotidů (Obr. 3.)



Obr. 3: Preference RVD k nukleotidům.

Nad osou se nachází primárně preferované nukleotidy, pod osou jsou vyjádřeny minoritní interakce. (Miller et al. 2011)

Dřívější pokusy o konstrukci TALEN používaly klonování a opakovaného skládání úseků DNA s ověřenou sekvencí jak pro jednotlivé TAL domény, tak pro dvojice i trojice domén (Christian et al., 2010). Poté byla vyvinuta metoda, která nebyla závislá na drahé

komerční syntéze nebo na metodách spojených s PCR, kde může docházet k mutačním chybám. Tato metoda syntéz DNA konstruktů pro TALEN probíhá systémem Golden Gate klonování, který nápadně připomíná puzzle. Využívá sady uměle vytvořených plasmidů, které nesou úsek DNA kódující jednu TAL doménu s konkrétním složením v oblasti RVD. Plasmidy nesou tetracyklinový selekční systém a restrikční místa BsaI těsně sousedící s klonovanými úseky. BsaI enzym štěpí vedle rozpoznávací sekvence s 5' přesahem. Klonované úseky nesou na svých koncích specifické čtyřbazové sekvence, které po rozštěpení vytvoří právě zmíněné přesahy. Tyto sekvence jsou specifické podle pořadí daného úseku v konstruktě. To znamená, že první úsek je kompatibilní s druhým, druhý s třetím atd. Pro každou pozici existují plasmidy se všemi čtyřmi možnostmi RVD a na základě sekvence, pro kterou je konstruován TAL, vybereme daný set plasmidů. Díky tomu lze poskládat deset úseků za sebe v jedné reakci, ve které jsou všechny námi zvolené plasmidy, plasmid pro inserci konstruktů, restrikční enzym BsaI, tak i ligáza. Jelikož BsaI má rozpoznávací sekvenci vně plasmidu, v konstruktě toto místo není. Plasmidy pro inserci konstruktů jsou také součástí sady. Jejich lepivé konce jsou také specifické a to podle délky vloženého konstruktů. pFUS_A je kompatibilní s 1. a s 10. RVD úsekem, pFUS_B1-10 pro 11. až 20. RVD úsek jsou kompatibilní podle délky vytvářeného TAL konstruktů. Pro delší konstruktů jsou určeny plasmidy pFUS_A30A a pFUS_A30B. Poslední TAL doména je kódována samostatným plasmidem pLR (Last repeat). Tyto plasmidy obsahují podobný restrikční systém, jen s enzymem Esp3I. Následně se všechny dílčí části spojí v další jednotné reakci do nosného vektoru obsahující už NLS i případnou efektorovou doménu, u TALEN FokI nukleázu (Cermak et al., 2011).

TAL effector nukleázy společně se ZF nukleázami využívají restrikční podjednotku FokI nukleázy, která je schopna štěpit pouze jedno vlákno. Pro rozštěpení obou vláken je nutná dimerizace dvou podjednotek, tudíž i dvou konstruktů. CRISPR technologie pracuje na odlišném principu.

1.4 CRISPR/Cas systém

Bakterie a archea jsou často vystaveny infekčnímu tlaku bakteriofágů a dalších elementů. Ty se mohou šířit tzv. horizontálním genovým transferem (HGT), zprostředkovaný transdukcí, transformací nebo konjugací mobilních elementů jako např.

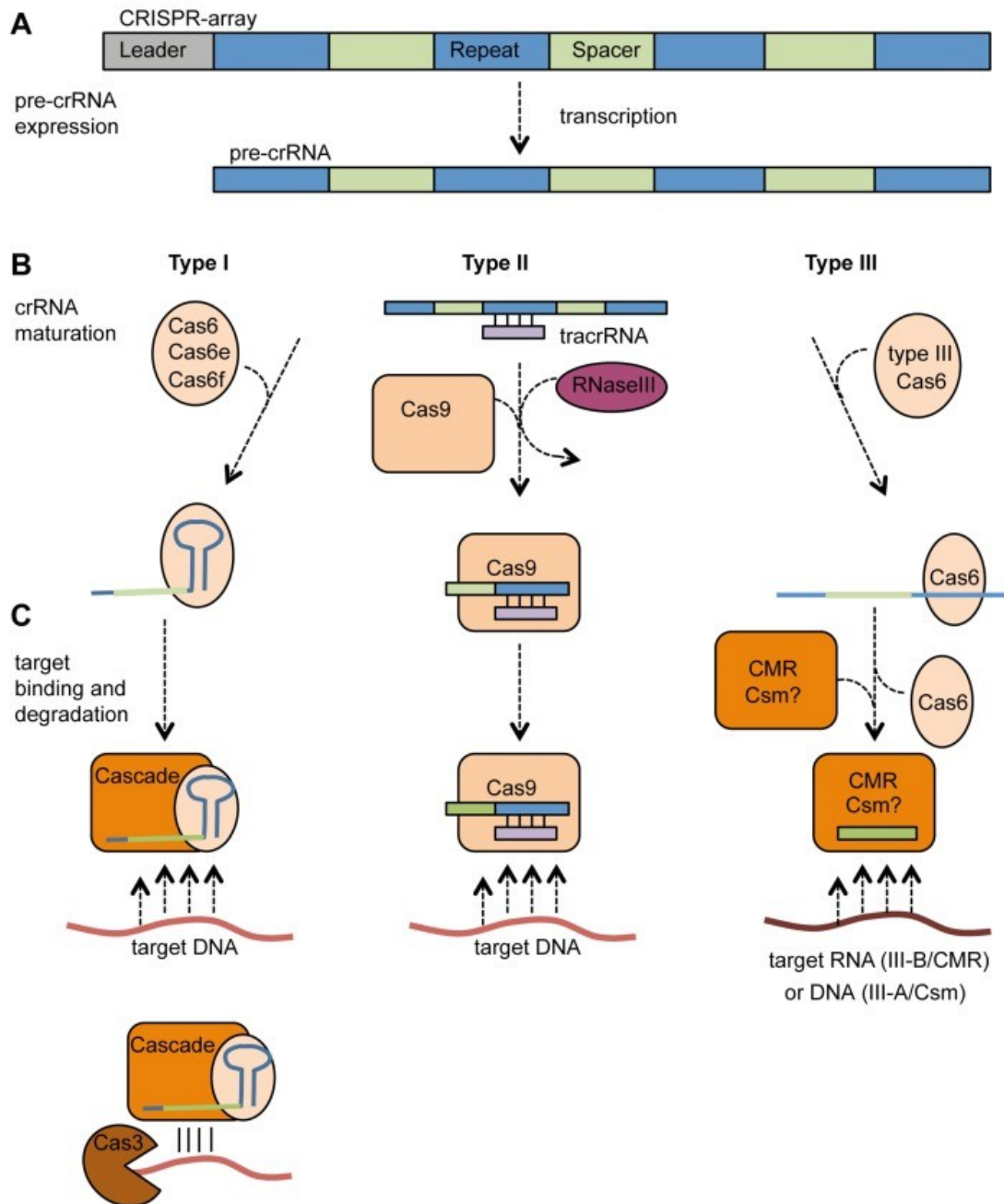
plasmidů. HGT může hrát významnou úlohu pro adaptaci díky přenosu genů pro rezistenci na antibiotika, virulentní faktory nebo pro degradaci toxických látek. Díky tomuto tlaku si prokaryota v průběhu evoluce vyvinula řadu obranných mechanismů. Tyto mechanismy zahrnují mutace nebo maskování povrchových receptorů, restriktivně-modifikační systémy a nebo CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) systém. CRISPR systém by se dal nazvat systémem adaptivní imunity a jeho geny byly objeveny u téměř 50% bakterií a u 85% archea.

CRISPR používá malé proteiny nekódující sekvence RNA pro obranu proti cizí DNA ve spojení s CRISPR associated (Cas) proteiny. Mechanismus účinku CRISPR systému lze rozdělit do tří fází. Pro první fázi je typická integrace fragmentů cizích genetických elementů (spacerů) do repetitivní oblasti v genomu bakterie, CRISPR oblasti. V druhé fázi dochází k transkripci a vytvoření malé RNA molekuly pomocí Cas proteinů. Třetí závěrečná fáze pak pomocí RNA a Cas proteinového komplexu zacílí cizorodou DNA a dojde k její degradaci. I přes značné shody v mechanismu účinku existují rozdíly mezi třemi hlavními CRISPR/Cas systémy. Ty jsou charakterizovány především podle zastoupení Cas proteinů.

CRISPR oblasti se skládají z repetice, spacerů a leader sekvence (Obr. 4). Repetice se střídají se spacery a jsou mezi sebou shodné, co se týče délky a sekvence. Jsou 23 bp až 47bp dlouhé a často obsahují palindromické nebo invertované sekvence. Naproti tomu spacery jsou v genomu unikátní a z hlediska sekvence vykazují podobnost s extrachromosomální DNA. Sekvence v cizí DNA, ke které vykazují spacery shodu a ze které byly vytvořeny, se nazývají protospacery. Avšak je zajímavé, že u některých CRISPR systémů byly nalezeny spacery se shodou k vlastnímu genomu organismu. Třetí komponentou CRISPR oblasti je leader sekvence, která se nachází ještě před první repeticí. Jde o AT bohatou sekvenci o délce 200 – 500 bp a obsahuje promotor nezbytný k transkripci oblasti. Také je důležitá pro získávání nových spacerů.

V těsné blízkosti k CRISPR sekvenci jsou i geny pro Cas proteiny. Ty tvoří celou kaskádu, která je zodpovědná za získávání a inkorporaci nových spacerů, zacílení a zničení cizích genetických elementů. Na jejich základě jsou CRISPR systémy děleny na I, II a III typy a tyto hlavní typy jsou rozděleny ještě do podtypů. Bývají rozlišovány dvě základní skupiny. První skupina obsahuje jaderné Cas proteiny, které byly nalezeny napříč CRISPR typy. Cas1 a Cas2 se nacházejí v operonech všech tří typů, přičemž Cas1 je považována za univerzální marker CRISPR systému. Cas3, Cas9 a Cas10 jsou specifické pro každý typ.

Druhá skupina zahrnuje proteiny kódované genovými klastry speciálně pro daný podtyp. Tyto podtypu specifické proteiny tvoří komplex zapojený v zacílení a interferenci s cílovou DNA. Ve výsledku Cas klastr pro každý podtyp CRISPR systému obsahuje geny pro Cas1 a Cas2, specifické geny Cas určující typ systému a celou sadu pro daný podtyp.



Obr. 4: Tvorba a působení CRISPR/Cas v jednotlivých systémech.

(A) Transkripce CRISPR oblasti do pre-crRNA.

(B) Tvorba zralé crRNA.

(C) Vazba na cílovou sekvenci a štěpení. (Richter et al. 2012).

U CRISPR typu I je crDNA transkript každého repetitivního úseku složen do smyčky, na kterou se následně váže endoribonukleáza. U systému typu I je endoribonukleáza tvořena skupinou Cas6 proteinů (Obr. 4). Po vytvoření pre-crDNA je naštěpena na jednotlivé crDNA ve specifické sekvenci tak, že spaceru předchází na 5' konci krátký úsek repetice a za spacerem následuje smyčka tvořená repetitivním úsekem následujícím. crDNA se spolu s endoribonukleázou skládá v jádro pro tvorbu Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense). Cascade je ribonukleoprotein složený z crDNA a podtypu specifických Cas proteinů. Cascade se s crRNA specificky váže na negativně superspiralizovanou DNA. Tyto negativní otáčky svojí energií napomáhají k vytvoření smyčky. PAM (Protospacer Adjacent Motif) sekvence je 7bp velká a nachází se v cílové sekvenci v pozici odpovídající 5' konci nasedající crRNA. Je nezbytná pro správné navázání Cas. Pro typ I je charakteristický protein Cas3, který má ATP dependentní helikázovou aktivitu a také je schopný štěpit ssDNA. U CRISPR typu II dochází ke vzniku tzv. tracrRNA – trans encoded RNA, která je komplementární k crRNA. tracrRNA je nezbytná pro vznik crRNA z pre-crRNA (Obr. 4). Obsahuje 25bp dlouhý úsek, který je přesně komplementární k repetitivním v pre-crRNA systému II. Pro vznik crRNA je nepostradatelný komplex proteinů Cas9 a RNázy III. Cas9 také společně s tracrRNA:crRNA hybridem rozpoznává a štěpí cílovou sekvenci dvouřetězcovými zlomy. Štěpící místo se nachází 3bp od PAM sekvence. CRISPR systém III je co se týče exprese částečně podobný systému I (Obr. 4). Jeho rozdílnost tkví především v endoribonukleáze Cas6 a její vazbě na RNA. Neváže se jako u systému I na smyčku, ale na první báze repetitivního úseku a následně umožňuje vznik crRNA. Vazebné místo Cas6 je v 2-8 bp velké oblasti a štěpí 8bp od 5' konce. Ale tato RNA není finální produkt použitý pro interferenci s NK. Cas6 ale na rozdíl od endoribonukleázy I pouze přesunuje crRNA ke komplexu CMR (proteiny Cmr1-6), který už může zacílit na nukleovou kyselinu. Systém III má dva podtypy, které se od sebe mírně liší, III-A cílí na RNA, III-B na DNA. (Richter et al. 2012)

Pro cílenou mutagenézi bylo využito CRISPR systému II, kdy je gen pro Cas9 nukleázu vnesen vektorem do cílové buňky, kde je exprimován. Může se tak použít linie buněk, která už má stabilní expresi nukleázy. Poté se z druhého vektoru transkribuje chimerická RNA tzv. guide RNA - gRNA, která nasedá na zvolené místo a Cas9 nukleáza štěpí vlákno DNA. gRNA odpovídá tracr:cr RNA duplexu v CRISPR systému II. Pro vektor

se použije uměle nasyntetizovaný úsek DNA odpovídající cílové sekvenci. Ta musí samozřejmě obsahovat PAM sekvenci.

2. HIV

2.1 ÚVOD

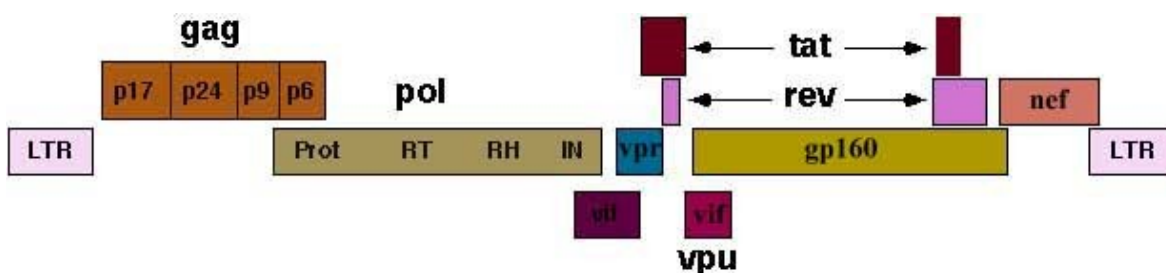
Virus lidské imunitní nedostatečnosti HIV-1 (Human Immunodeficiency virus) je obalený RNA virus z rodu Lentivirus z čeledi Retroviridae, což jsou viry, které mají ve své výbavě enzymatický aparát určený k tomu, aby svou RNA přepsali do dvouvláknové DNA a tu včlenili do genomu hostitele. Dle Baltimorovy klasifikace je řazen do třídy VI Lentivirus, jak vyplývá z jeho názvu (z latinského lente – pomalu, zdlouha, zvolna), zapříčiňuje onemocnění s různou, ale vždy velice dlouhou inkubační dobou, která může být i deset let, než jsou pozorovány jasné příznaky onemocnění. To je zapříčiněno právě integrací do genomu hostitele.

2.2 Virus HIV-2

Virus HIV-2 má většinu imunologických vlastností velice podobných viru HIV-1, ale geneticky se liší. Je homologní pouze z 40% až 60%. Virus HIV-2 má nižší afinitu k CD4 molekule a virová zátěž buňky je také nižší. Byly zaznamenány případy nakažení viry HIV-1 i HIV-2 současně. Vzhledem k specifickému výskytu především v západní Africe je jeho epidemiologický význam malý a mimo tuto oblast se vyskytuje jen sporadicky. Proto se budu zabývat pouze virem HIV-1, který bude zjednodušeně označován pouze jako virus HIV.

2.3 Genom HIV

Genom viru HIV (9181 bp) se skládá ze dvou identických řetězců RNA a je charakteristický přítomností devíti genů. Tři geny jsou strukturní, šest jich je regulačních a pomocných. Mezi strukturní geny řadíme geny gag, pol a env. Tyto strukturní geny jsou společné pro všechny retroviry. Do regulačních genů řadíme geny tat a rev. Dalšími geny jsou geny vedlejší, vif, vpr, vpu a nef. Na obou koncích virové RNA jsou LTR sekvence (Long terminal repeats) které se podílejí na replikaci HIV viru (Obr. 5).



Obr. 5: Organizace genomu viru HIV-1. (Heguy 1997)

2.4 Replikace Viru HIV

Replikace neboli množení viru probíhá ve dvou fázích. V první časné fázi se virus naváže na CD4 molekulu na povrchu buňky a na pomocný receptor CCR5 nebo CXCR4. Virus se zbaví kapsidy a dochází k přepisu RNA na DNA pomocí reverzní transkriptázy. Pomocí virových integráz je tato DNA začleněna do genomu hostitele jako provirus. Tam se udržuje v latentní podobě až do okamžiku aktivace. Důvodem k aktivaci jsou imunitní podněty. Po aktivaci dochází k druhé pozdní fázi množení viru. Dochází k přepisu provirové DNA do RNA a následné translaci do polyproteinu. Následně upravené proteiny jsou štěpeny a tvoří se nové virové částice. Buňka při uvolňování nových virionů praská. (Krejsek et al. 2004).

2.5 Proteiny kódované geny HIV

2.5.1 Strukturní proteiny

Gag gen kóduje 55 kD velký prekurzorový protein p55, který je exprimován z nesestříhané virové mRNA. V průběhu translace je jeho N konec myristylován, což zapříčiní napojení proteinu na vnitřní vrstvu cytoplasmatické membrány hostitelské buňky (Bryant et al. 1990). Takto upravený protein společně s dvěma kopiemi genomové RNA, ostatními virovými i buněčnými proteiny spouští tvorbu a pučení nových virových částic na povrchu hostitelské buňky. Těsně po vypučení virové částice je p55 v průběhu zrání viru štěpen pomocí virem kódované (pol gen) proteázy na menší proteiny označené jako MA (matrix, také označován jako p17), CA (capsid, p24), NC (nucleocapsid, p9) a p6 (Göttlinger et al. 1989).

MA peptid je odvozený od myristylovaného N konce proteinu p55. Většina MA molekul zůstává přichycená k vnitřní vrstvě virové membrány, kde stabilizuje virovou částici. Část MA proteinů se nachází i v ostatních hlubších vrstvách virionu, kde je součástí komplexu pro transport virové DNA do buněčného jádra (Gallay et al. 1995). MA molekuly zprostředkovávají transport virového genomu do jádra díky signální sekvenci na MA, která je rozpoznávána systémem jaderného transportu hostitelské buňky, kde je posléze genom viru v podobě DNA jako provirus začleněna do genomu hostitele. Díky tomu HIV napadá nedělící se buňky, což je vlastnost specifická právě pro retroviry (Lewis et al. 1992).

CA protein (p24) je stavební protein virové kapsidy. Na protein p24 se specificky váže cyclofilin A, což vede k jeho spoluzačlenění do vznikajícího viru. Interakce CA s Cyclofilinem A je terapeuticky inhibována cyclosporinem A (Franke et al. 1996).

NC část (p9) gag polyproteinu se specificky váže a rozpoznává signál pro zabalení virové částice (Harrison et al. 1992). Tento signál je velice konzervovaná oblast RNA, která má podobu čtyř smyček, nachází se v blízkosti 5' konce virové RNA a zprostředkovává správné začlenění a zabalení RNA do virionu HIV. NC s touto oblastí RNA interaguje pomocí dvou domén zinkových prstů. NC také usnadňuje průběh reverzní transkripce (Lapadat-Tapolsky et al. 1993)

Oblast p6 na polypeptidu gag zprostředkuje interakci mezi gag polypeptidem a pomocným proteinem Vpr, díky čemuž je Vpr následně včleněn do vznikajícího virionu (Paxton et al. 1993). Oblast p6 také obsahuje doménu zodpovědnou za správné uvolnění pučících virionů z infikované buňky.

Virové enzymy proteáza (Pro), integráza (IN), RNáza H a reverzní transkriptáza (RT) jsou vždy exprimovány společně v Gag-Pol fúzním proteinu. Gag-Pol prekurzor (p160) je vytvářen při posunu čtecího rámce ribosomu, způsobený specifickou cis regulační oblastí, sekvencí šesti nukleotidů s následující krátkou smyčkou v konečném úseku genu gag. Jakmile ribosom dosáhne této oblasti, tak se s frekvencí asi 5% posune čtecí rámec o jeden nukleotid zpět a bez přerušení vznikajícího polypeptidu naváže kontinuálně translaci Pol proteinu. Tato frekvence posunu čtecího rámce vysvětluje, proč infikované buňce vznikají polypeptid Gag a fúzní protein Gag-Pol v poměru přibližně 20:1 (Jacks et al. 1988, Parkin et al. 1992).

V průběhu zrání viru je od tohoto fúzního proteinu virovou proteázou odštěpen protein Pol, který je následně rozštěpen na části: proteázu (p10), RT (p50), RNázu H (p15) a integrázu (p31). Tyto části ale nejsou na 100% aktivní, například přibližně polovina RT je stále spojena s RNázou H v jeden polypeptid (p65).

HIV proteáza funguje jako aspartylproteáza a působí ve formě dimeru (Ashorn et al. 1990). Jak bylo již popsáno v předcházející části, je nezbytná pro štěpení polypeptidů ve zrající virové částici. Na základě popsané trojrozměrné struktury tohoto dimeru byly a jsou vyvíjeny preparáty, které cílí právě na tuto proteázu, inhibují ji a vývoj těchto léčiv zásadně ovlivnil léčbu HIV pozitivních pacientů (a pacientů s již rozvinutým syndromem AIDS)

Reverzní transkriptáza HIV má RNA dependentní a DNA dependentní polymerázovou aktivitu. V procesu reverzní transkripce polymeráza vytváří dvouřetězcovou DNA kopii původní virové RNA. RNáza H postupně odštěpuje RNA templát ze vzniklého heterodimeru RNA-DNA tak, jak postupuje syntéza druhého vlákna DNA. Virová DNA může být úplně vytvořena za 6 hodin po vstupu virionu do buňky, ale DNA samotná může zůstat nezačleněna do genomu i déle. Pro tvorbu je třeba několik cis elementů, např. TAR element, malá struktura tvořená smyčkou na 5' konci RNA, která váže Tat protein a je důležitá pro zahájení reverzní transkripce (Zack et al. 1990, Harrich et al. 1996).

Integráza je enzym zprostředkovávající včlenění provirové DNA do genomu infikované buňky. Tento proces je umožněn trojí funkcí enzymu. První exonukleázová aktivita odstraní dva nukleotidy z obou stran ze 3' konců provirové DNA. Druhá endonukleázová aktivita vytvoří dvouřetězcový zlom v DNA buňky a ligázová aktivita následně vytvoří vazbu mezi provirovou a buněčnou DNA (Bushman et al. 1990)

Env glykoprotein (gp160) je syntetizován ze sestříhané mRNA do endoplazmatického retikula. Poté je přesunut do Golgiho aparátu, kde projde N-glykosylací. Při ní jsou na postranní řetězce asparaginu navázány sacharidové řetězce složené z 25 až 30 jednotek (Capon et al. 1991). Poté buněčná proteáza rozštěpí glykosylovaný protein na dvě podjednotky gp120 a gp41. Interakce mezi povrchem viru HIV a buněčnými CD4 receptory je umožněna právě díky struktuře gp120 (Landau et al. 1988). Podjednotka gp120 obsahuje devět specificky umístěných a vysoce konzervovaných disulfidických můstků a pět hypervariabilních oblastí značených V1 až V5. Zvláště oblast nazývaná V3 smyčka je nesmírně důležitá pro interakci s buňkou. V3 smyčka se sice neváže přímo na CD4 receptor, ale je určující pro tzv. preferenční tropismus HIV viru pro T lymfoidní linii, nebo pro primární makrofágy (Kwong et al. 1998). Specifické sekvence V3 smyčky interagují s HIV receptory CXCR4 a CCR5 patřící do skupiny chemokinových receptorů, čímž je právě zajištěna citlivost HIV viru – preferenční tropismus. V3 smyčka je tudíž věrným cílem pro specifické neutralizační protilátky, které blokují infektivitu HIV viru.

2.5.2 Regulační proteiny

Tat je transkripční transaktivátor nezbytný pro množení viru a vyskytuje se ve dvou formách o délce 72 a 101 aminokyselin (Ruben et al. 1989). 72 AMK forma vzniká z mRNA o úplném sestříhu, zatímco druhá forma po sestříhu neúplném. Obě formy se nacházejí v jádře i jadérku infikovaných buněk a obě fungují jako aktivátory. Tat je RNA dependentní na rozdíl od běžných transkripčních aktivátorů, které se váží na DNA. Tat se váže na krátkou strukturu tvaru smyčky, která se vytvoří na 5' konci právě vznikající virové RNA a nazývá se transactivation response element (TAR) (Roy et al. 1990). Nejde tedy o klasický aktivátor transkripce, ale je nezbytný pro zdárný průběh transkripce celého úseku provirové DNA. Bez přítomnosti Tat aktivátoru by vznikaly jen krátké úseky RNA o délce přibližně 100 bp. Správného průběhu celé transkripce je dosaženo díky Cyklin dependentní kináze 9 (CDK9),

serinové kináze, která fosforyluje karboxyterminální doménu RNA polymerázy II a která je součástí komplexu přímo navázaného na Tat aktivátor. Další nezbytnou součástí komplexu je cyklin T, který v komplexu umožňuje rozpoznání TAR smyčky (Southgate et al. 1991, Tiley et al. 1992).

Rev je 13 kDa velký protein, specificky se vázající na RNA (Zapp et al. 1989). Je kódován dvěma exony, je vytvářen z kompletně sestříhané mRNA a umožňuje přechod z časné do pozdní fáze genové exprese HIV (Kim et al. 1989). Vyskytuje se výhradně v jádře a jadérku infikovaných buněk. Rev se váže do oblasti sekundární struktury RNA zvané Rev response element (RRE). Jde o 240 bp dlouhou oblast RNA s několika smyčkami nacházející se ve druhém intronu HIV (Malim et al. 1989). Rev se navazuje konkrétně na místo zvané Rev high affinity binding site, které má podobu bubliny na konci dvouvláknité smyčky číslo dvě, kde dochází k nekomplementárnímu spárování bází.

Navázání Rev na RRE umožňuje export nesestříhané nebo jen částečně sestříhané virové mRNA. Řetězce mRNA obvykle opouští buněčné jádro až o kompletním sestříhu. Exprese proteinu Rev je regulován zpětnovazebně. Pokud by došlo ke zvýšené expresi Rev, následoval by zvýšený export nesestříhané RNA z jádra a tím pádem by nastal nedostatek RNA pro kompletní sestřih (Felber et al. 1990).

2.5.3 Pomocné proteiny

Nef je 27 kDa velký myristylovaný protein kódovaný jedním exonem, který zasahuje částečně i do oblasti 3' LTR. Je to časný protein, který je jako první ze všech HIV proteinů detekovatelný v infikovaných buňkách (Kim et al. 1989). Má hned několik funkcí, jako například snižuje množství CD4 receptorů na infikovaných buňkách, narušuje aktivaci T lymfocytů a zvyšuje infektivitu HIV. Nef post-translačně snižuje počet CD4 receptorů tím, že zvyšuje endocytózu a lysosomální degradaci receptorů. Klíčovou oblastí pro působení Nef na receptor CD4 je cytoplasmatická část a oblast repetice leucinů v proximální části transmembránové sekvence CD4 (Aiken et al. 1994). Byla také prokázána souvislost mezi množstvím CD4 na povrchu buněk a produkcí nových virionů a to tak, že zvýšené množství CD4 zabraňuje inkorporaci glykoproteinu Env do membrány a brání pučení nových částic (Ross et al. 1999). Nef má také vliv na snížení počtu antigenů MHC I na buněčném povrchu,

čímž se sníží i efektivita odstraňování nakažených buněk pomocí cytotoxických T lymfocytů (Schwartz et al. 1996).

Studie provedené na Jurkat T buněčné linii ukázaly vliv Nef proteinu na snížení exprese transkripčního faktoru NF-kappa B a interleukinu IL-2 (Luria et al. 1991). Naopak výsledky z transgenních myší pro Nef ukázaly, že Nef protein zvyšuje signalizaci T receptoru (Skowronski et al. 1993). Pokusy s chimérickými proteiny CD8 – Nef na Jurkat buněčných liniích prokázaly jak pozitivní, tak negativní vliv na buněčnou signalizaci v závislosti na lokalizaci chimérických molekul v buňce. Pokud byly chimérické proteiny přítomny výhradně v cytoplasmě, tak blokovaly signalizaci T buněčným receptorem. Pokud byl ale ve zvýšené míře přítomen na povrchu buněk, tak docházelo ve zvýšené míře k apoptóze (Baur et al. 1994). HIV viriony, které by vznikly bez proteinu Nef, by měly asi desetkrát menší infektivitu než při přítomnosti proteinu ve vznikajícím virionu, jak je to běžné (Miller et al. 1994).

Protein Vpr se nachází uvnitř virionů a jeho inkorporace je umožněna specifickou interakcí s oblastí na C – konci polypeptidu p55 (Gag), která odpovídá proteinu p6 (Zac et al. 1990). Vpr umožňuje viru HIV infikovat právě nedělící se buňky. Vpr je součástí preintegračního komplexu a díky Vpr se tento komplex dostává jaderným pórem do jádra, kde pak dochází i integraci cDNA (Vodicka et al. 1998).

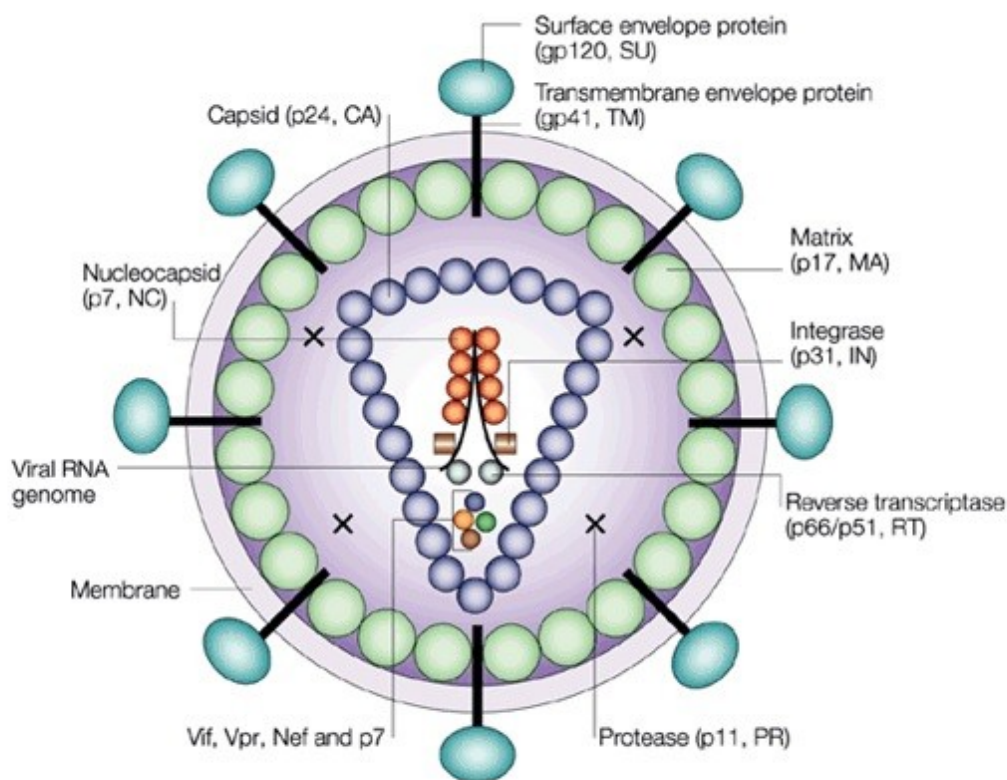
Vpu je integrální membránový fosfoprotein a je kódován z mRNA genu, který kóduje i Env. U HIV infikovaných buněk tvoří komplex mezi CD4 receptorem a virovým obalovým proteinem v endoplasmatickém retikulu a zlepšuje uvolňování virionů z buňky (Willey et al. 1992).

Protein Vif je nezbytný pro replikaci viru HIV v periferních lymfocytech a makrofázích (Strebel et al. 1987).

2.6 Stavba virionu HIV

Virion HIV je kulatého tvaru a průměru 100 nm. Na povrchu se nachází membrána bohatá na lipoproteiny. V této membráně jsou ukotveny heterodimerické glykoproteinové komplexy. Jejich vnější jednotka se skládá z trimerického komplexu glykoproteinu gp120 a

transmembránová jednotka také z trimerického komplexu, ale tentokrát glykoproteinu gp41. Glykoproteiny gp120 a gp41 jsou navzájem spojeny nekovalentně, tudíž se povrchový gp120 může spontánně uvolnit a může být detekován v séru nebo v lymfatických tkáních HIV pozitivního pacienta. Během procesu tvorby nových virionů v hostitelské buňce může vznikající virová částice do svého membránového obalu inkorporovat různé proteiny z membrány hostitelské buňky, jakými jsou například proteiny HLA antigenního systému I a II nebo adhezní proteiny jako ICAM 1. (Fanales-Belasio et al. 2010) Virion se skládá z kapsidy tvořené dřevým proteinem p24, uvnitř kapsidy jsou dva řetězce RNA asociované s NC proteinem p9. Mezi dřevové proteiny řadíme i MA p17. Přítomny jsou též virové enzymy a pomocné proteiny.



Obr. 6: Struktura zralého virionu HIV. (upraveno Robinson 2002).

2.7 Antiretrovirová farmakoterapie

2.7.1 Úvod a historie Farmakoterapie HIV

Nástup antiretrovirových preparátů do klinického využití v druhé polovině osmdesátých let 20. století znamenal obrovský zlom v dosavadním životě HIV pozitivních pacientů. Do té doby většina nakažených umírala na oportunní infekce v krátké době několika málo let od prvotní infekce HIV. Tento zlom nastal v roce 1987, kdy došlo k rychlému ukončení klinických testů, a do praxe bylo zavedeno první antiretrovirotikum zidovudin, nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy (NRTI). Ale jelikož to byl první a doposud jediný preparát, tak v začátcích vykazoval poměrně dost nežádoucích účinků, samostatně použitý do monoterapie nevykazoval takový terapeutický efekt a nemocných stále přibývalo. Zidovudin byl ale ve velkém měřítku využit v roce 1994 k preventivnímu programu u gravidních HIV infikovaných žen ve všech zemích s vyspělou zdravotní péčí. Bylo totiž zjištěno snížení frekvence přenosu HIV z matky na plod z 25,5% na necelých 8% při soustavném podávání zidovudinu. Zidovudin je dnes stále registrovaný a to v kombinaci s lamivudinem, též antiretrovirotikem ze skupiny NRTI. Tyto úspěchy ještě více urychlily výzkum replikačního cyklu HIV a průběhu infekce. Na to přímo navázal zájem o vývoj nových antiretrovirotik. Těch bylo hned několik, například didanosin (uveden 1991), hned rok po něm zalcitabin, následující roky stavudin (1994) nebo již zmíněný lamivudin (1995). Celých 8 let byly k dispozici pouze inhibitory RT, než se v roce 1995 objevil první inhibitor virových proteáz saquinavir. Tím byl položen základní kámen moderní terapie, jelikož probíhající výzkumy prokázaly, že kombinace účinných látek z různých skupin antiretrovirotik výrazně zvyšuje účinnost terapie než při použití jednoho preparátu. Také bylo zjištěno, že úspěšnost terapie lze velmi dobře sledovat pomocí množství virové RNA v krvi (RNA viral load) Touto moderní terapií se o rok později stala HAART terapie (High active antiretroviral therapy), která je dodnes terapeutickým základem HIV infikovaných. HAART je trojkombinační terapie, většinou systémem 2+1, kdy dvě účinné látky jsou ze stejné skupiny antiretrovirotik a třetí patří do jiné skupiny. Ve vážných případech selhání trojkombinační terapie, vzniku rezistence na současnou terapii nebo polyrezistence může být použit MEGAHAART režim, kombinace více než tří preparátů. V současné době se ale místo HAART využívá označení cART (Combinative antiretroviral therapy).

Antiretrovirotika lze podle místa jejich účinku rozdělit do několika skupin. Jsou to nukleotidové a nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI), dále nenukleosidové inhibitory RT (nNRTI), proteázové inhibitory (PI), inhibitory fúze (FI) a inhibitory vstupu (EI).

2.7.2 Nukleotidové a nukleosidové inhibitory RT

NRTI jsou významnou součástí většiny terapeutických režimů. Po prvním uvedeném zidovudinu a dalších zástupcích NRTI byl americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2001 schválen pro klinické použití nukleotidový inhibitor RT tenofovir, známý pod obchodním názvem Viread. Byl objeven významným a světově uznávaným biochemikem prof. Antonínem Holým a stal se jedním z nejvyužívanějších a nejúčinnějších preparátů nejen proti HIV, ale je též schválen pro léčbu chronické hepatitidy typu B. Hned o dva roky později FDA schvaluje další lék emtricitabin, také objevený skupinou vědců kolem prof. Holého. NRTI přímo zasahují do reverzní transkripce a zastavují její průběh, mohou působit kompetitivně, navzájem se často kombinují. Byla ale prokázána vysoká míra vzniku zkřížené rezistence, tudíž nebývá doporučována kombinace více jak 3 NRTI. Díky renální exkreci nemají tak časté interakce s jinými léčivy, která jsou často eliminována jaterní cestou. Častými nežádoucími účinky NRTI je anémie, hepatotoxicita a nefrotoxicita, laktátová acidóza a steatóza, gastrointestinální obtíže, pankreatitida, exantémy a mohou se časem objevit i významné metabolické změny. Ve stádiu klinického testování je několik dalších látek, které jeví prokazatelný účinek i proti viru hepatitidy B (HBV).

2.7.3 Nenukleosidové inhibitory RT

nNRTI se váží k RT v blízkosti nukleosidu, tudíž mají odlišný způsob účinku než NRTI. To umožňuje jejich použití v kombinaci a snižuje pravděpodobnost vzniku rezistence. Kombinace s NRTI zajišťuje velkou supresi RT a proto je využívána jako lék první volby u dosud neléčených HIV pacientů. Jejich eliminace probíhá jaterní cestou, proto je na místě opatrnost při kombinaci s jinými léky. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u NRTI: časté exantémy, hepatopatie, psychické poruchy a při dlouhodobějším užívání zasahují do

metabolismu pacienta. Nadějnými léky jsou nNRTI druhé generace, které mají dobrou účinnost proti rezistentním variantám viru a jsou zařazeny do kategorie záchranných léčiv.

2.7.4 Inhibitory proteáz

PI blokuje štěpení proteinových prekurzorů a tím i kompletaci a zrání virové částice. Ta se tak stává neinfekční. Jejich nasazení do praxe v roce 1996 (Ritonavir) zaznamenalo výrazné zpomalení rozvoje pozdních fází HIV onemocnění a prodloužilo aktivní život nakažených. Některé PI jsou zařazovány i do linie léků první volby. Nevýhodou je jejich významná interakce s jinými léky eliminovanými jaterní cestou (přes 3A4 isoformu CYP 450). Z vedlejších účinků jsou časté průjemy, exantém, nevolnosti a bolesti hlavy, poruchy ledvin, hepatopatie, s ní související hyperbilirubinémie a poruchy metabolismu lipidů, které mohou zapříčinit i vážnější kardiovaskulární změny. Proteázové inhibitory druhé generace jsou v kombinacích s ritonavirem doporučeny pro léčbu pacientů s multirezistencí k PI první generace, ale nejsou doporučeny u pacientů s přidruženou hepatitidou. Nežádoucími účinky PI II. Generace jsou i tak stále průjemy, nevolnosti, časté poruchy jaterních funkcí se zvýšenými hodnotami jaterních enzymů, amylázy a zvýšená lipidémie.

2.7.5 Inhibitory fúze

Zatím stále jediným schváleným (FDA i EMA) inhibitorem fúze je enfuvirtid, peptid T-20, který vazbou na gp41 zabraňuje fúzi viru s cílovou buňkou hostitele. Vzhledem ke svojí nestabilitě v trávicím traktu vyžaduje injekční subkutánní aplikaci. Z toho plynou i nežádoucí účinky v podobě nepříjemných infiltrátů v místě vpichu. Je zařazen do kategorie záchranných léků a podává se pouze u pacientů s vážnou multirezistencí na ostatní běžně používaná antiretrovirotika.

2.7.6 Inhibitory vstupu

Vstup HIV je jako první fáze množení viru zásadním a častým terčem výzkumu nových antiretrovirotik (EI – inhibitory vstupu). Většinou je zacílen receptor CCR5. Vysoce účinnými nízkomolekulárními inhibitory právě receptoru CCR5 jsou aplaviroc, vicriviroc a

maraviroc. Maraviroc byl zatím jako jediný schválen pro klinické využití jak FDA, tak i Evropskou lékovou agenturou (EMA). Ostatní jsou ještě ve fázi testování. Nebyl prokázán antagonismus s ostatními antiretroviroty, ale naopak díky synergickému působení s EI enfuvirtidem se nabízí možnost využití pro záchranou terapii. Za zmínku stojí i testování tzv. CCR5 mikrobicidních inhibitorů, které v testování zatím jeví dobré výsledky jako prostředek pro prevenci přenosu HIV přes vaginální i rektální sliznici.

2.7.7 Inhibitory integráz

Inhibitory integráz jsou schváleny dva léky: raltegravir a dolutegravir. Prvním lékem byl raltegravir, který má vysokou účinnost u multirezistentní HIV pacienty, nevykazuje zkříženou rezistenci s ostatními skupinami antiretrovirotik. Stejně tak i dolutegravir. Oba preparáty jsou používány jen v rámci záchranné terapie u multirezistentních pacientů.

2.7.8 Kombinované preparáty

Terapeutické programy v dnešní době využívají několika kombinovaných preparátů, kde jsou kombinace léčiv spojeny do jedné tablety a pacient ji užívá v přesně daných intervalech. Jedná se o kombinace účinných látek z různých skupin, aby byla zajištěna nízká pravděpodobnost vzniku rezistence. (Staňková 2008, FDA [online], EMA [online])

2.8 Průběh infekce virem HIV

2.8.1 Časná fáze infekce virem HIV

Účinnost infekce závisí na mnoha faktorech, především na vlastnostech konkrétního kmene viru HIV a imunobiologickými vlastnostmi člověka, který přišel do styku s virionem. Pro přenos sexuálním kontaktem jsou podstatné fyziologické bariéry a slizniční imunitní systém. V této fázi hrají významnou úlohu dendritické buňky, které jsou obvykle prvními

imunitními buňkami, jež přijdou do styku s HIV. Ty poté zanesou virus do lymfatických uzlin k T lymfocytům. Membránová molekula na povrchu dendritických buněk DC-SIGN, která fyziologicky umožňuje kontakt dendritických buněk s T lymfocyty, je schopna vázat povrchový virový glykoprotein. Tím je zajištěn prvotní kontakt právě s dendritickými buňkami a jejich využití jako transportního mechanismu do uzlin. Jelikož geny kódující DC-SIGN vykazují jistou míru polymorfismu, tak je možné, že i tato povrchová struktura ovlivňuje vnímavost dendritických buněk k viru HIV. V průběhu epidemiologických studií bylo zjištěno, že účinnost přenosu HIV je zvýšena koinfekcemi pohlavně přenosnými mikrobiálními chorobami. Vysvětlením je výrazná aktivace imunitního systému, která vede ke zvýšené aktivitě imunokompetentních buněk v oblasti brány infekce. Tyto buňky jednak produkují prozánětlivé cytokiny a jednak mohou být samy infikovány HIV.

2.8.2 Primární infekce virem HIV

Virus se v lymfatických uzlinách výrazně namnoží a po dosažení kritické úrovně se začne uvolňovat do krevního řečiště. K této viremické fázi dochází po několika týdnech od prvotního kontaktu s virem. Viremická fáze je ve většině případů provázena klinickými příznaky, které se nazývají stádium primární infekce HIV. Primární infekce po několika týdnech odezní spolu s těmito příznaky. Klinickými příznaky primární infekce připomínají svým průběhem chřipku. Pacienti se cítí výrazně unaveni, pociťují malátnost, bolesti svalů a kloubů, pocení a mají horečky. Navíc často trpí průjmy a zvracením. Někdy se může vyskytnout i vyrážka nebo zvětšené uzliny. Neurologické příznaky se objevují jen vzácně.

Laboratorně lze detekovat vysokou virémii dosahující až milion virů na jeden mililitr. Je zvýšená sedimentace a hodnoty pozitivních reaktantů akutní fáze. V krevním obraze je přítomna lymfopenie a při průkazu subpopulací T lymfocytů téměř vždy snížený počet pomocných CD4 T lymfocytů. Naopak výrazně roste počet cytotoxických CD8 T lymfocytů. V této fázi ještě nejsou vytvořeny specifické protilátky proti HIV viru. K jejich tvorbě dochází až s odstupem po určité době od vymizení klinických příznaků primární infekce. Proto je v této fázi k průkazu infekce nutno použít stanovení přítomnosti proteinu p24 nebo PCR. Faktory přirozené imunity, interferony, NK buňky a právě cytotoxická aktivita CD8 T lymfocytů zajišťují, že v časných fázích infekce je organismus schopen regulovat replikaci viru. To vede k eliminaci viru z krve a vymizení klinických příznaků.

2.8.3 Stádium bezpříznakového nosičství viru HIV

Délka trvání tohoto období je značně individuální, ale obvykle se počítá na roky. U části pacientů může dojít ke zrychlené progresi infekce a rychlejšímu nástupu AIDS. Zde hraje významnou roli opět infekční dávka, virulence a agresivita kmene, ale především vlastnosti imunitního systému konkrétního pacienta. Zrychlení průběhu infekce způsobuje i opakovaná infekce různými kmeny HIV.

Záměrně užívám označení bezpříznakové nosičství HIV namísto celkem hojně užívaného označení latentní fáze. Označení latentní fáze je nepřesné, je jím možno označit toto stádium pouze v souvislosti s klinickým popisem stádia. V tomto stádiu totiž pacient nevykazuje žádné klinické příznaky, samozřejmě kromě laboratorních ukazatelů. V tomto období se virus aktivně replikuje v sekundárních lymfatických orgánech (uzliny, tonsily, slezina apod.) a po několika měsících od infekce množství virové RNA v plasmě od jednoho tisíce do jednoho milionu molekul na mililitr. Poločas existence virionu v plasmě je maximálně 6 hodin a infikované CD4 T lymfocyty mají poločas života 1,6 dne. Denní produkce je nejméně 10^{10} virionů a v průběhu celého roku dojde k asi 140 generačním cyklům viru. Virus HIV aktivně produkuje zhruba 10^7 až 10^8 CD4 T lymfocytů (asi tisícina všech T lymfocytů). Přibližně stonásobek T lymfocytů obsahuje virovou DNA. Vyšší hladina RNA v plasmě vede k větším ztrátám CD4 T lymfocytů a k rychlejší progresi onemocnění. Proto jsou tyto ukazatele, počet molekul RNA v plasmě a počet CD4 T lymfocytů, využívají ke stanovení míry a rychlosti progresu onemocnění a také k určení počátku antiretrovirové terapie. Imunitní systém se snaží o kontrolu replikace viru. Je zajímavé, že přibližně 10% až 15% infikovaných neprogreduje do stádia AIDS. U těchto jedinců je po prodělání primární fáze indukována velice silná a dlouhodobá aktivita pomocných TH1 lymfocytů, které indukují zmnožení cytotoxických virově specifických CD8 T lymfocytů. Aktivitu TH1 lymfocytů indukuje vysoká hladina $INF\gamma$. CD8 T lymfocyty ničí napadené buňky, brání replikaci viru a udržují stabilně nízkou hladinu virémie. To může vyústit až k tomu, že i po deseti letech od infekce má zhruba 5% všech infikovaných normální počet CD4 T lymfocytů a velmi nízkou hladinu virémie.

U většiny nakažených je ale po primární fázi zvýšená aktivita TH2 lymfocytů, které produkcí IL-4 a dalších cytokinů stimulují protilátkovou imunitu. Avšak ani vysoká hladina specifických protilátek nemá potenciál pro regulaci replikace viru, jak tomu je u

neprogredující části nakažených. Naopak TH2 lymfocyty ještě tlumí aktivitu potřebných TH1 lymfocytů

2.8.4 Stádium AIDS

Hladina všech pomocných T lymfocytů klesá přibližně o $0,1$ až $0,2 \times 10^6$ buněk na ml a jakmile klesne počet CD4 T lymfocytů pod $0,2 \times 10^6$ buněk na ml, začne se projevovat imunitní nedostatečnost a nastává fáze AIDS. Stádium AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome, česky syndrom získané imunitní nedostatečnosti) předchází předstupeň zvaný AIDS-Related Complex (ARC), který je charakteristický především lymfadenopatiemi. Prvotní příznaky nastupujícího AIDS jsou časté kandidózy především dutiny ústní a jícnu, u žen i vaginální kandidózy. Dle klinických projevů je možné příznaky stádia AIDS rozdělit do dvou hlavních skupin. Jednak jde o oportunní mikrobiální a virové infekce a druhou skupinou jsou maligní transformace, především Kaposiho sarkom a Non-Hodgkinské lymfomy.

Infekce pacientů s AIDS jsou zapříčiněny nejrůznějšími infekčními agens: bakteriemi, viry, kvasinkami, houbami a plísněmi. Často se jedná o agens, která u zdravého jedince nevyvolají žádné onemocnění, nebo jde jen o běžné nemoci s mírným průběhem. U imunokompromitovaných jedinců ale způsobují závažná onemocnění, která jsou v pokročilém stádiu AIDS smrtelná. Tyto infekce postihují různé orgány. Na rozdíl od zdravých jedinců se manifestují na neobvyklých místech a vykazují mnohem větší agresivitu a charakter rychleji se šířící fulminantní infekce. Často jde o kombinace mnoha agens.

Významným cílem je respirační trakt. V souvislosti s AIDS se často vyskytuje a v osmdesátých letech byla popsána oportunní houbová infekce *Pneumocystis carinii*. Dalším častým agens jsou mykobakterie, především *M. tuberculosis*. U TBC sice převažuje plicní forma, ale časté jsou i mimoplicní tuberkulózy. Následují i mykoplasmata, chlamydie a viry, do značné míry zastoupeny herpes viry. Z houbových infekcí je možno zmínit rod *Aspergillus*.

Dalším častým cílem je gastrointestinální soustava. V podstatě všichni nemocní trpí průjmy a s nimi související malabsorpcí. Střevní sliznice je často postižena cytomegalovirem, často také játra a další orgány. Obecně cytomegalovirové infekce jsou u

pacientů s AIDS časté. Z parazitárních onemocnění se jedná o střevní záněty zapříčiněné lamblie, kryptosporidie, jaterní abscesy zapříčiněné toxoplasmou. Obecně vysoká kachektizace je kromě infekcí způsobena i rozvratem cytokinové rovnováhy a zvýšenou hladinou TNF α , který má kachektizační efekt.

Kůži a podkoží infikují viry a jednobuněčné houby, vytvářejí záněty a tyto afekce jsou pak často napadeny pyogenními bakteriemi, po kterých zůstávají puchýřky. Časté jsou projevy infekce herpetickými viry.

Pacienti s AIDS mívají i časté neurologické potíže. Postižena bývá jak periferní, tak centrální nervová soustava. Periferní nervy bývají často postiženy záněty vedoucí k parézám. CNS často postihují virové meningitidy, zatímco z bakteriálních to mohou být mykobakteria a u hub *Aspergillus*. Poškození mozku zvyšuje i výrazná aktivita mikroglíí, které uvolňují prozánětlivé cytokiny. Cytokiny ovlivňují funkce CNS a proto pacienti v posledních stádiích AIDS trpí tzv. AIDS demencí. (Krejsek et al. 2004)

Krátce se ještě zmíním o druhé skupině přidružených onemocněních - maligních transformacích. Velmi častým je u imunokompromitovaných jedinců Kaposiho sarkom. Jde o cévní nádor manifestující se hlavně na kůži, ale často i v orgánech. V nádorových buňkách lze prokázat herpesvirus (HHV-8). Klinicky se vyvíjí od stadia skvrn přes plaky až po stadium nádoru. Histologicky jsou přítomna tenkostěnná lumen prorůstající snopci kolagenu. Postupně se zmnožují cévy i větvenité endotelové buňky, až se vytvoří celé nádorové uzly tvořené solidními poli větvenitých buněk. Terapeuticky je Kaposiho sarkom málo ovlivnitelný, u imunologicky zdravých jedinců je velmi vzácný, ale u pacientů s AIDS velice agresivní. Taktéž prevalence Non-Hodgkinských lymfomů je u imunokompromitovaných jedinců znatelně zvýšená. Za vznikem některých lymfomů stojí infekce virem Epstein-Baarové (EBV). Za zmínku stojí Burkittův lymfom, běžně se vyskytující endemicky v rovníkové Africe, kde se manifestuje převážně v čelisti a obličejové části, jinak je vzácný. Také se jeho vznik spojuje s infekcí EBV. Ale u pacientů s AIDS se vyskytuje častěji. V histologickém nálezu pozorujeme difuzní uniformní lymfoblastovou infiltraci hustě na sobě nahloučených nádorových buněk s neostrými konturami. Buňky mají málo cytoplasmy, která bývá basofilní. Disperzně rozložené na pozadí z modrých buněk lymfoblastů vytvářejí obraz hvězdného nebe, který je charakteristický právě pro Burkittův lymfom. U imunokompromitovaných je infiltrace uzlin stejně častá jako infiltrace kostní dřeně. Jedná se

sice o vysoce maligní nádor, ale obvykle velmi dobře reaguje na léčbu a prognózy bývají příznivé. (Povýšil et al. 2007)

2.9 Genová terapie HIV

Prvními myšlenkami kolem genové terapie se vědci začali zabývat hned po objevení mutace v genu pro receptor CCR5. Tato mutace zvaná CCR5 delta32 spočívá v deleci 32 bp dlouhého úseku v genu pro receptor CCR5, která znemožní expresi receptoru a membráně buňky a zamezí tak jeho vyžití jako vstupní brány pro HIV virus. První úspěch předurčující využití genové mutace delta32 přišel v roce 2007 v souvislosti s tzv. berlínským pacientem Timothy Brownem. Brown byl HIV pozitivní a současně trpěl akutní myeloidní leukémií. Pro léčbu akutní myeloidní leukémie bylo nutné podstoupit alogenní transplantaci kostní dřeně. Brownův dárce byl homozygotní v mutaci delta32 a po několika letech od transplantace Brown nejevil příznaky nosičství HIV, ani mu nebyla v krvi detekována přítomnost virové RNA (Hutter et al. 2009, Allers et al. 2011). Bohužel nízká frekvence těchto homozygotních jedinců v populaci byla zásadní překážkou pro širší využití tohoto postupu. Také rizika spojená s celým řetězcem úkonů spojených s transplantací kostní dřeně byla vysoká. Především u alogenní transplantace riziko spojené s přijetím cizí tkáně (buněk kostní dřeně). Na základě této úspěšné léčby začaly první pokusy s cílenou terapií proti CCR5. Cílem této terapie bylo od začátku vytvořit buňky mutantní v receptoru z vlastních buněk pacienta. Slepou kolejí byly pokusy s RNA interferencí (Subramanya et al. 2010), jelikož by byla nutná neustálá přítomnost a aktivita siRNA v buňkách. Proto přišlo hlavní využití ZFN pro cílenou mutagenézi. Prvním pokusem s přímou mutagenézí DNA bylo v roce 2005 rozštěpení genu pro CCR5 pomocí technologie ZFN (Mani et al. 2005). Byly prováděny pokusy i na hematopoetických buňkách (Holt et al. 2010, Yao et al. 2012). Vzhledem k tomu že hlavním receptorem pro vstup viru do buněk je právě CCR5 (R5 tropismus), cílil se prvotní výzkum právě na něj. Navíc, když homozygotní delta32 jedinci vykazovali rezistenci k opakovaným infekcím virem HIV, nebo HIV pozitivní heterozygoti vykazovali značně zpomalenou progresi onemocnění (Liu et al. 1996, Eugen-Olsen et al. 1997,) Ale některé HIV viry jsou schopny využívat i CXCR4 receptor (X4 tropismus), zvláště v pozdějších fázích onemocnění, kdy virus vykazuje tzv. duální tropismus. Zhruba v 50 % případů má virus citlivost jak k CCR5, tak i k CXCR4 (Scarlati et al. 1997, Connor

et al. 1997). Proto se po čase začalo uvažovat i nad mutací receptoru CXCR4 jako doplňkovému cílu pro mutagenezi. V roce 2011 byly vytvořeny CXCR4 defektní CD4 T lymfocyty, byly otestovány jako rezistentní vůči X4 tropnímu HIV a také byly otestovány v myších (Wilens et al. 2011).

Významným krokem bylo spojení obou přístupů do jednoho pokusu, kdy byly poprvé použity ZFN pro editaci genů obou chemokinových receptorů, jak CCR5, tak i CXCR4 (Didigu et al. 2014). Pro pokus byly použity lidské buňky linie SupT1, které byly simultánně transfekovány dvojicí ZF nukleáz v několika koncentracích nosného vektoru. Při určité specifické koncentraci bylo dosaženo úspěšnosti mutace obou receptorů 9%. Pro negativní kontrolu byly použity vektory s genem pro GFP protein. Tyto kontroly nevykazovaly žádné změny v expresi receptorů na povrchu buněk. Při testování odolnosti upravených buněk proti infekci HIV byly buňky vystaveny X4 a R5 tropním virům, konkrétně R5 tropním kmenem BaL a X4 tropním kmenem BK132. Buňky byly monitorovány po dobu 42 dní. Během 25 dní vzrostl počet odolných buněk na 96 % až 99 % všech mutovaných, zatímco poměr geneticky upravených buněk ve vzorku bez infekce HIV zůstal stejný. Stejná genová mutace byla provedena i na CD4 T lymfocytech zdravých dárců. Oproti kontrolnímu vzorku byla úspěšnost transfekce 20% pro oba receptory, přičemž nebyl prokázán negativní vliv na životaschopnost buněk. Pro velký význam paměťových CD4 T lymfocytů u HIV infekce byly otestovány i tyto lymfocyty. Po transfekci oběma ZFN a kultivaci po dobu 10 dnů byly T lymfocyty na základě povrchových antigenů CCR7 a CD45RO rozděleny na centrální paměťové a na efektorové paměťové buňky pomocí fluorescenčního cell sorteru s úspěšností 97%. V obou skupinách byla naměřena podobná hladina exprese obou receptorů. Pro měření viability T lymfocytů byly vytvořeny tři skupiny, kontrolní neupravené buňky, druhá buňky se ZFN editovaným CCR5 a třetí s defektními oběma receptory. Poté byly tyto skupiny infikovány oběma kmeny viru. Po uplynutí 32 dnů pouze R5 a X4 defektní byly schopny růstu a ostatní dvě skupiny byly mrtvé. Poměr modifikovaných alel po třech týdnech vzrostl u CCR5 1,8 krát a u CXCR4 1,9 krát. Při simultánní transfekci dvojicí nukleáz může dojít k tomu, že se někde na genomu buňky může najít místo, kde se k sobě naváže jedna podjednotka z každé ZFN a vytvoří tak zlom na nechtěném místě. To se může stát i v případě, kdy zde není 100% homologie. V počítačovém modelu bylo určeno 40 rizikových míst, kde k tomuto nespecifickému štěpení mohlo dojít, ale důkladným měřením v praxi nebyla detekována žádná nechtěná mutace. Pro testování in vivo byly použity

imunodeficientní myši modely. 18 myším, rozdělených do tří skupin odpovídajících třem testovaným skupinám buněk, byla podána infuze $1,8 \times 10^7$ T lymfocytů. Jedna skupina tedy obdržela neupravené buňky, druhá CCR5 defektní a třetí CCR5 i CXCR4 defektní. Po třech týdnech byla jedna polovina ponechána jako kontrolní a druhé polovině myši z každé skupiny podána infuze 5×10^4 nemodifikovaných lymfocytů infikovaných X4 BK132 a v tom samém množství i lymfocyty infikované R5 Bal Kmenem HIV. Zde je třeba upozornit, že i když BK132 kmen využívá receptor CXCR4, může ve velice nízké hladině použít i CCR5 receptor. Po 22 dnech od infekce byly hodnoty CD4 T lymfocytů u R5/X4-ZFN skupiny myši 35 krát vyšší než u myši kontrolních a 100 krát vyšší než u R5-ZFN skupiny. Po 55 dnech tyto rozdíly narostly na 200 násobek. Po usmrcení byly u R5/X4-ZFN skupinky myši nalezeny modifikované lymfocyty ve slezině v zastoupení cca 10%.

Pro autologní přístup je vhodné použít hematopoetické kmenové a progenitorové buňky (HSPC). Zajímavým výsledkem jedné studie založené na použití lidských HSPC bylo výrazné zvýšení účinnosti ZFN z 5 na 25% za přítomnosti aktivátorů protein kinázy A v médiu (Li et al. 2013).

Významným krokem byla studie provedená na dvanácti pacientech na University of Pennsylvania ve Philadelphii (Tebas et al. 2014). Tuto studii lze považovat za první klinické testování využití genové terapie HIV. Šlo o otevřenou a nekontrolovanou studii, z jejichž výsledků vzhledem k nízkému počtu testovaných pacientů, vzhledem k jejich různému stavu imunitního systému a především vzhledem k nenáhodnému výběru pacientů nelze vyvozovat jasné a striktní závěry, jako je běžné u klasických vědeckých pokusů. Základními kritérii pro výběr pacientů byl věk alespoň 18 let a HIV pozitivita, ale ne stádium AIDS. Pacienti museli být ve stádiu avirémie s pravidelným podáváním HAART. Z hlediska genetiky nesměli mít žádné jednonukleotidové polymorfismy v oblasti působení ZFN na genu pro CCR5. Nesměli být infikováni X4 tropním nebo duálně tropním HIV, ani mít infekci viry hepatitidy B a C. Nesměli být na terapii maravirocem ani imunosupresivy. Kompletní protokol studie byl schválen nezávislou etickou komisí a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas a byli pod pravidelným dohledem.

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle množství CD4 T lymfocytů v cirkulaci. Skupina 1 s více než 450 buňkami na mikrolitr, skupina 2 s 200 – 500 buňkami na mikrolitr a minimálně 2 roky stabilizovaní na HAART, přičemž hranice stádia AIDS je právě 200 buněk na mikrolitr. Pacientům byly odebrány CD4 T lymfocyty, ty byly modifikovány ZFN

pro CCR5 receptor a poté byly injekčně podány zpět pacientům, v množství $0,5 - 1 \times 10^{10}$ s průměrnou frekvencí delece v genu pro receptor $21,2 \pm 5,7\%$ (od 10,9 do 27,7 %).

Po 24 hodinách od infuze buněk jeden pacient ze skupiny 2 převezen na pohotovost z důvodu nežádoucích příznaků horečky, bolesti kloubů a zad. Jinak byly u ostatních pacientů příznaky většinou mírné a především v reakci na látky obsažené v infuzi.

Jeden týden po podání infuze u pacientů stoupl obsah CD4 T lymfocytů v krvi z $1,27 \times 10^3$ buněk na mikrolitr na $2,33 \times 10^3$ buněk na mikrolitr. Během šesti týdnů klesl obsah na $1,7 \times 10^3$. Vzestup CD8 T lymfocytů byl po infuzi v prvním týdnu pouze mírný ze 435 na 582 buněk na mikrolitr. Vzrostl ale počet CD4 buněk, a sice ze 448 na 1517 buněk na mikrolitr. CD4 T lymfocyty se zvýšily u všech pacientů, ale pro bližší zkoumání bylo vybráno jen 7 s nejvyšším nárůstem. Medián nárůstu byl 1201 ± 1350 buněk na mikrolitr za první týden, postupně klesal na 615, ale počet zůstal nad původní hladinou o 256 buněk na mikrolitr. Střední hodnota poměru CD4/CD8 byla na počátku 0,99, v prvním týdnu v souvislosti s infuzí vzrostla na 2,62 a po 36 týdnech klesl na 1,14. Počty modifikovaných CD4 T byly vyjádřeny střední hodnotou 250 buněk na mikrolitr, což představuje 8,8% mononukleárních buněk periferní krve a 13,9% z cirkulujících CD4 T lymfocytů. Počet modifikovaných buněk v cirkulaci klesal relativně pomalu, s poločasem života 48 týdnů a dobou sledování pacientů 64 týdnů. U jednoho pacienta byla naměřena hodnota 13 buněk na mikrolitr i po 42 měsících od infuze. U jedenácti pacientů byla provedena biopsie rektální sliznice, jejíž zkoumání ukázalo přítomnost průměrně 0,8% modifikovaných buněk ze všech mononukleárních buněk.

Pacienti ze skupiny 1 podstoupili 12 týdenní přerušení HAART 4 týdny od infuze modifikovaných buněk. Na začátku přerušení terapie byla hladina RNA v krvi u všech šesti nedetekovatelná. Ta byla překročena a virová RNA byla detekovatelná u čtyř ze šesti pacientů dva až čtyři týdny od přerušení a vrchol hladiny RNA byl šest až osm týdnů od přerušení. U dvou pacientů byla tato fáze výzkumu předčasně zastavena. U jednoho došlo k vysokému nárůstu RNA v krvi nad 100 000 kopií na mikrolitr, což bylo jedno z hlavních kritérií pro předčasné nasazení HAART. U druhého pacienta byl zjištěn vysoký nárůst virémie. U zbylých čtyř pacientů došlo k poklesu virové RNA průměrně o 1,2 řádu. Jeden pacient, který měl ještě před léčbou hladinu RNA na 165 000 kopií na mikrolitr a byl později určen jako heterozygotní pro delta32 mutaci, nevykazoval nárůst hladiny RNA, ba naopak hladina RNA klesala za celých šest týdnů až na 6247 kopií RNA na mikrolitr. Poté klesla i pod hranici

detekovatelnosti. Měnil se také počty cirkulujících CD4 T lymfocytů z původních 1849 na 1711 lymfocytů v mikrolitru po dvou týdnech od přerušení. Po čtyřech týdnech hladina lymfocytů klesla na 1095 buněk na mikrolitr a na konci přerušení HAART byla 872 buněk na mikrolitr. Střední hodnota poklesu byla 237 ± 315 lymfocytů na mikrolitr. Podobně i počet modifikovaných CD4 T lymfocytů klesl z původních 259 na 126 buněk na mikrolitr s poklesem 126 ± 76 lymfocytů na mikrolitr. CD8 T lymfocyty vzrostly z 605 na 846 buněk na mikrolitr za celou dobu přerušení HAART. Na základě měření virové DNA v mononukleárních buňkách periferní krve pomocí digitální kapkové PCR, která je přibližně stokrát přesnější než běžná PCR, se během přerušení HAART u pěti pacientů hladina DNA v buňkách nezvýšila, u jednoho narostla. Po opětovném nasazení HAART se u všech pacientů vrátila zpět na původní hladinu. Cílem této studie bylo především prokázat bezpečnost metody, ale také se ukázal protektivní efekt editace genomu lymfocytů proti HIV infekci. Pokles modifikovaných lymfocytů byl nižší a především životnost nejen v cirkulaci, ale i v rektální sliznici byla delší. Taktéž pracovníky odhadovaný celkový počet modifikovaných lymfocytů v celém těle se pravděpodobně příliš neměnil. Ale jde jen o odhad.

Dalším přístupem pro využití programovatelných nukleáz je editace přímo genomu buněk, a sice cílení na provirovou DNA v genomu. V roce 2011 byla provedena mutace v pol genu provirové DNA a posléze i jiných částí proviru, kde se podařilo vyštěpit až 80 % provirové DNA (Wayengera 2011). Později bylo provedeno štěpení v 3' a 5' LTR oblastech v buněčných kulturách (Qu et al. 2013).

Pro editaci genomu v lymfocytech se systém TALEN téměř nevyužívá, především pro nadměrnou velikost konstruktů a jeho obtížný transport do jádra. Jelikož technologie TALEN a ZFN jsou si podobné, tak ZFN jsou již vyzkoušené a jejich nedostatky už nejsou překážkou. Systém CRISPR je relativně nový a nabízí zajímavou alternativu k ZFN. Jelikož cíl editace genomu je většinou shodný s použitím ZFN, jde především o snadnost a cenu přípravy, kde v obecném použití vede systém CRISPR, ale také frekvence možných nežádoucích necílených štěpení, což bude hlavním kritériem úspěšnosti dalších výzkumů.

3. Diskuse

Dle zpráv WHO z roku 2014 je na celém světě infikováno kolem 36,9 milionu lidí, z toho 2,6 milionu dětí mladších patnácti let. Jen za minulý rok 2014 na světě přibyly dva miliony nakažených, z toho 220 tisíc dětí. Na nemoci z AIDS zemřelo 1,2 milionu lidí, z toho 150 tisíc dětí. Antiretrovirovou terapii podstupovalo v roce 2013 11,7 milionu lidí, nejvíce na území Afriky, 9,1 milionu lidí. Pořád jde celosvětově pouze o 36% všech infikovaných. Za rok 2014 bylo do terapeutických programů začleněno 1,9 milionu lidí, což je doposud největší číslo v historii. V Evropě je tento poměr druhý nejmenší, přibližně 22%, hůře je na tom už pouze oblast afrického pobřeží Středozemního moře a Blízkého východu s 10%. Pokud jde o terapii pro děti, tam je celosvětový průměr pouze 22%. Zde jsou ještě velké rezervy především v distribuci léčiv a dodržování jejich užívání. Naopak příznivějších čísel dosahuje poměr gravidních žen na terapii zabraňující přenos HIV na plod, kterých je 73%. Na těchto číslech, především ohledně počtu lidí v terapeutických programech, může mít zásluhu celá řada vlivů. Samozřejmě jedním z hlavních problémů je stále ještě vysoká cena léčivých přípravků. Dalším faktorem je ztížená distribuce léčiv především v Africe, na Blízkém východě a v dalších odlehlejších oblastech světa a v rozvojových zemích. Naštěstí moderní kombinované přípravky, které jsou schváleny jak FDA, tak i EMA, jsou často ve formě jedné jediné tablety. Otázkou ovšem zůstává dostupnost těchto nejmodernějších preparátů mimo zem vyspělého „západního“ světa a samozřejmě jejich vysoká cena. Pro zdárný průběh terapie je důležité striktně dodržovat dávkování a intervaly v užívání léčiv, což značně souvisí s mentalitou obyvatelstva, jejich informovanosti o problematice, přenosu, terapie a života s HIV, jako i o komunikačních a sociálních bariérách a s dalšími faktory. Celá řada institucí jako je například OSN, Světová banka, UNICEF i WHO vynakládají nemalé úsilí a peníze do terapeutických programů, do prevence a osvěty ohledně infekce HIV.

Co se týče České republiky a preventivních programů, rád bych zmínil souvislost s programy zaměřenými na omezení užívání drog, především s protidrogovými nízkoprahovými a substitučními centry, nejen ve světě, ale i u nás. Především centra metadonové substituce, kde je lidem závislým na užívání opiátů, hlavně heroinu a metamfetaminu, podáván orální cestou syntetický substituční preparát metadon. Významnou zásluhu na protidrogové a tím pádem i HIV prevenci mají MUDr. Jiří Presl a PhDr. Ivan Douda, zakladatelé projektu Drop In, střediska pro prevenci a léčbu drogových závislostí.

Protidrogová centra jsou dnes minimálně v krajských městech běžná. S užíváním drog souvisí i terénní programy výměny použitých injekčních stříkaček a jehel za nové.

Neméně důležitá je správná informovanost veřejnosti. Prevence je totiž stále nejzásadnější z hlediska ochrany proti nákaze HIV. Bohužel se v posledních letech na prevenci často zapomíná. Klesá informovanost obyvatel, především v rizikových skupinách, ohledně preventivních programů, rizik nákazy a ochrany před nákazou. V tomto ohledu zaostává i vedení našeho státu. Podle vyjádření ministra zdravotnictví ČR Svatopluka Němečka zaznamenané v tiskové zprávě zveřejněné 19. 11. na stránkách ministerstva zdravotnictví bylo financování preventivních programů podhodnocené a na dotace pro různé zainteresované organizace šly v posledních letech jen necelé tři miliony korun ročně. Ještě pro tento rok 2015 ministerstvo uvolnilo 11 milionů a pro příští rok už to má být 19 milionů. Mají být otevřena další AIDS centra tak, aby rovnoměrně pokryla celou republiku. S nízkou podporou státu na prevenci proti infekci může souviset i strmější nárůst za posledních 12 až 13 let. Z výroční tiskové zprávy o výskytu a šíření HIV vydané Národní referenční laboratoří SZU pro rok 2014 zveřejněné na stránkách SZU je zřejmé, že do roku 2002 se počet nově zjištěných nakažených pohyboval v rozmezí 30 až 62 případů, přičemž v roce 2003 začal výrazný vzestup a od roku 2012 počet nově nakažených pokaždé přesáhl hranici dvou set. Dle měsíční zprávy Národní referenční laboratoře SZU bylo ke dni 30. 9. za rok 2015 dosud zjištěno 185 nově nakažených. Většinu, téměř 70%, ze všech 232 nově zjištěných nakažených, tvořil přenos HIV za rok 2014 homosexuální nebo bisexuální pohlavní styk, 19% heterosexuální styk a 6,5% injekční uživatelé drog. Nově infikovaných bylo 209 mužů a 23 žen. Tato čísla vyjadřují pouze zjištěné nákazy, reálný počet nakažených může být vyšší vzhledem k tomu, že dle Národní referenční laboratoře bylo provedeno 1 309 355 vyšetření, která zahrnují i screening dárců. Věřme, že finanční podpora státu bude efektivně využita a tato čísla nebudou již tak znepokojivá.

Na narůstajících počtech nově nakažených a nízké podpoře prevence je závislá i informovanost obyvatelstva o farmakoterapeutických možnostech. Obyvatelé a především rizikové skupiny se mohou z médií dozvídat o nových účinnějších preparátech na infekci HIV, ale mohou jim unikat zásadní informace o použití léčiv. Především antiretrovirová terapie nedokáže infekci vyléčit, dokáže pouze zmírnit progresi onemocnění tím, že zabráňuje viru HIV množit se v cílových buňkách organismu. Nedokáže ale HIV infekci, která je uložena ve formě provirové DNA, z organismu odstranit. Má spoustu vedlejších

účinků a u některých pacientů mohou být nežádoucí účinky tak závažné, že jsou důvodem pro zastavení terapie. I přes všechna pozitiva není farmakoterapie plným řešením proti infekci HIV. Tím by se v budoucnu mohla stát genová terapie. Vzhledem k tomu, že programovatelné nukleázy jsou využívány teprve pár let, tak je masivní využití geneticky upravených buněk pro pacienty hudbou daleké budoucnosti. Bude třeba najít vhodný, účinný a bezpečný způsob terapie. Prozatím první klinický test pracoval s upravenými zralými lymfocyty. Toho ale nelze využít pro jednorázový terapeutický zákrok, který by nahradil všechny kmenové a progenitorové buňky kostní dřeně za buňky rezistentní vůči HIV. Nadějně by se mohlo zdát využití programovatelných nukleáz pro excizi provirové DNA přímo z genomu buňky. Hlavní otázkou ale je, jak zajistit excizi skutečně v každé buňce organismu. Velmi složité by bylo zajistit distribuci vektoru s genem pro nukleázu do všech postižených buněk, aby nedošlo k nadměrné toxicitě nebo vyvolání imunitní odpovědi proti vektoru. V současné době by se zdála jako jednodušší varianta transplantace kostní dřeně. Tak jako je tomu u léčby nádorových onemocnění krve. Transplantace ale s sebou nese vysoká rizika pro pacienta související s radiační likvidací původní kostní dřeně, následující fází, kdy je pacient bez bílých krvinek náchylný k infekcím, které by u zdravého člověka byly banalitou, až po vysoké riziko odmítnutí transplantátu. Možnou variantou by mohla být částečná transplantace upravených buněk kostní dřeně spojená s cílenou likvidací hematopoetických buněk s normálním CCR5, popř. CXCR4 receptorem. Tedy podobným způsobem, jakou je dnes moderní cílená léčba nádorových onemocnění, laicky nazývaná biologická léčba. Každopádně významným krokem jsou testy na myších modelech a velmi významným první testování upravených buněk na HIV pozitivních pacientech.

Doufejme, že další výzkumy zabývající se genovou terapií přinesou žádané výsledky a že pomyslný štafetový kolík v léčbě HIV převezme od farmakoterapie právě genová terapie. Myslím si, že nikdo si netroufne odhadovat, za jak dlouho to nastane. Když se podíváme do minulosti, tak například v souvislosti s nádorovými onemocněními a jejich léčbou znamenala pro pacienta diagnóza „rakovina“ jistou a dost často i rychlou smrt a dnes máme na některé nádory již několik let na trhu cílenou léčbu, hormonální léčbu nebo vyspělé možnosti radioterapie a další postupy. Navíc když možnosti výzkumu na nejruznějších úrovních ovlivnění viru jdou neuvěřitelnou rychlostí dopředu.

4. Závěr

Programovatelné nukleázy představují velkou naději pro genovou terapii HIV. Prozatimní léčba dokáže s většími či menšími úspěchy potlačit příznaky infekce, dokáže zpomalit průběh onemocnění. Nedokáže ale nakaženého zcela vyléčit a ani nezabrání přenosu infekce na zdravého jedince. Na několika příkladech z pokusů editace genomu buněk a na klinickém případě mutace delta 32 byla prokázána jasná souvislost mezi defektním pomocným receptorem a neschopností viru buňku napadnout. Velké naděje se vkládají do ZFN vzhledem k tomu, že byly již několikrát úspěšně vyzkoušeny, a dále pak do nejnovější technologie CRISPR. Tyto metody jsou předurčeny také pro léčbu jiných virových onemocnění, kde dochází k integraci do genomu hostitele, jako třeba virová hepatitida B.

5. Seznam zkratek

| | |
|----------------|---|
| AIDS | acquired immune deficiency syndrome |
| AMK | aminokyselina |
| ARC | AIDS related complex |
| ATP | adenosintrifosfát |
| bp | base pair |
| CA | capside |
| cART | combination antiretroviral therapy |
| Cas | CRISPR associated |
| Cascade | CRISPR-associated complex for antiviral defense |
| CD | cluster of differentiation |
| CDK | cyklin dependentní kináza |
| cDNA | complementary DNA |
| CNS | centrální nervová soustava |
| crDNA | CRISPR DNA |
| CRISPR | Clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| crRNA | CRISPR RNA |
| CYP 450 | cytochrom P450 |
| DC-SIGN | dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EBV | Epstein Baar virus |
| EI | entrance inhibitor |
| EMA | European Medicines Agency |
| EMSA | electromobility shift assay |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FI | inhibitor fúze |
| HAART | high active antiretroviral therapy |
| HBV | hepatitis B virus |
| HGT | horizontal gene transfer |

| | |
|-------------------------------|---|
| HHV | human herpes virus |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HLA | human leucocyte antigen |
| HSPC | Hematopoetic stem and progenitory cells |
| ICAM | intercellular adhesion molecule |
| INFγ | interferon γ |
| LTR | long terminal repeats |
| MA | matrix |
| MHC | major hstocompatibility complex |
| mRNA | messenger RNA |
| NC | nucleocapside |
| NK | natural killer |
| NLS | nuclear localisation signal |
| NMR | nuclear magnetic resonantion |
| nNRTI | non nucleoside rverse transcriptase inhibitor |
| NRTI | nucleoside reverse transcriptase inhibitor |
| PAM | protospacer adjacent motif |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PI | protease inhibitor |
| RNA | ribonucleic acid |
| RRE | Rev response element |
| RT | reverzní transkriptáza |
| RVD | repeat variable disresidue |
| siRNA | short interference RNA |
| TAL | transcription like effector |
| TALEN | transcription like effector nuclease |
| TAR | trans activation response |
| TBC | tuberkulóza |
| TF | transkripční faktor |
| TH | T helper (lymfocyte) |
| TNFα | tumor necrosis factor α |
| tracrRNA | trans activating CRISPR RNA |
| ZF | zinc finger |
| ZFN | zinc finger nuclease |

6. Seznam literatury

- Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. 76(5):853-64.
- Allers K, Hutter G, Hofmann J, et al. (2011). Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood* 117:2791-2799.
- Ashorn P, McQuade TJ, Thaisrivongs S, Tomasselli AG, Tarpley WG, Moss B. (1990). An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(19):7472-6.
- Bartel DP, Zapp ML, Green MR, Szostak JW. (1991). HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell*. 67(3):529-36.
- Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. (1994). HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity*. 1(5):373-84.
- Berg JM, (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 85(1):99-102.
- Boch J, Bonas U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol*. 48:419-36.
- Bryant M, Ratner L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(2):523-7.
- Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. (1990). Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*. 249(4976):1555-8.
- Capon DJ, Ward RH. (1991). The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 9:649-78.

- Carroll D, Morton JJ, Beumer KJ, Segal DJ. (2006). Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nat Protoc.* 1(3):1329-41.
- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, and Voytas DF. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acid Res.* 39(12): e82.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 186(2):757-61.
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR (1997) Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1–infected individuals. *J Exp Med* 185: 621–8.
- Didigu CA, Wilen CB, Wang J, et al. (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood* 123(1):61-69.
- Eugen-Olsen J, Iversen AK, Garred P, et al. (1997). Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 11:305-310
- European Medicines Agency [vyhledávání v online databázi] [cit. 27. 10. 2015] [naposledy viděno 6. 12. 2015] dostupné z: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- Fanale-Belasio E1, Raimondo M, Suligo B, Buttò S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.* 46(1):5-14.
- Felber BK, Drysdale CM, Pavlakis GN. (1990). Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J Virol.* 64(8):3734-41.

- Franke EK, Luban J. (1996). Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology*. 222(1):279-82.
- Food and Drug Administration U.S. [online databáze], Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection [edit. 10. 8. 2015] [cit. 27. 10. 2015] dostupné z: <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>
- Gaj T, Gersbach CA and Barbas CF III. (2013). ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31(7): 397–405.
- Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. (1995). HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*. 83(4):569-76.
- Gonzalez B, Schwimmer LJ, Fuller RP, Ye Y, Asawapornmongkol L, and Barbas CF. III. (2010). Modular System for the Construction of Zinc-Finger Libraries and Proteins. *Nat Protoc.* 5(4):791-810.
- Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(15):5781-5.
- Harrich D, Ulich C, Gaynor RB. (1996). A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol.* 70(6):4017-27.
- Harrison GP, Lever AM. (1992). The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol.* 66(7):4144-53.
- Heguy, A. (1997). Inhibition of the HIV Rev transactivator : a new target for therapeutic intervention. *Front Biosci* 2:d283-97.
- Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, et al. (2010). Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 28:839–847.

- Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, et al. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360: 692–8.
- Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 331(6153):280-3.
- Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*. 63(9):3708-13.
- Klug A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* 79:213–231.
- Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie, Hradec Králové : Nucleus HK 2004, s. 941. ISBN 80-86225-50-X*
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393(6686):648-59.
- Lamb BM, Mercer AC, Barbas CF III. (2013) Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucl. Acids Res.* 41 (21): 9779-9785.
- Landau NR, Warton M, Littman DR. (1988). The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature*. 334(6178):159-62.
- Lapadat-Tapolsky M, De Rocquigny H, Van Gent D, Roques B, Plasterk R, Darlix JL. (1993). Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic Acids Res.* 21(4):831-9.
- Lee MS, Gippert GP, Soman KV, Case DA, Wright PE. (1989). Three dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science*. 245(4918):635-7.
- Lewis P, Hensel M, Emerman M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* 11(8):3053-8.

- Li L., Krymskaya L, Wang J, Henley J, Rao A, Cao LF, Tran CA, Torres-Coronado M, Gardner A, Gonzalez N, et al. (2013). Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases. *Mol. Ther.* 21:1259–1269.
- Liu Q, Segal DJ, Ghiara JB, and Barbas CF. III (1997). Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(11): 5525–5530.
- Liu R., Paxton W.A., Choe S., Ceradini D., Martin S.R., Horuk R., MacDonald M.E., Stuhlmann H., Koup R.A., Landau N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 86:367–377.
- Luria S, Chambers I, Berg P. (1991). Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(12):5326-30.
- Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science.* 335(6069):716-9.
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature.* 338(6212):254-7.
- Mani M, Kandavelou K, Dy FJ, Durai S, Chandrasegaran S. (2005). Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335:447–457.
- Miller J, McLachlan AD, and Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4(6): 1609–1614.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* 29(2):143-8.

- Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB. (1994). The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med.* 179(1):101-13.
- Nakaseko Y, Neuhaus D, Klug A, Rhodes D. (1992). Adjacent zinc-finger motifs in multiple zinc-finger peptides from SWI5 form structurally independent, flexibly linked domains. *J. Mol. Biol.* 228(2):619-36.
- Neuhaus D, Nakaseko Y, Schwabe JWR, Klug A. (1992). Solution structures of two zinc-finger domains from SWI5 obtained using two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy: A zinc-finger structure with a third strand of β -sheet. *J. Mol. Biol.* 228(2):637-51.
- Parkin NT, Chamorro M, Varmus HE. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol.* 66(8):5147-51.
- Pavletich NB, Pabo CO (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science.* 252(5007):809-17.
- Paxton W, Connor RI, Landau NR. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol.* 67(12):7229-37.
- Povýšil C, Šteiner et al. Speciální patologie, druhé doplněné a přepracované vydání, Praha : Vydavatelství Galén a Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2007, s. 430, Editor PhDr. Lubomír Houdek (Galén), IBSN 978-80-7262-494-2 (Galén), IBSN 80-246-1442-7 (Karolinum)
- Qu X, Wang P, Ding D, Li L, Wang H, Ma L, Zhou X, Liu S, Lin S, Wang X, et al. (2013). Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res.* 41:7771–7782.
- Richter C, Chang JT, and Fineran PC. (2012) Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. *Viruses.* 4(10): 2291–2311.

- Robinson HL. (2002). New hope for an aids vaccine. *Nature Reviews Immunology* 2, 239-250.
- Ross TM, Oran AE, Cullen BR. (1999). Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol.* 9(12):613-21.
- Roy S, Delling U, Chen CH, Rosen CA, Sonenberg N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4(8):1365-73.
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA, Rosen CA. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* 63(1):1-8.
- Sanjana NE, Cong L, Yang Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, and Zhang F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc.* 7(1):171-92.
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, et al. (1997) In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3: 1259–65.
- Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.* 2(3):338-42.
- Skowronski J, Parks D, Mariani R. (1993). Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J.* 12(2):703-13.
- Southgate CD, Green MR. (1991). The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev.* 5(12B):2496-507.
- Staňková M, (2008) Novinky v antiretrovirové terapii HIV/AIDS infekce. *Interní Med.* 10(11): 498–501

- Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. (1987). The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 20-26;328(6132):728-30.
- Subramanya S., Kim S.S., Manjunath N., Shankar P. (2010). RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment: Synthetic siRNA or vector-based shRNA? *Expert Opin. Biol. Ther.* 10:201–213.
- Tebas P1, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 370(10):901-10.
- Tiley LS, Madore SJ, Malim MH, Cullen BR. (1992). The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence. *Genes Dev.* 6(11):2077-87.
- Vodicka MA, Koepf DM, Silver PA, Emerman M. (1998). HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* 12(2):175-85.
- Wayengera M. (2011). Proviral HIV-genome-wide and pol-gene specific zinc finger nucleases: Usability for targeted HIV gene therapy. *Theor. Biol. Med. Model.* 8:e26.
- Wilen C.B, Wang J, Tilton JC, Miller JC, Kim KA, Rebar EJ, Sherrill-Mix SA, Patro SC, Secreto AJ, Jordan AP, et al. (2011) Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog.* 7:e1002020.
- Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol.* 66(12):7193-200.
- World Health Organisation [online] [naposledy viděno] 6. 12. 2015 dostupné z: www.who.int/hiv/en
- Wright DA, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, Winfrey RJ, Hirsh AS, Eichinger M, Fu F, Porteus MH, Dobbs D, Voytas DF, Joung JK. (2006). Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly. *Nat Protoc.* 1(3):1637-52.

- Yao Y, Nashun B, Zhou T, Qin L, Qin L, Zhao S, Xu J, Esteban M.A, Chen X. (2012). Generation of CD34+ cells from CCR5-disrupted human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum. Gene Ther.* 23:238–242.
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 61(2):213-22.
- Zapp ML, Green MR. (1989). Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature.* 342(6250):714-6.