

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

v letošním roce jsme vstoupili již do 26. roku působení naší společnosti a tímto číslem zahajujeme i 26. ročník našeho bulletinu Biopropect. Doufáme, že tento náš časopis nás bude i nadále vhodně informovat o zajímavých oblastech biotechnologií a přiblíží nám i ty oblasti, v nichž sami aktivně nepracujeme. Uvítáme Vaše příspěvky i návrhy, o jaká témata byste měli zájem.

Ve volbách do nové Rady naší společnosti všichni hlasující členové podpořili navrženou kandidátku. Členové zvolení do Rady Vám děkují za projevenou důvěru a vynasnaží se, aby naše společnost byla nejméně tak úspěšná jako dosud. Jak víte, každé 3 roky pořádáme ve spolupráci s VŠCHT Praha a našimi švýcarskými partnery mezinárodní biotechnologické symposium. Po dohodě s nimi se bude tato akce konat příští rok opět v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích pod názvem „BioTech 2017 & 7<sup>th</sup> Czech-Swiss Symposium“, a to v termínu 13. – 17. června 2017. Předpokládáme, že symposium proběhne v podobném tematickém zaměření a rozsahu jako symposium, které se konalo v roce 2014. Podrobné informace o programu a příležitostech pro sponzory a vystavovatele jsou k dispozici na webových stránkách <http://www.biotech2017.cz>. Informace o předchozím ročníku konference včetně kompletní „Book of Abstracts“ jsou stále k dispozici na adrese <http://www.biotech2014.cz>. Vzhledem k tomu, že naše společnost nepořádá pravidelné sjezdy jak je běžné u většiny společností, byli bychom velmi rádi, kdyby tato mezinárodní akce je mohla do určité míry nahradit. Uvítali bychom, kdyby většina našich členů se této akce zúčastnila. Snažíme se i např. velmi nízkým konferenčním poplatkem, který je prakticky poloviční vzhledem k podobným akcím, tuto účast umožnit. Těšíme se, že nám pomůžete i s propagací symposia doma i v zahraničí a s vyhledáváním sponzorů. Všem dobrovolným spolupracovníkům poskytneme, po vzá-

jemné dohodě, benefity ve snížení či odpuštění kongresového poplatku.

Podrobnější informace o programu, registraci, poplatcích a sponzorských příležitostech naleznete na <http://www.biotech2017.cz>.

V letošním roce probíhá celá řada zajímavých biotechnologických akcí. Informace o mnohých z nich naleznete na webových stránkách EFB (European Federation of Biotechnology) [www.efb-central.org](http://www.efb-central.org). Chtěli bychom Vám zejména připomenout, že v době od 3. do 6. července 2016 se bude konat v polském Krakově 17<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology (ECB 2016). Na programu je 25 symposií, která prakticky pokrývají „všechny barvy biotechnologií“.

Jistě jste již všichni slyšeli, že se dnes hovoří o tom, že jsme na prahu čtvrté průmyslové revoluce. Průmysl a ekonomika procházejí rozsáhlými změnami vyvolanými zaváděním informačních technologií a systému umělé inteligence do výroby, služeb a dalších odvětví hospodářství. Na tyto trendy má v českém prostředí reagovat „Národní iniciativa Průmysl 4.0“ představená ministerstvem průmyslu a obchodu v r. 2015 a navazující na dokument německé spolkové vlády (2013), který vycházel z konceptu představeného na hanover-ském veletrhu v r. 2011 (viz Technický týdeník z 1. 3. 2016). V této čtvrté průmyslové revoluci mají hrát významnou úlohu i biotechnologie. Proto mezi „klíčovými technologiemi“ (KETs či Key Enabling Technologies) jsou mezi projekty financovaných EU v programu Horizont 2020 i biotechnologická témata (<http://bit.ly/1mCRO2X>, [www.czelo.cz](http://www.czelo.cz))

Přejeme Vám příjemné počtení článků, které jsme pro Vás v tomto čísle vybrali.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipová

Cílem činnosti Biotechnologického ústavu AV ČR, v. v. i. je základní výzkum v oblasti molekulárně biologických věd na špičkové úrovni a výhledově převod biotechnologických metod a molekulárních nástrojů k diagnostice a léčbě patologického stavu buňky do humánní a veterinární medicíny, případně dalších důležitých oblastí lidské činnosti.



Pro rozvoj ústavu je důležité jeho zapojení do projektu BIOCEV ([www.biocev.eu](http://www.biocev.eu)), společného projektu šesti ústavů Akademie věd ČR (Ústav molekulární genetiky, Biotechnologický ústav, Mikrobiologický ústav, Fyziologický ústav, Ústav experimentální medicíny a Ústav makromolekulární chemie) a dvou fakult Univerzity Karlovy v Praze (Přírodovědecká fakulta a 1. Lékařská fakulta), jehož cílem je realizace vědeckého centra excelence v oblastech biotechnologií a biomedicíny.

Finance byly poskytnuty z Evropského fondu regionálního rozvoje, prostřednictvím Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

Ústav se podílel na přípravě projektu, který byl v realizační části ukončen ke konci roku 2015.

**V lednu 2016 se ústav přestěhoval do nové budovy centra BIOCEV** ve Vestci a je zapojen do dvou z pěti výzkumných programů centra. Chceme plně využít tuto příležitost k produkci špičkových vědeckých výsledků, které budou převedeny do klinické praxe.

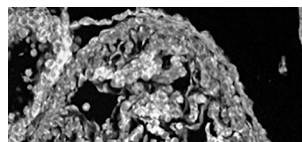


### Výzkumný program 3: Strukturální biologie a proteinové inženýrství

Cílem programu 3 je výzkum nových, biotechnologicky, diagnosticky a medicínsky zajímavých biomolekul, proteinů a nukleových kyselin, které mohou být připraveny metodami molekulární biologie a proteinového inženýrství.

Pochopení struktur studovaných molekul a jejich vzájemná interakce může pomoci v modifikaci jejich bio-

logických aktivit a může být použita v diagnostice, jako léčivo nebo jiné materiály.



### Výzkumný program 5: Vývoj léčebných a diagnostických postupů.

Sjednocujícími prvky výzkumného programu 5 jsou

studium patologických stavů buňky, identifikace příčin těchto stavů, změny expresního profilu studovaných genů, detekce změn v lokalizaci a modifikaci určitých proteinů a identifikace dalších molekul ve vztahu k indukci patologie.

Cílem programu je vývoj postupů pro prevenci onemocnění, příprava nových metod pro monitorování a diagnostiku onemocnění a vývoj nástrojů pro molekulární terapii doprovodných patologických stavů. Ústav dále v centru BIOCEV odpovídá za dvě servisní pracoviště – Centrum molekulární struktury a Kvantitativní a digitální PCR.

**Centrum molekulární struktury** poskytuje komplexní přístup ke studiu prostorové struktury, funkce a biofyzikálních vlastností biologických molekul.

**Kvantitativní a digitální PCR** se specializuje na poskytování PCR v reálném čase (RT-qPCR) a dalších služeb a organizuje kurzy s touto tematikou.

Více informací ([www.ibt.cas.cz](http://www.ibt.cas.cz))

Jana Pěkníková, únor, 2016

# FOSFATIDYLINOSITOL-4-FOSFÁT: REGULACE TRANSPORTU V BUŇCE

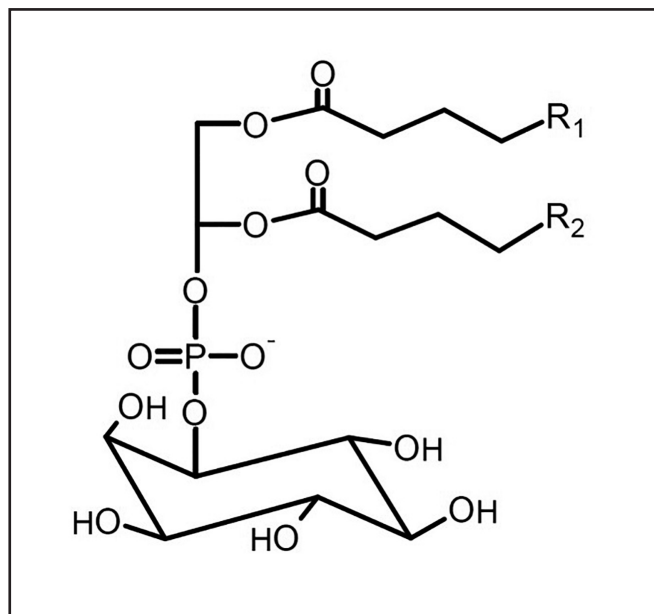
Anna Dubánková, Evžen Bouřa

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.; dubankova@uochb.cas.cz, boura@uochb.cas.cz

## Úvod

### Důležitá úloha fosfatidylinositolu

Fosfatidylinositol (na obr. 1) je glycerofosfolipid plasmatických membrán eukaryotních buněk. Fosfatidylinositoly mají na třetím uhlíku přes fosfátovou skupinu navázaný cyklický alkohol inositol. Na základě fosforylace hydroxylových skupin inositolového kruhu dokáže buňka rozlišit jednotlivé typy membrán. Na cytosolové straně membrány je produkováno sedm různých fosfoinositidů, jejichž množství a přesná lokalizace je určena aktivitou fosfatidylinositol kinas a fosfatas. Fosfatidylinositoly hrají také významnou roli v signální transdukcii, ale i vesikulárním transportu<sup>1</sup>.



Obr. 1: Fosfatidylinositol: R<sub>1</sub> – stearyl, R<sub>2</sub> – arachidonyl

### Vesikulární transport

Vesikulárním transportem chápeme přepravu z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu a z Golgiho aparátu do dalších oddílů endomembránové soustavy. Vesikulární transport je zprostředkován nepřetržitým pučením a fúzí transportních váčků tzv. vesikulů.

Když transportní váček dorazí ke své cílové organelle (prostou difúzí ale především pomocí motorových proteinů), musí ji rozpoznat a navázat se na ni. K tomu dochází především pomocí tzv. SNARE proteinů<sup>2</sup>. SNARE proteiny jsou poměrně malé proteiny (10 – 30 kDa) s evolučně konzervovanou SNARE doménou, která umožňuje protein – proteinovou interakci<sup>3</sup>. Většina těchto proteinů má hydrofobní C – konec, který slouží jako membránová kotva. SNARE proteiny, které nemají hydrofobní C – konec, se upevňují k membráně skrze prenyl, nebo palmitoylací cysteinů<sup>4</sup>.

SNARE proteiny na povrchu váčků (v – SNARE, z angl. „vesicle“) jsou specificky rozpoznávány komplementárními SNARE proteiny na povrchu cílových membrán (t – SNARE, z angl. „target“). Následně tyto SNARE proteiny vytvoří komplex, který katalyzuje fúzi váčků. Obvykle mezi jedním v – SNARE a třemi t – SNARE motivy se vytvoří pevná interakce alfa helixů. Proteiny přitáhnou membrány do těsné blízkosti a umožní tak fúzi váčku s membránou<sup>5</sup>.

Energie uvolněná při tvorbě SNARE komplexu překoná energetický odpor membrány tvořený především záporným nábojem hydrofilní části membránové dvojvrstvy. Po fúzi membrán přejde trans – SNARE do cis – SNARE konformace k jejíž regeneraci je nutné dodat energii v podobě ATP. K fúzi membrán je obvykle zapotřebí kromě SNARE komplexů i dalších proteinů, které pomáhají fúzi a určují čas a místo kde proběhne splnutí membrán<sup>4</sup>.

### VAMP3

Do SNARE proteinů spadají proteiny vesikulární membrány (VAMP, z angl. „Vesicle-associated membrane protein“).

VAMP3 neboli cellubrevin je protein patřící do skupiny v – SNARE proteinů. VAMP3 je přítomen v migrujících endosomech a v endosomálních vesikulech, kde zprostředkovává jejich fúzi s plasmatickou membránou<sup>4,6</sup>.

### Regulace

Fosfatidylinositoly jsou syntetisovány v endoplasmatickém retikulu, odkud jsou transportovány řadou transportních proteinů v rámci vesikulárního transportu. Přičemž směr cesty a místo fúze vesikulu je pravděpodobně mimo jiné determinované fosforylací hydroxyly inositolového kruhu fosfoinositolů.

Soustředme se nyní na fosfatidylinositol-4-fosfát, ten se nachází na membráně váčků pučících z trans-síť Golgiho aparátu. Fosfatidylinositol-4-fosfát vzniká kinasovou aktivitou fosfatidylinositol-4-kinas (PI4K, EC 2. 7. 1.67). Existují 4 typy PI4K: PI4K II alfa, PI4K II beta, PI4K III alfa a PI4K III beta. Číslování začíná od II, jelikož kinasa dříve známá jako PI4K I, jak bylo později zjištěno, je ve skutečnosti fosfatidylinositol-3 kinasa<sup>7</sup>.

#### Fosfatidylinositol-4-fosfát kinasa II alfa

PI4K II alfa je převážně asociována s trans-síť Golgiho aparátu, kde se zprostředkovává účastní regulace aktivity klathrinových adaptinů<sup>8</sup>. Dále se také PI4K II alfa nachází v endosomech a v menší míře v endoplasmatickém retikulu, na jehož membráně katalyzuje tvorbu fosfatidylinositolu-4-fosfátu, který je nezbytným elementem při výběru a transportu látek do pozdních endosomů / lysosomů<sup>9</sup>.

V katalytické doméně PI4K II alfa je přítomen motiv bohatý na cystein (motiv CCPCC), který je post-translačně modifikován palmitoylací<sup>10</sup>. To umožňuje ukotvení enzymu k membráně, kde se nachází jeho substrát, fosfatidylinositol<sup>11</sup>.

#### *Fosfatidylinositol-4-kinasa II beta*

PI4 II beta je strukturně velmi podobná PI4K II alfa, liší se od ní ale rozdílnou lokalizací v buňce (je přítomna v endosomu<sup>12</sup>) a asociací s transportními vesikuly<sup>11</sup>.

#### *Fosfatidylinositol-4-kinasa III alfa*

PI4K III alfa je lokalizována především na plasmatické membráně, ale také v endoplazmatickém retikulu, v časných cis-Golgi kompartmentech a v jádře buňky<sup>9</sup>. V buňkách savců má hlavní funkci v udržování proteinového a lipidového složení plasmatické membrány. Dále pak bylo zjištěno, že hraje klíčovou roli v replikaci viru hepatitidy C<sup>7</sup>.

#### *Fosfatidylinositol-4-kinasa III beta*

PI4K III beta je fyziologickým substrátem protein kinasy D, patří do rodiny serin / threonin proteinových kinas. Hlavní funkce PI4K III beta nespočívá v tvorbě fosfatidylinositolu-4-fosfátu v plasmatické membráně na rozdíl od PI4K III alfa, ale ve struktuře a funkci Golgiho aparátu<sup>9</sup>. Viry z čeledi *Picornaviridae* využívají PI4K III beta pro svou replikaci<sup>7</sup>.

Fosfatidylinositol kinasy, tedy fosforylují fosfatidylinositol na membráně vesikulu a tím určí jeho další osud. Ale jak kinasa rozezná správný vesikul, kde má fosforylovat inositol? Jedním z potenciálních mechanismů je interakce fosfatidylinositol kinasy se SNARE proteinem. V naší laboratoři se zabýváme vSNARE proteinem VAMP3 jakožto interakčním partnerem PI4K II alfa. Bylo zjištěno, že „knockdown“ PI4K II alfa má vliv na transport proteinu VAMP3<sup>13</sup>. Pochopení interakce VAMP3 proteinu s PI4K II alfa může být klíčové pro studium některých závažných lidských onemocnění, viz níže.

## **Vliv fosfatidylinositol kinas na lidské zdraví**

Studium molekulárního mechanismu funkce PI4K II alfa může přinést důležité informace vedoucí k pochopení vzniku některých lidských onemocnění.

### **• Gaucherova choroba**

Gaucherova choroba je genetická porucha způsobená mutací lysosomálního enzymu beta – glukocerebrosidasy. Nedostatek tohoto enzymu vede k akumulaci glukocerebrosidů v lysosomech makrofágů zejména ve slezině a játrech<sup>14</sup>.

Beta – glukocerebrosidasa dosáhne lysosomální membrány skrze její receptor: lysosomální integrální membránový protein 2 (LIMP2). Bylo zjištěno, že protein PI4K II alfa prostřednictvím vesikulárního transportu ovlivňuje akumulaci proteinu LIMP2 a tím reguluje transport beta – glukocerebrosidasy. Proto je PI4K II alfa kinasa potenciální terapeutický cíl Gaucherovy choroby<sup>15</sup>.

### **• Plus RNA-viry**

Většina virových patogenů uvnitř hostitelské buňky potřebuje co nejrychleji iniciovat svoji replikaci. Několik prvních syntetizovaných virových proteinů se musí vzájemně vyhledat, aby mohly vytvořit replikační komplex, který umožní replikaci virového genomu. Mnoho typů plus RNA-virů řeší tento problém umístěním svých replikačních mechanismů na cytosolovou stranu hostitelské intracelulární organelové membrány. Navázáním replikačních enzymů na membránu vzroste pravděpodobnost, že se replikační komponenty setkají a zároveň dojde k zvýšení jejich citlivosti a rychlosti odpovědi na změnu koncentrace enzymu nebo substrátu.

Membrána, kterou takto využívají plus RNA-viry, je obvykle z endoplazmatického retikula, trans – sítí Golgiho aparátu, endosomu nebo mitochondrie. Fosfatidylinositol na cytosolové straně membrány je potřebný pro replikaci mnohých plus RNA-virů jako jsou *Picornaviridae* (poliovirus, coxsackie virus, aichi virus, enterovirus 71) a *Flaviviridae* (virus hepatitidy C)<sup>7</sup>.

### **• Rakovinné bujení**

Výsledky získané výzkumem lidských nádorových tkání ukázaly, že exprese PI4K II alfa u několika typů rakovinného bujení (fibrosarkom, rakovina prsu, rakovina močového měchýře a papilární karcinom štítné žlázy) významně stoupá ve srovnání s normálními tkáněmi<sup>12</sup>. Potlačěním exprese PI4K II alfa dochází ke zpomalení růstu nádorů u myši, omezením tubulogenese v nádorových endoteliálních buňkách a má za následek sníženou angiogenesi<sup>16</sup>. PI4K II alfa je potenciální cíl pro terapii nádorového onemocnění.

PI4K III alfa je zodpovědná za chemorezistenci nádorů, které odolávají indukované apoptose. Také exprese PI4 III beta má anti-apoptotické účinky na buňky rakoviny prsu.

Na rozdíl od ostatních PI4K má PI4K II beta anti-metastatickou funkci a to zejména u hepatocelulárních karcinomů, u nichž byla objevena. Zvýšení exprese tohoto enzymu bylo zaznamenáno i na dalších karcinomech, ale jeho účinky už byly méně prokazatelné<sup>12</sup>.

### **• Neurologické poruchy**

Snížení exprese PI4K je spojeno s neuronální disfunkcí, zejména narušením délky života specifických buněk v centrální nervové soustavě.

U geneticky modifikovaných myši, které neexprimují PI4K II alfa, dochází ke glióze mozečku a ztrátě Purkyňových buněk. Může dojít i k axonální degradaci vstoupných i sestupných drah v míše<sup>17</sup>. Tento fakt poukazuje na význam PI4K II alfa jako na neurologicky důležitý enzym.

Dále bylo zjištěno, že při chronické závislosti na spotřebě ethanolu, dochází u hlodavců k redukcii exprese PI4K III beta<sup>18</sup>.

## **Závěr**

Intracelulární transport je velmi aktuální téma, v roce 2013 byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu Jamesi Rothmanovi, Randy Schekmanovi a Tomasi Sudhofovi za objevy týkající se vesikulárního

transportu. Navzdory tomu dosud není mechanismus intracelulárního transportu zcela objasněn.

Zjištění možnosti vazby VAMP3 proteinu na PI4K II alfa může napomoci pochopení vesikulárního transportu na molekulární úrovni. Mimo to je PI4K II alfa enzym s důležitou signální funkcí, která významně ovlivňuje metabolismus. Zjištění mechanismu její regulace může

vést k pochopení nejrůznějších patologických jevů jako je rakovinné bujení či některá virová onemocnění.

### Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

### Literatura

1. Graham TR, Burd CG: *Trends Cell Biol.* 21, 113 (2011).
2. Alberts B, Kotyk A, Bouzek B, et al: *Základy buněčné biologie.* Espero Publishing, Ústí na Labem (1998)
3. Chaineau M, Danglot L, Galli T: *FEBS Lett.* 583, 3817 (2009).
4. Hong W: *Biophys. Acta* 1744, 120 (2005).
5. Miller SE, Sahlender D, Graham S, Honing S, et al: *Cell* 147, 1118 (2011).
6. Hu C, Hardee D, Minnear F: *Exp. Cell Res.* 313, 3198 (2007).
7. Altan-Bonnet N, Balla T: *Trends Biochem. Sci.* 37, 293 (2012).
8. Wang YJ, Wang J, Sun H, et al.: *Cell* 114, 299 (2003).
9. Clayton EL, Minogue S, Waugh MG: *Prog. Lipid Res.* 52, 294 (2013).
10. Barylko B, Mao Y, Wlodarski P, et al.: *J. Biol. Chem.* 284, 9994 (2009).
11. Balla A, Balla T: *Trends Cell Biol.* 16, 351 (2006).
12. Waugh MG: *Cancer Lett.* 325, 125 (2012).
13. Jović M, Kean M, Dubankova A: *J. Cell Sci.* 127, 3745 (2014).
14. Nagral, A: *J. Clin. Exp. Hepatol.* 4, 37 (2014).
15. Jović M, Kean M, Szentpetery Z, et al.: *Mol. Biol. Cell* 23, 1533 (2012).
16. Li, J. Lu Y, Zhang J, et al.: *Oncogene* 29, 2550 (2010).
17. Simons JP, Al-Shawi R, Minogue S, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11535 (2009).
18. Saito M, Smiley J, Toth R, et al.: *Neurochem. Res.* 27, 1221 (2002).

### Souhrn

#### Dubánková A., Bouřa E.: Fosfatidylinositol-4-fosfát: Regulace transportu v buňce

Fosfatidylinositoly jsou významné signální molekuly, společně se SNARE proteiny hrají důležitou roli ve vesikulárním transportu. V tomto textu se snažíme zdůraznit vzájemnou součinnost SNARE proteinů a fosfatidylinositolových kinas. Vesikulární transport je velmi komplikovaný dynamický proces, který není doposud plně prostudován. Jeho pochopení může být klíčové pro léčbu závažných lidských nemocí jako je například Gaucherova choroba, rakovina prsu, rakovina močového měchýře, papilární karcinom štítné žlázy a další.

**Klíčová slova:** fosfatidylinositol, fosfatidylinositol-4-kinasa, SNARE, VAMP3, vesikulární transport

### Summary

#### Dubánková A., Bouřa E.: Phosphatidylinositol-4-phosphate: Regulation of transport in the cell

Phosphatidylinositols are important signal molecules, and together with SNARE proteins play important role in vesicular transport; a process that is still not fully understood. In this paper, we try to underline the interaction of SNARE proteins and phosphatidylinositol kinases. Vesicular transport is very complicated dynamic process. The understanding can be crucial for treatment of several human diseases such as Gaucher disease, breast cancer, bladder cancer, papillary thyroid carcinoma, and others.

**Keywords:** phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4 kinase, SNARE, VAMP3, vesicular transport

## TUBERKULÓZA V ROLI SPOLUPACHATELE

Iva Machová<sup>a, b</sup>, Iva Pichová<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická; machova@uochb.cas.cz

### Úvod

Tuberkulóza (TB), jejíž kořeny sahají hluboko do antických dob, stále zůstává jednou z hlavních příčin úmrtí navzdory účinným a cenově dostupným chemoterapeutikům, známým více než 50 let. Patogen způsobující TB je bakterie *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), jejímž jediným známým hostitelem a rezervoárem jsou lidé. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2014 onemocnělo TB 9,6 mil. lidí (z toho 1 mil. dětí) a 1,5 mil. osob (z toho 140 tisíc dětí) v souvislosti s tuberkulózou zemřelo<sup>1</sup>. Předpokládá se, že až jedna třetina světové populace je nakažena tzv. latentní formou MTb infekce, která probíhá bez příznaků nemoci.

Přibližně u 10 % takto nakažených dojde k propuknutí akutní tuberkulózy. Jedná se především o osoby s oslabeným imunitním systémem, jako jsou děti a staří lidé nebo osoby trpící podvýživou, dalšími nemocemi, psychickým či fyzickým stresem.

Za posledních několik desítek let došlo k výraznému poklesu výskytu TB v tzv. vyspělých státech, ale v zemích s vysokým výskytem HIV, rozšířenou podvýživou, v přelidněných oblastech nebo v oblastech s nedostačnou zdravotní infrastrukturou kontroly tuberkulózy, je počet onemocnělých stále vysoký. Situaci navíc významně ovlivňuje i výskyt multirezistentních kmenů MTb, které jsou málo nebo zcela necitlivé k řadě dostupných antituberkulotik<sup>2</sup>.

## Imunitní odpověď na infekci MTb

K přenosu infekce MTb dochází především inhalací aerosolových kapének obsahujících bakterie, vykašlávány osobou s akutní formou TB. MTb je intracelulární patogen, jehož primárním cílem jsou alveolární makrofágy. V plicních sklípcích jsou bakterie rozpoznány a pohlceny alveolárními makrofágy za vzniku tzv. fagosomů. Uvnitř fagosomů jsou bakterie vystaveny nedostatku živin, účinkům kyselého prostředí, lytických enzymů, kyslíkových a dusíkových radikálů, které vedou k poškození DNA, či buněčné stěny<sup>3</sup>. MTb se v průběhu infekce dokáže adaptovat na prostředí, kterému je vystavena, např. efektivně brání dozrávání fagosomu (splynutí s lysozomem), redukuje kyselost fagosomálního prostředí, produkuje proteiny na opravu DNA, remodelaci buněčné stěny a enzymy degradující mastné kyseliny, které jsou tak zdrojem živin<sup>3</sup>. V imunitní odpovědi proti vzniku TB hrají významnou roli CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, stejně jako Th1 cytokiny (TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  je produkován širokou škálou lymfocytů a podporuje jak aktivaci makrofágů, tak se podílí na tvorbě granulomů<sup>4,5</sup>. Tvorba granulomů je typická pro infekci MTb a je to jeden ze způsobů regulace infekce MTb. Granulom je kulovitá buněčná struktura tvořená infikovanými makrofágy ve svém středu, obklopená epitelioidními a Langhansovými buňkami a nakonec řadou lymfocytů (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma/\delta$  T-lymfocyty). Uvnitř granulomů MTb může přežít řadu let. Toto stádium je považováno za latentní infekci. Celý mechanismus infekce MTb a následná odpověď imunitního systému je velmi složitý proces, který je podrobován intenzivnímu výzkumu především z pohledu hledání nových antituberkulotik a vakcín proti akutní i latentní formě infekce. Plně funkční lidský imunitní systém vystavený infekci MTb je schopen zabránit propuknutí akutní formy TB úplným zničením bakterií nebo jejich utlumením do podoby latentní infekce. Akutní forma TB propukne obvykle za stavu snížené imunitní obrany způsobené např. diabetem mellitus, HIV infekcí, rakovinou aj.

## Tuberkulóza a podvýživa

Problém podvýživy se v současnosti týká převážně rozvojových zemí, kde podvýživa zvyšuje náchylnost především k infekcím HIV/AIDS, tuberkulózy a malárie. Lidský organismus se v případě infekce brání pomocí svého vrozeného imunitního systému. Celý proces obrany zahrnuje aktivaci a množení imunitních buněk, syntézu celé řady molekul vyžadující replikaci DNA, RNA expresi, syntézu bílkovin a jejich sekreci, tedy celou řadu procesů spotřebovávajících energii. Pokusy na zvířecích modelech potvrdily škodlivý vliv podvýživy na obranoschopnost proti MTb. Během těchto pokusů byla zjištěna snížená stimulace lymfocytů, stejně tak jako pokles vylučování Th1 cytokinů IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , které jsou součástí obrany proti MTb<sup>6,7</sup>. Evropa se potýkala s epidemiemi tuberkulózy způsobené podvýživou především v období první a druhé světové války.

## Tuberkulóza a diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je hormonálně regulované onemocnění, které výrazně ovlivňuje fungování imu-

nitního systému při infekcích. Pacienti s diabetem jsou tak více náchylní k onemocněním způsobených MTb či *Staphylococcus aureus* a vykazují vyšší procento mortality a morbiditu u infekcí *S. pneumoniae* a virem chřipky<sup>6,8</sup>. Jak již bylo zmíněno, nejdůležitějšími buňkami podílejícími se na odstranění MTb z organismu jsou fagocyty (především alveolární makrofágy a jejich prekurzory monocyty) a lymfocyty. V případě pacientů s diabetem je řada funkcí fagocytů, jako např. chemotaxe, fagocytóza, aktivace, produkce ROS (reaktivní formy kyslíku, včetně H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a prezentace antigenů, negativně ovlivněna, čímž je snížena účinnost odpovědi imunitního systému na přítomnost MTb v organismu. Diabetes také nepříznivě ovlivňuje růst, funkci a proliferaci T-lymfocytů, stejně tak jako produkci interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), který zvyšuje smrtící účinek makrofágů pomocí NO.

V případě některých infekcí, včetně MTb, často dochází ke zhoršené kontrole glykémie u diabetických pacientů, což může mít za následek zhoršení průběhu infekce. Některé studie se dokonce zabývají myšlenkou, zda diabetes nemůže být vyvolán TB. Pro stanovení tolerance ke glukose se obvykle u TB pacientů používá orální glukosový toleranční test (OGT). Při porovnání tolerance na glukosu u pacientů s TB a pacientů s pneumonií, 10 % z TB pacientů bylo intolerantní ke glukose a 9 % mělo diabetes. U pacientů s pneumonií 17 % mělo diabetes, ale žádný glukosovou intoleranci. Všichni pacienti z této studie měli po 3 měsících léčby TB/pneumonie i během následujících 2 let zcela normální OGT. Na základě těchto a dalších studií lze předpokládat, že vratná glukosová intolerance je následkem infekce, nemusí se však nutně jednat jen o infekci MTb<sup>10-12</sup>.

Vzájemný vztah mezi diabetes mellitus a infekcí MTb je podrobován intenzivnímu výzkumu, zkoumá se především, zda DM vede ke zvýšení citlivosti při primární infekci MTb nebo spíše napomáhá reaktivaci latentní infekce a rozvoji TB.

## Tuberkulóza a rakovina

Rakovina každoročně usmrtí přibližně 7 milionů lidí po celém světě. Společný výskyt TB a především rakoviny plic přináší řadu problémů při určování správné diagnózy (TB či rakoviny) a zahájení odpovídající léčby. Zánět a zjizvení tkáně při chronické TB může vyústit v metaplasii, dysplasii a rakovinu. Dvojí roli v tomto procesu hraje TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor; nádor nekrotizující faktor). Na jedné straně je TNF- $\alpha$  nezbytný v boji proti rozvíjení infekce MTb, protože podporuje vznik granulomů, do kterých je MTb zachytáván a přispívá ke vzniku latentní infekce, na druhé straně TNF- $\alpha$  podporuje rozvoj nádorů<sup>13</sup>, chronických zánětů, autoimunitních onemocnění, stimuluje produkci genotoxických molekul, jako jsou NO a ROS, které vedou k poškození DNA a mutacím v epiteliálních buňkách plic<sup>14-15</sup>. Díky zdoluhavému nástupu symptomů TB dochází k produkci TNF- $\alpha$  po velmi dlouhou dobu, než je TB diagnostikována. Tvorba granulomů vytváří specifické prostředí, které činí okolní tkáň náchylné k maligní transformaci. Dalším negativním faktorem spojeným s rakovinou a zároveň podporující vznik TB je samotná léčba. Díky

agresivní chemoterapii, radioterapii, imunomodulační léčbě či nedostatečné výživě může docházet u pacientů s rakovinou k reaktivaci latentní infekce MTb v akutní TB, stejně jako k primární infekci MTb<sup>16</sup>.

## Tuberkulóza a HIV/AIDS

Infekce HIV je nejvýznamnější známý rizikový faktor pro rozvoj aktivní TB u pacientů infikovaných MTb. U HIV negativních osob infikovaných MTb se TB rozvine jen u desetiny případů a u malé části infikovaných lidí se TB rozvine až po 2 letech, dochází tedy k tzv. post-primární infekci (reaktivaci). U HIV pozitivních osob je toto riziko zvýšené na 5 – 15% každý rok<sup>17</sup>. Reaktivace latentní MTb infekce je až 20 krát vyšší u HIV pozitivních lidí. Dle WHO v roce 2014 až jedna třetina pacientů s HIV byla infikována MTb a jeden ze tří HIV pozitivních pacientů zemřel ve spojitosti s TB. V roce 2014 bylo zaznamenáno 1,2 mil. nových případů TB u HIV pozitivních (74 % v oblasti Afriky) a přibližně 0,4 mil. lidí zemřelo na TB spojenou s HIV<sup>5</sup>. Koinfekce HIV – TB představuje velkou výzvu pro zdravotnický systém především v Africe a Asii, tedy v zemích s největším výskytem obou infekcí. Vzájemná koinfekce těchto patogenů urychluje zhoršení imunologických funkcí organismu a v případě chybějící léčby vede k předčasné smrti nakaženého<sup>18</sup>.

Hlavním rysem HIV infekce je úbytek CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, což zvyšuje citlivost k primární infekci MTb a velmi zvyšuje riziko reaktivace latentní MTb. HIV infekce má dopad na řadu dalších mechanismů usnadňujících infekci MTb a vznik TB. HIV např. ovlivňuje baktericidní dráhy makrofágů, dereguluje chemotaxi, narušuje TNF- $\alpha$  řízenou apoptotickou odpověď makrofágů k MTb. CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty a TNF- $\alpha$  jsou důležité faktory pro tvorbu granulomů. U HIV pacientů s oslabeným imunitním systémem dochází k selhání tvorby granulomů a existují dokonce hypotézy, že HIV zvyšuje patologii TB pomocí manipulace s granulomy<sup>19</sup>. Podobně jako u rakoviny, přirozená obrana proti MTb v podobě tvorby TNF- $\alpha$  má negativní vliv na potlačení HIV infekce, resp. podporuje replikaci HIV v makrofázích<sup>17</sup>.

Společná infekce HIV a MTb má i několik specifických účinků na lidský organismus. Například zatímco u většiny dospělých HIV negativních pacientů je TB lokalizována do oblasti plic, u pacientů s HIV byly již popsány

všechny formy extrapulmonární (mimoplicní) formy TB a u některých HIV pozitivních pacientů se TB stává systémovou chorobou zahrnující několik orgánů<sup>17</sup>. Dále se u pacientů infikovaných HIV i MTb projevuje fenomén, tzv. zánětlivý syndrom imunitní obnovy asociovaný s TB (TB-IRIS = tuberculosis associated – immune reconstitution inflammatory syndrome). IRIS je akutní imunitní reakce způsobená především vstupem CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů do centrální nervové soustavy, ale přesný mechanismus IRIS zatím není zcela znám<sup>17,20</sup>. TB – IRIS se vyskytuje jak u pacientů s terapií pouze proti HIV (u nichž nebyla TB na počátku léčby HIV diagnostikována), tak u pacientů, kteří již podstupují anti-TB terapii společně s antivirovou léčbou.

Pravděpodobně nejspolehlivější obranou proti oběma infekcím by byla společná vakcína. Současná vakcína BCG (Bacille Calmette-Guérin) proti TB má velmi malou účinnost u dospělých osob. Stejně tak v případě HIV infekce není prozatím v dohledu žádná účinná vakcína, ačkoliv výzkum v této oblasti je značný. Jedním z možných přístupů vývoje společné vakcíny by tedy mohla být vakcína založená na rekombinantní BCG vakcíně nesoucí kombinaci antigenů MTb i HIV. Návrh takové vakcíny je obzvláště náročný úkol, který prozatím naráží i na řadu technických problémů, jakými jsou správný výběr antigenů, adjuvans či režim vakcinace<sup>17</sup>.

## Závěr

Tuberkulóza je infekční choroba, která se jak v minulosti, tak v současnosti pohybuje na předních příčkách nemocnosti i úmrtnosti. Velký optimismus v léčbě tuberkulózy zavládl v době objevu BCG vakcíny (r. 1921 první testy na lidech) a po objevu streptomycinu, prvního antibiotika s baktericidním účinkem proti MTb v roce 1944. Následovaly objevy i dalších účinných antibiotik a největší optimisté předpokládali brzké vymýcení TB. Tyto předpoklady se však nenaplnily, především díky rozšíření HIV infekce v 80. letech, vzniku multirezistentních kmenů MTb a dalším faktorům, které ovlivňují správnou funkci imunitního systému jako je podvýživa, rakovina či diabetes mellitus.

**Poděkování:** Tato práce byla financována z projektu LO 1302 od MŠMT.

## Literatura

1. WHO Factsheets, Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (2015)
2. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, et al.: *Chest*. 136, 420 (2009).
3. Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil J, et al.: *J. Exp. Med.* 198, 693 (2003).
4. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al.: *J. Exp. Med.* 178, 2249 (1993).
5. Walker N, Meintjes G, Wilkinson R.: *Future Virol.* 8, 57 (2013).
6. Schaible UE, Kaufmann SH.: *PLoS Med.* 4, e115 (2007).
7. Cegielski JP, McMurray DN: *Int. J. Tuberc. Lung, DiS.* 8, 286 (2004).
8. Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, et al.: *N. Engl. J. Med.* 341, 1906 (1999).
9. Young F, Critchley JA., Johnstone LK, et al. *Global Health.* 5, 9 (2009).
10. Başoğlu OK, Bacakoğlu F, Cok G, et al.: *Monaldi Arch. Chest, DiS.* 54, 307 (1999).
11. Alisjahbana B, van Crevel R, Sahiratmadja E, et al.: *Int. J. Tuberc. Lung, DiS.* 10, 696 (2006).
12. Dooley KE, Chaisson RE: *Lancet Infect., DiS.* 9, 737 (2009).
13. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, et al.: *Cancer Cell.* 6, 297 (2004).
14. Hussain SP, Hofseth LJ., Harris CC: *Nat. Rev. Cancer.* 3, 276 (2003).
15. Vento S, Lanzafame M: *Lancet. Oncol.* 12, 520 (2011).

16. Harikrishna J, Sukaveni V, Kumar DP: *Indian Acad. Clin. Med.* 13, 142 (2012).
17. Pawlowski A, Jansson M, Sköld M, et al.: *PLoS Pathog.* 8, e1002464 (2012).
18. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al.: *Lancet.* 367, 1747 (2006).

19. Diedrich CR, Flynn JL: *Infect. Immun.* 79, 1407 (2011).
20. Seidl Z, Vaněčková M: Diagnostická radiologie – Neuroradiologie, str.244, GradaPublishing, a.s., Praha (2014).

## Souhrn

### Machová I, Pichová.: Tuberkulóza v roli spolupachatele

*Mycobacterium tuberculosis* (MTb) je lidský intracelulární patogen, jehož flexibilní metabolismus mu umožňuje přežít v hostiteli ve formě tzv. latentní infekce bez symptomů onemocnění po dlouhé období. K reaktivaci MTb s následným rozvojem akutní tuberkulózy může dojít kdykoliv. Více ohroženi jsou především lidé s oslabeným imunitním systémem, jako jsou HIV pozitivní pacienti, lidé trpící podvýživou, postižení diabetem nebo rakovinou.

**Klíčová slova:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberkulóza, diabetes mellitus, HIV, rakovina

## Summary

### Machová I, Pichová I.: Tuberculosis as an accomplice

*Mycobacterium tuberculosis* (MTb) is a human intracellular pathogen, which can survive in the host due to its flexible metabolism in a form of latent infection without any symptoms of illness for a long period. Reactivating tuberculosis (post-primarily) can occur any time. Especially people with compromised immune systems, such as people living with HIV, malnutrition, diabetes or cancer, have a much higher risk of falling ill with MTb or reactivation of latent infection into acute tuberculosis.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, diabetes mellitus, HIV, cancer

# SEKRETOVANÉ ASPARTÁTOVÉ PROTEASY A JEJICH ÚLOHA V PATOGENITĚ KVASINEK RODU *Candida*

Jiří Dostál, Iva Pichová

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.; dostalj@uochb.cas.cz

## Úvod

Význam patogenních kvasinek rodu *Candida* z hlediska humánní medicíny stoupá spolu se stoupajícím počtem imunosuprimovaných pacientů. Přestože jsme v současnosti schopni díky širokému spektru antibiotik zvládnout bakteriální infekce, v případě mykotických infekcí jsou naše možnosti léčby značně omezené. Důsledkem této situace je, že míra mortality u imunosuprimovaných pacientů je v případě sekundárních mykotických infekcí poměrně vysoká.

V klinické praxi mezi nejčastější původce závažných mykotických infekcí, a to jak povrchových, tak i systémových, řadíme zástupce rodu *Candida* a *Aspergillus*. Podobně jako ostatní patogenní kvasinky mají zástupci rodu *Candida* řadu vlastností, které významně přispívají k jeho patogenitě. Mezi hlavní virulentní faktory podílející se na rozvoji mykotické infekce u kandid řadíme schopnost adheze na povrch hostitele, tvorbu biofilmů, změnu fenotypu a produkci hydrolytických enzymů u některých druhů kandid. Virulentní faktory se mohou lišit u jednotlivých druhů. Hlubší pochopení role jednotlivých virulentních faktorů je komplikováno polymorfismem kandid a složitostí vztahů mezi patogenem a hostitelem (např. není dosud jasné, jak a proč dochází k přeměně původně komensálního mikroorganismu na patogenní mikroorganismus).

## Sekretované aspartátové proteasy *Candida* spp.

Mnoho přírodních procesů je úzce spojeno s aktivitou proteas. Jejich základní role spočívá v hydrolýze peptidových vazeb při degradaci proteinů a peptidů.

Tato očividně jednoduchá funkce je nezbytná pro mnoho procesů souvisejících s lidskou fyziologií. Proteasy jsou však důležité i pro životní cyklus mnoha patogenů. U retrovirů např. aspartátová proteasa sehrává kritickou roli ve zrání virových částic a je klíčová pro jejich infektivitu<sup>1</sup>. Kvasinky rodu *Candida* sekretují do svého okolí také aspartátové proteasy (Secreted aspartic proteases; Saps; EC 3. 4. 23.24), které přispívající k jejich virulenci. Extracelulární proteolytická aktivita byla poprvé popsána v polovině šedesátých let dvacátého století u *C. albicans*<sup>2-4</sup>, ale až rozvoj molekulárně biologických metod přinesl nové informace o úloze těchto enzymů u patogenních druhů kandid. Genomy *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*<sup>5-9</sup> obsahují více genů *SAP*, které kódují různé izoenzymy, ale pouze některé z nich byly doposud charakterizovány<sup>10-12</sup>. Například u nejznámějšího a nejfrekventovanějšího zástupce *C. albicans* se v genomu nachází 9 genů kódujících Saps izoenzymy. Do okolí je během infekce sekretován v největší koncentraci izoenzym Sap2p<sup>7</sup>.

## I. Sekretované aspartátové proteasy štěpí široké spektrum substrátů

Sekretované aspartátové proteasy mohou hydrolyzovat velké spektrum proteinů v širokém rozmezí různých biologických podmínek (př. pH 2,0-7,0). Rolí Saps není pouze poskytnutí využitelného zdroje dusíku kvasince, ale také zvýšení úspěšnosti kolonizace a penetrace hostitelské tkáně degradací hostitelských bariér. Například Sap2p z *C. albicans* je schopna degradovat molekuly extracelulárního matrixu jako je keratin, kolagen a vimentin<sup>4,13</sup>. Navíc dokáže hydrolyzovat v lidské plazmě se vyskytující přírodní inhibitor proteas  $\alpha_2$ -makroglobulin,



dále pak cystatin A a inhibitory cysteinových proteas, nacházející se v epidermálních tkáních<sup>14,15</sup>. Saps degradují i IgA, který je značně rezistentní vůči proteolýze.

## II. Vztah mezi produkcí sekretovaných aspartátových proteas a virulencí kandií

Řada studií prokázala, že pouze virulentnější druhy jako jsou *C. albicans*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis* jsou schopné výrazné produkce extracelulárních proteolytických enzymů *in vitro*. Naopak méně klinicky významné druhy jako např. *C. kefyr*, *C. guilliermondii* tuto schopnost nemají<sup>13,16,17</sup>. Výjimku zde tvoří *C. glabrata*, u které nebyla pozorována proteolytická aktivita a přesto zaujímá v klinické praxi přední místo<sup>18</sup>. Další studie zaměřené převážně na *C. albicans* demonstrovaly, že klinické izoláty *C. albicans* z pacientů s příznaky různých rozvinutých kandidóz vykazovaly větší proteolytickou aktivitu než izoláty z pacientů bez klinických příznaků<sup>19–21</sup>.

Řada studií poskytla jasný důkaz o produkci Saps *in vivo*. Například použitím nepřímé imunofluorescenční mikroskopie byla přítomnost Saps stanovena uvnitř buněčné stěny *C. albicans* ve všech orgánech imunosuprimovaných pacientů, kteří podlehli systémovým infekcím<sup>22</sup>. Současně byla přítomnost Saps prokázána v průběhu fagocytózy *C. albicans* leukocyty. Macdonald a Odds prokázali, že zvýšená rezistence *C. albicans* vůči fagocytóze je spjata právě s produkcí Saps. Mutanty s odstraněnými geny pro *SAP4-SAP6* snadněji podléhaly fagocytóze v porovnání s kontrolním kmenem<sup>23</sup>. Dále bylo prokázáno, že v séru pacientů se systémovou infekcí je zvýšená hladina specifických protilátek IgG proti Saps v porovnání se zdravými jedinci<sup>14,22</sup>.

Produkce Saps je ovlivněna i morfologií a fenotypovou variabilitou kandií. Bylo prokázáno, že u kvasinkových buněk docházelo k transkripci genů *SAP1-SAP3*, naopak geny *SAP4-SAP6* byly transkribovány u buněk vytvářejících hyfy<sup>24</sup>. V případě fenotypové variability byla pozorována rozdílná exprese genů *SAP1* a *SAP3* v průběhu fenotypové změny. Vedle toho například transkripce *SAP8* byla *in vitro* silně indukována při teplotě 30 °C, zatímco při vyšší teplotě (37 °C) transkripce *SAP8* klesala. To naznačuje, že tento gen je přednostně transkribován během povrchových infekcí<sup>4</sup>.

## III. Vztah produkce sekretovaných aspartátových proteas a dalších virulentních faktorů u *C. albicans*

První experimenty sledovaly vztah mezi produkcí Saps a schopností adherence u *C. albicans* za různých kultivačních podmínek. Ukázalo se, že silně proteolytické kmeny *C. albicans* adherovaly jednoznačně silněji na ústní epiteliální buňky než kmeny se slabší produkcí proteas<sup>25</sup>.

Nepohlavní způsob rozmnožování a diploidní povaha *C. albicans* jsou důvody, proč bylo obtížné po řadu let připravit mutanty použitelné pro studium virulentních vlastností kandií. Před příchodem moderních molekulárně biologických metod byla role Saps v patogenезi studována na mutantech připravených chemickou nebo UV mutagenézí. U myších experimentálních kandidóz byly takto připravené neproteolytické kmeny jednoznačně méně virulentní než proteolytické kontrol-

ní kmeny<sup>26</sup>. Avšak při interpretaci získaných výsledků bylo potřeba mít na zřeteli, že takto připravené mutanty obsahovaly i nespecifické mutace, které se mohly projevit na růstu a virulenci. Teprve až rozvoj molekulárních metod cílené mutagenéze (př. Ura-mutanty) dovolil hlubší analýzu podílu jednotlivých Saps na patogenitě *C. albicans*. U povrchových infekcí (myší, krysí model) *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* deficientními mutanty vykazovaly výrazně menší schopnost adherence na epiteliální buňky. V případě systémových infekcí (myší, krysí model) nebyl pozorován vliv delece *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* na endoteliální buňky. U mutantů *SAP4-SAP6* však docházelo k poklesu schopnosti poškozovat a pronikat peritoneální tkání<sup>27,28</sup>. Vedle toho úloha Sap7-Sap10 ve virulenci *C. albicans* není prozatím zřejmá. Souhrnně tedy exprese SAP genů a jejich regulace závisí na typu a stádiu infekce, podmínkách a dostupnosti substrátu v daném prostředí.

## IV. Změna virulence v případě inhibice sekretovaných aspartátových proteas pepstatinem

Další podpůrné důkazy o roli Saps jako jednoho z virulentních faktorů přinesly práce, které sledovaly vliv pepstatinu na patogenезi *C. albicans*. Pepstatin je obecný a velmi účinný inhibitor aspartátových proteas pepsinového typu<sup>12</sup>. Redukující schopnost pepstatinu byla prokázána například v případě degradace proteinů extracelulárního matrixu lidských endoteliálních buněk pomocí Saps<sup>29</sup> nebo v modelu využívajícím *in vitro* lidské epidermální buňky<sup>28</sup>. Přestože v tomto případě přítomnost pepstatinu byla schopna redukovat poškození tkání, nezabránila degradaci epiteliálních tkání v pozdním stádiu infekce. To naznačuje, že buď nejsou všechny izoenzymy Saps u *C. albicans* efektivně blokovány, nebo se na tomto procesu podílí další proteasy. Ochranný účinek pepstatinu byl také prokázán *in vivo* na myším modelu vaginální infekce, kde postinfekční léčba pepstatinem (1 mg/ml) vedla k výraznému potlačení infekce<sup>20,21</sup>. Tyto studie naznačily, že inhibice pepstatinem významně redukuje schopnost *C. albicans* kolonizovat a penetrovat hostitelské tkáně. Zároveň ukázaly potenciální možnost využití pepstatinu jako léčiva. Na druhou stranu také odhalily i jeho nízkou selektivitu a částečnou toxicitu.

## Závěr

Z výše uvedených informací vyplývá, že sekretované aspartátové proteasy jsou v případě *C. albicans* účinným virulentním faktorem a mohou hrát při infekci hostitele zásadní roli. Toto zjištění společně se vzrůstajícím výskytem rezistentních kmenů kandií vůči klasickým antimykotikům je podnětem pro vývoj nových léčiv. Jedním z možných řešení tohoto problému by mohly být právě inhibitory sekretovaných aspartátových proteas, které by byly použity jako účinná antimykotika fungující na odlišném principu než doposud používaná. Hlubší studium těchto enzymů by také mohlo vyřešit problém mykotických infekcí vyvolaných proteolytickými druhy kvasinek rodu *Candida*.

**Poděkování:** Financováno z projektu LO 1302 od MŠMT.

## Literatura

1. Burstein H, Bizub D, Skalka AM: *J. Virol.* 65, 6165 (1991).
2. Staib F: *Sabouraudia* 4, 187 (1965).
3. Diasio RB, Bennett JE, Myers CE: *Biochem. Pharmacol.* 27, 703 (1978).
4. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 400 (2003).
5. De Viragh PA, Sanglard D, Togni G, et al.: *J. gen. Microbiol.* 139, 335 (1993).
6. Gilfillan GD: *Microbiology* 144, 829 (1998).
7. Hube B, Naglik J: *Microbiology* 147, 1997 (2001).
8. Pfaller MA, et al.: *Diagn. Microbiol. Infect., DiS.* 67, 162 (2010).
9. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, & Monod M: *Infect. Immun.* 69, 405 (2001).
10. Fusek M, Smith EA, Monod M, et al.: *FEBS Lett.* 327, 108 (1993).
11. Lin X, Tang J, Koelsch G, Monod M, et al.: *J. Biol. Chem.* 268, 20143 (1993).
12. Pichová I, Pavličková L, Dostál J, et al.: *Eur. J. Biochem.* 268, 2669 (2001).
13. Ray TL, Payne CD: *Infect. Immun.* 58, 508 (1990).
14. Rüchel R, Böning B: *J. Immunol. Methods* 61, 107 (1983).
15. Tsushima H, Mine H, Kawakami Y, et al.: *Microbiology* 140, 167 (1994).
16. Rüchel R, Uhlemann K, Böning B: *Infect. parasitol* 255, 537 (1983).
17. Macdonald F: *Sabouraudia* 22, 79 (1984).
18. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, et al.: *Diagn. Microbiol. Infect., DiS.* 31, 327 (1998).
19. Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, et al.: *J. Med. Microbiol.* 44, 311 (1996).
20. De Bernardis F: *Infect. Immun.* 64, 466 (1996).
21. De Bernardis F: *J. Clin. Microbiol.* 37, 1376 (1999).
22. Rüchel R, Zimmermann F, Böning-Stutzer B, et al.: *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 419, 199 (1991).
23. Macdonald F, Odds FC: *J. gen. Microbiol.* 129, 431 (1983).
24. Hube B, Monod M, Schofield DA, et al.: *Mol. Microbiol.* 14, 87 (1994).
25. Ghannoum M, Abu Elteen K: *J. Med. Vet. Mycol.* 24, 407 (1986).
26. De Bernardis F: *J. Infect., DiS.* 161, 1276 (1990).
27. Watts HJ, Cheah FS, Hube B, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 129 (1998).
28. Schaller M: *Mol. Microbiol.* 34, 169 (1999).
29. Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 349 (1997).

## Souhrn

### Dostál J., Pichová I.: Sekretované aspartátové proteasy a jejich úloha v patogenitě kvasinek rodu *Candida*

Sekretované aspartátové proteasy (Saps) jsou považovány za jeden z virulentních faktorů oportunně patogenních druhů kvasinek rodu *Candida*. Díky své široké substrátové specifičnosti jsou schopny hydrolyzovat široké spektrum hostitelských proteinů a přispívají tak ke kolonizaci hostitelských tkání a umožňují využívat hostitelské proteiny jako zdroj živin. Rostoucí výskyt mykotických infekcí a výskyt rezistentních kmenů jsou hlavní důvody pro výzkum zaměřený na vývoj nových antimykotických sloučenin. Inhibice sekretovaných aspartátových proteas patogenních kvasinek rodu *Candida* se zdá být potenciálním cílem pro vývoj nových léčiv.

**Klíčová slova:** sekretované aspartátové proteasy, *Candida*, Sap, *Candida albicans*

## Summary

### Dostál J., Pichová I.: Secreted aspartic proteases and their role in the pathogenicity of *Candida* spp.

Secreted aspartic proteinases (Saps) produced by opportunistic fungal pathogens of the genus *Candida* are considered to act as virulence factors. Due to their broad substrate specificity they can degrade a wide variety of host protein substrates and facilitate the pathogen invasion of the host cells, but also allow microorganisms to utilize host cell macromolecules as a source of nutrients. The increasing frequency of infections and occurrence of drug resistant strains are the main reasons for research focused on novel antimycotic compounds. Inhibition of secreted aspartic proteases of pathogenic *Candida* spp. appears to be a potential target of therapeutic intervention.

**Keywords:** secreted aspartic proteases, *Candida*, Sap, *Candida albicans*

# HIV/AIDS A ANTIRETROVIROVÁ TERAPIE

Růžena Píchalová, Pavel Ulbrich

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze; pichalor@vscht.cz

## Úvod

Virus lidské imunodeficiency (HIV) je obalený RNA virus z čeledi *Retroviridae*, který způsobuje onemocnění nazvané syndrom získané imunitní nedostatečnosti, tzv. AIDS. HIV napadá buňky imunitního systému, zejména T-lymfocyty nesoucí CD4 receptory. Klesne-li počet CD4+ T-lymfocytů pod určitou hladinu, stává se napařený organismus náchylný k řadě infekčních a nádorových onemocnění<sup>1</sup>.

Předpokládá se, že HIV byl přenesen okolo roku 1920 z opic na lidi v Demokratické republice Kongo<sup>2</sup>. Až do 80-tých let se neví, kolik případů AIDS se kde objevilo a kolik bylo kde HIV infikovaných osob. První proka-

zatelné případy AIDS jsou tak datovány až na počátek 80-tých let minulého století. Ke konci roku 1986, poté, co se jako původce AIDS skutečně potvrdil virus HIV a byly vyvinuty i komerční soupravy na testování HIV pozitivních lidí, bylo zjištěno, že se HIV rozšířil do 85 zemí celého světa, kde infikoval přes 38000 jedinců<sup>2</sup>. Již v březnu r. 1987 bylo pro léčbu AIDS schváleno první antiretrovirotikum, Zidovudin<sup>3</sup>, na druhou stranu ale odhadovaný počet infikovaných vzrostl na 5-10 milionů<sup>2</sup>. Přestože Zidovudin, spadající do skupiny nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptasy (viz Obr. 1, Tab. I), nebyl v monoterapii příliš účinný<sup>4,5,6</sup>, významně přispěl k poklesu neonatálního přenosu HIV<sup>7</sup>. V květnu

r. 1995 byl na trh uveden první inhibitor virové proteasy (viz Obr. 1, Tab. I), Saquinavir, který započal éru tzv. vysoce účinné antiretrovirové terapie (HAART)<sup>8</sup>, která spočívá v kombinaci více antiretrovirotik podávaných najednou. I přes neustálý vývoj nových účinných antiretrovirotik, kterých je v dnešní době k použití v medicíně oficiálně schváleno více než 20, počty HIV pozitivních lidí neustále narůstají vysokým tempem. V současnosti je na celém světě téměř 40 milionů HIV pozitivních jedinců, z toho 2 miliony lidí se každoročně virem HIV nově nakazí a více než 1,5 milionu lidí v souvislosti s AIDS zemře<sup>9</sup>. V ČR bylo ke 30. 11. 2015 hlášeno celkem 2596 HIV pozitivních občanů, z toho přes 230 bylo v roce 2015 nově infikovaných. Celkově se již u 455 občanů ČR projevilo onemocnění AIDS, na jehož následky 234 lidí zemřelo<sup>10</sup>. Z těchto dat je tedy zřejmé, že pro potlačení a eradikaci této celosvětové smrtelné infekce nestačí pouze vyvíjet nová antiretrovirotika nebo hledat kvalitní vakcínu, ale že spolu s účinnou prevencí je nezbytné kombinovat více přístupů vedoucích k inhibici retrovirů a zastavení šíření HIV infekce, navíc u HIV pozitivních jedinců je nutné i eliminovat již infikované buňky.

## Prevence

Chceme-li zabránit dalšímu šíření HIV v populaci, je důležité si uvědomit, jakým způsobem se tento virus přenáší. HIV je u infikované osoby přítomen v tělních tekutinách, tj. v krvi, spermatu, vaginálním sekretu a v mateřském mléku. Proto mezi možné způsoby jeho přenosu patří nechráněný sex, sdílení použité jehly (aplikace drog a piercingu, tetování), krevní transfúze a transplantace orgánů (HIV pozitivní donor) a přenos z HIV pozitivní matky na dítě v průběhu porodu a následně i kojením<sup>11</sup>.

Historicky byla prevence proti přenosu HIV zaměřena převážně na HIV negativní či netestované jedince, kdy byl kladen důraz především na osvětu, používání kondomu, věrnost sexuálních partnerů a vývoj levné a všem přístupné HIV diagnostiky. Teprve s rozvojem a dostupností antiretrovirové terapie bylo nutné se zaměřit i na HIV pozitivní jedince<sup>12,13</sup>, kteří se díky svým zvyšujícím se počtům a terapií prodlouženému přežití stali závažným zdrojem nákazy a současně mohli přispívat i ke vzniku a šíření subtypů HIV rezistentních k léčbě<sup>14,15</sup>.

Jedním z intenzivně zkoumaných přenosů HIV je přenos sexuální. Studiemi provedenými v jižní Africe<sup>16</sup>, Keni<sup>17</sup> a Ugandě<sup>18</sup> sice bylo zjištěno, že lékařsky provedená obřízka u mužů vede ke snížení přenosu HIV o 57 %, přesto však poptávka po nových ochranných pomůckách proti HIV zůstávala i nadále velmi aktuální.

Jako vhodný kandidát se jeví různé mikrobicidní gely, jejichž aplikace do vagíny či konečníku by zabránila přenosu sexuálně přenosných onemocnění včetně HIV. V r. 2010 byly zveřejněny výsledky II. fáze klinických testů, které zkoumaly účinnost a bezpečnost tenofovirového vaginálního gelu<sup>19,20</sup>. Tenofovir je antiretrovirotikum patřící do skupiny nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptasy (viz Obr. 1, Tab. I) a jeho derivát (tenofovir disoproxyl fumarát) je pod názvem Viread běžně používán při léčbě AIDS<sup>21</sup>. Bylo sice zjištěno, že

tenofovirový vaginální gel u žen snižoval riziko přenosu HIV o 39 % a genitálních herpes virů o 51 %<sup>19</sup>, avšak III. fáze klinických testů, publikovaná v r. 2015, účinnost tenofovirového gelu jako prevenci proti přenosu HIV u žen nepotvrdila<sup>20,22</sup>. Jedním z hlavních nedostatků gelu byla jeho nízká přilnavost. Mezi další antiretrovirotika, jejichž účinnost byla ve formě vaginálního gelu studována, patří např. inhibitor vstupu HIV do buňky, Maraviroc (viz Obr. 1, Tab. I)<sup>23,24</sup> a nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptasy Dapivirin (viz Obr. 1, Tab. I)<sup>25</sup>.

Další možností, bránící sexuálnímu přenosu HIV u žen, jsou intravaginální kroužky (IVR) obsahující jednu či více mikrobicidních látek, které se z kroužku kontinuálně uvolňují ve vysokých koncentracích do vagíny a odtud se dále vstřebávají přímo do tkání a jednotlivých buněk<sup>26,30</sup>. Kombinace dvou a více mikrobicidních látek v IVR zaručuje inhibici HIV v různých fázích jeho životního cyklu, čímž zvyšuje účinnost daného IVR a současně snižuje pravděpodobnost nákazy k léčbě rezistentním typem HIV<sup>27,28,29</sup>. Typická životnost IVR bývá 30 – 365 dní<sup>26</sup>. V současnosti se v I. fázi klinických testů nachází IVR obsahující Dapivirin v kombinaci s Maraviroce<sup>31</sup>. Ve III. fázi klinických testů se pak nachází IVR obsahující pouze Dapivirin<sup>32,33</sup>. Výsledky těchto studií budou známy v průběhu r. 2016. Dalším směrem, kterým by se výzkum IVR mohl v následujících letech ubírat, je vývoj IVR kombinujících antiretrovirotika s antikoncepcí<sup>34,35,36</sup>, který by měl význam především pro ženy v sub-saharské Africe<sup>29</sup>, kde je virem HIV infikováno nejvíce lidí (v r. 2015 to bylo přes 26 milionů)<sup>9</sup>. V souvislosti s IVR kombinujícími antiretrovirotika s antikoncepcí však vyvstávají otázky, zda je tato kombinace opravdu vhodná a zda přítomnost hormonální antikoncepce v IVR naopak nezvyšuje náchylnost žen k infekci HIV a dalším pohlavně přenosným chorobám díky změnám ve vaginálním prostředí<sup>37,38,39,40</sup>.

Novějším způsobem ochrany je preventivní podání antiretrovirotik dosud HIV negativním osobám, u nichž hrozí vysoké riziko nákazy, tzv. PrP (z angl. „pre-exposure chemoprophylaxis“)<sup>41</sup>. Pro dosažení maximální ochrany by PrP měla být kombinována s dalšími způsoby prevence přenosu HIV, jako je používání kondomu, pravidelné HIV testy a diagnostika a léčba dalších sexuálně přenosných onemocnění. Současně by osoba, které je PrP podávána, měla být kontinuálně pozorována kvůli možným vedlejším účinkům PrP, vzniku rezistencí na podávané léky a také případné změně sexuálního chování. Hrozí totiž nebezpečí, že podání PrP by mohlo vést k rizikovému sexuálnímu chování těchto jedinců. V r. 2015 byla na toto téma publikována studie, která zjistila, že přestože po zavedení PrP do praxe nebyl mezi uživateli PrP zaznamenán žádný případ nové nákazy HIV, zvýšil se mezi nimi počet infikovaných pohlavně přenosnými chorobami a snížilo se i používání kondomů<sup>42</sup>. Ideálními kandidáty pro PrP jsou levné a bezpečné látky s dlouhým biologickým poločasem, které v monocitech, makrofázích a genitálních sekretech dosahují vysokých koncentrací<sup>41</sup>. Zatím jediným dostupným antiretrovirotikem pro PrP je léčivo Truvada (kombinace Tenofoviru a Emtricitabinu)<sup>41,42</sup>, které bylo FDA pro tyto účely schváleno v červnu r. 2012<sup>44</sup>.

## Vakcinace

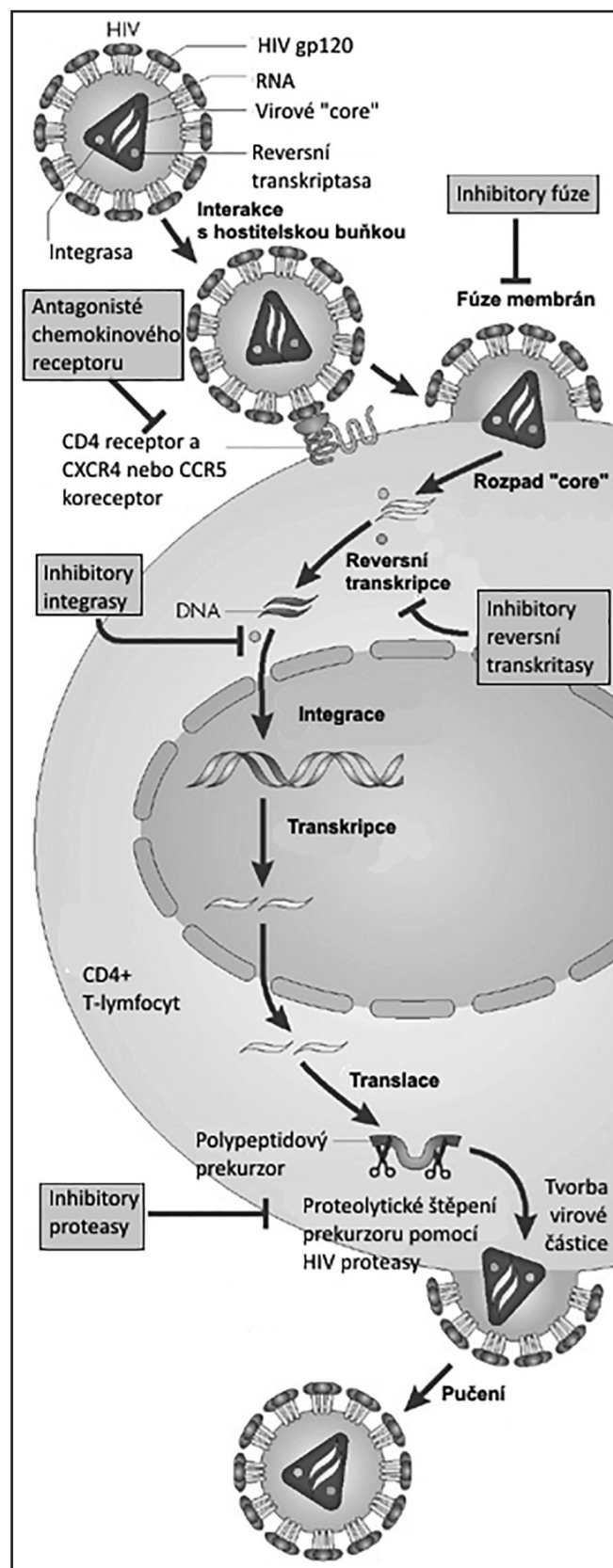
Vysoce účinná vakcína proti HIV by měla být schopna navodit trvalou imunitu proti HIV a současně by měla zabránit i přenosu infekce a/nebo u již infikovaných osob snížit replikaci a transmissi viru a zpomalit vývoj a postup onemocnění<sup>45</sup>. I přes intenzivní a dlouhodobý výzkum HIV/AIDS však stále není jasné, které specifické části imunitního systému by měla vakcína cílit. Tyto základní překážky ve vývoji vakcíny jsou způsobeny nejen tím, že stále neexistuje účinná léčba AIDS, ale i vysokou komplexností a rozmanitostí samotného HIV. Nedávné studie však napovídají, že mezi důležité faktory ochranné imunity proti HIV-1 se řadí odolná slizniční imunita, vysoká avidita polyfunkčních T-lymfocytů a tzv. bNabs (z angl. „broadly neutralizing HIV-1 antibodies“)<sup>46</sup>, což jsou neutralizační protilátky, které jsou specifické k více subtypům HIV-1.

Od r. 1987 bylo vyvinuto množství potenciálních vakcín proti HIV-1, které při studiu na primátech vykazovaly různý stupeň imunitní odpovědi<sup>47,48</sup> a mnohé z nich poté vstoupily do klinických studií<sup>49,50,51</sup>. Vývoj podjednotkové vakcíny založené na obalovém glykoproteinu gp120 byl však zastaven ve II. fázi klinických testů, protože nebylo dosaženo žádné imunitní ochrany<sup>52,53</sup>. Ve II. fázi klinických testů byl v r. 2007 pro její slabou účinnost zastaven i výzkum živé rekombinantní vakcíny odvozené od adenovirového vektoru typu-5 (Ad5), který nesl HIV geny *gag*, *pol* a *nef*<sup>54</sup>. Dalším potenciálním kandidátem byla tzv. „prime-boost“ kombinace dvou vakcín (klinický test byl nazván RV144): „prime“ živé rekombinantní vakcíny založené na poxvirovém vektoru nesoucím HIV gen *env* (název vakcíny byl ALVAC-HIV vCP1521), popřípadě geny *gag*, *pol* a *env* (ALVAC-HIV vCP205) a „boost“ podjednotkové vakcíny, založené přímo na proteinu gp120 (název vakcíny AIDS VAX B/E)<sup>55</sup>. Tato kombinovaná vakcína sice vykazovala 31% snížení přenosu HIV-1, ale neovlivnila stupeň virémie ani počet CD4+ T-lymfocytů u subjektů, u kterých byla nákaza HIV-1 posléze diagnostikována<sup>55</sup>. Vědecká komunita se proto v současné době zaměřila na snahu porozumět tomu, jakým způsobem vakcína poskytla alespoň mírnou imunitní ochranu proti HIV-1 a na základě těchto zjištění se pokusit tuto kombinovanou vakcínu buď zdokonalit anebo vyvinout zcela novou vakcínu<sup>50,56</sup>.

## Inhibice životního cyklu HIV pomocí HAART

Zavedením tzv. vysoce účinné antiretroviróvé terapie (HAART) došlo k významné změně klinického průběhu infekce HIV a osudu HIV pozitivních jedinců. Dříve fatální onemocnění AIDS se u pacientů, kteří mají přístup k HAART a u kterých došlo k udržitelné supresi HIV virémie, změnilo v onemocnění „pouze“ chronické<sup>15</sup>. HAART je založena na kombinaci několika antiretrovirotik<sup>57</sup>, které inhibují HIV v různých fázích jeho životního cyklu (viz Obr. 1) a tím brání jeho dalšímu šíření a vývoji AIDS. Kombinací správně vybraných antiretrovirotik je dosaženo vyšší účinnosti HAART a její lepší tolerance a zároveň je sníženo i riziko vzniku rezistentních forem HIV<sup>58</sup>. Je doporučeno používat nejméně tři antiretrovirotika z alespoň dvou různých tříd (viz Tab. I)<sup>58,59</sup>.

V současné době existuje šest skupin antiretrovirotik v závislosti na místě jejich působení<sup>57,61</sup>: nukleosidové (NRTIs) a nenukleosidové (NNRTIs) inhibitory reverzní transkriptasy, inhibitory proteasy (PIs), integrasy (INSTIs), inhibitory fúze (FIs) a antagonisté chemokinnových receptorů (CCR5 antagonisté). Všechna dostupná a schválená léčiva pro HAART jsou uvedena v Tab. I.



Obr. 1: Životní cyklus HIV a jeho inhibitory používané v rámci HAART<sup>60</sup>.

**Tabulka I.: Antiretrovirová léčiva používaná při léčbě infekce HIV/AIDS**

	<b>Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptasy (NRTIs)</b>	<b>Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptasy (NNRTIs)</b>	<b>Inhibitory fúze (FIs)</b>
název (komerční název)	Abacavir (Ziagen) Emtricitabine (Emtriva) Lamivudine (Epivir) Tenofovir disoproxyl fumarát (Viread) Zidovudine (Retrovir)	Efavirenz (Sustiva) Etravirine (Intelence) Nevirapine (Viramune) Raltegravir (Isentress)	Enfuvirtide (Fuzeon)
	<b>Inhibitory HIV proteasy (PIs)</b>	<b>Inhibitory integrasy (INSTIs)</b>	<b>CCR5 antagonisté</b>
název (komerční název)	Atazanavir (Reyataz) Darunavir (Prezista) Fosamprenavir (Lexiva) Nelfinavir (Viracept) Ritonavir (Norvir) Saquinavir (Invirase) Tipranavir (Aptivus)	Dolutegravir (Tivicay) Elvitegravir (Vitekta) Raltegravir (Isentress)	Maraviroc (Selzentry)
<b>Kombinovaná antiretrovirotika</b>			
název (komerční název)	Abacavir/Dolutegravir/Lamivudine (Triumeq) Efavirenz/Emtricitabine/Tenofovir (Atripla) Elvitegravir/Cobicistat/Emtricitabine/Tenofovir (Stribild) Emtricitabine/Rilpivirine/Tenofovir (Complera) Abacavir/Lamivudine (Epzicom) Abacavir/Lamivudine/Zidovudine (Trizivir) Atazanavir/Cobicistat (Evotaz) Darunavir/Cobicistat (Prezcobix) Emtricitabine/Tenofovir (Truvada) Lamivudine/Zidovudine (Combivir) Lopinavir/Ritonavir (Kaletra)		

NRTIs patří mezi první dostupná léčiva pro HIV terapii a ačkoliv jsou méně účinné než antiretrovirotika jiných tříd, tak v HAART stále mají své pevné a opodstatněné místo. Jejich výhodou je, že jsou účinné jak proti HIV-1, tak i HIV-2<sup>63</sup>. NRTIs jsou strukturální analoga DNA nukleosidů, a proto je mechanismem jejich účinku kompetitivní inhibice reverzní transkriptasy (RT) a následná terminace syntézy provirové DNA<sup>57</sup>. Rezistence viru k NRTIs vznikají dvěma způsoby: buď jejich chybnou inkorporací do provirové DNA nebo jejich odstraněním z provirové DNA<sup>64</sup>. Několik mutací spojených se vznikem těchto rezistencí již bylo identifikováno<sup>64</sup>.

NNRTIs jsou účinné proti HIV-1 a jsou doporučenu součástí počáteční HAART<sup>62</sup>. NNRTIs jsou nekompetitivní inhibitory RT<sup>65</sup>. RT vytváří heterodimer, který se skládá ze dvou podjednotek (p66 a p51). NNRTIs se na podjednotce p66 váží do hydrofobní kapsy vzdálené od aktivního místa enzymu a následná konformační změna v RT, vyvolaná vazbou NNRTIs, mění strukturu aktivního místa enzymu a tím RT inhibuje<sup>65</sup>. Vznik rezistencí umožňují mutace v RT, které pozměňují strukturu tohoto enzymu a současně tím ovlivňují i vazbu NNRTIs na RT<sup>66</sup>.

PIs jsou nedílnou součástí HAART<sup>62</sup> a fungují jako kompetitivní inhibitory HIV proteasy, na kterou se přímo váží a tím brání štěpení virových polyproteinových prekurzorů a následnému zrání viru<sup>67</sup>. Vznik rezistencí k PIs je spojen s mutacemi jak v aktivním místě HIV proteasy, tak i mimo něj. Bylo zjištěno, že prvotní hlavní mutace, která způsobí konformační změnu ve vazebném místě pro PIs, je často následována dalšími mutacemi, které zvýší enzymovou aktivitu HIV proteasy a v některých případech i tzv. „fitness“ viru<sup>68</sup>.

INSTIs (z angl. „integrase strand-transfer inhibitors“) jsou inhibitory HIV integrasy, která je zodpovědná

za transport provirové DNA do jádra a její zabudování do chromozomu hostitelské buňky. Integrace proviru probíhá ve dvou reakcích katalyzovaných HIV integrasou: nejdříve je v cytoplasmě hostitelské buňky upraven 3'-konec provirové DNA tak, aby bylo možné vlákno proviru uchytit, a následně je takto upravené vlákno přeneseno a kovalentně připojeno k buněčné DNA<sup>57</sup>. INSTIs kompetitivně inhibují reakci přenosu vlákna tím, že vážou ionty kovů v aktivním místě HIV integrasy<sup>69</sup>.

FIs jsou prvními antiretrovirotiky inhibujícími životní cyklus HIV extracelulárně a jejich unikátní mechanismus účinku tedy nabízí další možnost pro pacienty s virem vysoce rezistentním k běžné HAART<sup>57</sup>. Jak již sám název napovídá, FIs brání extracelulární fúzi HIV s hostitelskou buňkou a to tak, že váží HR1 oblast HIV obalového glykoproteinu gp41, jehož úkolem je penetrovat do cytoplasmatické membrány a tím přiblížit HIV membránu k membráně buněčné a umožnit tak jejich fúzi. Vazbou FIs na HR1 oblast proteinu gp41 je zabráněno konformační změně gp41 nutné pro fúzi membrán a celý proces je takto zablokovan<sup>70</sup>. Vznik rezistencí k FIs je velmi dobře popsán<sup>71</sup> a je způsoben mutacemi v oblasti HR1.

Poslední skupina, antagonisté chemokinového receptoru, je nejnovější skupinou antiretrovirotik a také se řadí mezi FIs. Vazba HIV na CD4+ hostitelské buňky probíhá v několika krocích. Nejprve se virový obalový glykoprotein gp120 naváže na buněčný chemokinový receptor CD4. Tím dojde ke konformační změně gp120, která odhalí V3 smyčku tohoto proteinu. V3 smyčka poté interaguje s chemokinovým koreceptorem (CCR5 nebo CXCR4) a tato interakce umožní zanoření virového proteinu gp41 do buněčné membrány, což indukuje fúzi HIV s hostitelskou buňkou. Účinek antagonistů chemokinového receptoru je tedy založen na selektivní a silné

vazbě koreceptoru CCR5, která brání jeho interakci s V3 smyčkou a následně tak i fúzi membrán<sup>72</sup>.

## Budoucnost – léčba HIV/AIDS

Zavedení HAART v léčbě HIV/AIDS je bezpochyby velkým úspěchem moderní medicíny, avšak ne dostatečným. HAART neodstraní provirovou DNA ani virus HIV, ale pouze inhibuje životní cyklus viru v infikovaných buňkách. Určitá část infikovaných buněk tedy dále přežívá a vytváří tzv. latentní rezervoár buněk, které mají provirovou DNA integrovanou do své buněčné DNA. Úplná léčba infekce HIV/AIDS proto musí být založena na likvidaci těchto rezervoárů. Teprve poté může být dosaženo celkového vyléčení jedince a HAART bude možno přerušit. Jednou z hlavních překážek je však skutečnost, že u HIV pozitivního jedince je třeba pouze jedna buňka z milionu CD4+ T-lymfocytů latentně infikována, tedy je velmi obtížné tyto infikované buňky cílit. Navíc HIV latentní rezervoár může obsahovat i buňky v takových částech těla, do kterých je velmi obtížné dopravit terapeuticky účinné molekuly, například velké proteinové komplexy (buňky CNS nebo genitálního traktu)<sup>73</sup>.

Aby buňky infikované HIV mohly být cíleně likvidovány, je potřeba, aby na svém povrchu signalizovaly, že obsahují virus, tj. aby na svém povrchu prezentovaly virové antigeny. Pro latentně infikované buňky to znamená, že je nutné virus uvnitř nich reaktivovat, aby se začal opět aktivně replikovat. Pro tyto účely již bylo testováno množství léčiv včetně inhibitorů histon-deacetylasy, které by měly indukovat transkripci virové RNA. Přestože tato léčiva v buňkách virovou transkripci reaktivovala, tak tyto buňky nebyly imunitním systémem následně rozpoznány a účinně zničeny<sup>74</sup>.

Dalším přístupem likvidace latentních rezervoárů HIV je použití tzv. bi-specifických protilátek. Ty jsou navrženy tak, že jejich jedna část se váže k širokému spektru

obalových glykoproteinů HIV, které jsou vystaveny na povrchu aktivně infikovaných buněk (převážně CD4+ T-lymfocytů), a jejich druhá část se váže na molekulu CD3, která je přítomna na povrchu všech T-lymfocytů. Cílem tohoto konstruktů, tzv. DART (z angl. „dual-affinity re-targeting proteins“), je tedy donutit CD8+ T-lymfocyty, které mají cytotoxickou aktivitu, zlikvidovat latentně infikované buňky, které byly reaktivovány a tím pádem na svém povrchu vystavují virové obalové glykoproteiny<sup>75,76</sup>. Nedávnými studiemi bylo zjištěno, že DART fungují jak *in vitro*<sup>75,76</sup>, tj. indukují přímou smrt buněk exprimujících virové obalové glykoproteiny, tak i *ex vivo*<sup>75</sup>, tj. po reaktivaci došlo ke smrti buněk odebraných pacientům, jejichž HIV infekce byla pomocí HAART dobře potlačena. Současně bylo zjištěno, že CD3 vazebná část DART aktivuje *in vitro* jak cytotoxické CD8+ T-lymfocyty tak i latentně infikované CD4+ T-lymfocyty, které poté začnou exprimovat obalové glykoproteiny HIV a tím imunitnímu systému umožní je zničit bez dalších indukčních faktorů<sup>76</sup>.

## Závěr

Zavedením preventivních opatření a zpřístupněním HAART i v chudých zemích se podařilo celosvětově šíření HIV významně zpomalit. Oproti minulým letům se počet nových infekcí HIV a úmrtí v důsledku AIDS značně snížil, a proto si OSN vytyčila nový cíl: ukončit epidemii AIDS do roku 2030, tj. zcela zabránit dalšímu šíření HIV<sup>9</sup>. Hledání účinné léčby HIV infekce je navzdory slibným počátečním výsledkům s DART pravděpodobně stále v počátečních fázích. Dobré výsledky v *in vitro* systému totiž ještě zdaleka nemusí znamenat dostatečnou odezvu i *in vivo*, kde potenciální léčivo musí čelit řadě překážek, např. adsorpci, distribuci a metabolismu, nerovnoměrnému rozložení cílových buněk a v neposlední řadě i rozmanitosti cílových proteinů.

## Literatura

1. Fauci AS: *Science*. 239, 617 (1988).
2. [http://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview#footnote30\\_6zn14ht](http://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview#footnote30_6zn14ht), staženo 12. 1. 2016.
3. <https://aidsinfo.nih.gov/news/274/approval-of-azt>, staženo 12. 1. 2016.
4. Niu MT, Jermano JA, Reichelderfer P, et al.: *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 9, 913 (1993).
5. Kinloch-De Loes S, Hirschel BJ, Hoen B, et al.: *N. Engl. J. Med.* 333, 408 (1995).
6. Lindbäck S, Vizzard J, Cooper DA, et al.: *J. Infect., Dis.* 179, 1549 (1999).
7. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al.: *N. Engl. J. Med.* 331, 1173 (1994).
8. James JS: *AIDS Treat. News*. 237, 1 (1995).
9. <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015>, staženo 11. 1. 2016.
10. <http://www.szu.cz/tema/prevence/zprava-o-vyskytu-a-sireni-hiv-aids-za-rok-2015>, staženo 11. 1. 2016.
11. <http://hivinsite.ucsf.edu/insite?page=basics-00-00>, staženo 12. 1. 2016.
12. Gordon CM, Stall R, Cheever LW: *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 37, S53 (2004).
13. Janssen RS, Valdiserri RO: *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 37, S119 (2004).
14. Valdiserri RO.: *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 37, S138 (2004).
15. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC: *N. Engl. J. Med.* 338, 853 (1998).
16. Auvert B, Taljaard D, Lagarde E.: *PLoS Med.* 2, e298 (2005).
17. Bailey RC, Moses S, Parker CB, et al.: *Lancet.* 369, 643 (2007).
18. Gray RH, Kigozi G, Serwadda D, et al.: *Lancet.* 369, 657 (2007).
19. Karim QA, Karim SSA, Frohlich JA, et al.: *Science.* 329, 1168 (2010).
20. <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/272/tenofovir-microbicide-0/patient>, staženo 12. 1. 2016.
21. <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Documents/HIVPillBrochure.pdf>, staženo 12. 1. 2016.
22. Karim SSA, Karim QA, Kharsany ABM, et al.: *N. Engl. J. Med.* 373, 530 (2015).
23. Forbes CJ, Lowry D, Geer L, et al.: *J. Control. Release.* 156, 161 (2011).

## Literatura (pokračování)

24. Neff CP, Kurisu T, Ndolo T, et al.: *PLoS One*. 6, e20209 (2011).
25. Nel AM, Coplan P, Smythe SC, et al.: *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 26, 1181 (2010).
26. Kiser PF, Johnson TJ, Clark JT: *AIDS Rev*. 14, 62 (2012).
27. Sobieszczyk ME, Talley AK, Wilkin T, et al.: *Top. HIV Med*. 13, 24 (2005).
28. Martinez J, Coplan P, Wainberg MA: *Antiviral. Res*. 71, 343 (2006).
29. Rosenberg ZF, Devlin B: *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 26, 503 (2012).
30. Kelly CG, Shattock RJ: *J. Intern. Med*. 270, 509 (2011).
31. Fetherston SM, Boyd P, McCoy CF, et al.: *Eur. J. Pharm. Sci*. 48, 406 (2013).
32. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01617096>, staženo 13. 1. 2016.
33. Palanee-Phillips T, Schwartz K, Brown ER, et al.: *PLoS One*. 10, e0128857 (2015).
34. Johnson TJ, Gupta KM, Fabian J, et al.: *Eur. J. Pharm. Sci*. 39, 203 (2010).
35. Mertenskoetter T, Kaptur PE: *Eur. J. Med. Res*. 16, 1 (2011).
36. Thurman AR, Clark MR, Doncel GF: *Infect., DiS. Obstet. Gynecol*. 2011, 1 (2011).
37. Polos CB, Westreich D, Balkus JE, et al.: *AIDS*. 27, S35 (2013).
38. Rees H: *Contracept*. 90, 354 (2014).
39. Crook AM, Ford D, Gafos M: *Hum. Reprod*. 29, 1810 (2014).
40. Achilles SL, Hillier SL: *AIDS*. 27, S5 (2013).
41. <http://emedicine.medscape.com/article/2054869-overview>, staženo 14. 1. 2016.
42. Volk JE, Marcus JL, Phengrasamy T, et al.: *Clin. Infect., DiS*. 61, 1601 (2015).
43. Van Damme L, Corneli A, Ahmed K, et al.: *N. Engl. J. Med*. 367, 411 (2012).
44. <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm311821.htm>, staženo 14. 1. 2016.
45. Douek DC, Kwong PD, Nabel GJ: *Cell*. 124, 677 (2006).
46. Walker LM, Burton DR: *Curr. Opin. Immunol*. 22, 358 (2010).
47. Robinson HL: *Clin. Pharmacol. Ther*. 82, 686 (2007).
48. Pantaleo G, Esteban M, Jacobs B, et al.: *Curr. Opin. HIV AIDS*. 5, 391 (2010).
49. Mascola JR, Montefiori DC: *Annu. Rev. Immunol*. 28, 413 (2010).
50. Fauci AS, Marston D: *Science*. 349, 386 (2015).
51. Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, et al.: *Vaccine*. 29, 6191 (2011).
52. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, et al.: *J. Infect., DiS*. 194, 1661 (2006).
53. Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, et al.: *J. Infect., DiS*. 191, 654 (2005).
54. [http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/Archive/2007/Pages/step\\_statement.aspx](http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/Archive/2007/Pages/step_statement.aspx), staženo 14. 1. 2016.
55. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al.: *N. Engl. J. Med*. 361, 2209 (2009).
56. [http://www.iavireport.org/Back-Issues/Pages/IAVI-Report-13\(5\)-RaftofResultsEnergizesResearchers.aspx](http://www.iavireport.org/Back-Issues/Pages/IAVI-Report-13(5)-RaftofResultsEnergizesResearchers.aspx), staženo 15. 1. 2016.
57. <http://emedicine.medscape.com/article/1533218-overview>, staženo 15. 1. 2016.
58. Smith RL, de Boer R, Brul S, et al.: *Front. Genet*. 3, 328 (2013).
59. Dybul M, Fauci AS, Bartlett JG, et al.: *Ann. Intern. Med*. 137, 381 (2002).
60. de Clercq E: *Nat. Rev. Drug Discovery*. 6, 1001 (2007).
61. <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Documents/HIVPillBrochure.pdf>, staženo 15. 1. 2016.
62. <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-treatment-guidelines/0>, staženo 15. 1. 2016.
63. Cox SW, Aperia K, Albert J, et al.: *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 10, 1725 (1994).
64. Clavel F, Hance AJ: *N. Engl. J. Med*. 350, 1023 (2004).
65. Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I: *Curr. HIV Res*. 2, 323 (2004).
66. Soriano V, de Mendoza C: *HIV Clin. Trials*. 3, 237 (2002).
67. Flexner C: *N. Engl. J. Med*. 338, 1281 (1998).
68. Kim R, Baxter JD: *AIDS Patient Care STDs*. 22, 267 (2008).
69. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M: *Science*. 278, 646 (2000).
70. Chan DC, Fass D, Berger JM: *Cell*. 89, 263 (1997).
71. Perez-Alvarez L, Carmona R, Ocampo A, et al.: *J. Med. Virol*. 78, 141 (2006).
72. Lieberman-Blum S, Fung H, Bandres J: *Clin. Ther*. 30, 1228 (2008).
73. Richman DD: *Nature*. 528, 198 (2015).
74. Elliot JH, Wightman F, Solomon A, et al.: *PLoS Pathog*. 10, e1004473 (2014).
75. Sung JAM, Pickeral J, Liu L, et al.: *J. Clin. Invest*. 125, 4077 (2015).
76. Pegu A, Asokan M, Wu L, et al.: *Nature Commun*. 6, 38447 (2015).

## Souhrn

### Píchalová R., Ulbrich P. : HIV/AIDS a antiretrovirová terapie

HIV je celosvětově rozšířený retrovirus, jehož infekce vede k vážnému potlačení imunity a následné náchylnosti k řadě infekčních a nádorových onemocnění, tzv. AIDS. Tento souhrnný článek popisuje současné přístupy k potlačení HIV infekce včetně prevence, antiretrovirové terapie, vývoje vakcíny a účinné léčby AIDS.

**Klíčová slova:** HIV, AIDS, HAART, léčba AIDS, vakcinace proti HIV

## Summary

### Píchalová R., Ulbrich P. : HIV/AIDS and antiretroviral therapy

HIV is a worldwide spreaded retrovirus, whose infection leads to severe immunodeficiency followed by the susceptibility to various infectious diseases and cancer, overall called AIDS. This review describes current approaches to inhibit HIV infection, including prevention, antiretroviral therapy, vaccine development and efficient cure of AIDS.

**Keywords:** HIV, AIDS, HAART, AIDS cure, HIV vaccination

## OBSAH

<b>Úvodem</b>	<b>1</b>
Pěkníková J.: <b>Biotechnologického ústavu AV ČR</b>	<b>2</b>
Dubánková A., Bouřa E.: <b>Fosfatidylinositol-4-fosfát: Regulace transportu v buňce</b>	<b>3</b>
Machová I, Pichová.: <b>Tuberkulóza v roli spolupachatele</b>	<b>5</b>
Dostál J., Pichová I.: <b>Sekretované aspartátové proteasy a jejich úloha v patogenitě kvasinek rodu <i>Candida</i></b>	<b>8</b>
Píchalová R., Ulbrich P. : <b>HIV/AIDS a antiretrovirová terapie</b>	<b>10</b>

## CONTENTS

<b>Editorial</b>	<b>1</b>
Pěkníková J.: <b>Institute of Biotechnology CAS</b>	<b>2</b>
Dubánková A., Bouřa E.: <b>Phosphatidylinositol-4-phosphate: Regulation of transport in the cell</b>	<b>3</b>
Machová I, Pichová I.: <b>Tuberculosis as an accomplice</b>	<b>5</b>
Dostál J., Pichová I.: <b>Secreted aspartic proteases and their role in the pathogenicity of <i>Candida spp.</i></b>	<b>8</b>
Píchalová R., Ulbrich P. : <b>HIV/AIDS and antiretroviral therapy</b>	<b>10</b>