

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Lucie Jedličková

**Peptidázy monogeneí čeledi Diplozoidae**

**Peptidases of monogeneans of the family Diplozoidae**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Praha 2013

## **Prohlášení:**

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

V Praze dne 13. 08. 2013

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli RNDr. Liboru Mikešovi, Ph.D. za možnost pracovat na zajímavém tématu, za jeho ochotu, pomoc a cenné rady během mého studia a při psaní mé diplomové práce. Dále děkuji za poskytnutí materiálu na experimenty Ing. Pavlovi Vejsadovi, Ph.D., dr. hab. Ing. Josefu Velíškovi, Ph.D. a kolegům z PřF Masarykovy univerzity v Brně. Za odbornou pomoc při zpracování vzorků děkuji RNDr. Janě Nekvindové, Ph.D. a Mgr. Romaně Stopkové, Ph.D.

Děkuji celému týmu helmintologické laboratoře za příjemnou atmosféru a především Hance Dvořákové za trpělivost, důležité rady, pomoc při experimentech a Janě Bulantové za obrázky.

Dále bych ráda poděkovala Magdě Jančářové a své rodině za velkou podporu při mém studiu.

## Abstrakt

Proces trávení krve u monogeneí podtřídy Polyopistocotylea je znám pouze z ultrastrukturálních a histochemických analýz. V porovnání s ostatními krevsajícími parazity existuje jen malé množství biochemických a molekulárně biologických studií zabývajících se trávicími enzymy u monogeneí vůbec. Proto jsme se zaměřili na biochemickou a molekulární charakteristiku hydrolytických enzymů (peptidáz) u hematofágických druhů *Paradiplozoon bliccae* a *Eudiplozoon nipponicum*.

Podářilo se nám prokázat přítomnost cysteinových peptidáz, zejména cathepsinu L, v exkrečně sekrečních produktech a solubilním proteinovém extraktu u *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Detekce proběhla použitím fluorogenních substrátů, specifických inhibitorů a značenou sondou DCG-04. Na gelech / membránách po elektroforóze / blotování byly zaznamenány proužky o velikosti 35 kDa u obou zástupců a navíc 24 kDa u *E. nipponicum*. Vzorky byly rozděleny rovněž pomocí 2D elektroforózy a na gelech byly zaznamenány relevantní spoty o velikosti 35 kDa u *P. bliccae* a 25 - 35 kDa u *E. nipponicum*, které byly potvrzeny hmotnostně spektrometrickou analýzou jako cathepsiny L.

Pomocí degenerovaných primerů, navržených na základě konzervovaného místa cysteinových peptidáz, byla získána částečná sekvence genu pro cathepsin L *E. nipponicum*. Metodou 3' RACE PCR byla získána sekvence jeho 3' konce a kombinací s výsledky transkriptomové analýzy byla složena úplná sekvence cathepsinu L *E. nipponicum* (bez signálního peptidu).

Metodou 454 sekvenování cDNA dospělců *E. nipponicum* se podařilo získat 324 941 čtení o průměrné délce 423 pb, která byla sestavena do 6910 kontigů. Pomocí bioinformatické analýzy bylo predikováno 30 peptidázových genů.

**Klíčová slova:** cathepsin L, Monogenea, Diplozoidae, trávení, peptidáza, hematofágie

## Abstract

The blood processing mechanisms in monogeneans of the subclass Polyopisthocotylea are known from ultrastructural and histochemical analyses only. In contrast to other blood-feeding parasites, just few biochemical and molecular analyses have been done on digestive enzymes in monogeneans. Therefore, we focused on the biochemical and molecular characterization of hydrolytic enzymes (peptidases) in the hematophagous species *Paradiplozoon bliccae* and *Eudiplozoon nipponicum*.

The presence of the cysteine class peptidases, mainly cathepsin L, in excretory-secretory products and soluble protein extracts of *P. bliccae* and *E. nipponicum* were found. Detection was carried out using fluorogenic substrates, specific inhibitors and the labelled probe DCG-04. On the gels / membranes after electrophoresis / blotting we detected bands of approximately size of 35 kDa in the case of both species and 24 kDa for *E. nipponicum*. Soluble protein extracts of worms were separated by 2D gel electrophoresis and relevant spots around 35 kDa (*P. bliccae*) and around 25 - 35 kDa (*E. nipponicum*) were confirmed by mass spectrometry as cathepsins L.

Using degenerate primers based on the conserved motifs of cysteine class peptidases, a partial sequence of cathepsin L gene from *E. nipponicum* was obtained. Furthermore, 3'RACE PCR method revealed 3' end sequence of the gene; combining with the results of the transcriptome project, we received a complete sequence of cathepsin L of *E. nipponicum* (except for the signal peptide).

Applying 454 sequencing technology on cDNA of adult *E. nipponicum*, we received a total of 324 941 reads, average length 423 bp, which were assembled into 6910 contigs. So far, 30 genes of peptidases were predicted by bioinformatic analyses.

**Keywords:** cathepsin L, Monogenea, Diplozoidae, digestion, peptidase, hematophagy

## Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>10</b>
1.1. MONOGENEA.....	10
1.1.1. Klasifikace a fylogenze.....	10
1.1.2. Obecná charakteristika .....	10
1.1.3. Patogenita způsobená monogeneí.....	11
1.1.4. Čeleď Diplozoidae .....	12
1.1.4.1. Trávicí soustava.....	13
1.2. HEMATOFÁGIE A HEMATOFÁGNÍ PARAZITI.....	15
1.3. PEPTIDÁZY .....	15
1.3.1. Cysteinové peptidázy.....	18
1.3.2. Klasifikace cysteinových peptidáz.....	20
1.4. CATHEPSIN L .....	21
1.4.1. Trávení krve u motolic rodu <i>Schistosoma</i> .....	22
1.4.1.1. Cathepsin L u rodu <i>Schistosoma</i> .....	24
1.4.2. Trávení krve u motolic rodu <i>Fasciola</i> .....	25
1.4.2.1. Cathepsin L u rodu <i>Fasciola</i> .....	26
1.4.3. Trávení krve u klišťat .....	26
1.4.3.1. Cathepsin L u klišťat.....	28
1.4.4. Cathepsin L u monogeneí.....	28
<b>MATERIÁLY A METODY.....</b>	<b>29</b>
1.5. MODELOVÉ ORGANIZMY .....	29
1.6. SBĚR A PŘÍPRAVA MATERIÁLU .....	29
1.6.1. Proteinové vzorky.....	30
1.6.2. Měření koncentrace proteinu .....	30
1.6.3. Izolace RNA.....	30
1.7. BIOCHEMICKÉ METODY .....	31
1.7.1. Měření aktivity enzymu .....	31
1.7.2. Detekce cysteinových peptidáz na blotu biotinylovanou próbou.....	32
1.7.3. Detekce cysteinových peptidáz v gelech fluorescenční próbou .....	33
1.7.4. Hmotnostní spektrometrická analýza .....	34
1.7.5. Zymografie .....	35
1.8. MOLEKULÁRNÍ METODY .....	36
1.8.1. Syntéza ss cDNA.....	36
1.8.2. PCR.....	36
1.8.3. Extrakce z gelu.....	37
1.8.4. Klonování do plazmidu pCR®2.1-TOPO.....	37
1.8.5. Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	37
1.8.6. Izolace plazmidu .....	37
1.8.7. 5' a 3' RACE PCR.....	38
1.8.7.1. Příprava RACE cDNA.....	38
1.8.8. Příprava pro transkriptomovou analýzu .....	39
1.8.8.1. Syntéza cDNA .....	40
1.8.8.2. cDNA amplifikace.....	41
1.8.8.3. Normalizace cDNA.....	42
1.8.8.4. Příprava cDNA knihovny.....	44
1.8.8.5. Emulzní PCR (emPCR).....	45
1.8.8.6. 454 pyrosekvenace.....	45

1.8.8.7. Amplifikace vybraných genů z transkriptomové analýzy.....	46
<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>48</b>
1.9. MĚŘENÍ ENZYMATICKÝCH AKTIVIT.....	48
1.10. DETEKCE CP BIOTINYLOVANOU PRÓBOU DCG-04 .....	52
1.11. DETEKCE CP FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝM DCG-04 v ESP .....	53
1.12. DETEKCE CP POMOCÍ FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉHO DCG-04 VE 2D GELECH.....	53
1.13. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRICKÁ ANALÝZA.....	55
1.14. ZYMOGRAFIE .....	57
1.15. PCR .....	57
1.16. 5' A 3' RACE PCR.....	58
1.17. TRANSKRIPTOMOVÁ ANALÝZA- PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	59
1.17.1. Syntéza a amplifikace cDNA .....	59
1.17.2. Normalizace a amplifikace cDNA.....	59
1.17.3. cDNA knihovna .....	60
1.17.4. Transkriptomová analýza.....	61
1.17.5. Amplifikované vybrané geny z transkriptomové analýzy.....	65
1.18. POROVNÁNÍ CATHEPSINŮ L U VYBRANÝCH ORGANISMŮ.....	68
<b>DISKUZE .....</b>	<b>72</b>
<b>ZÁVĚREČNÉ SHRNTÍ .....</b>	<b>79</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>80</b>
<b>PŘÍLOHA Č.1.....</b>	<b>89</b>
<b>PŘÍLOHA Č.2.....</b>	<b>92</b>

## Seznam použitých zkratk

LAP - leucin aminopeptidáza

AE - asparaginylová endopeptidáza (legumain)

ESP - exkrečně sekreční produkty

*solPE* - solubilní proteinový extrakt

CP - cysteinové peptidázy

iCL - inhibitor cathepsinu L

ABC - ammonium bikarbonát

IAA - jodacetamid

DTT - dithiotreitol

ACN - acetonitril

EN - *Eudiplozoon nipponicum*

PB - *Paradiplozoon bliccae*

AK - aminokyseliny

Cat L/B/C/D - cathepsiny L/B/C/D

SCP - karboxypeptidáza

emPCR - emulzní PCR

TBS - T – Tris pufr, NaCl, Tween 20 (složení v příloze č. 1)

CPB - citrát fosfátový pufr (složení v příloze č. 1)

CPB - T - citrát fosfátový pufr, Triton (složení v příloze č. 1)

AMC - 7 -amino-4-methylcoumarin

SDS - dodecylsulfát sodný

CBBR- 250 - Coomassie Brilliant Blue R- 250

SDS-PAGE – vertikální elektroforéza

SP- signální peptid

## Úvod a cíle práce

Zástupci čeledi Diplozoidae jsou krevsající parazitičtí ploštěnci řadící se do třídy Monogenea. Jedná se o ektoparazity s přímým vývojovým cyklem parazitující převážně na žábrách kaprovitých ryb. Mohou mít signifikantní patogenní účinek, který spočívá v mechanickém poškození žaber, často doprovázeném sekundárními bakteriálními nebo mykotickými infekcemi. Zároveň sání krve může u napadených ryb vyvolat onemocnění označované jako hypochromní mikrocytická anémie. Přemnožení monogeneí v chovných rybnících může mít negativní ekonomický dopad.

Proto je důležité tuto skupinu podrobně studovat a získat informace o jejich vývoji a fyziologii. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na proces trávení krve u č. Diplozoidae, který zatím není dostatečně objasněn. U hematofágních helmintů je jedním z hlavních zdrojů potravy hemoglobin, na jehož degradaci se podílejí peptidázy v rámci proteolytické kaskády. Byla prokázána účast především cysteinových a aspartátových peptidáz, které v kyselém prostředí střeva / trávicích buněk fungují optimálně. Peptidázy jsou naprosto nezbytné pro přežití a vývoj parazita. Hrají klíčovou roli v interakcích mezi parazitem a hostitelem a proto bývají i častým cílem pro vývoj vakcín. O peptidázách u skupiny monogeneí *Polyopisthocotylea* nejsou žádné informace.

Ve své diplomové práci jsem se zabývala biochemickou a molekulární charakteristikou peptidáz u vybraných zástupců č. Diplozoidae, které by se mohly podílet na trávení hemoglobinu. U monogeneí byla doposud identifikována pouze jedna peptidáza, a to cathepsin L z mořského monogenea *Neobenedenia melleni* zařazeného do podtřídy *Monopisthocotylea*. Jedná se o ektoparazita živícího se mukusem a buňkami epitelu ryb.

**Cíle práce:**

- biochemická charakteristika peptidázových aktivit u vybraných zástupců č. Diplozoidae
- získání genových sekvencí vybraných peptidáz účastnících se pravděpodobně trávení
- porovnání výsledků s dalšími skupinami krevsajících parazitů, jako jsou schistosomy, fascioly nebo klíšťata

# Literární přehled

## **1.1. Monogenea**

### **1.1.1. Klasifikace a fylogenze**

Třída Monogenea se dělí na podtřídy Polyopisthocotylea (Heteronchoinea) a Monopisthocotylea (Polyonchoinea). Podtřída Monopisthocotylea se živí buňkami epitelu a mukusem, zatímco Polyopisthocotylea se živí krví (Ehlers 1984 in Littlewood *et al.* 1999; Ehlers 1985 in Littlewood *et al.* 1999; Boeger and Kritsky 2001). Monogenea spolu se třídami Trematoda a Cestoda patří do monofyletického taxonu Neodermata (Platyhelminthes) (Littlewood and Bray 2001).

### **1.1.2. Obecná charakteristika**

Zástupci třídy Monogenea se vyskytují ve slané, sladké i brakické vodě. Parazitují převážně na rybách, ale nacházejí se i u jiných organismů jako jsou hlavonožci, obojživelníci, plazi a savci. Většinou se jedná o ektoparazity, ale některé druhy mohou být endoparazitické a mohou se vyskytovat např. v močovém měchýři žab. Na konci těla mají charakteristický přichycovací orgán zvaný opisthaptor, který bývá často vybaven různými háčky, destičkami, svorkami a přísavkami (Smyth and Halton 1983; Roberts and Janovy 2005; Buchmann and Bresciani 2006; Whittington and Kearn 2011).

Monogenea jsou až na výjimky oviparní hermafrodité, jejichž vajíčko je opatřeno víčkem a pevnou chemicky odolnou vaječnou stěnou (Smyth and Halton 1983; Whittington and Kearn 2011). Mají přímý vývojový cyklus, který nezahrnuje mezihostitele. Z vajíčka se vylíhne pohyblivé stádium onkomiracidium, které volně plave a aktivně vyhledává hostitele. Po přisednutí na hostitele se přemění v dospělého (Roberts and Janovy 2005).

Monogenea dále vykazují vysokou hostitelskou i orgánovou specifitu (Buchmann and Bresciani 2006), která je zajímavá pro studium interakcí a koevolučních studií mezi parazitem a hostitelem. V interakcích s hostitelem se uplatňují různé fyziologické faktory jako je např. imunita hostitele, nutriční požadavky parazita a dále etologické a ekologické faktory (faktory vnějšího prostředí a chování hostitele)

(Lambert and Gharbi 1995; Whintington *et al.* 2000; Desdevises *et al.* 2002). Studium monogeneí může mít praktické využití při chovu ryb v umělých nádržích, kde patogenita způsobená monogeneí může mít závažné důsledky.

### **1.1.3. Patogenita způsobená monogeneí**

U chovných ryb nejsou ničím neobvyklým epizootie způsobené nadměrným množstvím parazitů. Ryby bývají často drženy v nadměrných stavech v nádržích a to umožňuje líhnoucím se monogeneím snadnější vyhledávání hostitele. Navíc stres způsobený agresivním chováním mezi rybami v nádržích, špatná výživa a špatná kvalita vody mohou mít dopad na schopnosti imunitního systému ryb reagovat na přítomnost parazitů (Reed *et al.* 2009; Roberts and Janovy 2005).

Monogenea se běžně vyskytují i u volně žijících ryb. Ve volné přírodě se na jednotlivých rybách nevyskytují v tak vysokém počtu a proto nejsou považována za nebezpečná (Roberts and Janovy 2005). Avšak jakákoliv změna v hustotě populace volně žijících ryb, způsobená např. vysycháním nebo odkloněním vody, může výrazně zvýšit hustotu parazitů na volně žijících rybách. Pokud se dostanou ryby silně infikované monogeneí do přírodního prostředí, mohou mít potencionálně devastující účinky (Reed *et al.* 2009).

Ryby s vysokou intenzitou infekce mohou být letargické, plavou blízko hladiny, mají sevřené ploutve, vyhledávají rohy nádrží nebo okraje rybníků a přijímají méně potravy. Velký počet monogeneí na kůži nebo na žábkách může mít za následek významná mechanická poškození, často doprovázená sekundárními infekcemi a zvýšenou mortalitou. V napadených místech dochází ke ztrátě šupin a odlišnému zbarvení kůže. Silné žaberní nákazy mohou vést k respiračnímu onemocnění. Žábry mohou být oteklé a bledé, dechová frekvence může být vyšší a ryby jsou méně tolerantní k nízké hladině kyslíku (Reed *et al.* 2009).

Důsledkem vysoké intenzity infekce monogeneí z podtřídy Polyopisthocotylea je nadměrné sání krve, které může způsobovat hypochromní mikrocytickou anémii u hostitelů, která je charakterizována vysokým procentem nezralých erytrocytů (Kawatsu 1978; Buchmann and Bresciani 2006; Valigurová *et al.* 2011).

### 1.1.4. Čeleď Diplozoidae

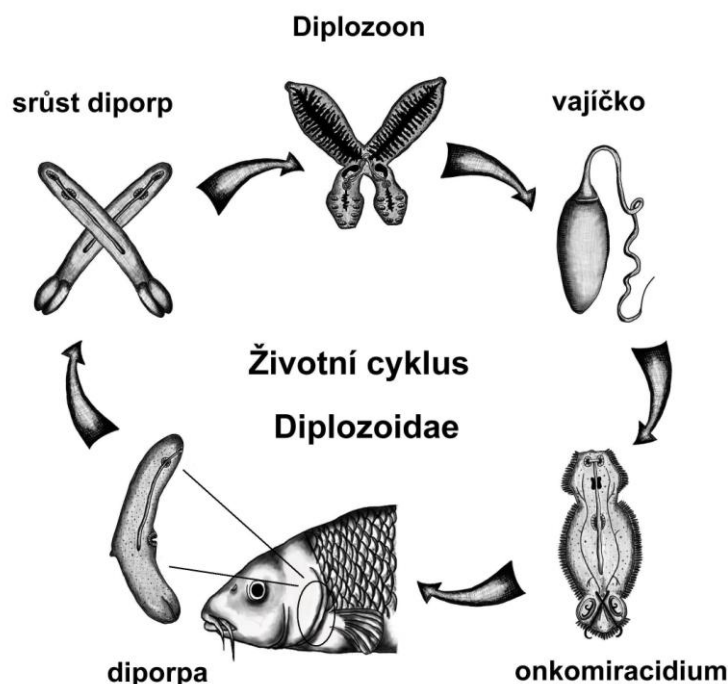
Zástupci čeledi Diplozoidae se řadí do podtřídy Polyopisthocotylea. Jedná se o hematofágní parazity sající na žábách především kaprovitých ryb. Mají přímý vývojový cyklus bez střídání hostitelů a často vysokou hostitelskou specifitu (tab. 1) (Matějusová *et al.* 2001; Schabussova *et al.* 2003; Khotenovsky 1985 in Košková *et al.* 2011).

Tab. 1 – Druhy č. Diplozoidae na území Evropy a jejich hostitelé (Matějusová *et al.* 2001, upraveno)

druh	název ryby	latinský název ryby
<i>Eudiplozoon nipponicum</i>	kapr obecný	<i>Cyprinus carpio</i>
<i>Paradiplozoon bliccae</i>	cejnek malý	<i>Blicca bjoerkna</i>
<i>Paradiplozoon homoion</i>	střevle potoční, plotice obecná, cejnek malý, kapr obecný, hlaváč říční, hrouzek obecný a další...	<i>Phoxinus phoxinus</i> , <i>Rutilus rutilus</i> <i>Blicca bjoerkna</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Gobius fluviatilis</i> , <i>Gobio gobio</i>
<i>Paradiplozoon megan</i>	jelec tloušť	<i>Leuciscus cephalus</i>
<i>Paradiplozoon pavlovskii</i>	bolen dravý	<i>Aspius aspius</i>
<i>Paradiplozoon nagibinae</i>	cejn siný	<i>Abramis ballerus</i>
<i>Paradiplozoon sapae</i>	cejn perleťový	<i>Abramis sapa</i>
<i>Diplozoon paradoxum</i>	cejn velký	<i>Abramis brama</i>

Životní cyklus zástupců čeledi Diplozoidae začíná na jaře produkcí vajíček s dlouhým filamentem, ze kterých se přibližně za 10 dní líhnou onkomiracidia (obr. 1). Onkomiracidium se přichytí na žábry ryby, kde se přemění na larvu zvanou diporpa. Ta musí najít druhou diporpu, se kterou srůstá a společně se vyvíjejí do stádia dospělého (Roberts and Janovy 2005; Matějusová *et al.* 2001; Pečínková *et al.* 2007a; Zurawski *et al.* 2001). Samotná diporpa není schopna dosáhnout pohlavní dospělosti (Khotenovsky 1985 in Pečínková *et al.* 2007b). Diporpy se pohybují po povrchu žaber, při setkání dvou diporp na stejném žaberním oblouku je pravděpodobné, že dojde k jejich spojení. Jakým způsobem se diporpy hledají, není dosud známo (Zurawski *et al.* 2001; Schabussova *et al.* 2003; Zurawski *et al.* 2003). Po setkání se dorzální papila prvního jedince spojí s ventrální přísavkou druhého jedince a naopak a dochází tak k somatické fúzi (Zurawski *et al.* 2001). Po splynutí dvou samostatných jedinců dojde ke sdílení nervové, svalové, trávicí a pohlavní soustavy. Poté začnou

společně růst a mohou přežít pouze jako pár, takzvaná „permanentní kopula“ (Zurawski *et al.* 2003).



Obr. 1 – Životní cyklus zástupců č. Diplozoidae

V přední části těla je uložena většina orgánů včetně vitelárií, zatímco v zadní části těla je umístěna reprodukční soustava a párová slepá střeva. Přichycovací struktury dospělců č. Diplozoidae se skládají ze čtyř párů svorek a z páru malých centrálních háčků. První pár svorek a centrální háčky se objevují již u onkomiracidíí a umožňují jim přichytit se na žábry ryb (Khotenovsky 1985 in Matějusková *et al.* 2001; Khotenovsky 1985 in Pečínková *et al.* 2007a).

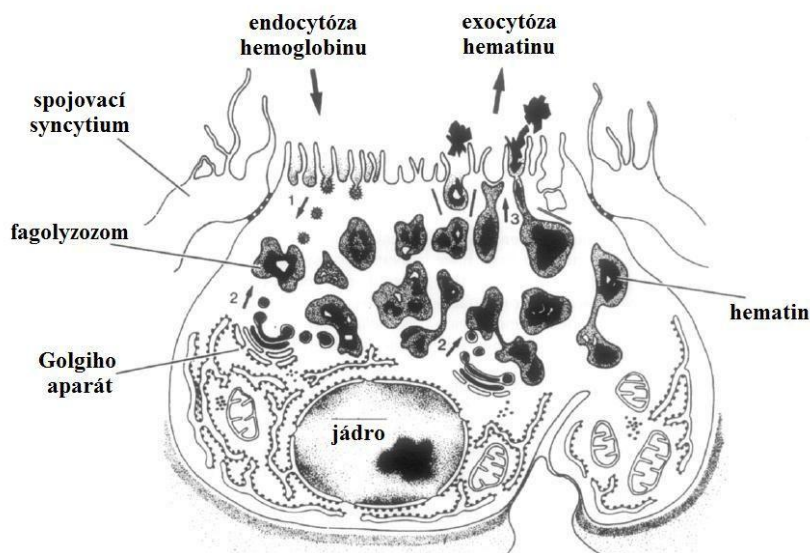
#### 1.1.4.1. Trávicí soustava

U zástupců podtřídy Polyopisthocotylea trávicí soustava začíná ústním otvorem, následuje přední střevo zahrnující farynx a ezofágus, na které navazují párová slepá střeva. Do lumen předního střeva ústí četné žlázové buňky a mohlo by zde docházet k extracelulární fázi trávení potravy (Smyth and Halton 1983).

Příjem potravy začíná u *Eudiplozoon nipponicum* přichycením k povrchu sekundárních žaberních lamel, pomocí bukálních přísavek. Svalnatý farynx se odtáhne, vyvolá tlak, který způsobí protržení žaberní lamely (Hodová *et al.* 2010), nebo může dojít k narušení cév žaberní lamely pomocí histolytických enzymů, které by mohly být

sekretovány žlázními buňkami v předním střevě (Hodová *et al.* 2010; Smyth and Halton 1983). Ústní dutina se plní krví, která je pravděpodobně pumpována do střeva pomocí farynxu (Hodová *et al.* 2010).

Ve slepých střevech se nachází gastrodermis. Gastrodermis u krevsajících zástupců skupiny Polyopisthocotylea je velmi rozdílná od gastrodermis u zástupců skupiny Monopisthocotylea. U skupiny Polyopisthocotylea se gastrodermis skládá z pigmentovaných trávicích buněk a z nepigmentovaného spojovacího syncytia (obr. 2). Je vyztužena bazální laminou a vrstvou podélné a okružní svaloviny. Povrch celého střeva je pokryt spojovacím syncytiem, přes které vyúsťují na povrch výběžky trávicích buněk (Smyth and Halton 1983).



Obr. 2 – Trávicí buňka v gastrodermis u zástupců Polyopisthocotylea

(Smyth and Halton 1983, upraveno)

Ve slepých střevech dochází pravděpodobně k intracelulárnímu trávení v lyzozomálním cyklu. Hemoglobin je endocytován trávicími buňkami a následně se dostává do fagolyzozomu spolu s lytickými enzymy transportovanými z Golgiho aparátu. Dochází zde k intracelulárnímu trávení hemoglobinu, které zahrnuje nejspíše odštěpení hemu a degradaci globinu na dipeptidy a jednotlivé aminokyseliny (Smyth and Halton 1983). Hem je oxidován na ferriporphyrin hematin, který je nerozpustný a dochází k jeho hromadění v buňce. Postupným opakovaným trávením hemoglobinu a hromaděním pigmentu se začíná buňka zvětšovat. Výsledný tlak vyvolá fúzi lyzozomálních kanálů s povrchem buňky a tímto dočasným průchodem dochází

k vytlačení pigmentu do střeva, odkud je následně odstraněn regurgitací (obr. 2) (Halton 1997).

O trávení krve u monogeneí a zúčastněných trávicích enzymech je velmi málo informací v porovnání s ostatními krevsajícími parazity, jako jsou schistosomy, fascioly nebo klíšťa. Většina informací pochází z histochemických a ultrastrukturálních analýz (shrnuto v Smyth and Halton 1983).

## **1.2. Hematofágie a hematofágní paraziti**

Hematofágie je potravní strategie, která se během evoluce vyvinula nezávisle u mnoha skupin organismů, jako jsou např. Arthropoda, Annelida, Nematoda, Platyhelminthes a dalších taxonů (Azar and Nel 2012). Během vývoje hematofágní organismy musely překonat celou řadu problémů spojených s příjmem potravy, jako je zabránění srážení krve, inaktivace imunitního obranného systému hostitele a bezpodmínečná eliminace hemu. Hem je esenciální složkou výživy, ale zároveň je ve své volné formě potenciálně toxický a jeho rychlá detoxifikace je u krevsajících prazitů nezbytnou podmínkou pro jejich přežití (Toh *et al.* 2010; Dalton *et al.* 2004).

U hematofágních helmintů a klíšťa je jedním z hlavních zdrojů potravy hemoglobin, který je zdrojem proteinů pro anabolické procesy jako je vitelogeneze, produkce vajíček, růst a vývoj (Grandjean 1984 in Mendiola *et al.* 1996; Horn *et al.* 2009; Yamaji *et al.* 2013; Caffrey *et al.* 2004; Delcroix *et al.* 2006). Hemoglobin je tráven u jednotlivých skupin rozdílně za pomoci různých kaskád trávicích enzymů (peptidáz), které fungují v rámci proteolytické kaskády (Caffrey *et al.* 2004; Robinson *et al.* 2008a; Horn *et al.* 2009)

## **1.3. Peptidázy**

Peptidázy jsou enzymy, které jsou nezbytné pro přežití všech druhů organismů a jsou kódovány přibližně 2% všech genů (Rawlings *et al.* 1999). Hrají klíčovou roli v interakcích mezi parazitem a hostitelem: invaze do hostitele, migrace tkáněmi, trávení potravy, vyhnutí se imunitní odpovědi a tvorba zánětu (Tort *et al.* 1999; Caffrey *et al.* 2004; Zussman *et al.* 1970 in Delcroix *et al.* 2006; Delcroix *et al.* 2007). Peptidázy, enzymy štěpící proteiny, mohou být potenciálně velmi nebezpečné pro živé organismy a tedy jejich aktivita musí být přísně regulována. Pro řízení nadměrné peptidázové

aktivity existuje několik odlišných mechanismů, mezi nejdůležitější se řadí interakce enzymů s proteiny, které je inhibují (Rawlings *et al.* 2004).

Peptidázy katalyzují hydrolýzu peptidických vazeb v molekulách proteinů a polypeptidů. Dělí se podle místa působení na exopeptidázy a endopeptidázy. Endopeptidázy štěpí peptidické vazby uvnitř polypeptidového řetězce za vzniku peptidů o různé velikosti. Exopeptidázy odštěpují jednotlivé aminokyseliny nebo řetězce několika aminokyselin z konce polypeptidového řetězce. Dělí se na karboxypeptidázy (odštěpující jednotlivé aminokyseliny od C konce), peptidyl dipeptidázy (odštěpující dipeptidy od C konce), aminopeptidázy (odštěpující jednotlivé aminokyseliny od N konce), dipeptidyl peptidázy (odštěpující dipeptidy od N konce), tripeptidyl peptidázy (odštěpující tripeptidy od N konce), dipeptidázy (specifické pro dipeptidy) nebo omega peptidázy odštěpující substituované, cyklické nebo izopeptidovou vazbou vázané terminální aminokyselinové zbytky (Barrett *et al.* 2004).

Dále jsou peptidázy děleny podle katalytického mechanismu, který je dán chemickými vlastnostmi postranních skupin aminokyselin umístěných v aktivním místě peptidázy, které jsou odpovědné za katalytickou aktivitu enzymu (Rawlings and Barrett 1993). Peptidázy se dělí podle katalytického mechanismu na devět skupin dle databáze MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) (Barrett *et al.* 2004; Rawlings *et al.* 2010; James, 2004):

- Serinové peptidázy (**S**) – nukleofilem je hydroxylová skupina postranního řetězce aminokyseliny serinu v aktivním místě
- Cysteinové peptidázy (**C**) – nukleofilem je sulfhydrylová skupina postranního řetězce aminokyseliny cysteinu v aktivním místě
- Threoninové peptidázy (**T**) – nukleofilem je hydroxylová skupina postranního řetězce aminokyseliny threoninu v aktivním místě
- Aspartátové peptidázy (**A**) – nukleofilem je aktivní molekula vody na postranním řetězci kyseliny asparagové
- Glutamátové peptidázy (**G**) – nukleofilem je aktivní molekula vody na postranním řetězci kyseliny glutamové
- Asparaginylové peptidázy (**N**) – asparagin je unikátní aminokyselina, která může působit jako nukleofil a zároveň reagovat s molekulou vody

- Metalopeptidázy (**M**) – nukleofilem je aktivní molekula vody, která je aktivována kovovými ionty  $Zn^{2+}$
- Peptidázy s neznámým katalytickým mechanismem (**U**)
- Smíšené peptidázy (**P**) – nukleofilem může být hydroxylová skupina na postranním řetězci aminokyseliny serinu nebo threoninu

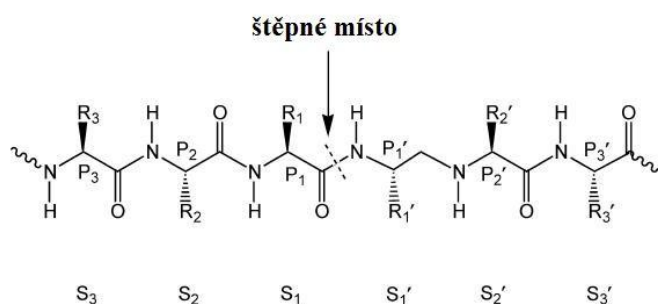
Rawlings and Barrett (1993) zavedli rozdělení peptidáz podle molekulární struktury, homologie a funkce. Na základě zkoumání dostupných aminokyselinových sekvencí peptidáz a statistické významnosti byly enzymy rozděleny do jednotlivých rodin. Některé rodiny mohou být seskupeny do tzv. klanů, které vykazují známky vzdálené příbuznosti a zdá se, že existuje až 60 různých vývojových linií peptidáz odlišného původu (Rawlings and Barrett 1993). Vzdálená příbuznost je dána především lineárním pořadím aminokyselinových zbytků v katalytickém místě polypeptidového řetězce a terciární strukturou. Název jednotlivých klanů peptidáz je tvořen písmenem, které popisuje katalytický mechanismus (S, C, T, A, G, N, M, P, U) a je doplněn druhým velkým písmenem, které se přiřazuje abecedně např. AA (Barrett *et al.* 1998).

Do rodin se peptidázy dělí podle evolučního původu na základě primární struktury, která je podobná alespoň s jedním dalším členem rodiny. Název rodiny je tvořen písmenem katalytického typu, za které se přidává číslice, např. C1 (Rawlings and Barrett 1993).

Pro hydrolyzu peptidické vazby je nezbytné, aby peptidáza byla schopna vázat protein nebo peptidický substrát ve svém aktivním místě. Vazebná účinnost je funkcí jak chemického prostředí, které vytváří peptidázové kapsy, tak chemické povahy peptidu, který přímo interaguje s aktivním místem. Důležitými faktory, které ovlivňují interakci jsou: velikost molekuly, polarita, náboj, hydrofóbnost a prostorová dostupnost. Sekvence, která je po stranách aminokyselin aktivního místa, je vysoce konzervovaná a udržuje katalytické vlastnosti. Tyto konzervované regiony jsou používány pro klasifikaci peptidáz. Substrátová specifita může být využita pro identifikaci nebo selekci inhibitorů proti peptidázám (Sajid and McKerrow 2002).

Jednou z nejdůležitějších vlastností peptidáz je substrátová specifita, podle které je můžeme snadno rozlišit, ale u mnoha peptidáz je specifita mnohem složitější a někdy těžko definovatelná (Rawlings *et al.* 2008; Rawlings *et al.* 2010). Písmenem  $S_n$  se označují vazebné kapsy peptidázy směřující k N konci a  $S_n'$  kapsy směřující k C konci,

číslování začíná od  $n = 1$ . Aktivní místo se nachází mezi pozicí  $S_1$  a  $S_1'$  vazebné kapsy. Postranní řetězce aminokyselin substrátu, které se vážou do vazebné kapsy peptidázy, se označují písmeny  $P_n$  směrem k C konci a  $P_n'$  směrem k N konci a číslování začíná od  $n = 1$ . Štěpné místo substrátu se nachází mezi pozicí  $P_1$  a  $P_1'$ . Peptidázy, které mají specifitu v jiných vazebných kapsách než je  $S_1$  a  $S_1'$  se nazývají peptidázy s rozšířenou vazebnou specifitou (Rawlings *et al.* 2008; Barrett *et al.* 1998) (obr. 3).



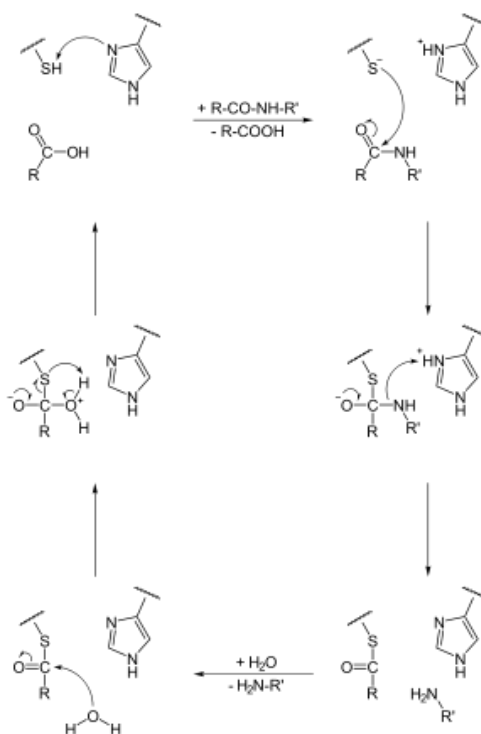
**Obr. 3 – schéma substrátové specifity peptidáz-** (podle schéma Schechter and Berger 1967 upraveno Shinnar *et al.* 2003)

U mnoha různých skupin navzájem značně odlišných organismů jako jsou např. Apicomplexa, Platyhelminthes, Nematoda nebo klíšťata, byla prokázána účast cysteinových a aspartátových peptidáz při hemoglobinolýze. Toto zjištění může svědčit o evolučně konzervované funkci peptidáz spjaté s kyselým prostředím zažívacího traktu, ve kterém cysteinové a aspartátové peptidázy fungují optimálně (Williamson *et al.* 2003; Caffrey *et al.* 2004; Delcroix *et al.* 2006; Sojka *et al.* 2008).

### 1.3.1. Cysteinové peptidázy

Peptidázy, u kterých je nukleofilem sulfhydrylová skupina na cysteinovém zbytku, jsou známy jako cysteinové peptidázy (Barrett *et al.* 1998). Jsou široce rozšířeny u živých organismů. Bylo identifikováno více než 400 typů cysteinových peptidáz u mnoha různých organismů zahrnujících viry, bakterie, rostliny, bezobratlé i obratlovce (Barrett and Rawlings 2001; Lecaille *et al.* 2002; Rao *et al.* 2007). U mnoha parazitů mají cysteinové peptidázy nezbytnou roli v životním cyklu a patogenitě. Rozmanitost těchto funkcí je dána jejich unikátní nukleofilitou, přizpůsobivostí k různým substrátům a relativní stabilitou v rozdílném biologickém prostředí. Cysteinové peptidázy parazitů hrají klíčovou roli v úniku před imunitním systémem, při aktivaci enzymů, virulenci, při buněčné a tkáňové invazi, excystaci, líhnutí, svlékání a trávení (Sajid and McKerrow 2002).

Katalytický mechanismus působení cysteinových peptidáz je podobný serinovým peptidázám (Barrett and Rawlings 1996; Barrett *et al.* 1998) (obr. 4). Cysteinové peptidázy vyžadují pro hydrolýzu cysteinový zbytek v aktivním místě. Nukleofilita thiolové skupiny je zesílena díky těsné blízkosti histidinu v aktivním místě, který vystupuje jako protonový donor. Sulfhydrylová skupina na cysteinové straně řetězce a imidazol histidinu vytvoří thiol-imidazolovou nábojovou dyádu, která bývá většinou stabilizována vysoce konzervovaným asparaginem. Jeho přítomnost však není podmínkou. Vysoce konzervované glutaminové formy oxoniové díry jsou klíčovým prvkem ve formování elektrofilního centra ke stabilizaci tetraedrálního meziprojektu v průběhu hydrolýzy. Dvě ionizovatelné skupiny thiol-imidazolové dyády umožňují enzymatickou aktivitu v širokém rozsahu pH díky  $pK_a$  cysteinu okolo 4 a  $pK_a$  histidinu okolo 8,5. Nábojový systém je dále stabilizován chemickým prostředím aktivního místa (Barrett *et al.* 1998; Sajid and McKerrow 2002).



**Obr. 4- Katalytický mechanismus cysteinových peptidáz -**  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine\\_protease](https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease))

Mnoho cysteinových peptidáz je syntetizováno jako prekurzor, který obsahuje proregion a katalytický region. Proregion umožňuje řadu nezávislých funkcí, které zahrnují (Sajid and McKerrow 2002):

- působení jako intramolekulární chaperon, který napomáhá proteinu se správně složit

- působení jako endogenní inhibitor regulující peptidázovou aktivitu
- v některých případech jako signál, který peptidázu směřuje do intracelulárního prostoru

Cysteinové peptidázy, které jsou sekretovány nebo směřovány do intracelulárních prostor, obsahují hydrofóbní N – terminální sekvenci tvořenou 15 – 22 aminokyselinovými zbytky, která se nazývá signální sekvence (Sajid and McKerrow 2002).

### 1.3.2. Klasifikace cysteinových peptidáz

V roce 1879 byla z ovoce *Carica papaya* izolována a určena první cysteinová peptidáza, která byla nazvána papain. Cysteinové peptidázy se podle databáze MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) dělí do 9 klanů (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP). Peptidázy, které mají sekvenci podobnou papainu, se nazývají „papain – like“ peptidázy a řadí se do klanu CA (Barrett *et al.* 1998). Klan CA se dále dělí na 24 rodin, z toho 12 rodin zahrnuje peptidázy helmintů a parazitických prvoků (Atkinson *et al.* 2009). Parazitární peptidázy jsou zařazeny především v rodinách C1 a C2, kde rodina C1 zahrnuje papain, příbuzné rostlinné peptidázy, příbuzné parazitární peptidázy a lyzozomální cathepsiny (Turk *et al.* 2000). Jedná se o velkou rodinu zahrnující 80 % peptidáz z klanu CA u helmintů a 45 % peptidáz z klanu CA u prvoků (Atkinson *et al.* 2009). Peptidázy z klanu CA jsou dále charakterizovány citlivostí k inhibitoru E-64 (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane). Rodina C2 obsahuje „calpain – like“ peptidázy (Sajid and McKerrow 2002).

Lyzozomální cysteinové peptidázy mohou být rozděleny na základě jejich vysoké sekvenční homologie a vysoce konzervovaného aminokyselinového motivu v proregionu (ER(V/I)FNIN – název je tvořen názvy aminokyselin motivu) na dvě skupiny cathepsin „L – like“ (L, V, K, S, W, F a H) obsahující ER(V/I)FNIN motiv a cathepsin „B – like“ pouze s jedním členem (Karrer *et al.* 1993; Turk *et al.* 2000). Cathepsiny W a F jsou blízce příbuzné a obsahují modifikovaný konzervovaný motiv v proregionu ERFNAQ (Wex *et al.* 1999). Cathepsiny B nemají ER(V/I)FNIN motiv (Karrer *et al.* 1993), ale mají vloženou peptidickou smyčku, tzv. „occluding loop“, v katalytické doméně, odpovědnou za peptidyl dipeptidázovou aktivitu. Kromě exopeptidázové aktivity cathepsiny B vykazují i endopeptidázovou aktivitu (Musil *et al.* 1991; Coulombe *et al.* 1996; Illy *et al.* 1997). Proregion skupiny

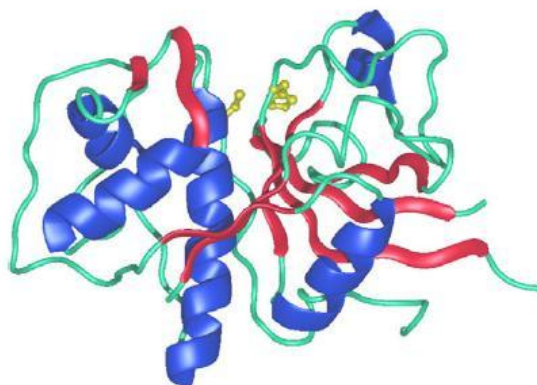
cathepsinu „L – like“ je složen přibližně ze 100 aminokyselin a je podstatně delší než proregion cathepsinů „B – like“, který obsahuje přibližně 60 aminokyselin (Turk *et al.* 2000). Cathepsin F má unikátní proregion, který může být dlouhý až 251 aminokyselin a obsahuje N-terminální segment vykazující strukturální podobnost s cystatiny (Nägler *et al.* 1999).

Cathepsiny B a L mají primárně substrátové preference v  $S_2$  kapse. Pro odlišení aktivity cathepsinu B od aktivity cathepsinu L se často využívá hydrolýzy malých peptidů, které obsahují v pozici  $P_2$  arginin. Savčí cathepsin B hydrolyzuje oba substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC, zatím co cathepsin L hydrolyzuje pouze Z-Phe-Arg-AMC, kdy Z je N-terminální blokující skupina a AMC je fluorescenční skupina zůstávající po hydrolýze (Sajid and McKerrow 2002).

#### **1.4. Cathepsin L**

Endopeptidáza cathepsin L patří mezi cysteinové peptidázy klanu CA do rodiny C1 (Rawlings and Barrett 1993; Barrett *et al.* 1998).

Lidský cathepsin L (obr. 5) je složen ze dvou domén, levé (L-) a pravé (R-). Levá doména se skládá ze 3  $\alpha$ -helixů. Nejdelší tzv. vertikální helix, někdy nazývaný centrální helix obsahuje více než 30 aminokyselinových zbytků. Pravá doména je tvořena  $\beta$ -barelem s předními vlákny tvořícími stočenou strukturu. Na spodní straně je barel obklopen  $\alpha$ -helixem. Histidin aktivního místa je umístěn na vrcholu skládaného listu tvořícího barel. Dvoudoménové rozhraní se otvírá na vrcholu a tvoří štěrbinu aktivního místa. V jeho centru jsou reaktivní zbytky aminokyselin – Cys a His, každý pocházející z jiné domény. Cystein reaktivního místa je umístěn na N konci centrálního helixu levé domény, zatímco histidin je umístěn mezi  $\beta$  - barelovými zbytky pravé domény. Tyto dva katalytické zbytky tvoří thiol-imidazolový iontový pár, který je nezbytný pro proteolytickou aktivitu enzymu (Gunčar *et al.* 1999; Turk *et al.* 2012).



Obr. 5 – 3D struktura lidského cathepsinu L (Turk *et al.* 2012)

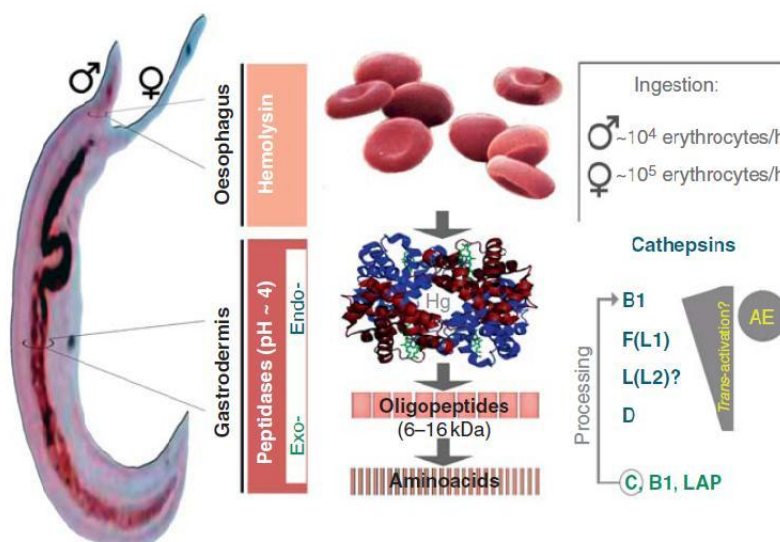
Preproenzym cathepsinu L je syntetizován na ribozomech endoplazmatického retikula a při vstupu do jeho lumen dochází k odstranění signální sekvence. Cathepsin L je modifikován glykosylací, manózovou fosforylací a vytvářením disulfidických vazeb. Prosegment je často nutný pro správné poskládání proteinu, stabilitu a pro transport do Golgiho aparátu (Tao *et al.* 1994 in Barrett *et al.* 1998). Doprava do lyzozomu je zprostředkována receptorem pro manózo-6-fosfát (MPRs) a pravděpodobně napojením na pH dependentní membránu (McIntyre *et al.* 1994). Lidský cathepsin L je katalyticky aktivní při pH 3 – 6,5 a jeho pH optimum je 6,5 (Dehrmann *et al.* 1995). Při neutrálním pH jsou savčí cathepsiny nestabilní a tím je organismus chráněn před nechtěnou proteolýzou savčích buněk cathepsiny uvolněnými z lyzozomů (Dowd *et al.* 2000).

Jednotlivé skupiny hematofágních helmintů se mezi sebou odlišují jak zastoupením proteolytických enzymů, tak i samotnou stavbou gastrodermis. Gastrodermis může být syncytiální nebo složená z jednotlivých buněk a trávení může probíhat intracelulárně v trávicích buňkách nebo extracelulárně v lumen střeva (Dalton *et al.* 2004; Toh *et al.* 2010). Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na cysteinové peptidázy, které hrají jednu z hlavních rolí při trávení hemoglobinu u hematofágních Platyhelminthes a klíšat. Největší pozornost byla věnována cathepsinu L, který je jedinou identifikovanou peptidázou u monogeneí.

#### 1.4.1. Trávení krve u motolic rodu *Schistosoma*

U schistosom jsou erythrocyty degradovány v jícnu pomocí hemolyzinu a volný hemoglobin postupuje dále do střeva (Dike 1971 in Bogitsh and Carter 1977). Trávení hemoglobinu probíhá extracelulárně za pomoci endopeptidáz a exopeptidáz (karboxypeptidázy a aminopeptidázy) sekretovaných do lumen střeva. Hemoglobin je

štěpen na hem a globin. Globin je postupně degradován na menší fragmenty a dále na jednotlivé dipeptidy a aminokyseliny pronikající do gastrodermis, která není u schistosom buněčná, ale syncytiální (Halton 1997; Dalton et al. 2004). Hem je následně oxidován na hematin, který se nachází v lumen střeva, odkud je odstraněn regurgitací a ukládá se v ledvinách hostitele (Brindley et al. 1997), viz obr. 6.



**Obr. 6 – Proteolytická kaskáda u *Schistosoma mansoni* (Kašný *et al.* 2009) – cathepsiny (B1, F(L1), L, D, C), AE – asparaginylová endopeptidáza, LAP – leucin aminopeptidáza**

Peptidázy, které se nacházejí ve střevě a podílejí se na degradaci hemoglobinu, tvoří proteolytickou kaskádu a zahrnují – cysteinové peptidázy (B1, F, L2, L3, C, AE) aspartátové peptidázy (D) a metalopeptidázy (LAP) (Barrett *et al.* 1998; Sajid and McKerrow 2002; Delcroix *et al.* 2006; Silva *et al.* 2011). Peptidázy se dále dělí dle místa působení na endopeptidázy (cathepsiny B1, D, F (L1), L (L2), L3, AE) a exopeptidázy (cathepsiny B1, C a leucin aminopeptidáza (LAP)). Všechny tyto enzymy jsou syntetizovány jako zymogeny s prosekvenčí, která blokuje aktivní místo a slouží tedy jako inhibitor enzymu. K aktivaci zymogenu může dojít autokatalyticky nebo působením jiné peptidázy (Caffrey *et al.* 2004). Ve střevě schistosom je přítomná asparaginylová endopeptidáza (legumain, AE), která plní aktivační funkci pro procathepsin B1 (Sajid *et al.* 2003), ale může aktivovat i další peptidázy jako jsou procathepsin F (L1), L (L2) a D (Dalton *et al.* 1996 in Caffrey *et al.* 2004), dále se může podílet na degradaci hostitelských proteinů. Cathepsin C přítomný ve střevě schistosom může dokončit zpracování cathepsinu B1 (Sajid *et al.* 2003; Caffrey *et al.* 2004). V rámci trávení hemoglobinu Cathepsin B1 vykazuje jak endopeptidázovou, tak exopeptidázovou aktivitu (Delcroix *et al.* 2006). Dále se v gastrodermis nachází peptidáza LAP, která je zodpovědná za konečnou fázi trávení hemoglobinu

(McCarthy *et al.* 2004). Všechny tyto peptidázy mají nízké pH optimum, které je v souladu s kyselým pH ve střevě schistosom (Caffrey *et al.* 2004) (obr. 6). U *S. mansoni* byl objeven další cathepsin L3 v gastrodermis, který se podílí na trávení hemoglobinu. Je aktivní v širokém rozpětí pH 3 - 11 s pH optimem 4 - 6 při trávení hemoglobinu. Vzhledem k jeho lokalizaci je pravděpodobné, že se podílí na kompletní degradaci hostitelských proteinů (Dvořák *et al.* 2009).

Ve střevě ani v gastrodermis schistosom nebyly při trávení prokázány žádné serinové peptidázy, které hrají hlavní roli v trávicím procesu u obratlovců (Delcroix *et al.* 2006).

Předchozí studie ukázaly, že inhibitory cysteinových peptidáz a aspartátové peptidázy mohou blokovat degradaci hemoglobinu a tím zastavit vývoj schistosom a produkci vajíček (Delcroix *et al.* 2006; Wasilewski *et al.* 1996). Identifikace klíčových enzymů není důležitá jen z důvodu biologie a patogeneze schistosom, ale tyto enzymy se dále mohou stát vhodným cílem pro vývoj léků (Delcroix *et al.* 2006).

#### **1.4.1.1. Cathepsin L u rodu *Schistosoma***

U schistosom byla prokázána přítomnost cathepsinů L ve vajíčkách, miracidíích, schistosomulách a u dospělců (Wasilevski *et al.* 1996; Dalton *et al.* 1996b). U schistosom byly porovnány sekvence cathepsinů L (SmCL1 (F) a SmCL2 (L)) a byla zjištěna shoda pouze ze 43,8 % (Dalton *et al.* 1996a). Po srovnání s jinými cathepsiny bylo prokázáno, že katalytický region u cathepsinu SmCL1 vykazuje vysokou podobnost s cathepsiny F u *Paragonimus. westermani* a s lidským cathepsinem F a následně byl přejmenován na cathepsin F (Park *et al.* 2001).

Podle studie Brady *et al.* (2000a) byl SmCF identifikován v gastrodermis a v exkrečně sekrečních produktech (ESP) pomocí metod imunolokalizace a imunoblotu. Tyto výsledky potvrzují hypotézu o jeho důležité roli při trávení hemoglobinu ve střevě. SmCL2 byl podle studie Michel *et al.* (1995) detekován v pohlavní soustavě samic a u samců byl lokalizován především v subtegumentu *canalis gynaecophorus*. Tuto studii však vyvrací studie Bogitsh *et al.* (2001), ve které se podařilo pomocí metody imunolokalizace prokázat přítomnost obou peptidáz SmCF i SmCL2 ve střevním lumen a gastrodermis dospělců *S. mansoni*. SmCF byla dále detekována v tegumentu dospělců *S. mansoni*, ale SmCL2 se v reprodukčním systému prokázat nepodařilo. SmCL3 byl

detekován ve vajíčkách, miracidíích a u dospělců, kde se kromě gastrodermis nachází ještě ve viteláriích (Dvořák *et al.* 2009).

Motiv ER(V/I)FNIN (Karrer *et al.* 1993) byl u SmCL2 identifikován jako ERFYIN, u SmCL3 jako ERFNMN a u SmCF jako ERFNAQ, který je identický s ostatními cathepsiny F (Brady *et al.* 2000b).

#### **1.4.2. Trávení krve u motolic rodu *Fasciola***

U fasciol probíhá rychlá hemolýza ve střevním lumen při kyselém pH. Dochází k roztažení střeva a do jeho lumen jsou sekretovány peptidázy z gastrodermis, dochází tak k extracelulární fázi trávení (Halton 1976 in Halton 1997). Gastrodermis se skládá z jednotlivých buněk stejného typu, které prodělávají opakované transformace mezi sekreční a absorpční fází. Fáze sekrece je charakteristická velkým počtem mitochondrií, aktivními Golgiho aparáty a velkým počtem sekrečních vezikul. Absorpční fáze zahrnuje zmnožení povrchových lamel, mezi kterými leží exocytované sekreční vezikuly, Golgiho aparáty jsou přítomny pouze v malém množství a většinou jsou neaktivní (Robinson a Threadgold 1975 in Dalton 1998).

Cathepsiny se dostávají do lumen střeva ve formě zymogenů (Robinson a Threadgold 1975 in Halton 1997). Za degradaci hostitelského hemoglobinu jsou zodpovědné cathepsin L – like peptidázy L1, L2 a L5. Bylo prokázáno, že cathepsin L1 dokáže efektivně degradovat hemoglobin na peptidy o velikosti 3–14 aminokyselin, které se pak pravděpodobně mohou snadno vstřebávat do gastrodermis, kde by mohly být tráveny intracelulárně za působení cathepsinu C a aminopeptidázy (Robinson *et al.* 2008a). Dále Robinson *et al.* (2008b) navrhli, že aktivace cathepsinů L může probíhat i jinou peptidázou ve dvou krocích. Nejprve je malé množství cathepsinů L aktivováno asparaginylovými endopeptidázami, které se nachází ve střevním epitelu (Adisakwattana *et al.* 2007) a je následováno rychlým odštěpením prosegmentu aktivovaným cathepsinem L u ostatních cathepsinů L. Na trávení hemoglobinu se pravděpodobně podílí i cathepsin D, který byl detekován v gastrodermis (McDougall 2012). Hemoglobin je extracelulárně tráven mezi povrchovými lamelami buněk gastrodermis při pH přibližně 4,5 (Lowther *et al.* 2009; Acosta *et al.* 1998). Při nízkém pH dochází k autokatalytické aktivaci cathepsinu L1, který je velmi stabilní a funkční v širokém rozpětí pH 3,0–9,0 (Lowther *et al.* 2009).

Produktem degradace hemoglobinu vzniká hematin, který se nachází především ve střevním lumen, méně v trávicích buňkách a je odstraňován regurgitací ze střeva (Robinson and Threadgold 1975 in Halton 1997).

#### **1.4.2.1. Cathepsin L u rodu *Fasciola***

Cysteinové peptidázy u *Fasciola hepatica* jsou v průběhu vývoje parazita silně regulovány a u různých stádií jsou různě zastoupeny. Infekční larva používá k penetraci hostitelské střevní stěny cathepsiny L3 a B, k migraci hostitelskými játry u nedospělého stádia parazita využívá cathepsiny L1 a L2, někdy i B a L3. U dospělců se podílejí na trávení hemoglobinu cathepsiny L1, L2 a L5 (Robinson *et al.* 2008a). Ve studii Dalton *et al.* (2003) se podařilo získat transkripty kódující zymogeny cathepsinů L (FhCL1 a FhCL2), které vykazují strukturální podobnost s cathepsinem L u obratlovců a skládají se ze signálního peptidu (12 – 20 aminokyselinových zbytků), prosegmentu (100 aminokyselinových zbytků) a holoenzymu (200 aminokyselinových zbytků). U cathepsinů FhCL1 a FhCL2 nebyla na samotném enzymu metodou imunoblotu prokázána glykosylace ani N – glykosylační místa, narozdíl od savčích cathepsinů L.

Cathepsiny L1 u *Fasciola hepatica* je katalyticky aktivní v širokém rozpětí pH od 3 do 9 a jeho pH optimum při trávení hemoglobinu je 4,5 (Dalton *et al.* 2003; Lowther *et al.* 2009).

U cathepsinů L-like u fasciol se nachází v prosegmentu modifikovaný ER(V/I)FNIN motiv (DRWNIN) (Harmsan *et al.* 2004; Kuk *et al.* 2005; Yamasaki *et al.* 2002).

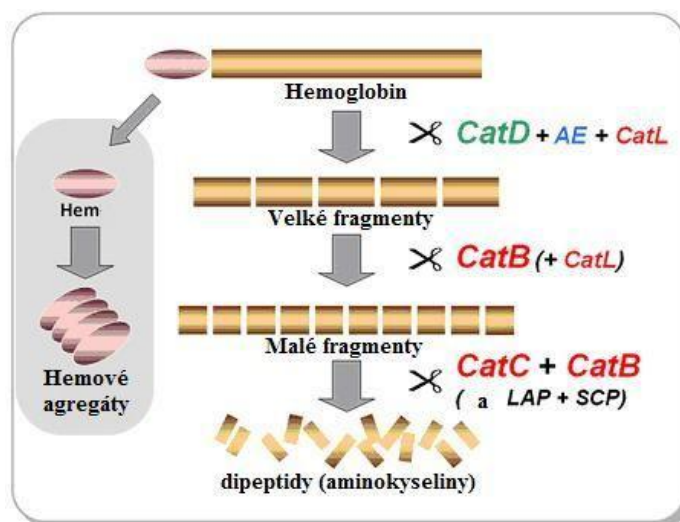
#### **1.4.3. Trávení krve u klíšťat**

U klíšťat probíhá trávení krve intracelulárně v trávicích buňkách střeva. Střevo současně slouží jako orgán k ukládání nasáté krve. Klíšťe dokáže nasát až stonásobek své hmotnosti a tuto krev postupně tráví (Sonenshine 1991; Coons *et al.* 1986 in Franta *et al.* 2011). V lumen střeva klíšťat se zřejmě nevyskytují žádné trávicí enzymy a proto vytváří ideální prostředí pro přežití a vývoj mikrobiálních patogenů získaných z krve hostitele (Sonenshine 1991).

Příjem potravy do trávicích buněk je zprostředkován jak endocytózou kapalně fáze, tak receptory zprostředkovanou endocytózou váčků s clathrinovými obaly (Coons

*et al.* 1986 in Franta *et al.* 2011). Intracelulární trávení krve začíná fúzí endozomu s primárním lyzozomem v sekundární lyzozom (Sonenshine 1991) a probíhá při kyselém pH výrazně nižším, než je pH obsahu střeva (Coons *et al.* 1986 in Franta *et al.* 2011). U peptidáz klíšťat je pH optimum okolo 3,0 (Akov *et al.* 1976 in Hatta *et al.* 2006). Hydrolýza hemoglobinu je výsledkem spolupráce cysteinových a aspartátových peptidáz, které působí jako kaskáda (Sojka *et al.* 2008). V trávicím procesu byly prokázány i serinové peptidázy (SCP) a metalopeptidázy (LAP) (Mulenga *et al.* 2003; Hatta *et al.* 2006).

Trávení hemoglobinu (obr. 7) v sekundárním lyzozomu u klíšťate *Ixodes ricinus* začíná štěpením hemoglobinu na velké fragmenty pomocí endopeptidáz cathepsinu D, cathepsinu L a legumainu (AE). Hlavní roli v degradaci hemoglobinu zaujímá cathepsin D, zatímco cathepsin L má mnohem nižší účinnost. Legumain se při fragmentaci uplatňuje nejméně, ale hraje specifickou roli při dokončení trávení. V další fázi se uplatňuje aktivita cathepsinu B, který je nejhojněji vyskytující se peptidázou v této kaskádě a cathepsinu C, které štěpí vzniklé menší fragmenty na dipeptidy. Štěpení na jednotlivé aminokyseliny je dokončeno mono-peptidázami, jako je karboxypeptidáza (SCP) a leucin aminopeptidáza (LAP) (Horn *et al.* 2009).



**Obr. 7 – Proteolytická kaskáda u klíšťat (Horn *et al.* 2009, upraveno) – CatD-** cathepsin D, **AE-**asparginylóvá endopeptidáza, **CatL-** cathepsin L, **CatB-** cathepsin B, **CatC-** cathepsin C, **LAP-** leucin aminopeptidáza, **SCP-** karboxypeptidáza

Při hydrolýze hemoglobinu se uplatní hlavní detoxifikační mechanismus hemu t.j. převedení hemu do formy nekrystalického agregátu. Tento agregát se shromažďuje uvnitř specializované organely trávicí buňky, která se nazývá hemozom (Lara *et al.* 2003). Nekrystalický agregát může být z buňky odstraněn pomocí exocytózy

nebo v některých případech může dojít k prasknutí plazmatické membrány a uvolnění obsahu buňky do lumen střeva. V ostatních případech se velké trávicí buňky oddělí od bazální laminy a jsou uvolněny do lumen střeva, kde se hromadí a defekací jsou následně odstraněny ven. Odstraněné trávicí buňky jsou nahrazeny nově diferencovanými buňkami střeva a celý cyklus se opakuje (Sonenshine 1991).

#### **1.4.3.1. Cathepsin L u klíšťat**

Cathepsin L u klíštěte *I. ricinus* nebyl detekován v lumen střeva, ale byl detekován uvnitř kompartmentů trávicích buněk. Zjištění podporuje domněnku, že tento enzym je součástí lyzozomálního trávicího aparátu u klíšťat (Franta *et al.* 2011).

cDNA sekvence cathepsinu L u klíštěte *I. ricinus* je dlouhá 1151 pb a kóduje 316 aminokyselin. Predikovaný signální peptid je složen z 16 aminokyselin a molekulová hmotnost proenzymu je 35,4 kDa s teoretickým pI 5,79. Proenzym má dvě N-glykosylační místa, která se nachází u holoenzymu (Sojka *et al.* 2008). V proregionu obsahuje ERYNIN motiv.

#### **1.4.4. Cathepsin L u monogeneí**

První kompletní sekvence genu pro cathepsin L u monogeneí, která byla získána z mořského druhu *Neobenedenia melleni*, je dlouhá 1070 pb a kóduje preprocathepsin L složený z 335 aminokyselin. Signální sekvence se skládá ze 17 aminokyselin, proregion ze 100 aminokyselin a holoenzym z 218 aminokyselin. Gen se skládá ze tří intronů a čtyř exonů. V proregionu cathepsinu L *N. melleni* byl objeven modifikovaný ER(V/I)FNIN motiv. Holoenzym cathepsin L *N. melleni* obsahuje v aktivním místě Cys<sup>25</sup>, His<sup>159</sup> a Asn<sup>175</sup> (číslované podle papainu). Aminokyselinová srovnávací analýza naznačuje, že cathepsin L u *N. melleni* je ortolog k ostatním eukaryotickým cathepsinům L (Rao *et al.* 2007).

*N. melleni* je mořské monogeneum, které se řadí do podtřídy Monopisthocotylea. Jedná se o ektoparazita, který se živí mukusem a epiteliálními buňkami ryb (Robinson *et al.* 1992). Průkaz cathepsinu L u všech jeho vývojových stádiích naznačuje, že cathepsin L se podílí jak na jeho vývoji, tak na interakcích mezi parazitem a hostitelem (Rao *et al.* 2007).

## **Materiály a metody**

Seznam zkratek je umístěn na str. 7. Použité kity, chemikálie, pufry, média a jejich složení je uvedeno v příloze č. 1.

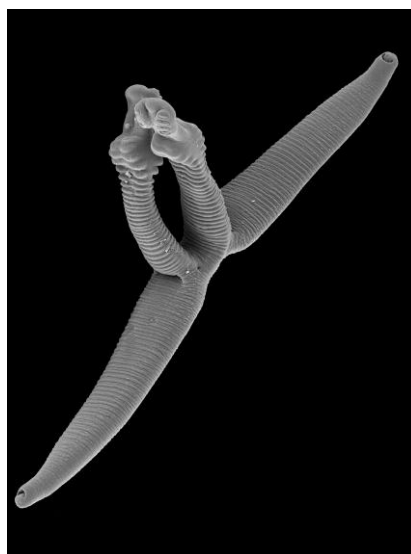
### **1.5. Modelové organizmy**

Modelovými organizmy pro naše pokusy byli dospělci *Paradiplozoon bliccae* (obr. 8) z *Blicca bjoerkna* a *Eudiplozoon nipponicum* (obr. 9) z *Cyprinus carpio*.



**Obr. 8 – *Paradiplozoon bliccae***

(RNDr. Jana Bulantová, Ph.D.)



**Obr. 9 – *Eudiplozoon nipponicum***

(RNDr. Jana Bulantová, Ph.D.)

### **1.6. Sběr a příprava materiálu**

Sběr materiálu (tab. 2) probíhal ve spolupráci s Ústavem botaniky a zoologie PřF Masarykovy univerzity v Brně a s Fakultou rybářství a ochrany vod JčU v ČB. Žábry ulovených ryb (*Cyprinus carpio*, *Blicca bjoerkna*) byly vyšetřovány pomocí binokulární lupy. Nalezení červí byli odebráni preparačními jehlami a dále byli zpracováni a uchováni dle potřeby experimentů.

**Tab. 2 – Počet získaných červů**

Druh	Název ryby	Lokalita	Celkový počet získaných červů
<i>Eudiplozoon nipponicum</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Experimentální rybníčky VÚRH JU Vodňany, Brněnská přehrada, Bartoldy Wielkie Ruś (Polsko)	122
<i>Paradiplozoon bliccae</i>	<i>Blicca bjoerkna</i>	Brněnská přehrada, Stará Dyje, Kančí obora, Soutok Moravy a Dyje	428

### 1.6.1. Proteinové vzorky

Pro získání exkrecečně sekrečních produktů (ESP) byli živí červi očištěni ve sterilní vodě od zbytků tkáně a poté byli inkubováni v 0,5 ml sterilní kohoutkové vodě v 1,5 ml zkumavkách cca 3 h. Po inkubaci byla voda s ESP přenesena do čisté zkumavky a ESP byly zakoncentrovány ultrafiltrací (Amicon Ultra 0,5; Ultracel-10 Membrane; 10 kDa; Millipore; 16110 x g; 4°C; 20 min) a uchovány při - 70°C.

Solubilní proteinový extrakt (*so/PE*) byl připraven mechanickým homogenizováním celých červů ve sterilní zkumavce, dále následovala sonikace na ledu na přístroji Vibra cell 72405 (Bioblock scientific; 10 W; 6 x 10 s). Vzorek byl centrifugován (16110 x g; 4°C; 20 min) a následně byl odebrán supernatant a uchován při - 70°C.

### 1.6.2. Měření koncentrace proteinu

Měření koncentrace proteinu ve vzorcích (ESP, *so/PE*) probíhalo v černé 96 jamkové mikrotitrační destičce (Nunc) na fluorometru Infinite M200 (TECAN) pomocí kitu Quant-IT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) dle návodu výrobce.

### 1.6.3. Izolace RNA

Z dospělých červů *E.nipponicum* byla izolována celková RNA pomocí TRIzol® Reagent (Invitrogen) dle manuálu výrobce ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)). Získaná RNA byla rozpuštěna ve 20 µl sterilní dd H<sub>2</sub>O, koncentrace byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific), RNA uchována při - 80°C.

## 1.7. Biochemické metody

### 1.7.1. Měření aktivity enzymu

Pro měření aktivity enzymu bylo použito absolutní množství 1  $\mu\text{g}$  u vzorku *solPE* a 5  $\mu\text{g}$  u vzorku ESP na jednu jamku u obou druhů *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Vzorky byly inkubovány 5 min v pufrech o různém pH (tab. 3) s 5 mM DTT, které se nepřidávalo jen v případě GPR substrátu. Některé vzorky byly inkubovány 5 min s inhibitory peptidáz (50  $\mu\text{M}$ , tab. 4). Poté byl ke všem vzorkům přidán fluorogenní substrát (50  $\mu\text{M}$ , tab. 5) a měření probíhalo (tab. 6) v černé 96 jamkové mikrotitrační destičce (Nunc) ve fluorometru Infinite M200 (TECAN). Celkový objem reakce byl 200  $\mu\text{l}$ . Všechna měření byla 3 x opakována. U vzorku ESP *E. nipponicum* bylo měření provedeno pouze jednou z důvodu nedostatku materiálu, koncentrace nebyla měřena. Výsledky byly graficky znázorněny v Microsoft Office Excel.

U inhibitorů CA-074 a iCL byla ověřena jejich schopnost inhibovat aktivitu cathepsinu L i cathepsinu B. Aktivita byla měřena při použití fluorogenního substrátu FR (50  $\mu\text{M}$ ) při pH 5 s (1  $\mu\text{g}$  / 1 jamka) rekombinantním cathepsinem B *Trichobilharzia regenti* a (1  $\mu\text{g}$  / 1 jamka) rekombinantním cathepsinem L *Fascioloides magna*. Příprava vzorků a vyhodnocení výsledků probíhalo stejně jako u předchozích vzorků.

**Tab. 3 - Použité pufry a různé pH**

Název pufru	pH
0,1 M Citrát/ 0,2 M fosfátový pufr	4; 5; 6; 7
0,2 M Tris pufr	8
0,2 M Glycin/NaOH pufr	9; 10

**Tab. 4 – Použité inhibitory**

Název inhibitoru	Specifita
E-64	cysteinové peptidázy
iCL	cathepsin L
CA-074	cathepsin B

**Tab. 5 – Použité substráty a specifita**

Fluorogenní substrát	Specifita
Z-Phe-Arg-AMC (FR)	pro cysteinové peptidázy
Z-Ala-Ala-Asn-AMC (AAN)	pro legumain
Z-Arg-Arg-AMC (RR)	pro cathepsin B
Z-Gly-Phe-Arg-AMC (GPR)	pro serinové peptidázy

**Tab. 6 – Programování kinetického cyklu**

Počet cyklů	30, interval 2 min
Excitace	355 nm
Emise	460 nm
Teplota	26°C

### 1.7.2. Detekce cysteinových peptidáz na blotu biotinylovanou próbou

Pro detekci cysteinových peptidáz, byla ke vzorkům přidána biotinem značená sonda DCG-04, analog inhibitoru E-64, která se kovalentně váže do jejich aktivního místa (Greenbaum *et al.* 2000; Greenbaum *et al.* 2002).

Vzorky *solPE P. bliccae* a *E. nipponicum* (10 µg) byly inkubovány 5 min s 5 mM DTT a s 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Poté byla přidána biotinem značená próba (5 µM) DCG-04 a inkubace pokračovala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Některé vzorky byly před přidáním DCG-04 preinkubovány s různými inhibitory (E-64, CA-074, iCL, DFP, PMSF, TLCK, TPCK) o koncentraci 100 µM po dobu 30 min. Ke vzorkům byl nakonec přidán neredukující vzorkový pufr na SDS-PAGE (15 min při laboratorní teplotě). Následně byly nanесeny na 10% gel (Mini protean TGX, Bio-rad) spolu s 10 µl proteinového standardu (Precious Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Xtra Standards, Bio-Rad). Vertikální elektroforéza (SDS-PAGE) probíhala na aparatuře MINI-Protean® 3 cell (Bio-Rad) při napětí 200 V. Po elektroforéze byly gely vloženy na 5 min do blotovacího pufru, stejně jako blotovací papíry a metanolem aktivované PVDF membrány (Immun – Blot<sup>TM</sup>; Bio-Rad). Rozdělené proteiny byly přeneseny na membránu přístrojem Trans – Blot® Turbo<sup>TM</sup> Transfer System (3 min; 2,5 A; Bio-Rad).

Membrány byly 2 x promyty v TBS-T (Tris pufr, NaCl, Tween 20) a vloženy do blokovacího pufru na 1 h pro blokování nespecifických vazeb. Následovalo promytí

1 min v TBS-T a inkubace 30 min v roztoku 15 ml TBS-T + 1% BSA + 15  $\mu$ g streptavidinu značeného křenovou peroxidázou (Sigma). Dále byly membrány 2 x promyty 5 min v TBS-T a vyvíjeny kitem Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad). Výsledek byl zdokumentován na přístroji GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

### 1.7.3. Detekce cysteinových peptidáz v gelech fluorescenční próbou

Vzorky ESP (20  $\mu$ g) a *solPE* (cca 200  $\mu$ g) *P. bliccae* a *E. nipponicum* byly preinkubovány s 5 mM DTT a s 5 mM  $MgCl_2$  5 min, poté bylo přidáno 20  $\mu$ M fluorescenčně značené DCG-04 (Red) (Greenbaum *et al.* 2000; Greenbaum *et al.* 2002) a inkubace probíhala 1h ve tmě.

Ke vzorkům ESP byl přidán neredukující vzorkový pufr a vzorky byly inkubovány 15 min při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky nanесeny na 10% gel (Mini protean TGX, Bio-Rad) spolu s 8  $\mu$ l proteinového standardu (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards; Bio-Rad). SDS-PAGE probíhala ve tmě při napětí 150 V.

Pro podrobnější rozdělení proteinů (peptidáz) ve vzorcích *solPE P. bliccae* a *E. nipponicum* byla použita metoda 2D elektroforéza. Po inkubaci vzorků *solPE* s DCG-04 bylo ke vzorkům přidáno 0,5 % amfolytů (Bio-Lyte® 3 / 10; Bio-Rad) a vzorky byly doplněny do 125  $\mu$ l rehydratačním pufrem. Následně byly nanесeny do rehydratační vaničky a překryty gelovými fokusačními proužky (ReadyStrip<sup>TM</sup> IPG Strips; 7cm; pH 3 – 10; Bio-Rad). Pasivní rehydratace proužků probíhala 12 hodin při pokojové teplotě bez přístupu světla. Po rehydrataci byly vzorky rozděleny pomocí izoelektrické fokusace při maximálním proudu 50  $\mu$ A na gelový proužek, izoelektrická fokusace byla ukončena po dosažení 30 000 Vh (Protean IEF System; Bio-Rad).

Po skončení fokusace byly gelové proužky ekvilibrovány na třepačce ve tmě po 10 min v ekvilibračním pufru I a poté 10 min v pufru II. Následně byly ekvilibrované proužky vloženy na 12% polyakrylamidové gely spolu s 8  $\mu$ l proteinového standardu (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards; Bio-Rad). SDS-PAGE probíhala ve tmě při konstantním napětí 200 V.

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního skeneru Molecular Imager® FX (Bio-Rad) při nastavení filtru Cy 2 (excitace = 488; emise = 530 nm).

Na závěr byly gely barveny 10 min v Coomassie Brilliant Blue R – 250 (CBBR-250) a zdokumentovány na přístroji GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

#### **1.7.4. Hmotnostní spektrometrická analýza**

Elektroforetogramy z 2D elektroforézy byly vyhodnoceny pomocí programu PDQuest (Bio-Rad). Obrázky gelů s peptidázami značenými fluorescenčním DCG-04 a obrázky gelů obarvených v CBBR-250 byly překryty přes sebe a porovnány. Relevantní spoty proteinu byly z gelu barveným CBBR-250 vyříznuty, vloženy na sucho do 0,5 ml zkumavky a poslány k analýze do laboratoře hmotnostní spektrometrie (Přf UK).

Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l 100 mM ABC (ammonium bicarbonát) a 50  $\mu$ l ACN (acetonitril), poté následovala inkubace 30 min s občasným promícháním na vortexu. Dále bylo ke vzorku přidáno 190  $\mu$ l ACN a následovala inkubace 2 min. Po inkubaci byl roztok odstraněn. Bylo přidáno 50  $\mu$ l redukčního roztoku a vzorek byl inkubován 30 min při 56°C. Poté bylo přidáno 400  $\mu$ l ACN, vzorek byl promíchán na vortexu a inkubován 2 min. Po inkubaci byl roztok odstraněn. Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l blokovacího roztoku, vzorek byl 2 min sonikován a 25 min inkubován ve tmě při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 400  $\mu$ l ACN, směs byla promíchána a vzorek byl inkubován 2 min. Roztok byl následně odstraněn. Bylo přidáno 100  $\mu$ l ACN a následovala inkubace 2 min. Roztok byl odstraněn a vzorek byl usušen. Enzym byl rozpuštěn ve 155  $\mu$ l 50 mM kys. octové a rozdělen po 15  $\mu$ l do alikvotů, které se uchovávaly při - 20°C. Při použití je alikvot třeba 10 x naředit (přidat k enzymu 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 60  $\mu$ l 100 mM ABC a 15  $\mu$ l ACN v tomto pořadí) a pro jeden vzorek je třeba použít 15  $\mu$ l směsi (odpovídá cca 0,5  $\mu$ M koncentraci enzymu) Vzorek byl inkubován 120 min na ledu (provedl Mgr. Karel Harant).

Analýza probíhala na přístroji 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex) vybaveným Nd:YAG laserem (355 nm, bombardování o frekvenci 200 Hz). Data byla identifikována pomocí programu MASCOT 2,2 (Matrix Science) s databází, která obsahuje přibližně 6000 proteinů, mezi které byla zařazena námi dodaná sekvence cathepsinu L *E. nipponicum* (tab. 7).

**Tab. 7 – Kritéria pro vyhledávání v databázi**

Enzym	Trypsin
Taxonomie	Insecta
Pevná modifikace	Carbamidomethylace
Variabilní modifikace	Deaminace, oxidace methioninu
Proteinová hmotnost	Neomezená
Peptidová hmotnostní tolerance	± 125 ppm
Fragmentová hmotnostní tolerance	± 0,3 Da

### 1.7.5. Zymografie

Pro analýzu bylo použito 5 µg *sol*PE *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Část vzorků byla preinkubována 1 h s inhibitory cysteinových peptidáz E-64 a iCL. Všechny vzorky byly inkubovány s neredukujícím vzorkovým pufrům 15 min při laboratorní teplotě. Vzorky byly nanášeny na předem připravené 12% polyakrylamidové gely o šířce 1 mm s 1% želatinou. Vertikální elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V na aparatuře MINI-Protean® 3 cell (Bio-Rad) s použitím proteinového standardu (Bench Marker™ Protein Ladder; Invitrogen). Výsledné gely byly nařezány na proužky podle vzorků a rozmístěny do Petriho misek. Byly promyty 10 min v CPB-T (citrát-fosfátový pufr, Triton), následně 10 min v CPB-T s příslušnými inhibitory (1 µM). Vzorky bez inhibitoru byly inkubovány opět v samotném CPB-T. Následovala inkubace 8 h při 37°C při pH 5 v CPB u vzorků bez inhibitoru, do ostatních misek byly přidány příslušné inhibitory (10 µM). Po inkubaci byly vzorky obarveny 10 min v CBBR- 250. Výsledek byl zdokumentován na přístroji GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

## 1.8. Molekulární metody

### 1.8.1. Syntéza ss cDNA

Z celkové RNA byla syntetizována jednovláknová cDNA metodou RT-PCR pomocí kitu SuperScript™ III First-Strand Synthesis (Invitrogen) podle návodu. Koncentrace byla změřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) a cDNA byla následně uchována při - 20 °C.

### 1.8.2. PCR

Syntetizovaná cDNA byla naředěna na koncentraci 100 ng/μl a použita jako templát pro PCR reakci s degenerovanými primery (M-C.spec.3 Forw; M-C.spec.3 Rev). Degenerované primery (tab. 9) byly navrženy podle alignmentu sekvencí konzervovaného místa cysteinových peptidáz u jiných organismů (Heussler and Dobbelaere 1993; Eakin *et al.* 1990; Li *et al.* 2006; Renard *et al.* 2000). Reakce (tab. 8) proběhla ve 200 μl zkumavkách na přístroji C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, tab. 10). Výsledek byl vyhodnocen elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu obsahujícím Sybr green v 1x TAE pufru (Invitrogen). Jako standard byl použit HyperLadder IV (Bioline). Elektroforéza probíhala 30 minut při 96 V. Vzniklé PCR produkty byly pod modrým světlem vyříznuty.

**Tab. 8 – Složení reakční směsi**

PPP master mix (Top-bio)	12,5 μl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 μl
M-C.spec.3 Forw (10 μM)	1 μl
M-C.spec.3 Rev (10 μM)	1 μl
cDNA (100 ng/μl)	1 μl
dd H <sub>2</sub> O	7 μl

**Tab. 9 – Použité primery**

Název primeru	sekvence
M-C.spec.3 Forw	5'- CAA/ GGG NCA RTG YGG ITC NTG C/T TGG -3'
M-C.spec.3 Rev	5'- CCA NSA/ TRT TYT TIA CRA TCC AA/ GTA -3'

**Tab. 10 – Program PCR reakce**

1.	94°C	5 min	} 35 x
2.	94°C	60 s.	
3.	45°C	60 s.	
4.	72°C	60 s.	
5.	72°C	10 min	
6.	4°C	~	

### 1.8.3. Extrakce z gelu

PCR produkty byly izolovány z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction kit (Quiagen) dle návodu a eluovány do 20 µl sterilní vody.

### 1.8.4. Klonování do plazmidu pCR®2.1-TOPO

Izolované produkty byly ligovány do vektoru pCR®2.1-TOPO® pomocí kitu TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) podle návodu (tab. 11).

**Tab. 11 – Reakční směs**

10x ligační pufr	1 µl
PCR vektor	2 µl
čerstvý PCR produkt	6 µl
T4 DNA ligázu	1 µl

Reakce probíhala ve 200 µl zkumavkách při 14°C přes noc.

### 1.8.5. Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Ke kompetentním buňkám (One Shot® TOP10; Invitrogen), které byly pozvolna rozmrazeny na ledu, bylo přidáno 5 µl ligační směsi a postup probíhal dle manuálu výrobce ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshottop10\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_man.pdf)).

### 1.8.6. Izolace plazmidu

Z narostlých buněk byly izolovány plazmidy pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) dle návodu. Plazmidové DNA byly eluovány z kolonky 50 µl sterilní vody a přítomnost inzertu byla ověřena následnou PCR reakcí (tab. 13) s vektor-specifickými primery M13 Forward a M13 Revers (tab. 12). Výsledek byl vyhodnocen pod UV světlem na 1,5 % agarózovém gelu obsahujícím Sybr green.

**Tab. 12 – Použité primery**

Název primeru	sekvence
M13 Forw	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'
M13 Rev	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'

**Tab. 13 – Program PCR reakce**

94°C	2:00 min	} 30 x
94°C	1:00 min	
55°C	1:00 min	
72°C	1:00 min	
72°C	10:00 min	

Plazmidy, u kterých byla potvrzena přítomnost inzertu, byly poslány na sekvenaci do laboratoře sekvenace DNA (Seqlab, PřF UK). Vzorky byly připraveny podle protokolu sekvenační laboratoře.

### 1.8.7. 5' a 3' RACE PCR

Metoda se používá pro získání neznámé sekvence 5' a 3' konce genu za použití GeneRacer™ Kit (Invitrogen).

#### 1.8.7.1. Příprava RACE cDNA

Byla použita RNA *E. nipponicum* o koncentraci 59,33 ng / µl. Do reakční směsi bylo použito maximální množství RNA 7 µl. Dále příprava RACE cDNA probíhala podle návodu kitu GeneRacer™ Kit (Invitrogen).

Jednovláknová RACE cDNA o koncentraci 1000 ng/µl byla zředěna 1:9 sterilní vodou do RACE PCR reakce (tab. 14, tab. 15, tab. 16):

**Tab. 14 – Reakční směs**

EmeraldAmp PCR master mix (Clontech)	12,5 µl
RACE cDNA (100ng/ µl)	1 µl
M-CL-RACE Forw/ M-CL-RACE Rev	1µl
GeneRacer primer Rev/ GeneRacer primer Forw	3 µl
dd H <sub>2</sub> O	7,5 µl

**Tab. 15 – Použité primery**

Název primeru	sekvence
M-CL-RACE Forw	5'- CCG ACT TGG ATC ACG CCG TAT TGT TGG T -3'
M-CL-RACE Rev	5'- GAC CTT CCA ATG ACC CTG TCG TGG AGA A -3'
GeneRacer™ Forw Primer	5'- CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA -3'
GeneRacer™ Rev Primer	5'- GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G -3'

**Tab. 16 – Program PCR reakce**

94°C	120 s	
94°C	30 s	
72°C	60 s	
94°C	30 s	
70°C	60 s	
94°C	30 s	
60°C	90 s	
70°C	90 s	
72°C	10:00 min	
4°C	~	

Výsledek byl vyhodnocen pod UV světlem po elektroforéze v 1,5% agarózovém gelu. Jako standard byl použit HyperLadder II (BioLine). PCR produkty byly skalpelem vyříznuty pod modrým světlem a poté se opakovaly kroky **1.8.3 – 1.8.6**.

### 1.8.8. Příprava pro transkriptomovou analýzu

Kroky 1.8.8.1 – 1.8.8.4 byly provedeny pod vedením Mgr. Romany Stopkové, Ph.D. Krok 1.8.8.5 byl proveden pod vedením RNDr. Jany Nekvindové, Ph.D., která provedla i vlastní 454 sekvenaci (krok 1.8.8.6). Všechny kroky byly provedeny pouze jednou.

### 1.8.8.1. Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA byly použity vzorky totální RNA *E. nipponicum* (EN) o koncentraci (tab. 17):

**Tab. 17 – Koncentrace vzorků**

EN1 (ČR-Vodňany)	1444,88 ng / $\mu$ l
EN2 (ČR-Vodňany)	2484,66 ng / $\mu$ l
ENP (Polsko)	1686,92 ng / $\mu$ l

Míra fragmentace RNA byla ověřena na přístroji Agilent 2200. Syntéza probíhala pomocí kitu SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) dle návodu. Totální RNA byla před použitím zahřáta na 65°C na 1-2 min. Reakční směs č. 1 obsahovala (tab. 18):

**Tab. 18 – Reakční směs č. 1**

2 ng – 1 $\mu$ g totální RNA	1 – 3 $\mu$ l
<b>CDS T22 primer</b> (modifikovaný) – 3' adaptér (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTGT TTTCTTTTTTTTTVN3'); c=12 pmol	1 $\mu$ l
<b>SMARTer II A Oligonucleotid</b> – 5' adaptér (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXX3'); c=12 pmol	1 $\mu$ l
Sterilní RNase free H <sub>2</sub> O	doplnit do 5 $\mu$ l

Komponenty byly smíchány a jemně stočeny na mikrocentrifuze. Poté proběhla inkubace při 72°C 3 minuty a následné ochlazení na 42°C po 2 min. Reakční směs č. 2 obsahovala (tab. 19):

**Tab. 19 – Reakční směs č. 2**

5 x First-strand buffer	2 $\mu$ l
DTT (20 mM)	1 $\mu$ l
50 x dNTP	1 $\mu$ l
SMARTScribe Reverzní Transcriptáza (100 U)	1 $\mu$ l
RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l

Poté byla reakční směs č. 2 přidána do reakční směsi č. 1 a výsledná směs byla inkubována 1,5 h při 42°C. Vzniklé cDNA byly použity pro následnou amplifikaci, zbytek byl uchován při - 20°C.

### 1.8.8.2. cDNA amplifikace

Pomocí Advantage 2 PCR Kit (Clontech) byly cDNA amplifikovány (tab. 21) dle přiloženého návodu. Složení reakční směsi je uvedeno v tab. 20 (celkový objem 100  $\mu$ l / 1 vzorek):

**Tab. 20 – Reakční směs**

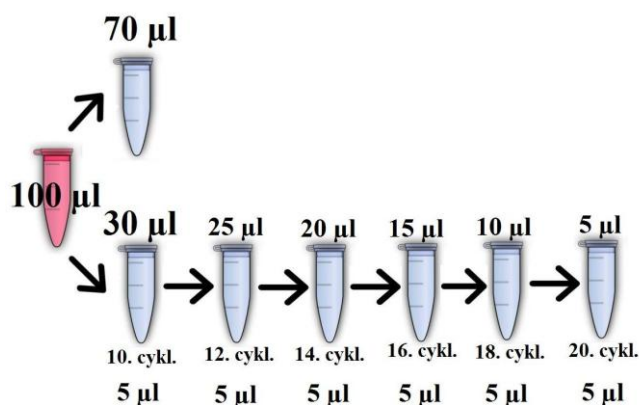
10X Advantage 2 PCR pufr	10 $\mu$ l
dNTP mix (10 mM)	2 $\mu$ l
PCR primer M1 (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
ss cDNA	2 $\mu$ l
50 x Advantage 2 Polymeráza mix	2 $\mu$ l
Sterilní RNase free H <sub>2</sub> O	80 $\mu$ l

**Tab. 21 – Použitý PCR program**

95°C	1 min	} X cyklů
95°C	15 s	
66°C	20 s	
72°C	3 min	

Po doběhnutí PCR reakce do 10. cyklu, bylo odebráno 70  $\mu$ l vzorku a vzorek byl uchováván při 4°C. Ze zbylých 30  $\mu$ l bylo odebráno 5  $\mu$ l pro následnou vizualizaci na gelu a PCR reakce byla opět spuštěna. Vždy po 2 cyklech bylo odebráno 5  $\mu$ l vzorku, které byly následně vyhodnoceny na 1% agarózovém gelu a byl vybrán optimální PCR cyklus. U vzorku ponechaného na ledu, byla poté dokončena amplifikace do námi vybraného PCR cyklu.

Výběr správného PCR cyklu (princip na obr. 10):



**Obr. 10** Princip výběru správného PCR cyklu (SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, upraveno)

Výsledná ds cDNA byla přečištěna pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) dle návodu a eluována do 20 µl sterilní vody. Koncentrace byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific).

### 1.8.8.3. Normalizace cDNA

Normalizace cDNA slouží ke snížení abundančních transkriptů a vyrovnává tak koncentrace transkriptů ve vzorku cDNA. Tím se zvyšuje efekt sekvenace a mohou být objeveny málo přepisované geny. Normalizace probíhala pomocí kitu Trimmer 2 cDNA normalization kit (Evrogen) dle přiloženého návodu.

#### 1. cDNA denaturace a hybridizace

**Tab. 22** – Reakční směs pro každý vzorek obsahovala (celkový objem 12 µl)

ds cDNA (0,6-0,9 µg)	EN1 9 µl/ EN2 9 µl/ EP 4,7 µl
4 x hybridizační pufr	3 µl
dd H <sub>2</sub> O	x µl

12 µl reakční směsi (tab. 22) bylo rozděleno do 3 zkumavek označených 0; 1/2; 1 a překryto kapkou minerálního oleje.

#### 2. Degradace ds cDNA pomocí DSN enzymu

DSN enzym (dsDNA nukleáza) má mnohem silnější preferenci k ds cDNA než k ss cDNA a RNA, bez ohledu na jejich délku. Slouží tedy k vyrovnání transkriptů ve vzorcích.

Těsně před koncem hybridizace, bylo připraveno ředění DSN roztoku (tab. 23) o finální koncentraci 0,5 U /  $\mu\text{l}$  (1:1 skladovací pufru: zásobní roztok DSN).

**Tab. 23 – Ředění DSN roztoku**

komponenty	Zkumavka 1	Zkumavka 1/2	Zkumavka 0
DSN roztok	1 $\mu\text{l}$		
1/2 DSN roztok		1 $\mu\text{l}$	
DSN skladovací pufr			1 $\mu\text{l}$

Na konec bylo do každé reakce přidáno 25  $\mu\text{l}$  RNase free H<sub>2</sub>O a normalizované cDNA byly uloženy na led.

### 3. Amplifikace normalizované cDNA

**Tab. 24 – Reakční směs**

Sterilní RNAsa free H <sub>2</sub> O	161,5 $\mu\text{l}$
dNTP mix (10 mM)	3 $\mu\text{l}$
PCR primer M1 (10 uM) 5' AAGCAGTGGTGGTATCAACGCAGAGT 3'	4,5 $\mu\text{l}$
50 x Advantage 2 Polymeráza mix	3 $\mu\text{l}$
10 x Advantage 2 PCR pufr	15 $\mu\text{l}$

Reakční směs (tab. 24) byla rozdělena po 49  $\mu\text{l}$  do tří 200  $\mu\text{l}$  zkumavek označených 0; 1/2; 1. Do každé zkumavky byl přidán 1  $\mu\text{l}$  normalizované cDNA (z minulého kroku) se stejným označením 0 ;1/2 ;1.

**Tab. 25 – Použitý PCR program**

95°C	1 min	} X cyklů
95°C	15 s	
66°C	20 s	
72°C	3 min	

Vhodný cyklus (tab. 25) byl vybrán pozastavením PCR reakce po 7. cyklu. Vzorky 1 a 1/2 byly umístěny na led. Výběr vhodného cyklu dále pokračoval jen s použitím kontrolní zkumavky 0. Vždy po 2 cyklech byla PCR reakce pozastavena a byl odebrán vzorek 10  $\mu\text{l}$ . 5  $\mu\text{l}$  bylo použito pro zhodnocení na 1,5% agarózovém gelu v 1x TAE pufru a byl vybrán optimální PCR cyklus. K vybranému cyklu u kontrolní zkumavky se přičetlo 9 a součet dával dohromady výsledný PCR cyklus u vzorků 1 a 1/2. U kontrolní zkumavky byla ukončena amplifikace po 11. cyklu. Výsledek byl

vyhodnocen na 1,5% agarózovém gelu a byla vybrána vhodná koncentrace DSN enzymu. Poté byly vzorky přečištěny pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) dle návodu. Výsledná koncentrace byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific). V našem případě byla amplifikace ještě jednou opakována u všech vzorků. Amplifikované ds cDNA byly připraveny pro tvorbu cDNA knihovny.

#### 1.8.8.4. Příprava cDNA knihovny

Příprava cDNA knihovny byla provedena dle Rapid Library Preparation Method Manual (GS FLX+, Roche). V tab. 26 jsou uvedené použité kity.

Tab. 26 – Použité kity

Rapid library preparation kit	Roche
Rapid library MID adaptors kit	Roche
Agencourt AMPure XP - PCR Purification	Beckman Coulter
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen

Nebulizace DNA slouží k fragmentaci vzorku DNA do krátkých úseků (300-800 pb) pomocí dusíku. Následně jsou na 3' a 5' konec každého fragmentu přidány specifické adaptéry, které jsou nezbytné pro purifikaci, amplifikaci a následnou sekvenaci.

Vzorky normalizované ds cDNA EN1 a EN2 z obou amplifikací byly spojeny (46  $\mu$ l (1,2  $\mu$ g)). Fragmentace DNA nebulizací, úpava konců fragmentů, příprava AMPure kuliček a odstranění malých fragmentů bylo provedeno podle manuálu Rapid Library Preparation Method Manual (GS FLX+, Roche). Ze vzorku obsahující cDNA knihovnu bylo odebráno 5  $\mu$ l pro následnou vizualizaci na 1% agarózovém gelu.

Kvantifikace cDNA knihovny byla provedena pomocí fluorometru Hoefler DQ 300. Standardy byly připraveny dle Rapid Library Preparation Method Manual (GS FLX+, Roche, tab. 27). Zkumavka 1 obsahovala 90  $\mu$ l RL Standardu s 90  $\mu$ l TE pufru, zbylé zkumavky byly naplněny 60  $\mu$ l TE pufru. Z první zkumavky bylo přeneseno 120  $\mu$ l do druhé zkumavky, promícháno a ředění probíhalo přenášením 120  $\mu$ l z jedné zkumavky do druhé.

**Tab. 27 – Ředění standardů**

Ředění standardů	RL Standard (mol/μl)
1	$2.50 \times 10^9$
2 (2/3 přeneseny ze zkumavky 1)	$1.67 \times 10^9$
3 (2/3 přeneseny ze zkumavky 2)	$1.11 \times 10^9$
4 (2/3 přeneseny ze zkumavky 3)	$7.41 \times 10^8$
5 (2/3 přeneseny ze zkumavky 4)	$4.94 \times 10^8$
6 (2/3 přeneseny ze zkumavky 5)	$3.29 \times 10^8$
7 (2/3 přeneseny ze zkumavky 6)	$2.19 \times 10^8$
8 (2/3 přeneseny ze zkumavky 7)	$1.46 \times 10^8$

Ředění vzorků proběhlo podle instrukcí na <http://454.com/my454/index.asp>, do tabulky byly uvedené naměřené hodnoty pro standardy a vzorek. Vzorek byl uchován při - 20°C pro další zpracování.

#### **1.8.8.5. Emulzní PCR (emPCR)**

Na každou speciální kuličku se naváže jeden fragment ssDNA opatřený adaptéry a kuličky jsou smíchány s olejovou emulzí. Jednotlivé kuličky se dostávají do vodních kapek (1 kulička/1 bublina), kde dochází k amplifikaci fragmentů pomocí emulzní PCR reakce.

Příprava vzorků pro emulzní PCR reakci a vlastní emPCR reakce probíhala podle protokolu GSFLX-Titanium Emulsion PCR protocol for medium volume (Roche).

#### **1.8.8.6. 454 pyrosekvenace**

Po emPCR byly kuličky nanášeny na pikotitrační destičku. Kuličky byly následně převrstveny kuličkami nesoucími různé enzymy (DNA polymerázu, ATP sulfurylázu, luciferázu), které jsou nezbytné k sekvenačnímu běhu. Nad pikotitrační destičkou proudí volné nukleotidy vždy ve stejném pořadí. Zařazení volného nukleotidu způsobí uvolnění pyrofosfátu (Ppi), který je následně působením enzymů převeden na světelný signál. Tento signál je snímán pomocí CDC kamery a pomocí programu vyhodnocen.

Sekvenace probíhala na přístroji (GS FLX System, Roche, Fakultní nemocnice Hradec Králové). Hrubá data byla zpracována v programu GS Run Browser algoritmem Image Processing, kde byl získán soubor, který obsahoval záznam luminiscenčního signálu v čase z každé sekvenované jamky pikotitrační destičky. Dále pomocí algoritmu

Signal Processing byl zpracován signál z každé pikotitrační jamky, který byl převeden na sekvenci nukleotidů a index jejich kvality. Soubor sekvencí byl dále zpracován algoritmem programu GS De Novo Assembler, kde byly fragmenty původních sekvencí seskládány počítačovou analýzou na základě jejich překrytí do tzv. kontigů. Z kontigů byly vyřazeny sekvence kratší než 100 pb a zbylé kontigy byly srovnány s databází NCBI pomocí blastx používaným programem blast2go ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)) a poté byly vybrány identifikované fragmenty sekvencí peptidázových genů.

Nukleotidové sekvence peptidázových genů byly pomocí programu ExPasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) přeloženy do aminokyselinových sekvencí a byl vybrán správný čtecí rámeček. U vybraných kompletních sekvencí byla zjištěna signální sekvence pomocí programu SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), odhadnuta molekulová velikost a pI podle programu Compute pI/Mw tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) a N-glykosylační místa pomocí programu NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

#### 1.8.8.7. Amplifikace vybraných genů z transkriptomové analýzy

U vybraných kompletních sekvencí genů z transkriptomové analýzy u *E. nipponicum* byly navrženy genově specifické primery (tab. 28) pro cathepsin L (*C. sinensis* L-like, EnCL Forw, EnCL Rev), pro cathepsin L (*S. mansoni* cathepsin L3-like; EnCL3 Forw, EnCL3 Rev) a pro cathepsin B (*S. mansoni* cathepsin B2-like; EnCB Forw, EnCB Rev). Jako templát byla použita cDNA *E. nipponicum*, která byla ředěna na koncentraci 100 ng / µl. PCR reakce (tab. 29) proběhla na přístroji C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, tab. 30).

Tab. 28 – Použité primery

Název primeru	Sekvence
EnCL Forw	5'- ATG GCA GGT CAG GAT CAC TG -3'
EnCL Rev	5'- CTA TAC GAG TGG ATA GCT TGC G -3'
EnCL3 Forw	5'- ATG GGA TCG TTT GCT AAA ATG -3'
EnCL3 Rev	5'- TTA AAC GAG AGG ATA TGA GGC T -3'
EnCB Forw	5'- ATG CGT TTG CAT TCG CAC TG -3'
EnCB Rev	5'- TTA AAG TTT CGG TAT CCC ACC AAC -3'

**Tab. 29 - Složení reakční směsi**

PPP master mix (Top-bio)	12,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ l
Primer Forw (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer Rev (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
cDNA (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l

**Tab. 30 – Program PCR reakce**

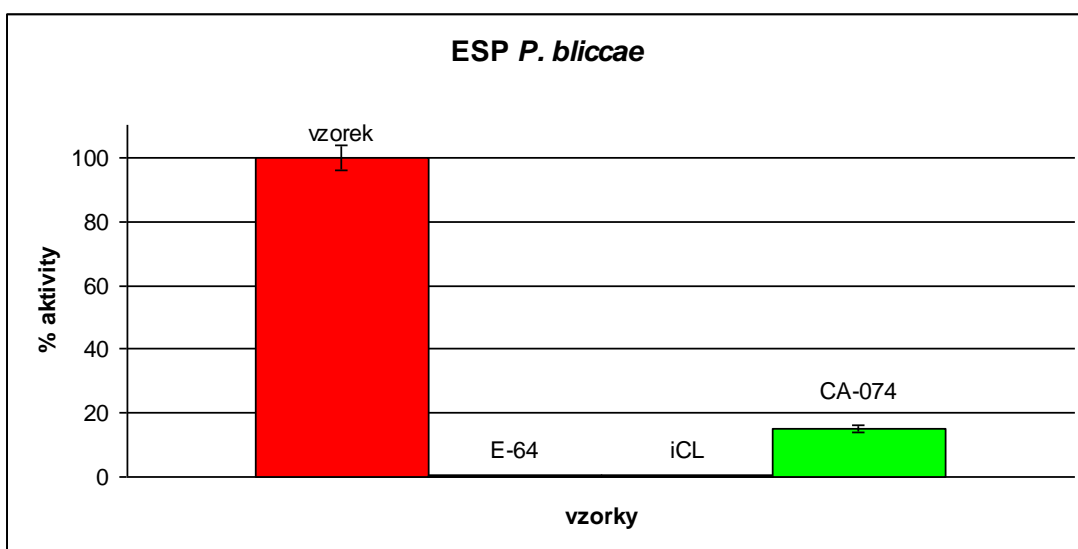
1.	94°C	5 min	} 35 x
2.	94°C	60 s.	
3.	60°C	60 s.	
4.	72°C	60 s.	
5.	72°C	10 min	
6.	4°C	~	

Výsledek byl vyhodnocen elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu obsahujícím Sybr green v 1x TAE pufru (Invitrogen). Vzniklé PCR produkty byly pod modrým světlem vyříznuty a dále zpracovány v krocích **1.8.3.-1.8.6.**

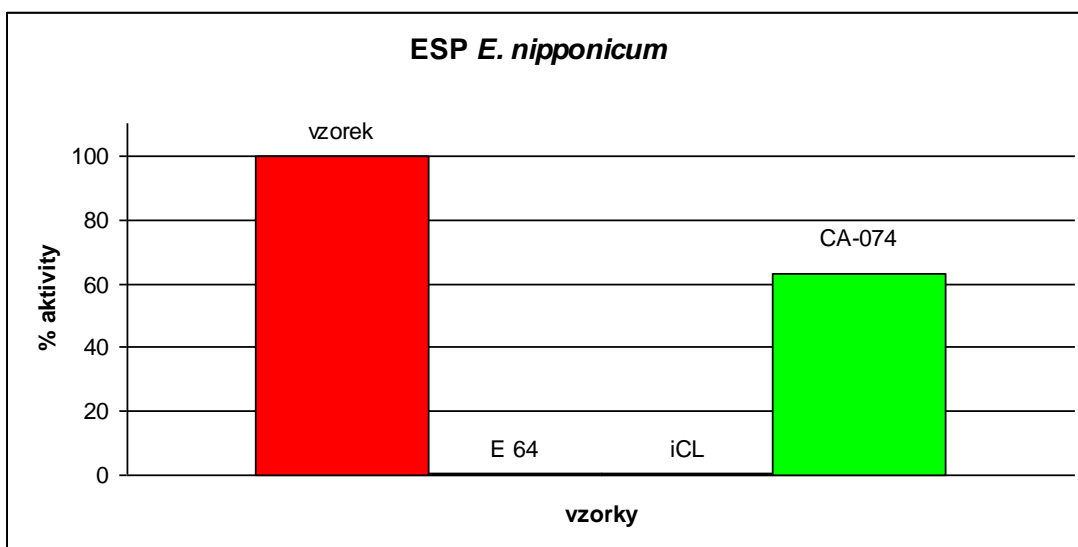
# Výsledky

## 1.9. Měření enzymatických aktivit

Při použití fluorogenního substrátu FR (Z-Phe-Arg-AMC), byla při pH 5 prokázána vysoká peptidolytická aktivita, která byla inhibována inhibitorem E-64 a iCL u vzorků ESP *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Inhibitor CA-074 inhiboval aktivitu částečně, u vzorku *P. bliccae* (obr. 11) více než u vzorku *E. nipponicum* (obr. 12).

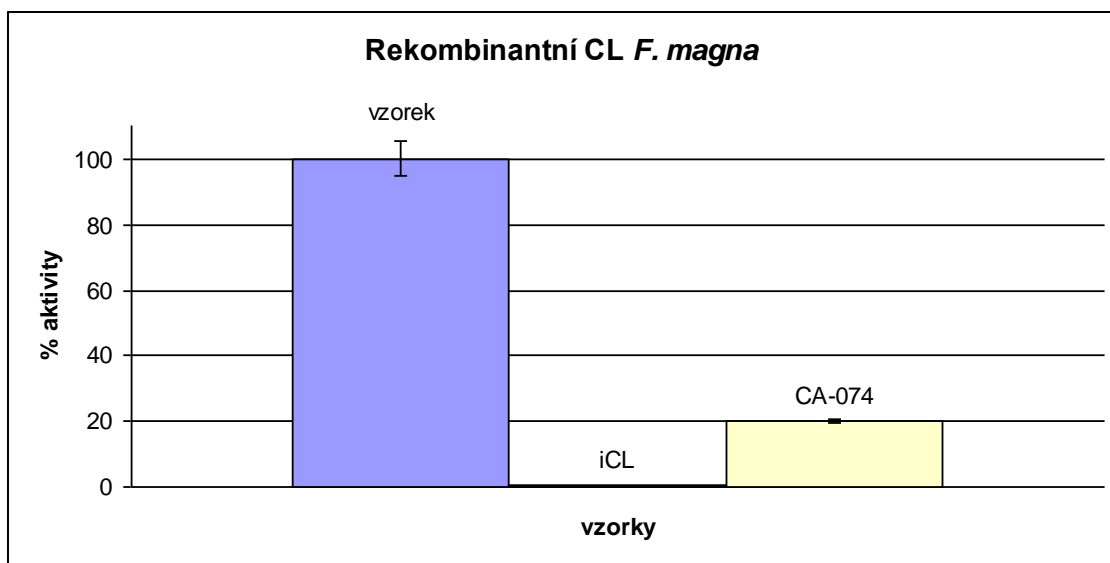


Obr. 11 - Měření aktivity ve vzorku ESP *P. bliccae* s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC), při pH 5, s inhibitory E-64 (inhibitor cysteinových peptidáz), CA-074 (inhibitor cathepsinu B), iCL (inhibitor cathepsinu L), úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

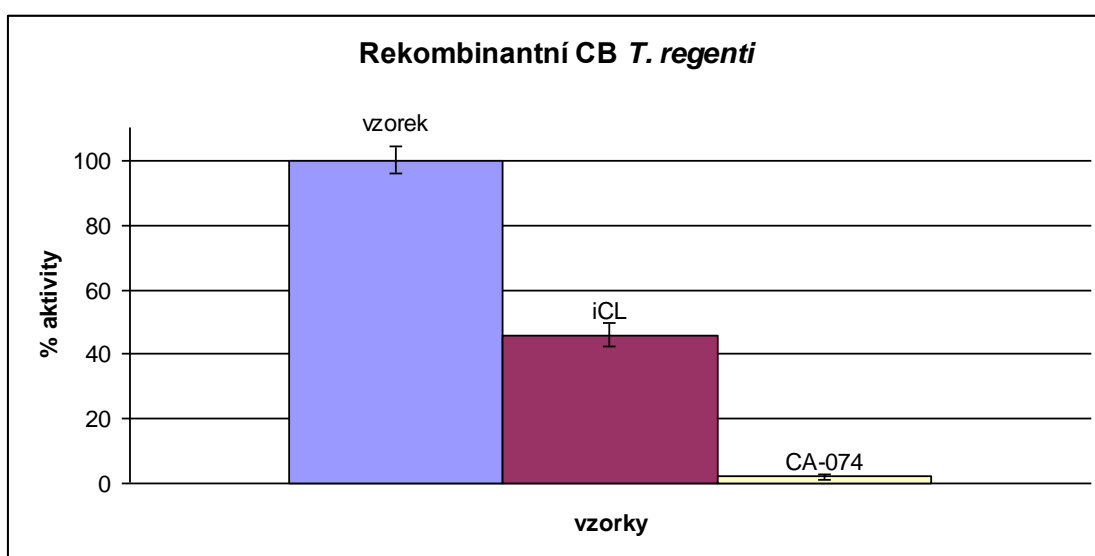


Obr. 12 - Měření aktivity ve vzorku ESP *E. nipponicum* s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC) při pH 5, s inhibitory E-64 (inhibitor cysteinových peptidáz), CA-074 (inhibitor cathepsinu B), iCL (inhibitor cathepsinu L).

Ověřovali jsme schopnost inhibitoru CA-074 inhibovat cathepsin L (rekombinantní CL *F. magna*, obr. 13) a schopnost inhibitoru iCL inhibovat cathepsin B (rekombinantní CB *T. regenti*, obr. 14) za použití fluorogenního substrátu FR při pH 5. Inhibitor CA-074 inhiboval aktivitu rekombinantního CB *T. regenti* téměř úplně a aktivitu rekombinantního CL *F. magna* z velké části. iCL inhiboval aktivitu rekombinantního CL *F. magna* zcela, zatímco aktivita rekombinantního CB *T. regenti* byla inhibována zhruba z poloviny.

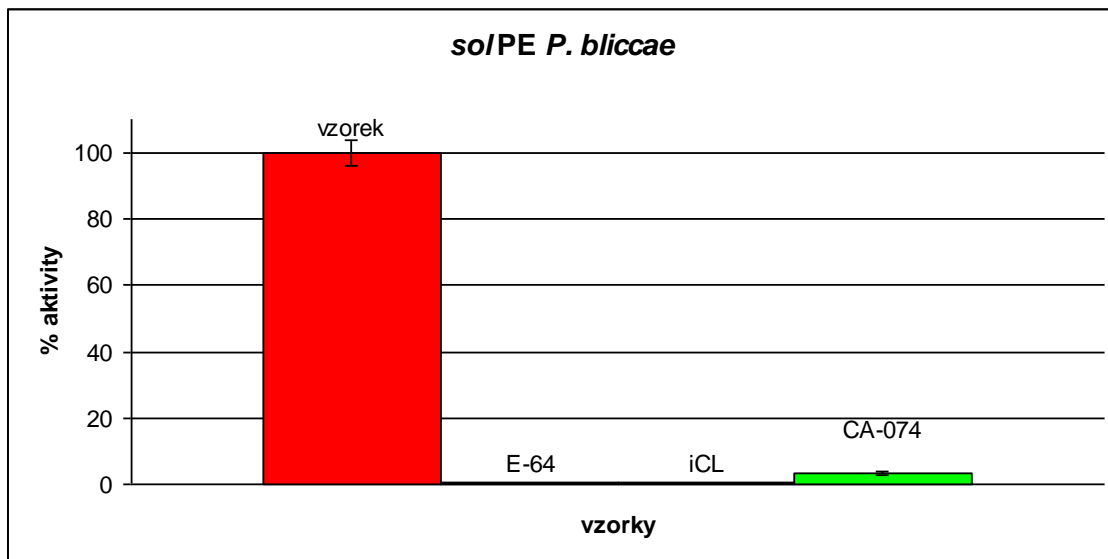


Obr. 13 – Měření aktivity ve vzorku rekombinantního cathepsinu L *F. magna* s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC) při pH 5, iCL (inhibitor cathepsinu L), CA-074 (inhibitor cathepsinu B), úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

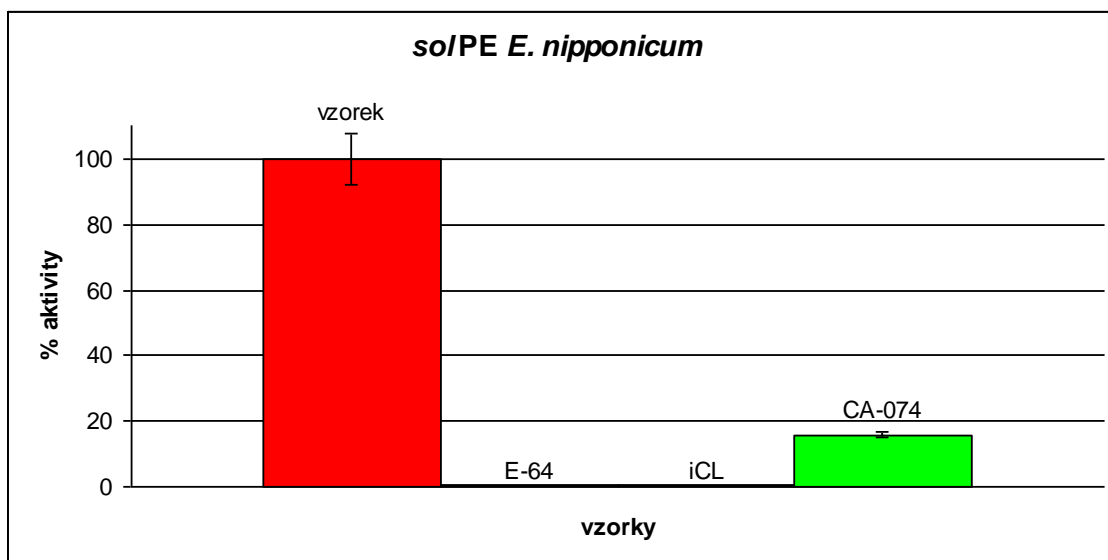


Obr. 14 – Měření aktivity ve vzorku rekombinantního cathepsinu B *T. regenti* s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC) při pH 5, iCL (inhibitor cathepsinu L), CA-074 (inhibitor cathepsinu B), úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

Peptidolytická aktivita byla zaznamenána i u vzorků *sol*PE *P. bliccae* a *E. nipponicum* s fluorogenním substrátem RR (Z-Arg-Arg-AMC) při pH 5. Aktivita byla inhibována inhibitory E-64 a iCL. Inhibitor CA-074 inhiboval aktivitu u vzorku *P. bliccae* (obr. 15) téměř úplně a méně u vzorku *E. nipponicum* (obr. 16)

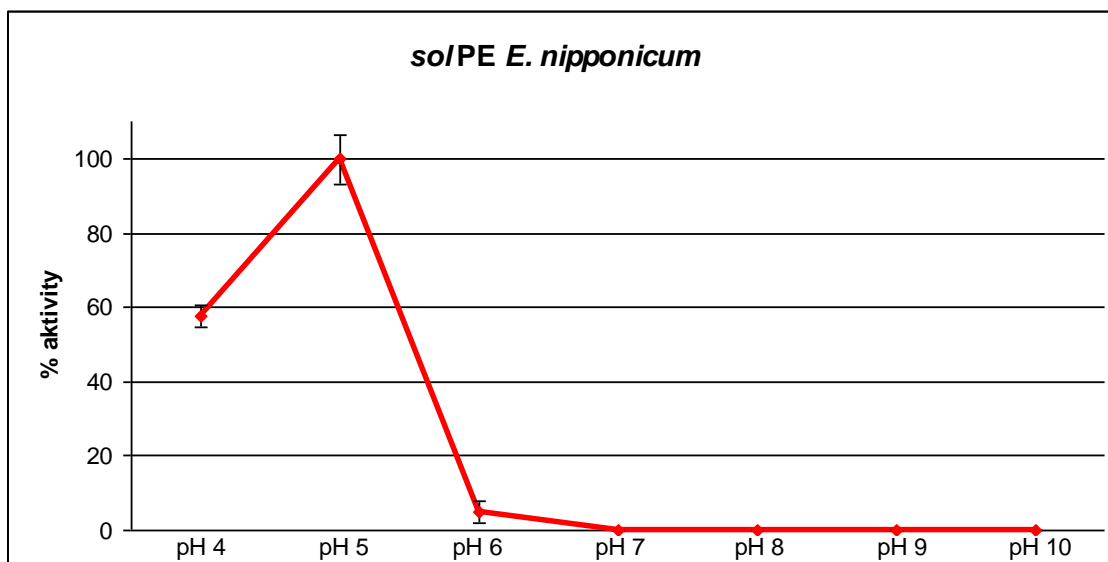


Obr. 15 - Měření aktivity ve vzorku *sol*SPE *P. bliccae* s fluorogenním substrátem RR (Z-Arg-Arg-AMC), při pH 5, s inhibitory E-64 (inhibitor cysteinových peptidáz), CA-074 (inhibitor cathepsinu B), iCL (inhibitor cathepsinu L), úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

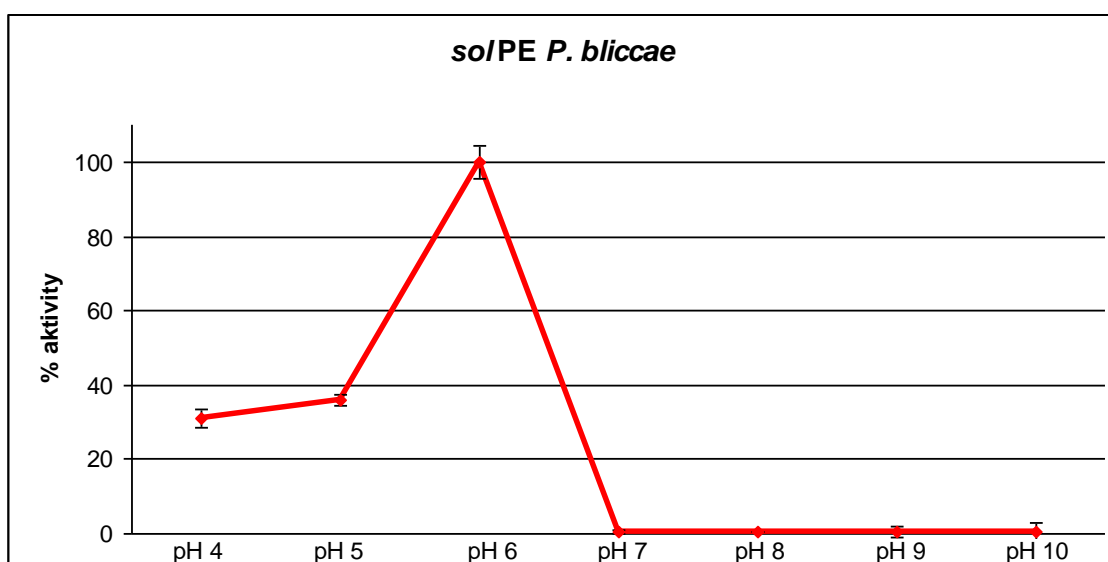


Obr. 16 - Měření aktivity ve vzorku *sol*SPE *E. nipponicum* s fluorogenním substrátem RR (Z-Arg-Arg-AMC), při pH 5, s inhibitory E-64 (inhibitor cysteinových peptidáz), CA-074 (inhibitor cathepsinu B), iCL (inhibitor cathepsinu L), úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

V rozsahu pH 4 - 10 bylo hledáno pH optimum s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC). U vzorku *solPE E. nipponicum* (obr. 17) byla hodnota pH optima zjištěna při hodnotě pH 5, nižší aktivita byla prokázána při pH 4. U vzorku *solPE P. bliccae* (obr. 18) bylo pH optimum při pH 6, nižší aktivita byla zaznamenána i při pH 5 a pH 4. Při neutrálním a zásaditém pH nebyla aktivita prokázána.



Obr. 17 - Měření pH optima v *solPE E. nipponicum* s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC) při pH 4 – 10, úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

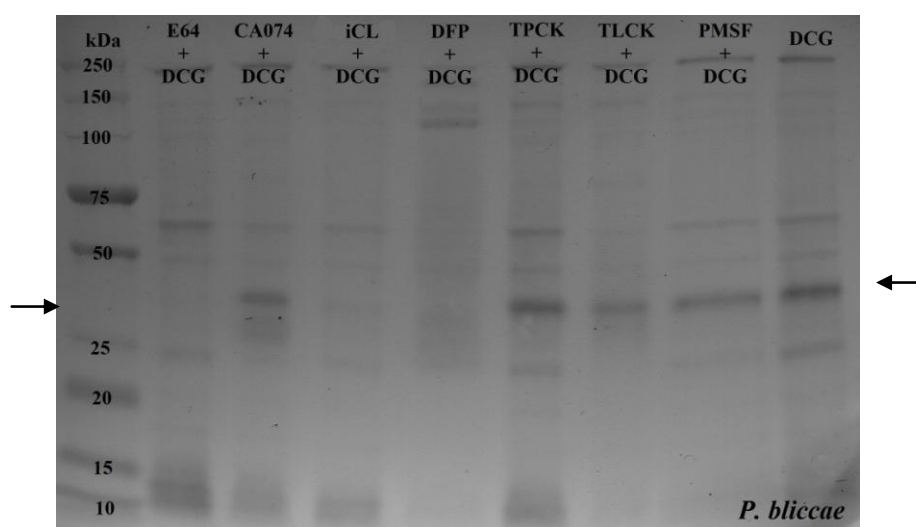


Obr. 18 - Měření pH optima v *solPE* u *P. bliccae* s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC) při pH 4 – 10, úsečka označuje směrodatnou odchylku měření

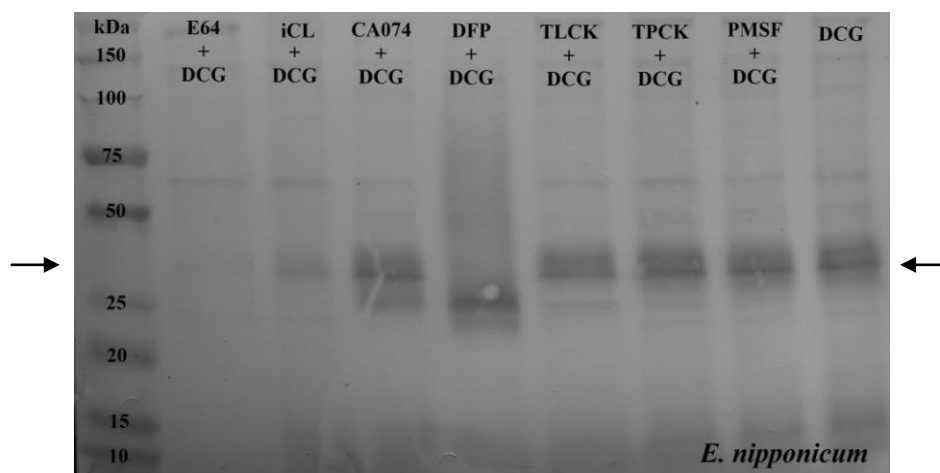
Dále byla měřena aktivita enzymů s fluorogenním substrátem GPR (Z-Gly-Phe-Arg-AMC) a AAN (Z-ALA-ALA-ASN-AMC) při pH 4-10. Ani u jednoho vzorku *solPE P. bliccae* a *E.nipponicum* nebyla aktivita prokázána.

## 1.10. Detekce CP biotinylovanou próbou DCG-04

U obou vzorků *solPE P. bliccae* (obr. 19) a *E. nipponicum* (obr. 20) inkubovaných se samotným DCG-04 byl zaznamenán proužek o velikosti přibližně 35 kDa. Vazba DCG-04 byla zablokována inhibitory E-64 a iCL, zatímco inhibitory CA-074 a inhibitory serinových peptidáz (TLCK, TPCK a PMSF) vazbu neinhibovaly. Při použití inhibitoru DFP u vzorku *solPE E. nipponicum* se objevil proužek o velikosti 24 kDa.



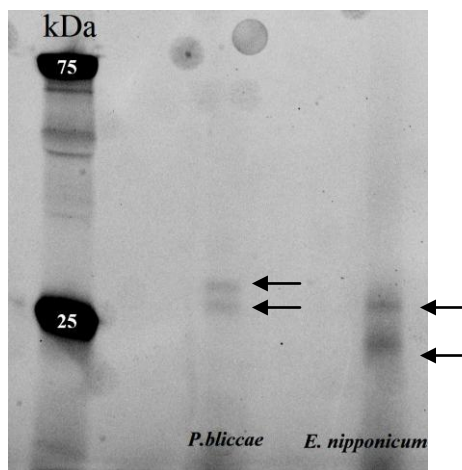
Obr. 19 – Detekce cysteinových peptidáz pomocí biotinylované próby DCG-04 ve vzorku *solPE P. bliccae*, část vzorků preinkubována s inhibitory.



Obr. 20 - Detekce cysteinových peptidáz pomocí biotinylované próby DCG-04 ve vzorku *solPE E. nipponicum*, část vzorků preinkubována s inhibitory.

### **1.11. Detekce CP fluorescenčně značeným DCG-04 v ESP**

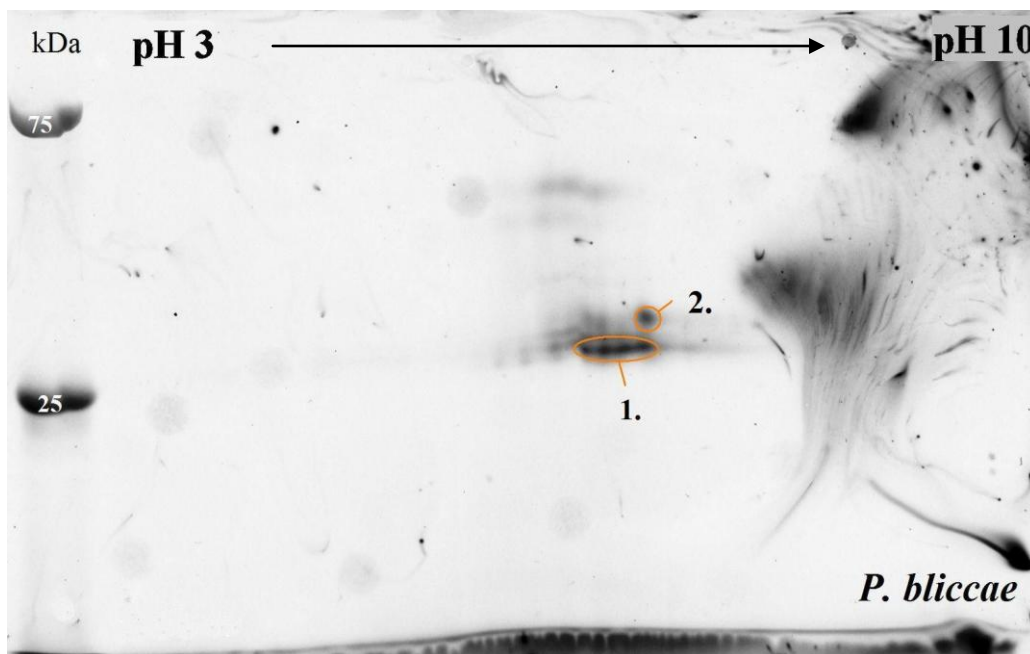
Vzorky ESP *P. bliccae* a *E. nipponicum* byly inkubovány s fluorescenčním DCG-04. U vzorku *P. bliccae* se objevily proužky o velikosti přibližně 28 a 35 kDa, u vzorku *E. nipponicum* o velikosti přibližně 24 a 28 kDa (obr. 21).



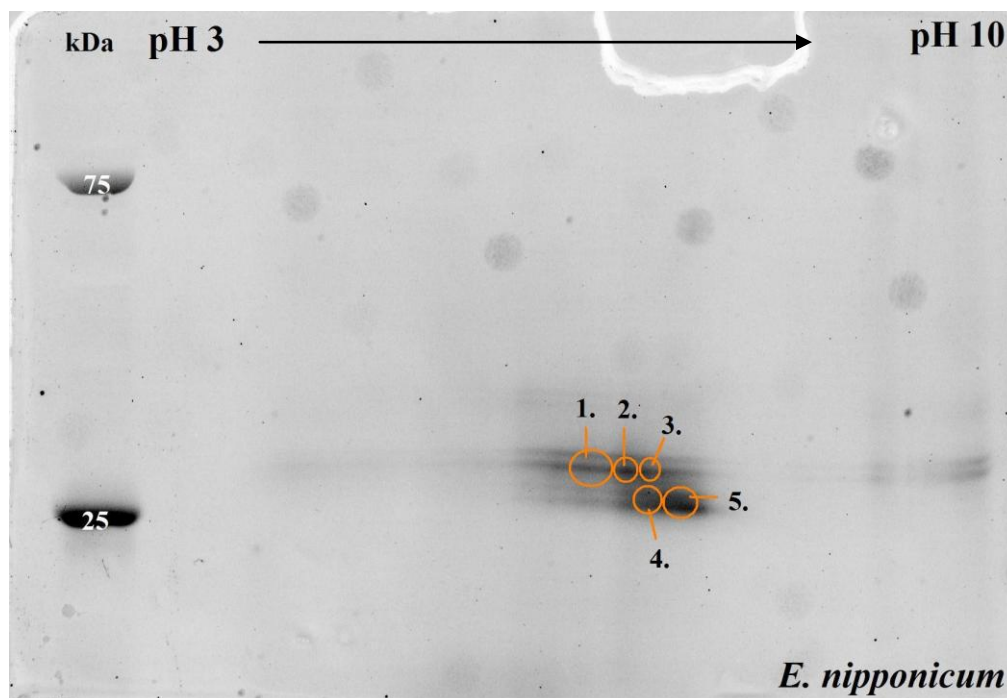
Obr. 21 – Detekce cysteinových peptidáz ve vzorcích ESP pomocí fluorescenčně značeného DCG-04 u obou zástupců č. Diplozoidae

### **1.12. Detekce CP pomocí fluorescenčně značeného DCG-04 ve 2D gelech**

Pomocí fluorescenčně značené próby DCG-04 byly na gelech zachyceny spoty o velikosti přibližně 30 - 35 kDa u vzorku *solPE P. bliccae* a u vzorku *solPE E. nipponicum* okolo 25 - 35 kDa. U vzorku *P. bliccae* (obr. 22) se pI nachází ve slabě kyselé až neutrální oblasti a u vzorku *E. nipponicum* (obr. 23) ve slabě kyselé až mírně zásadité oblasti.



Obr. 22 - Výsledky 2D elektroforézy u vzorku *solPE P. bliccae* s fluorescenčně značeným DCG-04, kroužky označují vyříznuté spoty poslané k analýze hmotnostní spektrometrií



Obr. 23 – Výsledky 2D elektroforézy u vzorku *solPE E. nipponicum* s fluorescenčně značeným DCG-04, kroužky označují vyříznuté spoty poslané k analýze hmotnostní spektrometrií

### 1.13. Hmotnostní spektrometrická analýza

Detekované spoty z 2D elektroforézy byly zaslány k analýze hmotnostní spektrometrií. Naměřená data byla identifikována programem MASCOT 2.2 (Matrix Science). K porovnání byla použita sekvence cathepsinu L *E. nipponicum*, která byla složena z částečných sekvencí získaných z transkriptomové analýzy a vlastního sekvenování. Vzniklé trypsinové štěpy byly porovnány s touto sekvencí a shodná místa byla barevně vyznačena. U vzorku *P. bliccae* (obr. 24) byly identifikovány 4 trypsinové štěpy u spotu č. 1, spot č. 2 se nepodařilo identifikovat. U vzorku *E. nipponicum* (obr. 25) byly identifikovány 4 trypsinové štěpy u spotu č. 1 a č. 4, tři trypsinové štěpy u spotu č. 2 a č. 3 a dva trypsinové štěpy u spotu č. 5.

<i>Paradiplozoon bliccae</i> spot č. 1	
1	MAGQDHWASFKSQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRAD
51	YSLALNHLSDWKDHELLCLRGRADLKTESRGSAPFNACPFELPERVDW
101	RDKGLVTPVKNQGCQGSWAFSTTGSLEGQHFRTKGKLLSLSEQQLVDCS
151	SAFGNHGCNGGLDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNP
201	DMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKSGIY
251	NPPSCPGDFSDLDHAVLLVGYGTQNGLNWIVKNSWSEKWGENGYVRICR
301	DGRNLCGVATCASYPLV

Obr. 24 – Identifikace cathepsinu L u *P. bliccae*- štěpy odpovídající sekvenci cathepsinu L *E. nipponicum* jsou vyznačeny žlutě; červeně zvýrazněny C, H, N aktivního místa.

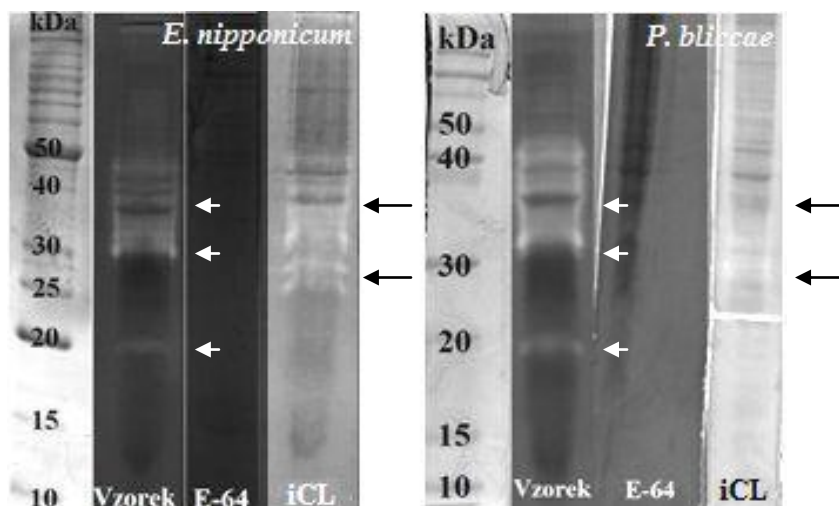
<i>Eudiplozoon nipponicum</i> spot č.1	
1	MAGQDHWASFKSQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRAD
51	YSLALNHLSDWKDHELLCLRGRADLKTESRGSAPFNACPFELPERVDW
101	RDKGLVTPVKNQGCQGSWAFSTTGSLEGQHFRTKGKLLSLSEQQLVDCS
151	SAFGNHGCNGGLDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNP
201	DMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKSGIY
251	NPPSCPGDFSDLDHAVLLVGYGTQNGLNWIVKNSWSEKWGENGYVRICR
301	DGRNLCGVATCASYPLV

<b>Spot č. 2</b>
<p>1 <b>MAGQDHWASFK</b>SQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRAD  51 YSLALNHLSDWKDHELLCLRGHRADLKTESR<b>GSAFIPNACPFELPER</b>VDW  101 RDKGLVTPVKNQGQCGS<b>C</b>WAFSTTGSLEGQHFRKTGKLLSLSEQLVDCS  151 SAFGNHGCNGLFDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNP  201 DMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKSGIY  251 NPPSCPGDFSDL<b>H</b>AVLLVGYGTQNGLNYWIVK<b>N</b>SWSEK<b>WGENGYVR</b>ICR  301 DGRNLCGVATCASYPLV</p>
<b>Spot č. 3</b>
<p>1 <b>MAGQDHWASFK</b>SQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRAD  51 YSLALNHLSDWKDHELLCLRGHRADLKTESR<b>GSAFIPNACPFELPER</b>VDW  101 RDKGLVTPVKNQGQCGS<b>C</b>WAFSTTGSLEGQHFRKTGKLLSLSEQLVDCS  151 SAFGNHGCNGLFDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNP  201 DMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKSGIY  251 NPPSCPGDFSDL<b>H</b>AVLLVGYGTQNGLNYWIVK<b>N</b>SWSEK<b>WGENGYVR</b>ICR  301 DGRNLCGVATCASYPLV</p>
<b>Spot č. 4</b>
<p>1 <b>MAGQDHWASFK</b>SQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRAD  51 YSLALNHLSDWKDHELLCLRGHRADLKTESR<b>GSAFIPNACPFELPER</b>VDW  101 RDK<b>GLVTPVKNQGQCGS</b><b>CWAFSTTGSLEGQHFR</b>KTGKLLSLSEQLVDCS  151 SAFGNHGCNGLFDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNP  201 DMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKSGIY  251 NPPSCPGDFSDL<b>H</b>AVLLVGYGTQNGLNYWIVK<b>N</b>SWSEK<b>WGENGYVR</b>ICR  301 DGRNLCGVATCASYPLV</p>
<b>Spot č. 5</b>
<p>1 MAGQDHWASFKSQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRAD  51 YSLALNHLSDWKDHELLCLRGHRADLKTESR<b>GSAFIPNACPFELPER</b>VDW  101 RDKGLVTPVKNQGQCGS<b>C</b>WAFSTTGSLEGQHFRKTGKLLSLSEQLVDCS  151 SAFGNHGCNGLFDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNP  201 DMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKSGIY  251 NPPSCPGDFSDL<b>H</b>AVLLVGYGTQNGLNYWIVK<b>N</b>SWSEK<b>WGENGYVR</b>ICR  301 DGRNLCGVATCASYPLV</p>

**Obr. 25 - Identifikace cathepsinu L u *E. nipponicum*- štěpy odpovídající sekvenci cathepsinu L *E. nipponicum* jsou vyznačeny u jednotlivých spotů žlutě 1., 2., 3., 4., 5.; červeně zvýrazněny **C**, **H**, **N** aktivního místa.**

## 1.14. Zymografie

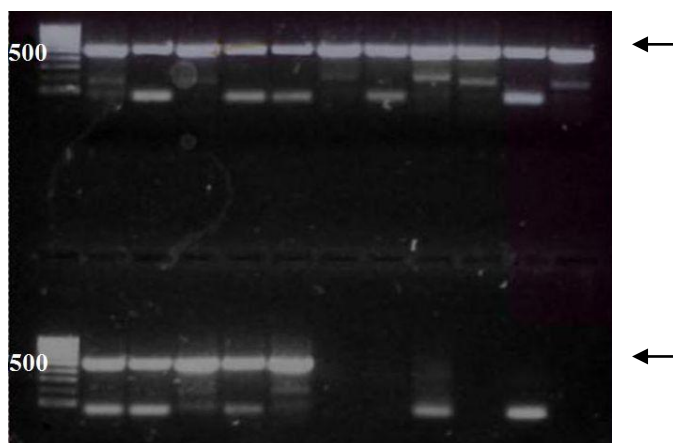
Při pH 5 byla ve vzorcích *solPE E. nipponicum* a *P. bliccae* zaznamenána gelatinolytická aktivita v oblastech okolo 20 a 30-35 kDa. Při použití inhibitoru E-64 byla aktivita zablokována úplně, u iCL byla objevena lytická aktivita o velikosti přibližně 28-35 kDa (obr. 26).



Obr. 26 – Gelatinolytická aktivita peptidáz ve vzorcích *solPE E. nipponicum* a *P. bliccae*

## 1.15. PCR

Na obrázku gelu (obr. 27) jsou znázorněny sekvenované fragmenty DNA s různými kombinacemi degenerovaných primerů, pomocí kterých se nám podařilo získat částečnou sekvenci cathepsinu L *E. nipponicum*. Částečná sekvence o velikosti 526 pb byla identifikována pomocí Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (obr. 28) a kóduje 175 aminokyselin, které obsahují cystein a histidin aktivního místa.



Obr. 27 – Amplifikace částečné sekvence genu cathepsinu L *E. nipponicum*

1	cagggtcagtgcgggctcgtgctgggccc <b>ttctccacgacagggtcattggaaggtc</b> cagcac Q G Q C G S <b>C</b> W A F S T T G S L E G Q H
61	ttccgcaagacaggaagttgcttagtctgtcagagcaacaactagttgactgtagttca F R K T G K L L S L S E Q Q L V D C S S
121	gcgtttgaaatcatggctgtaatgggtggtctatttgatttcgcttttaaatatggtcag A F G N H G C N G G L F D F A F K Y V Q
181	gacagtggaggaataactactgaagatctatatccatacgtatcagggcgttatccaaaaa D S G G I T T E D L Y P Y V S G V I Q K
241	gcacatgatgtgtgttcctacaatccagacatgtgcaaagcgacatgtactggatgggtc A H D V C S Y N P D M C K A T C T G W V
301	gatataccatcaaaagactctaaagcacttatgtatgctgtggcaactatcgggcctata D I P S K D S K A L M Y A V A T I G P I
361	tcaattgcaatcaatgccatgggcccctggctttatgcaatataaatcagggcatctacaat S I A I N A M G P G F M Q Y K S G I Y N
421	ccgcccctcttgctcctgggtgactttt <b>ccgacttggatcacgccgtattggttgg</b> ttggctac P P S C P G D F S D L D <b>H</b> A V L L V G Y
481	ggcacgcaaaacggacttaattattggatcgtccaaaaacacctgg G T Q N G L N Y W I V Q K H L

Obr. 28 - Částečná sekvence cathepsinu L *Eudiplozoon nipponicum* - s vyznačenými místy pro nasazení primerů **M-CL-RACE Forw** a **M-CL-RACE Rev** pro RACE PCR; **žlutě** vyznačen C a H aktivního místa

## 1.16. 5' a 3' RACE PCR

Pomocí metody 5' a 3' RACE PCR se podařilo získat pouze 3' konec neznámé sekvence cathepsinu L *E. nipponicum*, který je dlouhý 114 pb, kóduje 37 aminokyselin a zahrnuje asparagin aktivního místa (obr. 29).

1	cagggtcagtgcgggctcgtgctgggccc <b>ttctccacgacagggtcattggaaggtc</b> cagcac Q G Q C G S <b>C</b> W A F S T T G S L E G Q H
61	ttccgcaagacaggaagttgcttagtctgtcagagcaacaactagttgactgtagttca F R K T G K L L S L S E Q Q L V D C S S
121	gcgtttgaaatcatggctgtaatgggtggtctatttgatttcgcttttaaatatggtcag A F G N H G C N G G L F D F A F K Y V Q
181	gacagtggaggaataactactgaagatctatatccatacgtatcagggcgttatccaaaaa D S G G I T T E D L Y P Y V S G V I Q K
241	gcacatgatgtgtgttcctacaatccagacatgtgcaaagcgacatgtactggatgggtc A H D V C S Y N P D M C K A T C T G W V
301	gatataccatcaaaagactctaaagcacttatgtatgctgtggcaactatcgggcctata D I P S K D S K A L M Y A V A T I G P I

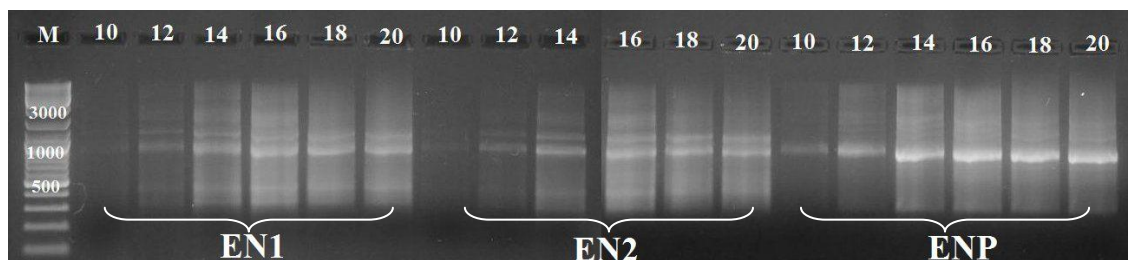
361	tcaattgcaatcaatgccatgggoccttggtttatgcaatataaatcaggcatctacaat S I A I N A M G P G F M Q Y K S G I Y N
421	ccgccctcctgtcctggtgacttttccgacttggatcacgccgtattggtgggtggctac P P S C P G D F S D L D <b>H</b> A V L L V G Y
481	ggcacgcaaaacggacttaattactggattgtgaagaacagctggagtgaaaagtgggga G T Q N G L N Y W I V K <b>N</b> S W S E K W G
541	gaaaatgggtatgtgcgcatTTTgtcgagatggTcgaaatctgtgtggagtggcaacatgc E N G Y V R I C R D G R N L C G V A T C
601	gcaagctatccactcgta <b>TAG</b> A S Y P L V -

Obr. 29 - Sekvence cathepsinu *L. E. nipponicum* – modře vyznačená sekvence získána metodou 3'RACE; žlutě jsou vyznačeny C, H, N aktivního místa; stop kodon je vyznačen tučným písmem

## 1.17. Transkriptomová analýza- příprava vzorků

### 1.17.1. Syntéza a amplifikace cDNA

Na obr. 30 je znázorněn výběr optimálního PCR cyklu u jednotlivých odběrů. Jako optimální PCR cyklus byl zvolen cyklus č. 14 u všech tří vzorků EN1, EN2 a ENP. Výsledná ds cDNA měla koncentraci viz tab. 31.



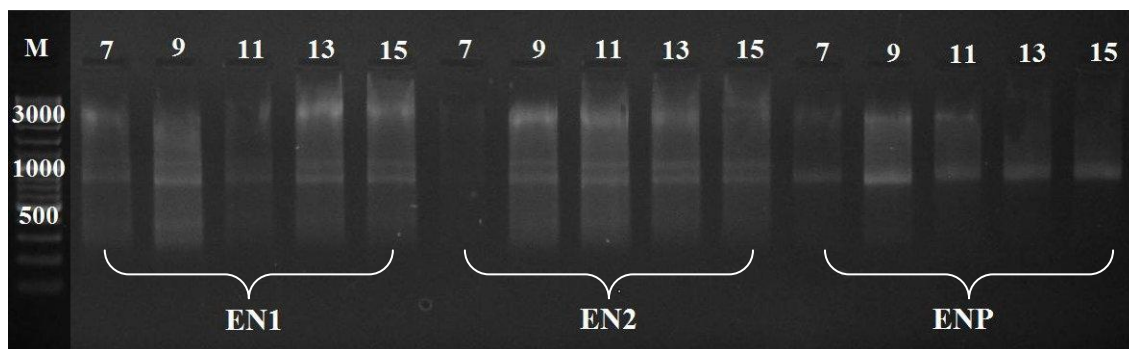
Obr. 30 - Výběr optimálního PCR cyklu

Tab. 31 – koncentrace ds cDNA

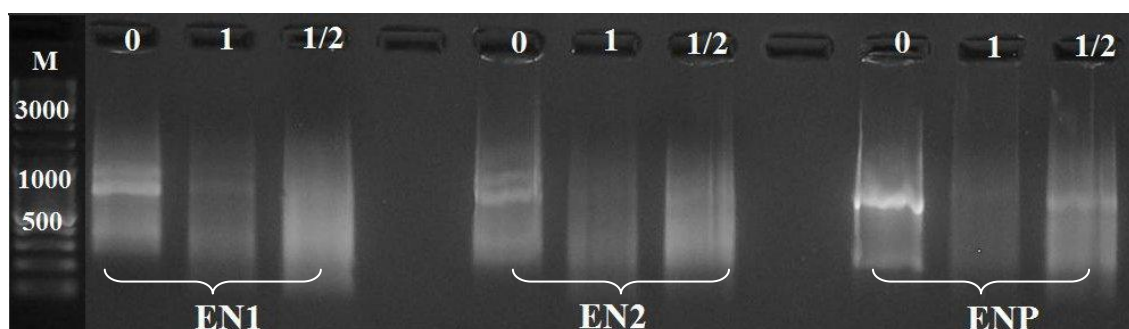
Vzorek (ds cDNA)	Koncentrace
EN1	81,5 ng/ $\mu$ l
EN2	65,5 ng/ $\mu$ l
ENP	191,4 ng/ $\mu$ l

### 1.17.2. Normalizace a amplifikace cDNA

Jako optimální PCR cyklus u kontrolní zkumavky 0 u všech vzorků EN1, EN2, ENP byl zvolen PCR cyklus číslo 9 (obr. 31). Vhodná koncentrace DSN enzymu byla vybrána u všech vzorků EN1, EN2, ENP koncentrace 1 (obr. 32).



Obr. 31 – Výběr vhodného PCR cyklu.



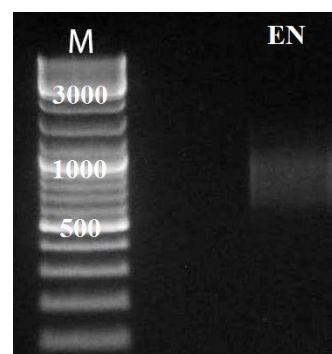
Obr. 32 – Výběr vhodné koncentrace DSN enzymu.

### 1.17.3. cDNA knihovna

Pro přípravu cDNA knihovny byly použity vzorky amplifikované ds cDNA. Vzorky EN1 a EN2 (tab. 32) z obou amplifikací byly spojeny, výsledný vzorek měl koncentraci 26 ng/μl. Knihovna cDNA byla zhodnocena na agarózovém gelu, kde byly zaznamenány fragmenty o velikosti 600 -1000 pb s píkem okolo 800 pb (obr. 33).

Tab. 32 - Normalizované ds cDNA a jejich koncentrace

normalizované ds cDNA amplifikace č.1	koncentrace
EN1	22,1 ng/ μl
EN2	34,63 ng/ μl
ENP	22,6 ng/ μl
amplifikace č.2	koncentrace
EN1	26,23 ng/ μl
EN2	28,45 ng/ μl
ENP	31,49 ng/ μl



Obr. 33 – cDNA knihovna

Při kvantifikaci cDNA knihovny byl zjištěn výsledný počet  $8,91 \times 10^8$  molekul /  $\mu\text{l}$  a vzorek byl následně naředěn tzn. 5,6  $\mu\text{l}$  vzorku do 494,4  $\mu\text{l}$  TE pufru (odpovídá  $1 \times 10^7$  molekul/  $\mu\text{l}$ ) a uchováván při  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 1.17.4. Transkriptomová analýza

Sekvenací na přístroji (GS FLX System, Roche) bylo zaznamenáno 324 941 čtení o průměrné délce 423 pb, které byly sestaveny do 6910 kontigů. Z kontigů byly vyřazeny sekvence kratší než 100 pb, nejdelší kontig je dlouhý 5221 pb. Po srovnání s databází NCBI bylo ve vzorku *E. nipponicum* predikováno 30 peptidázových genů (obr. 34). V příloze č. 2 jsou uvedeny fragmenty sekvencí peptidáz, které by se mohly podílet na procesu trávení krve u *E. nipponicum*.

Kompletní sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* bez signálního peptidu (obr. 36 na str. 64) byla získána složením naší částečné sekvence cathepsinu L *E. nipponicum* se sekvencemi z transkriptomové analýzy (kontig č. 131 a č. 132) viz obr. 35. Sekvence cathepsinu L v kontigu č. 131 je dlouhá 741 pb, kóduje 247 aminokyselin a zahrnuje cystein aktivního místa. Sekvence v kontigu č. 132 je dlouhá 213 pb, kóduje 70 aminokyselin a obsahuje histidin a asparagin aktivního místa.

MAGQDHWASFKSQHAKNYDDEEDTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRADYSLALNHLSDWKDHELLCL  
RGHRADLKTESRGSFIPNACPFELPERVDWRDKGLVTPVKNOGQCGS CWAFSTTGSLEGQHRKTGKLLS  
LSEQQLVDCSSAFGNHGCNGGLFDFAFKYVQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNPDMCKATCTGWV  
DIPSKDSKALMYAVATIGPISIAINAMGPGFMQYKS GIYNPPSCPGDFSDL HAVLLVGYGTQGLNYWIVK  
NSWSEKWGENGYVRICRDGRNLCGVATCASYPLY

**Obr. 35** – Složení kompletní aminokyselinové sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum*- **žlutě** je vyznačena částečná sekvence cathepsinu L z kontigu č.131, **modře** z kontigu č. 132, **červeně** je vyznačena naše částečná sekvence se získaným 3' koncem cathepsinu L *E. nipponicum*, **černě** označuje C, H, N aktivního místa.

číslo	největší podobnost	organismus (accession no.)	zařazení	celý gen ano/ne	délka fragmentu DNA/AK/počet kontigů
1.	cathepsin B	<i>Schistosoma mansoni</i> cathepsin B2-like (XP_002574974.1)	cysteinová peptidáza	ano	1149/382/1
2.	cathepsin C	<i>Clonorchis sinensis</i> cathepsin C-like (GAA56530.1)	cysteinová peptidáza	ano – bez SP	942/314/3
3.	cathepsin F	<i>Trichinella spiralis</i> cathepsin F-like (XP_003378245.1)	cysteinová peptidáza	ne	255/85/1
4.	cathepsin L	<i>Schistosoma mansoni</i> cathepsin L3-like (ABV71063.1)	cysteinová peptidáza	ano	1128/375/1
5.	cathepsin L	<i>Fasciola hepatica</i> cathepsin L4-like (ABZ80401.1)	cysteinová peptidáza	ne	252/84/1
6.	cathepsin M	<i>Salmo salar</i> cathepsin M-like (NP_001134251.1)	cysteinová peptidáza	ne	243/80/2
7.	pyroglutamyl peptidáza	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA56053.1)	cysteinová peptidáza	ne	402/134/2
8.	ubiquitin-specifická peptidáza 16	<i>Schistosoma mansoni</i> (XP_002578593.1)	cysteinová peptidáza	ne	465/155/1
9.	cathepsin L (naše složená sekvence)	<i>Clonorchis sinensis</i> cathepsin L-like (CAX72658.1)	cysteinová peptidáza	ano – bez SP	954/317/10
10.	calpain	<i>Schistosoma hematobium</i> (BAF62290.1)	cysteinová peptidáza	ano – bez SP	2256/751/2
11.	calpain-B	<i>Schistosoma japonicum</i> calpain B-like (gb AAX25709.2)	cysteinová peptidáza	ne	180/60/1
12.	calpain-7	<i>Clonorchis sinensis</i> calpain 7-like (EKC22455.1)	cysteinová peptidáza	ne	204/68/2
13.	cathepsin D	<i>Musca domestica</i> cathepsin D-like (ABM69086.1)	aspartátová peptidáza	ano – bez SP	1257/418/3
14.	nicalin	<i>Schistosoma mansoni</i> (CCD76986.1)	metalo-peptidáza	ano – bez SP	1104/368/1
15.	o-sialoglycoprotein endopeptidáza	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA28302.2)	metalo-peptidáza	ano – bez SP	981/327/1

16.	fxna peptidáza	<i>Schistosoma mansoni</i> ( CCD79539.1)	metalopeptidáza	ne	144/48/1
17.	atp-dependentní metalopeptidáza	<i>Flavobacterium branchiophilum</i> (WP_008462768.1)	metalopeptidáza	ne	489/163/1
18.	cytosolická aminopeptidáza	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA49276.1)	metalopeptidáza	ne	618/206/1
19.	methionyl aminopeptidáza	<i>Schistosoma mansoni</i> (XP_002575044.1)	metalopeptidáza	ne	690/230/1
20.	xaa-Pro aminopeptidáza	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA35639.1)	metalopeptidáza	ne	660/220/1
21.	metalopeptidáza ARXI	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA35285.2)	metalopeptidáza	ano – bez SP	1164/387/1
22.	lysozomální Pro-X karboxypeptidáza	<i>Schistosoma japonicum</i> ( CAX71065.1)	serinová peptidáza	ano	1464/488/1
23.	lysozomální Pro-Xaa karboxypeptidáza	<i>Schistosoma mansoni</i> ( XP_002571730.1)	serinová peptidáza	ano	1455/484/1
24.	trypsin	<i>Trichinella spiralis</i> (XP_003370290.1)	serinová peptidáza	ne	585/195/1
25.	serinová peptidáza 33	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA47585.1)	serinová peptidáza	ano	1086/361/2
26.	acylaminoacyl-peptidáza	<i>Clonorchis sinensis</i> (GAA29239.2)	serinová peptidáza	ne	435/145/1
27.	proacrosin trypsin-like serinová peptidáza	<i>Taeniopygia guttata</i> (XP_002190598.2)	serinová peptidáza	ne	570/190/1
28.	prolyl endopeptidáza	<i>Schistosoma mansoni</i> (XP_002572619.1)	serinová peptidáza	ano	1290/429/1
29.	cathepsin A	<i>Schistosoma japonicum</i> (CAX69725.1)	serinová peptidáza	ano – bez SP	1566/521/2
30.	impas 3 peptidáza	<i>Schistosoma mansoni</i> (XP_002577370.1)	aspartátová peptidáza	ne	543/181/1

**Obr. 34 - Predikované fragmenty peptidázových genů z transkriptomové analýzy- SP – signální peptid**

1	<b>ATG</b> gcaggtcaggatcactgggcttcattcaagtccaacatgccaagaactacgatgat <b>M A G Q D H W A S F K S Q H A K N Y D D</b>
61	gaagaggacacaacacgaagaacaatttttgagacaaatcttgcggtgtcgaacatcac <b>E E D T T R R T I F E T N L A A V E H H</b>
121	aatgcattgtttaatacaggccgagcagattatagcttggcggttaaatcatctgtcggac <b>N A L F N T G R A D Y S L A L N H L S D</b>
181	tggaaagaccacgaacttttggtgcttgccggtcatcgagctgatctcaagacggaatca <b>W K D H E L L C L R G H R A D L K T E S</b>
241	agaggctcggccttcattccaacgcctgtccttttgagttaccagaaagagtagattgg <b>R G S A F I P N A C P F E</b> L P E R V D W
301	cgtgacaagggctctggtgacaccagtaaaaaatcagggtcagtggtgatcgtggtggcc R D K G L V T P V K N Q G Q C G S <b>C</b> W A
361	ttctccacgacagggtcattggaaggtcagcacttccgcaagacaggaagttgcttagt F S T T G S L E G Q H F R K T G K L L S
421	ctgtcagagcaacaactagttgactgtagttcagcgtttgaaatcatggctgtaatggt L S E Q Q L V D C S S A F G N H G C N G
481	ggctctatttgatctcgttttaaatatgttcaggacagtgagggaataactactgaagat G L F D F A F K Y V Q D S G G I T T E D
541	ctatatccatacgtatcaggcgttatccaaaagcacatgatgtgtgctcacaatcca L Y P Y V S G V I Q K A H D V C S Y N P
601	gacatgtgcaaagcgacatgtaactggatgggtcgatataccatcaaaagactctaaagca D M C K A T C T G W V D I P S K D S K A
661	cttatgtatgctgtggcaactatcgggcctatatcaattgcaatcaatgccatgggcct L M Y A V A T I G P I S I A I N A M G P
721	ggctttatgcaatataaatcaggcatctacaatccgccctcttgtcctggtgacttttcc G F M Q Y K S G I Y N P P S C P G D F S
781	gacttggatcacgccgtattggtggttggttacggcacgcaaaacggacttaactactgg D L D <b>H</b> A V L L V G Y G T Q N G L N Y W
841	attgtgaagaacagctggagtgaaaagtggggagaaaatgggtatgtgctgcatcttgcga I V K <b>N</b> S W S E K W G E N G Y V R I C R
901	gatggctgaaatctgtgtggagtggaacatgcgcaagctatccactcgta <b>TAG</b> D G R N L C G V A T C A S Y P L V -

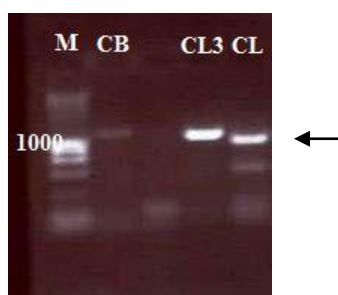
**Obr. 36 - Kompletní sekvenční sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* bez signálního peptidu – tučným písmem je vyznačen start a stop kodon, žlutě jsou vyznačeny C, H, N aktivního místa; černě proregion; růžově modifikovaný ER(V/I)FNIN motiv**

Kompletní sekvenční sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* je dlouhá 954 pb a kóduje proenzym cathepsin L složený z 317 aminokyselin, 160 nepolárních (C, A, F, G, I, L, M, P, V, W), 83 polárních (N, Q, S, T, Y), 35 kyselých (D, E) a 39 zásaditých (H, K, R). Odhadovaná molekulová velikost proenzymu cathepsinu L *E. nipponicum* je 34,9 kDa a jeho teoretické pI je 5,86. Prosekvence je

složena z 93 aminokyselin a obsahuje modifikovaný ER(V/I)FNIN motiv. U proenzymu nebyla pozorována žádná N- glykosylační místa.

### 1.17.5. Amplifikované vybrané geny z transkriptomové analýzy

Na gelu (obr. 37) jsou označeny sekvenované fragmenty DNA s genově specifickými primery, kde se podařilo získat kompletní sekvenci cathepsinů *E. nipponicum*: cathepsin L (*C. sinensis* cathepsin L-like) bez signální sekvence, cathepsin L (*S. mansoni* cathepsin L3-like, CL3, obr. 38) a cathepsin B (*S. mansoni* cathepsin B2-like, CB, obr. 39). Sekvence cathepsinu L *E. nipponicum* odpovídala námi složené sekvenci z transkriptomové analýzy ze 100 %.



Obr. 37 – Amplifikované sekvence genů cathepsinů *E. nipponicum*- CB (*S. mansoni* cathepsin B2-like), CL3 (*S. mansoni* cathepsin L3-like), CL (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum*

1	ATGggatcgttttgctaaaatgtttggtgctgctcttttgtttggtttttgtatcatc M G S F A K M F V A A S F V L C F C I I
61	ggctgtttcagtgctgatcaaaatgaatcacccttccagaaaaattttattataaaattca G C F S A D Q N E S P F Q K N F I I N S
121	aatactgctagtaaaggcgttgactatgtttctcaatcatgggtcaatgtttaaaaatttc N T A S K G V D Y V S Q S W S M F K N F
181	ttcaaacgaaattttgaaaatgccattgaagaaggagagcgtattttcattttgctcgc F K R N F E N A I E E G E R F F I F A R
241	Aacttctttatgataagtagccataatgctgaatatgctagtggaagaagatatacgaa N F F M I S S H N A E Y A S G K K I Y E
301	ctaactttaacaagttttcggatgctaaagaaagcgagcttatgaaactgctggttat L T L N K F S D A K E S E L M K L R G Y
361	aaagcagttatgaaaaagcataaagatgctcctaagggtcgacatatatttctccatcc K A V M K K H K D A P K G S T Y I S P S
421	gtagatttcaagttgcttacagatgtagactggcggaatgatggagccgtgactgatgtt V D F K L P T D V D W R N D G A V T D V
481	aaaaatcagggtcaatgtgggtcctgtgggccttttctacaacaggatcactagagggg K N Q G Q C G S C W A F S T T G S L E G

541	cagcacttcagaaagactggtaatctcgttagtctttcggagcaacagttggttgactgc Q H F R K T G N L V S L S E Q Q L V D C
601	agttcgtcatacggaaatatgggctgtaatggaggtctaattggataatgcgtttgcttat S S S Y G N M G C N G G L M D N A F A Y
661	atcaaagcgacgaatggaatcgattatgaggataagtatccatacgtatctggagataact I K A T N G I D Y E D K Y P Y V S G D T
721	ggcagcgcagaagatacctgctatattcaaggaggaagatattgggtgcagtcgacactgg G S A E D T C Y F K E E D I G A V D T G
781	tatgtagatattccgactgaagacgaagcagctcttcaagaaacagtcgcaaacgttgg Y V D I P T E D E A A L Q E T V A N V G
841	ccagtttctgtggctattaatgctggtagagccgattttatgatgtacaaacaaggaatt P V S V A I N A G R A D F M M Y K Q G I
901	tataaacctgatgaatgtcctgggtcaaataaatgatttagaccatgggtgtgctggttga Y K P D E C P G Q M N D L D <b>H</b> G V L V V
961	ggctatggatcagaaaatgggtcaggattattggatagtgaaagaacagttggggaccggat G Y G S E N G Q D Y W I V K <b>N</b> S W G P D
1021	tggggcgagagtggttacattcgtatggcgagaaatagtggaatcctttgtggaattgca W G E S G Y I R M A R N S G N L C G I A
1081	actgcagcctcatatcctctcgtt <b>TAA</b> T A A S Y P L V -

**Obr. 38 - Kompletní sekvence cathepsinu L (*S. mansoni* cathepsin L3-like) *E. nipponicum*** – tučným písmem je vyznačen **start a stop kodon**, **žlutě** jsou vyznačeny C, H, N aktivního místa; **↑** označuje odhadované místo odštěpení signálního peptidu, **černě** proregion; **ružově** modifikovaný ER(V/I)FNIN motiv

Sekvence cathepsinu L (*S. mansoni* cathepsin L3-like) *E. nipponicum* je dlouhá 1107 pb a kóduje preproenzym složený z 368 aminokyselin – 183 nepolárních (C, A, F, G, I, L, M, P, V, W), 102 polárních (N, Q, S, T, Y), 46 kyselých (D, E) a 37 zásaditých (H, K, R). Odhadovaná velikost proenzymu je 37,9 kDa a jeho teoretické pI je 4,8. N-glykosylační místa nebyla u proenzymu predikována. Proregion obsahuje ERFNIN motiv.

1	<b>ATG</b> cgtttgcattcgcactgctcagtgatttgtgctcgtcctgggtggttggccggttggc M R L H S H C S V I C V V L V L L A V G
61	ctcggcgtacaagcagagttttccacagtcagcctggtacaggagttactcgtttgagg L G V Q A <b>R</b> V F H S Q P G T G V T R L R
121	cagctattgcgggaaggcttttagcaatgtaaaacgtgacaactacattaaccagagggc <u>Q L L R E G F S N V K R D N Y I K P E G</u>
181	aaattgtacaaaccgatattcacgccgttgtctgagaacatcatcaatgccgtgaacaat <u>K L Y K P I F T P L S E N I I N A V N N</u>
241	gcaaactacatggaagccggaccaaccacagttttaattcgatttctgctctccgc <u>A N T T W K A G P T T R F N S I S A L R</u>

301	agtcaactgggtggttgggtcccgatccgaatggacgctcgcttaccactaagtgttctaca S Q L G V V P D P N G R R L P T K C S T
361	cgtggctacctcaacgaggagtaccaaactctaccagagacgtttgatgctcggaaagct R G Y L N E E Y Q N L P E T F D A R K A
421	tggcctaattgccctacaatcagccaaatccgcgatcaatctacttgtggctcgtgctgg W P N C P T I S Q I R D Q S T C G S C W
481	gcgtttggagcagttgaatcaatgtctgatcgaatctgtattcattcacgtgggaattta A F G A V E S M S D R I C I H S R G N L
541	aagccagagctatctgctgaggatcttgtctcttggctgtgggtaattctgcggggacgga K P E L S A E D L V S C C G E F C G D G
601	tgcaatgggtggatttcctcaacaggcctggttgtattgggtaagacatggaattgttacc C N G G F P Q Q A W L Y W V R H G I V T
661	ggtggagaataaccatttctactgattgctgccgaccgatgaattcccaccatgcatcat G G E Y H S T D C C R P Y E F P P C D H
721	cacgtcaatggcacactgataccggtgtcaaggcgaggttccgacaccaatttgtaaacad H V N G T L I P C Q G E V P T P I C K H
781	gattgtcaaccgagttatcacaaatcctacaaggcggacaagtattacggcaaagagtca D C Q P S Y H K S Y K A D K Y Y G K E S
841	tacaccggttgcggtgagttgcacataatgcgcgaacttatggagaatggaccgcttgaa Y T V V G E L H I M R E L M E N G P L E
901	gttgacttcgaggtgtatgctgactttcctaattacaagagtggtgtctaccagcatggt V D F E V Y A D F P N Y K S G V Y Q H V
961	gctgggtgctctcctgggaggacatgcagttcgtcttcttggatggggcacagaaaacggt A G A L L G G H A V R L L G W G T E N G
1021	gttaagtattggttgatagctaactcctggaatacagagtggggacgacaagggttattc V K Y W L I A N S W N T E W G D K G L F
1081	aagattcgtcgtggcaccaacgagtggtgaatcgagtcggacgttgttgggtgggataccg K I R R G T N E C G I E S D V V G G I P
1141	aaacttTAA K L -

**Obr. 39 - Kompletní sekvence cathepsinu B (*S. mansoni* cathepsin B2-like) *E. nipponicum* – tučným písmem je vyznačen start a stop kodon, žlutě jsou vyznačeny C, H, N aktivního místa; černě proregion, modře predikovaná N-glykosylační místa, ↑ označuje odhadované místo odštěpení signálního peptidu, černě je vyznačena „occluding loop“**

Sekvence cathepsinu B (*S. mansoni* cathepsin B2-like) *E. nipponicum* je dlouhá 1149 pb a kóduje preproenzym složený z 382 aminokyselin - 199 nepolárních (C, A, F, G, I, L, M, P, V, W), 93 polárních (N, Q, S, T, Y), 38 kyselých (D, E) a 52 zásaditých (H, K, R). Odhadovaná molekulová velikost proenzymu je 39,5 kDa a teoretické pI je 7,5. Bylo predikováno jedno N-glykosylační místo, které se nachází v sekvenci holoenzymu.

## 1.18. Porovnání cathepsinů L u vybraných organizmů

Porovnávali jsme získanou sekvenci cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* se sekvencemi cathepsinů L u vybraných organismů. Nejvyšší podobnost byla zaznamenána se sekvencí cathepsinu L (*S. mansoni* cathepsin L3-like) *E. nipponicum* (56 %) a se sekvencí cathepsinem L *C. sinensis* (54 %). Dále sekvence vykazuje podobnost se sekvencemi cathepsinů L u *Schistosoma mansoni* L3 (51%), u *Ixodes ricinus* CL (49 %), u *Neobenedenia melleni* CL (45 %), u *Fasciola hepatica* CL1 / CL2 / CL5 (43-41 %) a u *Schistosoma mansoni* CL2 (40 %). Porovnání aminokyselinových sekvencí cathepsinů L-like *E. nipponicum* s vybranými sekvencemi cathepsinů L ostatních parazitů potvrzuje, že se oba řadí do skupiny cathepsin L-like (obr. 40).

NmCL	-----MHTFSVFLLLCVATA-L
IrCL	-----MLRC-----LVLCLLVAAAAA
SmCL3	----MKCFLCLTA--FFVVVVGDSGFRKWSNLEPSLSLGRLE-----QQVKEGVPGSVN
CsCL	----MMFVLAAVFWSIFLVPGDSFTVQWRKLAPAQKVSFWKGASPLTSLDSMHMQDVIG
EnCL	-----
EnCL3	MGSFAKMFVAASFV-LCFCIIGC-FSAD-----Q-----NESPFQK--NFIINSNTA
SmCL2	-----VAIA
FhCL3	-----
FhCL1	-----MRLFVLAFLT
FhCL5	-----MRLVILTLLI
NmCL	SVPTYPLFNQWSQWKVKYQKDYLSSEDELNKLTTWSKNLETVRKHNELYAQGKKSYTLM
IrCL	VSYQEVLGAEWSAFKAKHGKSYVSETEEVFRLKIYMENRHKIAKHNEKYARGEVPYSMAM
SmCL3	VELLDDIIAAWKFFKIQFKRAYNGIHEETRRFFIFSANFVKMEHNAHFQEGKVTYKMGV
CsCL	VDWNETLSSIWKFHMTTYKRNIDPSEHERRFKIFANFVRI SKHNVRFIQGVSYTMGI
EnCL	---MAGQDHWASFKSQHAKNYDDEE-DTTRRTIFETNLAAVEHHNALFNTGRADYSLAL
EnCL3	SKGVVYVSQSWSMFKNFFKRNFENAIEEGERFFIFARNFFMISSHNAEYASGKKIYELTL
SmCL2	QHLSLQYDDIWKQWKLKYNKTYSDSN-EIRRKAIEMRYVEKIQQHNLRHDLGLEGYTMGL
FhCL2	VGVFASNDLWQWKRIYNKEYNGAD-DEHRRNIWGKNVKHIQEHNLRHDLGLVITYKLGL
FhCL1	VGVLGSNDLWQWKRYNKEYNGAD-DQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDLGLVITYTLGL
FhCL5	VGVFASNDLWQWKRIYNKEYNGAD-DDHRRNIWEQNVKHIQEHNLRHDLGLVITYKLGL
	. : : . : : : . * * :

↓

NmCL	NHMADLSSEEFKALYLVPK--FDATKVPKKGKAAGEHR-QIKNDPPSEIDWVRKGHVTAV
IrCL	NEFGDMLHHEFVSTRNGFKRNYKD--QPREGSTYLEPENIEDFSLPKTVDWRTKGAVTPV
SmCL3	NEFTDKTDYELKCLR-GYKVTSGAIR--HKGSTFIRSE---HTKLPKVDWRREGAVTDV
CsCL	NEFSDKTDEELKRLR-CFRGSLNASR---DGSKYITIA--A--PPPSEIDWRNKGAVTPV
EnCL	NHLSDWKDHELLCLR-GHRADLK---TESRGSAPI PNA--CPFELPERVDWRDKGLVTPV
EnCL3	NKFSDAKESELMLKL-GYKAVMKKHKDAPKGSTYISPS--VDFKLPTDWDWRNDGAVTDV
SmCL2	NQFCDMDWEEIKTIMLSKVFGNSP-LWDDKKEEL----ELSNDPLPSKWDWRDHGAVTPV
FhCL2	NQFTDLTFEEFKAKYLIEIPR-SSELLSR-GIPY----KANKLAVPESIDWRDYYYYVTEV
FhCL1	NQFTDMTFEEFKAKYLTEMSRASD-ILSH-GVPY----EANNRAVPDKIDWRESGYVTEV
FhCL5	NQFTDMTFEEFKAKYLTEMPRASE-LLSH-GIPY----KANKRAVPDRIDWRESGYVTEV
	. * * :



NmCL	KNQAQCGSCWAFSSTGSIEGAVKRATGKLISFSEQQLVDCSTAFGNHGCNGGIMDNSFNY
IrCL	KNQGQCGSCWAFSATGSLEGQHFRKSGSMVSLSEQNLVGCSTDFGNNGCEGGLMDDAFKY
SmCL3	KNQGQCGSCWAFSTTGAIEGQHYRKTNRNLVNLSEQQLVDCSKSYGNNGCSGGLMNSAFKY
CsCL	KNQGNCGSCWAFSATGAIEGQNFATGNLVSLSEQQLVDCSSEYGNACNGGLMDDAFKY
EnCL	KNQGQCGSCWAFSTTGSLEGQHFRKTGKLLSLSEQQLVDCSSAFGNHGCNGGLDFDAFKY
EnCL3	KNQGQCGSCWAFSTTGSLEGQHFRKTGNLVSLSEQQLVDCSSSYGNMGCNGGLMDDAFKY
SmCL2	KNQGLCGSCWAFSAAGAVEGQLVKKHKKLISLSEQQLVDCSYKYGNDGCQGGTMDQSFAY
FhCL2	KDQGQCGSCWAFSTTGAIVEGQFRKNERASASFSEQQLVDCRDFGNYGCGGGYMNAYEY
FhCL1	KDQGNCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERTSISFSEQQLVDCSRPWGNNCGGGLMENAYQY
FhCL5	KDQGGCGSCWAFSTTGAMEGQYMKNQRSTSISFSEQQLVDCSRDFGNYGCGGLMENAYEY
	*:* . *****:.* :*. :***:** * : .* ** . ::

NmCL	LIHNKGLESEASYPYEAQK-----KECRYKKALSKGTISSFTDVSQFDEKDLKRAVGLVG
IrCL	IRANKGIDTEKSYPYNGTD-----GTCHFVKSTVGATDSGFVDIKEGSETQLKKAVATVG
SmCL3	VRDNEGIDSEISYPYVSGDG-TENNRCLFNASNILAQVTGYVNIHEGDERALMDAVATKG
CsCL	VKDSNGIDTEASYPYVSGETGDANPTCRFNLKEAVVRVTGYIDLPRGQVSELKQAVGHYG
EnCL	VQDSGGITTEDLYPYVSGVIQKAHDVCSYNPDMCKATCTGWVDIPSKDSKALMYAVATIG
EnCL3	IKATNGIDYEDKYPYVSGDTGSAEDTCYFKEEDIGAVDTGYVDIPEDEAALQEAVANVG
SmCL2	LEK-YPIESEKDYKYIGHD-----SSCHFVKSKGVVKKFVDLPARDEEKLQKALYHYG
FhCL2	LKH-NGLETESYPYQAVE-----GPCQYDGRLAYAKVTGYTVHSGDEIELKNLVGTEG
FhCL1	LKQ-FGLETESSYPYTAVE-----GQCRYNKQLGVAKVTGFYTVHSGSEVELKNLVGAEG
FhCL5	LKR-FGLETESSYPYRAVE-----GQCRYNEQLGVAKVTGYTVHSGDEVELQNLVGAEG
	: : * * . * . . : . * : .



Teoretické pI 5,86 vypočítané na základě získané sekvence EnCL je přibližně podobné ostatním cathepsinům L až na výjimku cathepsinů L SmCL2 (pI 8,58) a NmCL (teoretické pI 7,57). U EnCL nebyla nalezena žádná N-glykosylační místa podobně jako je tomu u cathepsinů L (NmCL, EnCL3-like, FhCL1, FhCL2 a FCL5) (Dalton *et al.* 2003; Dvořák *et al.* 2009).

**Tab. 33 - Přehled vlastností cathepsinů L u vybraných organismů** - \* jsou vyznačena MW / teoretické pI /predikovaná N-glykosylační místa odhadovaná na základě sekvence

název	organismus	predikovaná N-glykosylační místa	ER(V/I)FNIN	odhadovaná velikost proteinu	pH optimum	pI	Lokalizace u dospělců
NmCL (DQ904526)	<i>N. melleni</i>	Ne *	DKWNVN	37,4 kDa (preproenzym) *	-	7,57 *	neurčená
IrCL (EF428205.1)	<i>I. ricinus</i>	Ano - 2 místa	ERYNIN	35,4 kDa (preproenzym)	3-4	5,79	buňky střeva
CsCL (DQ909016.1)	<i>C. sinensis</i>	Ano - 3 místa *	ERFNIN	41,4 kDa (preproenzym)	-	6,25	epiteliální buňky střeva, střevní lumen, vajíčka
EnCL	<i>E. nipponicum</i>	Ne *	DRFNVN	34,9 kDa (proenzym) *	5	5,86 *	neurčená
EnCL3-like	<i>E. nipponicum</i>	Ne *	ERFNIN	37,9 kDa (preproenzym) *	-	4,8 *	neurčená
SmCL2 (CAA83538)	<i>S. mansoni</i>	Ano – 1 místo	ERFYIN	36,5 kDa (proenzym)	5,35	8,58 *	gastrodermis, střevní lumen
SmCL3 (ABV71063)	<i>S. mansoni</i>	Ano - 2 místa	ERFNMN	41 kDa (preproenzym)	4-6	6,52	gastrodermis, vitelária
FhCL1 (U62288)	<i>F. hepatica</i>	Ne	DRWNIN	37,7 kDa (preproenzym)	4,5	6,26	buňky gastrodermis, střevní lumen
FhCL2(A5Z1V3)	<i>F. hepatica</i>	Ne	DRWNIN	37,07 kDa (preproenzym)	4,5	5,43	buňky gastrodermis, střevní lumen
FhCL5 (AF271385)	<i>F. hepatica</i>	Ne *	DRWNIN	37,1 kDa (preproenzym)	4,5	5,55	buňky gastrodermis, střevní lumen

## Diskuze

Cílem mé diplomové práce byla biochemická charakteristika peptidáz a získání genových sekvencí vybraných peptidáz, které se pravděpodobně účastní procesu trávení krve u *Paradiplozoon bliccae* a *Eudiplozoon nipponicum*. Největším problémem, se kterým se tato práce setkává, je relativní nedostatek materiálu pro naše pokusy, díky omezenému a sezónnímu výskytu zástupců č. Diplozoidae. Protože jsme měli jen omezené množství vzorků ESP (exkrečně sekreční produkty), musela být značná část pokusů provedena se vzorky *solPE* (solubilní proteinový extrakt) *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Vzorky *solPE* byly získány homogenizací celých červů a jejich nevýhodou je, že není možno určit ze které části těla peptidázy pochází a zda se účastní procesu trávení.

První fáze trávení u zástupců č. Diplozoidae pravděpodobně probíhá extracelulárně v předním střevu. Zde by se mohly uplatnit peptidázy, které by mohly být sekretovány z četných přídatných žlázek. Další fáze trávení probíhá pravděpodobně intracelulárně v trávicích buňkách střeva, kde se s největší pravděpodobností podílejí na trávení hemoglobinu peptidázy obsažené v lyzozomech (Smyth and Halton 1983). Vycházeli jsme z předpokladu, že ve vzorcích ESP mohou být obsaženy peptidázy, které se mohou podílet na extracelulární fázi trávení a zároveň peptidázy, které se mohou dostávat do lumen střeva exocytózou spolu s pigmentem z trávicích buněk a mohou být následně regurgitovány. Tak je tomu např. u fasciol, kde dochází k regurgitaci zbytků z procesu trávení přibližně každé 3 h (Smyth and Halton 1983; Halton 1997). Předpoklad byl potvrzen naměřením peptidázové aktivity ve vzorcích ESP *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Za pomoci fluorogenního substrátu FR (Z-Phe-Arg-AMC) pro cysteinové peptidázy byla u vzorků ESP obou zástupců č. Diplozoidae prokázána aktivita cysteinových peptidáz. Pro identifikaci peptidáz byly použity inhibitory cysteinových peptidáz E-64, iCL a CA-074. Úplná inhibice aktivity peptidáz inhibitorem E-64 potvrdila přítomnost cysteinových peptidáz ve vzorcích. Inhibitor iCL zcela zablokoval aktivitu u obou vzorků ESP, zatímco CA-074 inhiboval aktivitu pouze částečně. Ve vzorku ESP *P. bliccae* byla aktivita snížena o 85 %, u vzorku ESP *E. nipponicum* byla aktivita snížena o 35 %. Z výsledků by se dalo usuzovat, že ve vzorku *P. bliccae* je více cathepsinu B než ve vzorku *E. nipponicum*. Nicméně iCL inhiboval aktivitu úplně u obou vzorků, není tedy pravděpodobné, že by ve vzorcích byl

cathepsin B. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda je CA-074 schopen inhibovat cathepsin L a iCL je schopen inhibovat cathepsin B. Pro ověření byly použity rekombinantní cathepsin L *Fascioloides magna* a rekombinantní cathepsin B *Trichobilharzia regenti*, které jsou dostupné u nás v laboratoři. Podařilo se prokázat, že CA-074 inhibuje výrazně aktivitu cathepsinu L *F. magna* a iCL inhibuje aktivitu cathepsinu B *T. regenti* pouze částečně. Výsledky naznačují, že pokles aktivity při použití inhibitoru CA-074 nemusí znamenat přítomnost cathepsinu B ve vzorcích. Pokud ve vzorcích bylo přítomno jen malé množství cathepsinu B aktivita mohla být zablokována iCL. Zdá se, že majoritní peptidázou ve vzorcích ESP bude zřejmě cathepsin L, který byl nalezen i u vzorku ESP *Fasciola hepatica* (Carmona *et al.* 1993).

Pro ověření cathepsinu B ve vzorcích solPE *P. bliccae* a *E. nipponicum* byl použit fluorogenní substrát RR (Z-Arg-Arg-AMC). Aktivita byla prokázána, ale byla zcela inhibována inhibitory E-64 a iCL. CA-074 inhiboval aktivitu téměř úplně u vzorku *P. bliccae* a méně u vzorku *E. nipponicum*. Na základě toho, že byl vzorek zcela inhibován iCL předpokládáme, že v našem případě byl fluorogenní substrát RR štěpen cathepsinem L. Další možností je, že ve vzorcích mohlo být přítomno menší množství cathepsinu B, který štěpil RR substrát a mohl být inhibován iCL. Ve své práci Dalton *et al.* (1996a), uvádí že RR substrát může být štěpen cathepsinem L i B *S. mansoni* a při pH pod 4,5 převažuje aktivita cathepsinu L, zatímco aktivita cathepsinu B je méně významná. Přítomnost cathepsinu B ve vzorcích *P. bliccae* a *E. nipponicum* je třeba v dalších pokusech ověřit.

Z měření aktivity s fluorogenním substrátem FR (Z-Phe-Arg-AMC) při pH 4 - 10 bylo určeno optimální pH 6 u vzorku solPE *E. nipponicum* a u vzorku solPE *P. bliccae* bylo pH optimum 5. U obou vzorků solPE *P. bliccae* a *E. nipponicum* nebyla aktivita cysteinových peptidáz prokázána v neutrálním ani zásaditém pH. U cathepsinu L1 (FhCL1) *F. hepatica* byla aktivita zaznamenána v rozsahu pH 3 - 9 s pH optimumem 4,5 (Lowther *et al.* 2009; Dalton *et al.* 2003). U *S. mansoni* má cathepsin L2 (SmCL2) optimální pH 5,35 a je aktivní pouze v kyselém pH (Brady *et al.* 2000a), zatímco cathepsin L3 *S. mansoni* (SmCL3) má pH optimum 6,5. Při trávení hemoglobinu SmCL3 se pH pohybuje mezi 4 - 6. Aktivita SmCL3 byla zaznamenána v rozmezí pH 3-11 (Dvořák *et al.* 2009). U klíštěte *Ixodes ricinus* má cathepsin L optimální pH 3,5-4 (IrCL) (Franta *et al.* 2011). Rozdíl v pH optimech může být dán řadou faktorů. Jedním z důvodů mohou být kompartmenty, kde probíhá trávení krve. U schistosom dochází

k extracelulární fázi trávení, kdy jsou peptidázy sekretovány do lumen střeva. U fasciol dochází k extracelulární fázi trávení potravy uvnitř lumen střeva na menší fragmenty, které jsou následně vstřebány do gastrodermis, kde je trávení dokončeno intracelulárně (Halton 1997). U klíšťat probíhá intracelulární trávení krve v lyzozomálním cyklu (Sonenshine 1991). U většiny hematofágních helmintů se na degradaci hemoglobinu podílí více izoform cathepsinů L např. u *F. hepatica* (CL1, CL2, CL5) (Robinson *et al.* 2008), u *S. mansoni* (CL2, CL3) (Caffrey *et al.* 2004; Dvořák *et al.* 2009), je tedy možné, že dohromady cathepsiny L pokrývají širší rozpětí pH. Tuto myšlenku podporují i naše výsledky z transkriptomové analýzy vzorku *E. nipponicum*, při které byly predikovány tři cathepsiny L (CL1-like, CL3-like a CL4-like). Významnou roli může hrát i hostitelská specifita, která může vést k různým adaptacím u jednotlivých parazitů.

Přítomnost dalších peptidáz ve vzorcích *solPE P. bliccae* a *E. nipponicum* byla prověřena za použití fluorogenního substrátu pro serinové peptidázy GPR (Z-Gly-Phe-Arg-AMC) a substrátu pro legumain AAN (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Aktivita nebyla prokázána ani u jednoho vzorku. U krevsajících parazitů, kteří využívají v procesu trávení krve cysteinové peptidázy, je využití serinových peptidáz vzácným jevem. Příkladem jsou klíšťata, u kterých se serinové peptidázy podílejí na konečné fázi trávení hemoglobinu (Horn *et al.* 2009). U mořského monogenea *Neobenedeniagirellae* byla prokázána aktivita serinových peptidáz (Hirazawa *et al.* 2006), ale protože se jednalo o komplexní vzorek, nemusí to znamenat, že serinové peptidázy se účastní procesu trávení. Z výsledků z transkriptomové analýzy je patrné, že monogeneum *E. nipponicum* exprimuje geny jak pro serinové a aspartátové peptidázy, tak pro metalopeptidázy, ale nebyly zaznamenány geny pro legumain-like, pravděpodobně z důvodu, že náš transkriptom není kompletní. Je tedy možné, že nebyly použity vhodné substráty pro serinové peptidázy a legumain. Protože se jednalo o komplexní vzorky mohlo dojít k inhibici nebo degradaci peptidáz ve vzorcích.

Pokoušeli jsme se prokázat proteolytickou aktivitu peptidáz v gelech s želatinou jako substrátem při pH 5. Gelatinolytická aktivita byla na gelech zaznamenána v oblasti okolo 20 a 30 - 35 kDa ve vzorcích *solPE E. nipponicum* a *P. bliccae*. Aktivita byla zcela zablokována při použití inhibitoru E-64, s inhibitorem iCL se objevily slabší proužky o velikosti 28 - 35 kDa. Podle práce Hirazawa *et al.* (2006) byla ve vzorku *solPE* mořského monogenea *N. girellae* prokázána hydrolytická aktivita v oblasti přibližně 107, 149 a 167 kDa. Tyto proužky nebyly senzitivní k inhibitoru E-64 pro

cysteinové peptidázy, ale k inhibitoru Pefabloc SC specifickému pro serinové peptidázy, což může svědčit o přítomnosti serinových peptidáz ve vzorku. Ve vzorcích *solPE P. bliccae* a *E. nipponicum* nebyly touto metodou žádné serinové peptidázy zjištěny, proužky byly senzitivní k inhibitoru E-64 a tím byla přítomnost cysteinových peptidáz potvrzena. Tato metoda byla prováděna pouze při pH 5, a protože serinové peptidázy jsou většinou aktivní v neutrálním a zásaditém pH, nemusela být aktivita zaznamenána.

Pro detekci cysteinových peptidáz, byly ESP *P. bliccae* a *E. nipponicum* inkubovány z fluorescenčně značenou próbou DCG-04 (Greenbaum *et al.* 2000; Greenbaum *et al.* 2002), která se kovalentně váže do jejich aktivního místa. Vzorky ESP *P. bliccae* a *E. nipponicum* byly rozděleny pomocí 1D elektroforézy. Ve vzorcích ESP u *P. bliccae* byl zaznamenány proužky s navázaným DCG-04 o velikosti přibližně 28 a 35 kDa a u vzorku ESP *E. nipponicum* se objevily proužky o velikosti 28 a 24 kDa. Proužek o velikosti přibližně 24 kDa by mohl odpovídat holoenzymu cathepsinu L, proužek v oblasti 35 kDa by mohl představovat proenzym cathepsin L. Proužek o velikosti 28 kDa jsme zaznamenali pouze ve vzorku ESP a nikoliv ve vzorku *solPE*. Proužek by mohl vzniknout v důsledku autodegradace cathepsinu L ve vzorku nebo jeho částečnou degradací jinou peptidázou. Vzhledem k omezenému množství materiálu nebylo možno pokus opakovat. V budoucnu se pokusíme charakterizovat celý sekretom pomocí metod hmotnostní spektrometrie.

Ve vzorcích *solPE P. bliccae* a *E. nipponicum* byla ověřena specifita vazby biotinem značené próby DCG-04 (Greenbaum *et al.* 2000; Greenbaum *et al.* 2002) k detekovaným proteinům za pomoci preinkubace s různými inhibitory. Ve vzorcích se samotným DCG-04 a ve vzorcích preinkubovaných s CA-074 a inhibitory serinových peptidáz (TPCK, TLCK, PMSF) se objevil proužek o velikosti přibližně 35 kDa, který by mohl odpovídat proenzymu cathepsinu L. Při použití inhibitoru E-64 nebyl zaznamenán žádný proužek a tedy přítomnost cysteinových peptidáz v *solPE* vzorcích *P. bliccae* a *E. nipponicum* byla potvrzena. Při použití iCL se objevil slabý proužek o velikosti 35 kDa, to znamená, že iCL inhiboval vazbu částečně (jedná se o reverzibilní inhibitor). Použitím inhibitoru DFP pro serinové peptidázy se u vzorku *solPE E. nipponicum* objevil proužek o velikosti přibližně 24 kDa. Je možné, že DFP stojí za autoaktivací cathepsinu L, nicméně netušíme jakým mechanismem. Detekce cathepsinu L pomocí značené próby DCG-04 byla využita s úspěchem např.

i u cathepsinu L *I. ricinus* (Franta *et al.* 2011) a cathepsinu L3 *S. mansoni* (Dvořák *et al.* 2009).

K přímému průkazu přítomnosti cysteinových peptidáz byla použita 2D elektroforéza v kombinaci s fluorescenčně značenou próbou DCG-04 a hmotnostní spektrometrií. Spoty o velikosti přibližně 30 - 35 kDa se objevily u vzorku *solPE P. bliccae* a nacházely se ve slabě kyselé až neutrální oblasti. Spoty o velikosti 25 - 35 kDa u vzorku *solPE E. nipponicum* se nacházely ve slabě kyselé až mírně zásadité oblasti. U vzorku *P. bliccae* byly vyříznuty 2 oblasti gelu, první oblast obsahovala 4 spoty, které se nacházely v odhadované velikosti 30 kDa. Pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy byly spoty identifikovány jako cathepsin L. Druhá oblast obsahovala 1 spot v oblasti 35 kDa, který se identifikovat nepodařilo. U vzorku *E. nipponicum* bylo vyříznuto 5 spotů v oblasti 25 - 35 kDa, které se všechny podařilo identifikovat jako cathepsin L. Spoty č. 1, č. 2 a č. 3 se nacházely v oblasti 35 kDa. Spoty č. 4 a č. 5 se nacházely v oblasti 24 kDa. Jednotlivé spoty mohou představovat různé izoformy cathepsinu L, které se mohou lišit např. mírou posttranslačních modifikací. Spoty o velikosti 35 kDa mohou představovat proenzym, zatímco spoty o velikosti 24 kDa mohou představovat holoenzym. Díky různé velikosti odštěpeného fragmentu, může docházet k rozdílnému zastoupení aminokyselin v polypeptidovém řetězci a jednotlivé izoformy enzymu se mohou lišit rozdílným pI. Teoretické pI vypočítané na základě získané sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* (proenzymu pI je 5,86 a holoenzymu pI je 6,09) odpovídá spotům v mírně kyselé oblasti gelu.

Na základě námi navržených degenerovaných primerů se podařilo získat částečnou sekvenci cathepsinu L *E. nipponicum*. Metodou 3' RACE PCR se podařilo získat 3' konec neznámé sekvence cathepsinu L a pomocí výsledků z transkriptomové analýzy a našeho sekvenování, byla sestavena kompletní sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* bez signálního peptidu. Sekvence byla ověřena navržením genově specifických primerů a následným osekvenováním celého genu. Z výsledků z transkriptomové analýzy byly navrženy i další genově specifické primery pro cathepsin L (*S. mansoni* L3-like) *E. nipponicum* a cathepsin B (*S. mansoni* B2-like) *E. nipponicum*, získané fragmenty DNA byly osekvenovovány a podařilo se nám získat kompletní sekvence genů. Cathepsin L (*C. sinensis* cathepsin L-like, EnCL) *E. nipponicum* a cathepsinu L (*S. mansoni* L3-like) *E. nipponicum* obsahují v

prosegmentu modifikovaný ER(V/I)FNIN motiv, který odpovídá ostatním cathepsinům L.

Gen cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* o délce 954 pb kóduje proenzymu (317 aminokyselin) o odhadované velikosti 34,9 kDa a jeho teoretické pI je 5,86, zatímco holoenzym má odhadovanou velikost 24,2 kDa (teoretické pI je 6,09). Odhadovaná velikost cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* určená na základě sekvence odpovídá výsledkům našich biochemických analýz. U preproenzymu cathepsinu L (*S. mansoni* L3-like) *E. nipponicum* je odhadovaná molekulová velikost 37,9 kDa, zatímco odhadovaná velikost holoenzymu je 24,1 kDa (teoretické pI je 4,1). Námi zjištěné velikosti pro cathepsiny L *E. nipponicum* jsou v souladu s velikostí, kterou získali Robinson *et al.* (2011), kde zymogen cathepsin L *F. hepatica* má molekulovou hmotnost 37 kDa a autokatalyticky aktivovaný holoenzym dosahuje velikosti 24,5 kDa.

Gen cathepsinu B (*S. mansoni* B2-like) *E. nipponicum* obsahuje 1149 pb a kóduje preproenzymu (382 aminokyselin) o odhadované velikosti 39,9 kDa a holoenzymu je 30,4 kDa. Tento výsledek odpovídá velikosti cathepsinu B u *S. mansoni*, kde velikost holoenzymu 31 kDa (Götz *et al.* 1992).

U proenzymu cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* a preproenzymu cathepsinu L (*S. mansoni* L3-like) *E. nipponicum* nebyla pozorována žádná N-glykosylační místa. Podobně jako je tomu u cathepsinů L *N. melleni* a *F. hepatica* (L1, L2) (Dalton *et al.* 2003). U cathepsinů L *I. ricinus* a *S. mansoni* (L2, L3) byla predikována N-glykosylační místa (Dvořák *et al.* 2009; Franta *et al.* 2011). U cathepsinu B (*S. mansoni* B2-like) *E. nipponicum* bylo predikováno jedno N-glykosylační místo v holoenzymu.

Sekvence cathepsinu L (*C. sinensis* cathepsin L-like) *E. nipponicum* byla porovnána s jinými sekvencemi cathepsinů L u vybraných organismů. Nejvyšší homologie byla zaznamenána s cathepsinem L (*S. mansoni* L3-like) *E. nipponicum* 56 %, s CsCL (*C. sinensis*) 54 %, s SmCL3 (*S. mansoni*) 51 %, s IrCL (*I. ricinus*) 49 %, s NmCL (*N. melleni*) 45 %, s FhCL1/FhCL2/FhCL5 (*F. hepatica*) 43-41 % a s SmCL2 (*S. mansoni*) 40 %.

Metodou 454 pyrosekvenování jsme získali pouze 324 941 čtení oproti očekávanému 1 milionu. Jednou z příčin mohla být nedostatečná kvalita cDNA knihovny, dále se při emPCR mohlo navázat více fragmentů na kuličku, nebo do jamky mikrotitrační destičky mohlo zapadnout více kuliček. Z různých možných důvodů získaná informace o transkriptomu není zatím kompletní a to se odrazilo i na počtu získaných sekvencí peptidázových genů (30). Např. v transkriptomu dospělce *F. hepatica* je predikováno 265 peptidázových genů (Young *et al.* 2010). Náš transkriptomový projekt bude nadále pokračovat a očekáváme získání většího množství peptidázových genů.

V této chvíli existují pouze dvě studie zabývající se peptidázami u monogeneí (Rao *et al.* 2007; Hirazawa *et al.* 2006) a to byl jeden z důvodů proč se na toto téma zaměřila moje diplomová práce. Pomocí molekulárních metod se nám podařilo získat sekvence cathepsinu L, cathepsinu L (*S. mansoni* L3-like) a cathepsin B (*S. mansoni* B2-like) u sladkovodního monogenea *E. nipponicum*, které by se mohly účastnit procesu trávení hemoglobinu. Z transkriptomové analýzy se nám podařilo získat 30 sekvencí predikovaných peptidázových genů u monogenea *E. nipponicum*, na něž bychom se rádi zaměřili v dalších experimentech. Na základě získaných informací se pokusíme odhalit proteolytickou kaskádu trávení hemoglobinu u zástupců č. Diplozoidae.

## **Závěrečné shrnutí**

Aktivita cysteinových peptidáz byla zaznamenána ve vzorcích ESP a *solPE* u *P. bliccae* a *E. nipponicum* za použití fluorogenního substrátu FR (pro cysteinové peptidázy) a RR, kde pravděpodobně hlavní aktivita je přisuzována cathepsinu L. Při použití substrát pro legumain a serinové peptidázy žádná aktivita zaznamenaná nebyla. Avšak serinové peptidázy byly predikovány pomocí transkriptomové analýzy, proto je třeba pokusy opakovat s použitím jiných substrátů pro serinové peptidázy a pokusit se optimalizovat podmínky.

Přítomnost cysteinových peptidáz se nám podařilo prokázat ve vzorcích *solPE* u *P. bliccae* a *E. nipponicum* metodu zymografie, 2D elektroforézy a použitím značených prób DCG-04. Cathepsin L byl identifikován ze spotů z 2D elektroforézy pomocí metody hmotnostní spektrometrické analýzy u obou zástupců č. Diplozoidae.

Ve vzorku ESP *P. bliccae* a *E. nipponicum* byly detekovány cysteinové peptidázy fluorescenčně značenou sondou DCG-04. Z důvodu malého množství vzorku nebylo možné pokus opakovat. V dalších experimentech bychom se pokusili charakterizovat sekretom.

Podařilo se nám získat tři sekvence peptidázových genů cathepsin L (*C. sinensis* cathepsin L-like), cathepsin L (*S. mansoni* L3-like) a cathepsin B (*S. mansoni* B2-like) *E. nipponicum*, které by se mohly podílet na procesu trávení krve u č. Diplozoidae. Z transkriptomové analýzy je predikováno dalších 27 peptidázových genů, na některé z nich bychom se chtěli v příštích experimentech zaměřit podrobněji. Pokusíme se je charakterizovat pomocí biochemických a molekulárních metod.

Majoritní peptidázou u č. Diplozoidae je cathepsin L, který byl prokázán ve vzorcích ESP a *solPE* u *P. bliccae* a *E. nipponicum*. Lze se domnívat, že se může jednat o hlavní trávicí peptidázu.

## Použitá literatura

**Acosta, D., Goni, F., Carmona, C. (1998):** Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology* 84, 1–7.

**Adisakwattana, P., Viyanant, V., Chaicumpa, W., Vichasri-Grams, S., Hofmann, A., Korge, G., Sobhon, P. and Grams, R. (2007):** Comparative molecular analysis of two asparaginyl endopeptidases and encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 156, 102–116.

**Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. and Sajid, M. (2009):** The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends in parasitology* 25, 573–81.

**Azar, D. and Nel, A. (2012):** Evolution of hematophagy in “non-biting midges” (Diptera: Chironomidae). *Terrestrial Arthropod Reviews* 5, 15–34.

**Barrett, A. J. and Rawlings, N. D. (1996):** Families and clans of cysteine peptidases. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 6, 1–11.

**Barrett, A. J. and Rawlings, N. D. (2001):** Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. *Biological Chemistry* 382, 727–733.

**Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (1998):** Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*, 1666.

**Barrett, A. J., Woessner, J. F. and Rawlings, N. D. (2004):** Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd ed. *Elsevier Academic Press*, 984.

**Boeger, W. A., Kritsky, D. C. (2001):** Phylogenetic relationships of the Monogonoidea. In: Littlewood, D. T. J., Bray, R. A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 92–102.

**Bogitsh, B. J. and Carter, S. (1977):** *Schistosoma mansoni*: ultrastructural studies on the esophageal secretory granules. *The Journal of Parasitology* 63, 681–686.\*

**Bogitsh, B. J., Dalton, J. P., Ciaran, P. B. and Brindley, P. J. (2001):** Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. *Journal of Parasitology* 87, 237–241.

**Brady, C. P., Brindley P. J., Dowd, A. J. and Dalton, J. P. (2000a):** *Schistosoma mansoni*: Differential Expression of Cathepsins L1 and L2 Suggests Discrete Biological Functions for Each Enzyme. *Experimental Parasitology* 94, 75–83.

**Brady, C. P., Brinkworth, R. I., Dalton, J. P., Dowd, A. J., Verity, C. K. and Brindley P. J. (2000b):** Molecular Modeling and Substrate Specificity of Discrete Cruzipain-like and Cathepsin L-like Cysteine Proteinases of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 380, 46–55.

- Brindley, P. J., Kalinna, B. H., Dalton, J. P., Day, S. R., Wong, J. Y. M., Smythe, M. L. and McManus, D. P. (1997):** Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89, 1–9.
- Buchmann, K. and Bresciani, J. (2006):** Monogenea. In: WOO, P. T. K. (ed.): *Fish Diseases and Disorders*. Second Edition. Volume 1. Protozoan and Metazoan Infections. CABI, Wallingford, 297–344.
- Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P. and Sajid, M. (2004):** Blood and guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends in Parasitology* 20, 241–248.
- Capinera, J. L. (2008):** Encyklopedia of Entomology. Springer, 4346.
- Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M. and Dalton, J. P. (1993):** Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 9–17.
- Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Menard, R., Mort, J. S. and Cygler, M. (1996):** Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *The EMBO Journal* 15, 5492–5503.
- Dalton, J. P., Clough, K. A., Jones, M. K. and Brindley, P. J. (1996a):** Characterization of the Cathepsin-Like Cysteine Proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity* 64, 1328–1334.
- Dalton, J. P., McGonigle, S., Rolph, T. P. and Andrews, S. J. (1996b):** Induction of Protective Immunity in Cattle against Infection with *Fasciola hepatica* by Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Hemoglobin. *Infection and immunity* 64, 5066–5074.
- Dalton, J.P. ed. (1998):** Fasciolosis. CAB International, Fairweather 77–81. \*
- Dalton, J. P., Neil, S. O., Stack, C., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maoule, A. G., Donnelly, S. M. (2003):** *Fasciola hepatica* cathepsin L-like: biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal of Parasitology* 33, 1173-1181.
- Dalton, J. P., Skelly, P. and Halton, D. W. (2004):** Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Canadian Journal of Zoology* 82, 211–232.
- Dehrman, F. M., Coetzer, T. H. T., Pike, R. N. and Dennison, C. (1995):** Mature Cathepsin L Is Substantially Active in the Ionic Milieu of the Extracellular Medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324, 93–98.
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lim, K.C., Dvořák, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C. and McKerrow, J.H. (2006):** A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 39316–39329.

- Delcroix, M., Medzihradsky, K., Caffrey, C. R., Fetter, R. D., and McKerrow J. H. (2007):** Proteomic analysis of adult *S. mansoni* gut contents. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154, 95–97.
- Desdevises, Y., Morand, S., Jousson, O. and Legendre, P. (2002):** Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) and spridae (Teleostei): The study of a complex host–Parasite system. *Evolution* 56, 2459–2471.
- Dowd, A. J., Dooley, M., Fágáin, C. and Dalton, J. P. (2000):** Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 599–604.
- Dvořák, J., Mashiyama, S. T., Sajid, M., Braschi, S., Delcroix, M., Schneider, E. L., McKerrow, W. H., Bahgat, M., Hansell, E., Babbitt, P. C., Craik, C. S. C., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R. (2009):** SmCL3, a Gastrodermal Cysteine Protease of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e449.
- Eakin, A. E., Bouvier, J., Sakanari, J. A., Craik, C. S. and McKerrow, J. H. (1990):** Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 39, 1–8.
- Franta, Z., Sojka, D., Frantova, H., Dvorak, J., Horn, M., Srba, J., Talacko, P., Mares, M., Schneider, E., Craik, Ch. S., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Kopacek, P. (2011):** IrCL1 – The haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology* 41, 1253–1262.
- Götz, B., Felleisen, R., Shaw, R. and Klinker, M. Q. (1992):** Expression of an active cathepsin B-like protein Sm31 from *Schistosoma mansoni* in insect cells. *Tropical Medicine and Parasitology* 43, 282–84.
- Halton, D. W. (1997):** Nutritional Adaptations to Parasitism within the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* 27, 693–704.
- Harmsan, M. M., Cornelissen, J. B. W. J., Bujis, H. E. C. M., Boersma, W. J. A., Jeurissen, S. H. M and van Milligen, F. J. (2004):** Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *International Journal for Parasitology* 34, 675–682.
- Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N., Fujisaki, K. (2006):** Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *International Journal for Parasitology* 36, 1123–1132.
- Heussler, V. T. and Dobbelaere, D. A. E. (1994):** Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64, 11–23.
- Hirazawa, N., Umeda, N., Hatanka, A. and Kuroda, A. (2006):** Characterization of serine proteases in the monogenean *Neobenedenia girellae*. *Aquaculture* 255, 188–195.

- Horn, M., Nussbaumerová, M., Šanda, M., Kovářová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C. R., Kopáček, P. and Mareš, M. (2009):** Hemoglobin digestion in Blood-Feeding Tick: Mapping a Multi-Peptadase Pathway by functional Proteomics. *Chemistry & Biology* 16, 1053–1063.
- Hodová, I., Matějusková, I. and Gelnar, M. (2010):** The surface topography of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) developmental stages parasitizing carp (*Cyprinus carpio* L.). *Central European Journal of Biology* 5, 702–709.
- Greenbaum, D., Medzihradsky, K. F., Burlingame, A. and Bogyo, M. (2000):** Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chemistry & Biology* 7, 569–581.
- Greenbaum, D., Baruch, A., Hayrapetian, L., Darula, Z., Burlingame, A., Medzihradsky, K. F. and Bogyo M. (2002):** Chemical approaches for functionally probing proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 60–68.
- Gunčar, G., Pungerčič, G., Klemenčič, I., Turk, V. and Turk, D. (1999):** Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *The EMBO Journal* 18, 793–803.
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T. and Mort, J. S. (1997):** Role of the Occluding Loop in Cathepsin B Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 1197–1202.
- James, M. N. G (2004):** Catalytic pathway of aspartic peptidases. In Handbook of Proteolytic Enzymes, 2 edn (Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. eds), Elsevier; 12–19.
- Karrer, K. M., Peiffert, S. L. and Ditomas, M. E. (1993):** Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 3063–3067.
- Kašný, M., Mikeš, L., Hampl, V., Dvořák, J., Caffrey, C. R., Dalton, J. P. and Horák, P. (2009):** Peptidases of Trematodes. *Advances in Parasitology* 69, 205–297.
- Kawatsu, H. (1978):** Studies on the anemia of fish. IX. Hypochromic microcytic anemia of crucian carp caused by infestation with a trematode, *Diplozoon nipponicum*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44, 1315–1319.
- Košková, E., Špakulová, M., Koubková, B., Reblánová, M., Orosová, M. (2011):** Comparative karyological analysis of four diplozoid species (Monogenea, Diplozoidae), gill parasites of cyprinid fishes. *Parasitology Research* 108, 935–941.
- Kuk, S., Kaplan, M., Ozdarendeli, A., Tonbak, S., Felek, S. and Kalkan, A. (2005):** *Fasciola hepatica* cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to Asiatic isolates. *Acta Parasitologica* 50, 244–248.
- Lambert, A. and Gharbi, S. E. (1995):** Monogenean host specificity as a biological and taxonomic indicator for fish. *Biological Conservation* 72, 227–235.

- Lara, F. A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I. C., Braga, C. M., Miguens, F. C., Oliveira, P. L. and Dansa-Petretski, M. (2003):** A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *The Journal of Experimental Biology* 206, 1707–1715.
- Lecaille, F., Kaleta, J. and Brömme, D. (2002):** Human and Parasitic Papain–Like Cysteine Proteases: their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chemical Reviews* 102, 4459–4488.
- Li, A. H., Moon, S. U., Park, Y. K., Na, B. K., Hwang, M. G., Oh, C. M., Cho, S. H., Kong, Y., Kim, T. S., Chung, P. R. (2006):** Identification and characterization of cathepsin L–like cysteine protease from *Taenia solium* metacestode. *Veterinary Parasitology* 141, 251–259.
- Littlewood, D. T. J., Rohde, K., Bray, R. A. and Herniou, E. A. (1999):** Phylogeny of the Platyhelminthes and the evolution of parasitism. *Biological Journal of the Linnean Society* 68, 257–287. \*
- Littlewood, D. T. J. and Bray, R. A. (Eds.). (2001):** *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor & Francis, 356 pp.
- Lowther, J., Robinson, M. W., Donnelly, S. M., Xu, W., Stack, S. M., Matthews, J. M. and Dalton, J. P. (2009):** The Importance of pH in Regulating the Function of the *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Cysteine Protease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e369.
- Matějusková, I., Koubková, B., D’Amelio, S. and Cunningham, C. O. (2001):** Genetic characterization of six species of diplozoids (Monogenea; Diplozoidae). *Parasitology* 123, 465–474.
- McCarthy, E., Stack, C., Donnalley, S. M., Doyle, S., Mann, V. H., Brindley, P. J., Stewart, M., Day, T. A., Maule, A. G. and Dalton, J. P. (2004):** Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology* 34, 703–714.
- McDougall, H. C. (2012):** Identifying “hidden” antigens in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. PhD thesis. University of Glasgow.
- McIntyre, G. F., Godbold, G. D. and Erickson, A. H. (1994):** The pH-dependent Membrane Association of Procathepsin L Is Mediated by a 9–Residue Sequence within the Propeptide. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 567–572.
- Mendiola, J., Alonso, M., Marquetti, M. C. and Finlay, C. (1996):** *Boophilus microplus*: Multiple Proteolytic Activities in the Midgut. *Experimental Parasitology* 82, 27–33.
- Michel, A., Ghoneim, H., Resto, M., Klinkert, M. Q. and Kunz, W. (1995):** Sequence, characterization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73, 7–18.

- Mulenga, A., Misao, O. and Sugimoto, C. (2003):** Three serine proteinases from midguts of the hard tick *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Experimental and Applied Acarology* 29, 151–164.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovici, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N. and Bode, W. (1991):** The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *The EMBO Journal* 10, 2321–2330.
- Nägler, D. K., Sulea, T. and Ménard, R. (1999):** Full-Length cDNA of Human Cathepsin F Predicts the Presence of a Cystatin Domain at the N-terminus of the Cysteine Protease Zymogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257, 313–318.
- Park, H., Hong, K. M., Sakanari, J. A., Choi, J. H., Park, S. K., Kim, K. Y., Hwang, H. A., Paik, M.K., Yun, K.J., Shin, Ch.H., Lee, J. B., Ryu, J. S. and Min, D. K. (2001):** *Paragonimus westermani*: Cloning of a Cathepsin F-like Cysteine Proteinase from the Adult Worm. *Experimental Parasitology* 98, 223–227.
- Pečínková, M., Matějusková, I., Koubková, B., Gelnar, M. (2007a):** Investigation of *Paradiplozoon homoion* (Monogenea, Diplozoidae) life cycle under experimental conditions. *Parasitology International* 56, 179–183.
- Pečínková, M., Vøllestad, L. A., Koubková, B. and Gelnar, M. (2007b):** Asymmetries in the attachment apparatus of a gill parasite. *Journal of Zoology* 272, 406–414.\*
- Rao, Y. Z., Yang, T. B. (2007):** cDNA cloning, mRNA expression and recombinant expression of a cathepsin L-like cysteine protease from *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae). *Aquaculture* 207, 41–53
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1993):** Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 290, 205–218.
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1999):** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 27, 325–331.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J. (2004):** Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal* 378, 705–716.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J. and Barrett, A. J. (2008):** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 36, D320–D325.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. and Bateman A. (2010):** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 38, D227–D233.
- Reed, P., Francis-Floyd, R., Klinger, R., Petty, D. (2009):** Monogenean Parasites of Fish. *University of Florida IFAS extension*, 1–4.
- Roberts, L. S., Janovy, J. (2005):** Foundation of parasitology seventh edition. *McGraw-Hill*, 702 pp, ISBN 0–07–234898–4, 293–307.

- Robinson, R. D., Khalil, L. F., Hall, R. N. and Steele, R. D. (1992):** Infection of red hybrid tilapia with a monogenean in coastal waters off southern Jamaica. *Proceedings Gulf & Caribbean Fisheries Institute* 42, 441–447.
- Robinson, M. W., Dalton, J. P. and Donnelly, S. (2008a):** Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 601–608.
- Robinson, M. W., Tort, J. F., Lowther, J., Donnelly, S. M., Wong, E., Xu, W., Stack, C.M., Padula, M. and Herbert, B. (2008b):** Proteomics and Phylogenetic Analysis of the Cathepsin L Protease Family of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 1111–1123.
- Robinson, M. W., Corvo, I., Jones, P. M., George, A. M, Padula, M. P., To, J., Cancela, M., Rinaldi, G., Tort, J. F., Roche, L. and Dalton, J. P. (2011):** Collagenolytic Activities of the Major Secreted Cathepsin L Peptidases Involved in the Virulence of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5, e1012.
- Sajid, M. and McKerrow, J. H. (2002):** Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 1–21.
- Sajid, M., McKerrow, J. H, Hanssell, E., Mathieu, M. A., Lucas, K. D., Hsich, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J. P., Lim, K. C., Franklin, Ch., Kim, J. H., Caffrey, C. R. (2003):** Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its *trans*-activation by endogenous asparaginyl endopeptidase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 131, 65–75.
- Schabussova, I., Gelnar, M., Schabuss, M. and Horák, P. (2003):** Use of lectins in characterizing developmentally regulated changes on the surface of *Paradiplozoon megan* (Monogenea: Diplozoidae). *Helminthologia* 40, 135–140.
- Shinnar, A. E., Butler, K. L. and Park, H. J. (2003):** Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorganic Chemistry* 31, 425–436. \*
- Silva, L. L., Marcet-Houben, M., Zerlotini, A., Gabaldón, T., Oliveira, G. and Nahum, L. A. (2011):** Evolutionary histories of expanded peptidase families in *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 864–877.
- Smyth, J. D. and Halton, D. W. (1983):** The Physiology of Trematodes. Cambridge University press (2nd edition), 446 pp, ISBN 0521222834, 250–297.
- Sojka, D., Franta Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C. R., Mareš, M. and Kopáček, P. (2008):** Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionary conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasites and Vectors* 7, 1–13.
- Sonenshine, D. E. (1991):** Biology of ticks. *Oxford University Press* Vol. 1, 472 pp.
- Tessmar-Raible, K. and Arendt, D. (2003):** Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa. *Current Opinion in Genetics & Development* (13), 331–340

- Toh, S. Q., Glanfield, A., Gobert, G. N. and Jones, M. K. (2010):** Heme and blood-feeding parasite: friends or foes? *Parasites and Vectors* 3: 108.
- Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K. H. and Dalton, J. P. (1999):** Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Advances in Parasitology* 43, 161–266.
- Turk, B., Turk, D. and Turk, V. (2000):** Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 98–111.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B. and Turk, D. (2012):** Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824, 68–88.
- Valigurová, A., Hodová, I., Sonnek, R., Koubková, B. and Gelnar, M. (2011):** *Eudiplozoon nipponicum* in focus: monogenean exhibiting a highly specialized adaptation for ectoparasitic lifestyle. *Parasitology Research* 108, 383–394.
- Wasilewski, M. M., Lim, K. C., Philips, J. and McKerrow, J. H. (1996):** Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. *Molecular and Biochemical Parasitology* 81, 179–189.
- Wex, T., Levy, B., Wex, H. and Brömme D. (1999):** Human Cathepsins F and W: A New Subgroup of Cathepsins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 401–407.
- Williamson, A. L., Brindley, P. J., Knox, D. P., Hotez, P. J. and Loukas, A. (2003):** Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology* 19, 417–423.
- Whittington, I. D., Cribb, B. W., Hamwood, T. E. and Halliday, J. A. (2000):** Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas? *International Journal for Parasitology* 30, 305–320.
- Whittington, I. D. and Kearn, G. C. (2011):** Hatching Strategies in Monogenean (Platyhelminth) Parasites that Facilitate Host Infection. *Integrative and Comparative Biology* 51, 91–99.
- Yamaji, K., Miyoshi, T., Hatta, T., Matsubayashi, M., Alim, A. M., Anisuzzaman, Kushibiki, S., Fujisaki, K. and Tsuji, N. (2013):** HICPL – A, a cathepsin L-like cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, modulated midgut proteolytic enzymes and their inhibitors during blood meal digestion. *Infection, Genetics and Evolution* 16, 206–211.
- Yamasaki, H., Mineki, R., Murayama, K., Ito, A. and Aoki, T. (2002):** Characterisation and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *International Journal for Parasitology* 32, 1031–1042.
- Young, N. D., Hall, R. S., Jex, A. R., Cantacessi, C. and Gasser, R. B. (2010):** Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* — A key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnology Advances* 28, 222–231.

**Zurawski, T. H., Mousley, A., Mair, G. R., Brennan, G. P., Maule, A. G., Gelnar, M. and Halton, D. W. (2001):** Immunomicroscopical observations on the nervous system of adult *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea: Diplozoidae). *International Journal for Parasitology* 31,783–792.

**Zurawski, T. H., Mousley, A., Maule, A. G., Gelnar, M. and Halton, D. W. (2003):** Cytochemical studies of the neuromuscular systemer of the diporpa and juvenile stages of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea: Diplozoidae). *Parasitology* 126, 349–357.

**Další zdroje :**

<http://merops.sanger.ac.uk/>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine\\_protease](https://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine_protease)

\* Sekundární literatura

# Příloha č.1

Tab. 34 - Použité chemikálie, kity, software

<b>RNA, DNA elektroforéza, PCR</b>	
TRIzol®	Invitrogen
50 x TAE buffer	Invitrogen
Agaróza	Invitrogen
PPP master mix	Top-Bio
EmeraldAmp GT PCR Master Mix	Takara – Bio
HyperLadder I	Bioline
HyperLadder II	Bioline
HyperLadder IV	Bioline
<b>Chemikálie a média pro pěstování bakterií</b>	
LB médium	10 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 10 g chloridu sodného; pH 7,0 do 1l sterilní H <sub>2</sub> O
SOC médium	Invitrogen
LB agar	10 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 10 g chloridu sodného; 15 g agaru; pH 7,0 do 1l sterilní H <sub>2</sub> O
Kanamycin (zásob. 50 mg/ml)	Sigma-Aldrich
<b>Inhibitory peptidáz</b>	
CA-074	L-3- <i>trans</i> -(Propylcarbamyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (Sigma-Aldrich)
Inhibitor Cathepsinu L	Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
E-64	L- <i>trans</i> -epoxysuccinyl-leucyl-amido (4-guanidino) butan (Sigma-Aldrich)
DFP	Diisopropylfluorofosfát (Sigma-Aldrich)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich)
TPCK	Tolylsulfonylphenylalanyl chloromethyl keton (Sigma-Aldrich)
TLCK	N- $\alpha$ - <i>p</i> -tosyl-L-lysine chloromethyl keton (Sigma-Aldrich)
<b>Fluorogenní oligopeptidové substráty</b>	
Z-Phe-Arg-AMC (FR)	Bachem
Z-Arg-Arg-AMC (RR)	Bachem
Z-Gly-Phe-Arg-AMC (GPR)	Bachem
Z-Ala-Ala-Asn-AMC (AAN)	Bachem
<b>SDS Page, Western blot</b>	
DL- Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumins (BSA)	Sigma-Aldrich
Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad
Streptavidin HRP	Sigma
Tween 20	Bio-Rad
5 x vzorkový pufr neredukující	2% SDS; 25% glycerol; 0,1 % bromphenol blue; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; do 10 ml sterilní H <sub>2</sub> O
10 x Tris/Glycine/SDS pufr (TGS)	Bio-Rad
Blotovací pufr	10 ml 10x TGS; 70 ml H <sub>2</sub> O; 20 ml metanol
TBS-T	20 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20

Blokovací pufr	TBS-T; 5% sušené mléko; 2% BSA
Protilátky	TBS-T; 1% BSA; streptavidin-HRP (1:1000)
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
Precious Plus Protein™ Dual Xtra Standards	Bio-Rad
Barvicí roztok	1,2 g Coomassie brilliant blue; 300 ml metanol; 240 ml H <sub>2</sub> O; 60 ml kys. Octová
Odbarvovací roztok	250 ml metanol; 100 ml kys. octová; 650 ml H <sub>2</sub> O
<b>Pufry pro měření aktivity, zymografii, 2D elektroforézu, hmotnostní spektrometrii</b>	
Citrát- fosfátový pufr	pH 4; 5; 6; 7
Glycin-NaOH pufr	pH 9; 10
Tris pufr	pH 8
Rehydratační pufr	7M urea; 2M thiourea; 4% CHAPS, 100 mM DTT; 0,5% amfolyty; bromfenol blue
Equilibrační pufr I.	6M urea; 0,05M Tris-HCl pH 8,8; 2% SDS ; 20% glycerol; 2% DTT
Equilibrační pufr II.	6M urea; 0,05M Tris-HCl pH 8,8; 2% SDS ; 20% glycerol; 2,5% iodoacetamid
CPB-T	1M Citrát- 0,2M fosfátový pufr; pH 5; 1% Triton
CPB	1M Citrát- 0,2M fosfátový pufr; pH 5
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Redukční roztok (hmotnostní spektrometrie)	10 mM DTT v 100 mM ABC
Blokovací roztok (hmotnostní spektrometrie)	55 mM iodoacetamid v 100 mM ABC
<b>Kity</b>	
Opti 4CN substrate kit	Bio-Rad
Quant-iT™ protein assay kit	Invitrogen
SuperScript™ III First-Strand Synthesis	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction kit	Qiagen
Topo TA cloning kit	Invitrogen
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
GeneRacer™ Kit	Invitrogen
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech
Advantage 2 PCR Kit	Clontech
Trimmer 2 cDNA normalization kit	Evrogen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
Rapid library preparation kit	Roche
Rapid library MID adaptors kit	Roche
Agencourt AMPure XP - PCR Purification	Beckman Coulter
<b>Software</b>	
Analýza sekvencí	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> <a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a> <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a> <a href="http://www.blast2go.com/b2ghome">http://www.blast2go.com/b2ghome</a>

Kontrola primerů	<a href="http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx">http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx</a>
Úprava sekvencí	Bioedit, Seqmen (DNASTAR)
dokumentace gelů/membrán	GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD) Molecular Imager® FX (BIO-RAD) Software PDQuest (BIO-RAD)

**Tab. 35 - Primery**

Název primeru	použití	Sekvence
M-C.spec.3 Forw	sekvenace	5'- CAA/ GGG NCA RTG YGG ITC NTG C/T TGG -3'
M-C.spec.3 Rev		5'- CCA NSA/ TRT TYT TIA CRA TCC AA/ GTA -3'
M13 Forw		5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'
M13 Rev		5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'
GeneRacer™ Forw Primer	5' a 3' RACE	5'- CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA -3'
GeneRacer™ Rev Primer		5'- GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G -3'
M-CL-RACE Forw		5'- CCG ACT TGG ATC ACG CCG TAT TGT TGG T -3'
M-CL-RACE Rev		5'- GAC CTT CCA ATG ACC CTG TCG TGG AGA A -3'
PCR primer M1	Amplifikace cDNA (příprava na transkriptom)	5'- AAG CAG TGG TGG TAT CAA CGC AGA GT -3'

## Příloha č.2

Název (peptidáza s největší podobností)	Celý gen ano/ne	Délka fragmentu  DNA/AK	Sekvence
<b>cathepsin B</b>  ( <i>S. mansoni</i> - cathepsin B- like)	ano	1155/385	TQTMRLHSHCSVICVVLVLLAVGLGVQARVFHSQP GTGITRLRQLLREG FSNVKRDNYIKPEGKLYKPIFTPLSENIINAVNNANTTWKAGPTTRFNSIS ALRSQLGVVPDPNGRRLPTKCSTRGYLNEEYQNLPETFDARKAWPNC TISQIRDQSTCGS <b>C</b> WAFGAVESMSDRICHSRGNLKELSAEDLVSCCGE FCGDGCNGGFPPQAWLYWVRHGIVTGGEYHSTDCCRPYEFPDHHV NGTLIPCQGEVPTPICKHDCQPSYHKS YKADKYYGKESYTVV GELHIMR ELMENGLPEVDFEVYADFPNYKSGVYQHVAGALLGG <b>H</b> AVRLLGWGTE NGVKYWLIA <b>N</b> SWNTEWGDKGLFKIRRTNECGIESDVVGGIPKL-
<b>cathepsin C</b>  ( <i>C. sinensis</i> - cathepsin C-like)	bez signálního peptidu	942/314	MMRRFPVLDLNRRLRNDEFIKRINDMKMSWNAVHYPQFENMTLLDL QRISGGRKSVNPNRPKAPVTPPEIERLARQLPTEFDWRKPIGGLPSIVTPV RHQDSCGS <b>C</b> YAFASTAAVESRIRLQTGGFHKPILSPQDVVDCSPFSQGC GGFPYLIAGKYAEYKGMVEEDCNPYQGGKGTGSCQSRIGCKRYTTKYH YIGGYGACNEKLMLELVHRGPFVGFVYSDFRNYKGGVYQHTAH NDLLNEFNPFETN <b>H</b> AVLLVGYGYDEELNKPYWIVK <b>N</b> SWGTSWGEDGF FRILRGSDECGIESLGVSVEVVI-
<b>cathepsin F</b>  ( <i>Perkinsus marinus</i> - cathepsin F-like)	Ne	255/85	KGKKGKQDNLNRVSLNVQQLERKLGRRLPQSV DWRNFGVINRIKQ GDCGS <b>C</b> YAFATVCTIESHYAIKTSQLLRLSEQQIVDCA
<b>cathepsin L</b>  ( <i>S. mansoni</i> - cathepsin L3-like)	ano	1128/375	DLIAVSQMGSAKMFVAASFVLCFCIGCFSADQNESPFQKNFIINSNTAS KGVYDVSQSWSMFKNFFKRN FENAIEEGERFFIFARNFFMISSHNAEYAS GKKIYELTLNKFSDAKESELMKLRGYKAVMKKHKDAPKGSTYISPSVD FKLPTD VDW RNDGAVTDVKNQGC <b>C</b> WAFSTTGSLGQHFRKTGNL VSLSEQQLVDCSSSYGNMGCNGLMDNAFAYIKATNGIDYEDKYPYVS GDTGSAEDTCYFKEEDIGAVDTGYVDIPTEDAALQEAVANVGPVSVAI NAGRADFM MYKQGIYK PDECPGMNDL <b>H</b> GVLVVGYGSENGQDYWI VK <b>N</b> SWGPDWGESGYIRMARNSGNLCGIATAASYPLV-
<b>cathepsin L</b>  ( <i>F. hepatica</i> - cathepsin L4- like)	Ne	252/84	SYSLELNKFGDESDEFAMRHKKKNGKKGKQDNLNRVSLNVQQLERK LGRRLPQSV DWRNFGVINRIKQ GDCGS <b>C</b> YAFATVC
<b>cathepsin L</b>  ( <i>C. sinensis</i> - cathepsin L- like)	Ano- bez signálního peptidu	964/317	Sekvence uvedena ve výsledcích

<b>cathepsin M</b> <i>(Salmo salar-cathepsin M-like)</i>	Ne	243/80	MCDLSDKAFNEWKIKYNKSYSTEDEDRRRRIWEENVKIVEDHNAKGL SYKMEVNHLADRQSHVCCGGISADRCEHGKS-
<b>cathepsin D</b> <i>(Musca domestica-cathepsin D-like)</i>	bez signálního peptidu	1257/418	MYSRNTLRLRHLVIFFFITFFHRILLNGYCFLDISSEKPLQNHISEDAKQIN NILDNSKSTTVDYTKRLNDIANGVSRHSKDSGGITFDLEYSTSLRLYSEIK IGTPGQRFNVTFD <sup>D</sup> TSTSELWIPSTKFKLSPIWRNKQFNKYSSASSTYEDA HRHVTLAIDDGITFCYIGRDNDVLSGVIVQKQTFGEDVLES GDYFLNLD YDGILGLGVRQKSLFQAKPILQSLDQGHIEPIFAFYVSRFPEFQKSELT GHYNPDRLIGDFS YLNLTGDTDWELSDLE MAGRQFKKIRMFTAIISSA LPYFYAPTCFVDFVNHIGSIRANGAVYFVECERIATPLTRFQLNNVSFS LEPEDYIKISTPSMTVCYNAIMQLPSNKLTAFWLGSVFLRKYYTLFDA KNKRVGIAIAR-
<b>cathepsin A</b> <i>(Schistosoma japonicum-cathepsin A-like)</i>	ano	1566/521	MLQNKLLRLIVLACLAFCSSSAIQLTPDAEKDQVTDLPGLRFLPKFKHF AGYLRYGDASQKLFYWFFESQDRPEVDPLVLWLNNGPGCSSLMGATTE NGPFTLTSSKTLVQNTQSWNKQANMLYIEAPAGVGFYSVAPGNHND DSTSLNTMAALKDFLVKFPQYKLHDFYITGE <sup>S</sup> YGGVYVPTLATRVIKDG TFNLKAVAIGNGLSSYEKNDNSLIYFAYYHGLIETRFWKKMFKACCPNV DDITRCYFTRSKSLMCQSFIDIFDRISNGLNIYNLYGPCVGGASVNLKES STNEVQLEFDRMSLELRKIEPTEETAQQTDNSHLSKYSHSDFHNLFRDNI FMKEERALRNITRQKEPLRMIIPCS DSSDLTNYFNDPLVKAALHVRPNP TWDVCSDDVNANYERIYNDTSMFYNFMLN NNIRVLVYNGDT <sup>D</sup> MACN YLGDEWFLDDLNLKLRKYQPWFYTDANGWKVGGYAKQFTKDNAK LTFATIRGSG <sup>H</sup> MVPTDKPIAAKRMFDAFLGNKNL-

**Obr. 41 - Predikované fragmenty lyzozomálních genů z transkriptomové analýzy, které by mohly být zahrnuty v procesu trávení *E. nipponicum* - žlutě** jsou vyznačeny aminokyseliny aktivního místa