

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Romana Šašková

Expresní profil katepsinu L u jednotlivých vývojových stádií *Fascioloides magna*

The expression profile of cathepsin L in developmental stages of *Fascioloides magna*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Praha, 2015

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, 13.8.2015

Podpis

Romana Šašková

Poděkování:

Mé poděkování patří především mému školiteli Martinu Kašnému za podporu po celou dobu mého studia a za ochotu a odborné rady při vzniku této práce. Děkuji Richardu Nádvoříkovi za cenné rady ohledně problematiky qPCR a Romanovi, který si našel vždy čas na konzultaci. Dále děkuji Lence za neskutečnou technickou i psychickou podporu (nejen) při hybridizačních pokusech. Obrovské díky patří také mému příteli Jakubovi, který se mnou roky trpěl při mých experimentálních nezdarech a rodičům, že mi toto studium vůbec umožnili. Tímto také děkuji helmintologickému týmu za příjemné pracovní prostředí plné vzájemné spolupráce.

ABSTRAKT

Fascioloides magna, dvouhostitelská motolice z čeledi Fasciolidae parazitující u domácích a volně žijících přežvýkavců severní Ameriky a střední Evropy včetně České Republiky. V České republice se vyskytuje tento vysoce patogenní helmint u jelenovitých a turovitých, přičemž způsobuje těžká poškození jater a prevalence této nákazy místy dosahuje až 95%. Přesto biologie *F. magna* dosud není zcela prozkoumána a informace související s molekulární podstatou interakce mezi parazitem a hostitelem či funkce určitých molekul produkovaných tímto parazitem zůstávají velmi omezené. Dle zjištění našeho předchozího výzkumu exkrečně-sekreční produkty dospělého *F. magna* (ESP) obsahují značné množství molekul, které hrají zásadní roli při průniku do tkání hostitele, trávení a úniku před imunitní odpovědí. Mezi nejvíce abundantní patří cysteinová peptidáza - cathepsin L (FmCL). Předpokládá se, že FmCL hraje klíčové role v průběhu celého životního cyklu, u všech stádií a v různých procesech. Za tímto účelem jsme provedli pilotní studii, v níž jsme stanovovali úroveň exprese FmCL u miracidíí a dospělců. Pro porovnání míry exprese u těchto dvou stádií byla aplikována metoda qPCR. Výsledky experimentu potvrdily naše očekávání, že u dospělých červů je tento enzym exprimován v mnohem větší míře než u miracidíí. Současně jsme se pokusili expresi FmCL1 lokalizovat na histologických řezech dospělcem, avšak pozorovaný signál lokalizaci jasně neprokázal.

Klíčová slova: *Fascioloides magna*, cysteinové peptidázy, cathepsin L, exprese, qPCR, RNA *in situ* hybridizace

ABSTRACT

Our experimental organism *Fascioloides magna* is a digenetic liver fluke from Fasciolidae family which parasitizes in domestic and free-living ruminants of North America and Central Europe including Czech Republic. In Czech Republic this highly pathogenic worm causes a severe liver damage to cervids and bovids and the prevalence locally reaches up to 95%.

The biology of *F. magna* including e.g. the characteristics of host-parasite molecular interaction and the functions of particular molecules produced by the parasite are not fully understood. According to results of our previous research the excretory-secretory products of *F. magna* adults contain number of molecules which play the crucial role in host tissue invasion, digestion and evasion of the host immune response. One of the most abundant is cysteine peptidase cathepsin L (FmCL). FmCL is supposed to play various key roles in biological processes of all stages during a life cycle and therefore we can suppose its different expression level in particular life stages. In order to define the expression level of FmCL we performed the pilot study with miracidia and adults where the qPCR method was applied. The results of this experiment revealed much higher expression level of FmCL1 in adults than in miracidia. The attempt to *in situ* localize the mRNA transcripts of FmCL1 in paraffin sections of adult worm was also realized but the localization of recorded signal was not clear.

Keywords: *Fascioloides magna*, cysteine peptidases, cathepsin L, expression, qPCR, RNA *in situ* hybridization

OBSAH

ÚVOD	1
CÍLE PRÁCE.....	2
LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
1.1 Čeleď Fasciolidae	3
1.1.1 <i>Fascioloides magna</i>	5
1.1.1.1 Životní cyklus <i>F. magna</i>	6
1.2 Peptidázy	8
1.2.1 Rozdělení peptidáz	9
1.2.2 Přehled nejvýznamnějších peptidáz vybraných skupin motolic.....	10
1.2.3 Peptidázy a jejich funkce v kontextu s životním cyklem	12
1.2.4 Cysteinové peptidázy.....	16
1.2.4.1 Cathepsin L	16
1.2.4.2 Cathepsin B	19
1.2.4.3 Legumain.....	21
1.2.4.4 Cysteinové peptidázy ostatních druhů motolic	22
1.3 Metody využívané pro analýzu genové exprese	23
1.3.1 qPCR.....	24
1.3.1.1 MIQE guidelines	25
1.3.1.2 Využití qPCR	26
1.3.2 RNA <i>In situ</i> hybridizace (ISH).....	27
1.3.2.1 FISH (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization)	28
1.3.2.2 CISH (Chromogenic <i>in situ</i> hybridization)	28
MATERIÁL A METODIKA.....	29
2.1 Sběr materiálu.....	29
2.1.1 Dospělci a vajíčka.....	29
2.1.2 Sběr miracidí	29
2.2 Příprava materiálu pro molekulární analýzy.....	30
2.2.1 Izolace celkové RNA.....	30
2.2.2 Reverzní transkripce	31
2.3 Příprava materiálu pro histochemické analýzy	31
2.3.1 Zalévání do parafínu.....	32
2.3.2 Příprava řezů.....	33

2.4	MOLEKULÁRNÍ METODY	33
2.4.1	Detekce exprese cathepsinu L1 u dospělců a miracidíí	33
2.4.1.1	PCR	33
2.4.1.2	Extrakce amplikonů z agarózového gelu	34
2.4.1.3	Klonování do plazmidu pGEM®-T Easy	34
2.4.1.4	Transformace buněk XL1-Blue (E.coli)	35
2.4.1.5	Kontrolní PCR bakteriálních kolonií a sekvenace	35
2.4.2	Výběr referenčních genů a testování specifity primerů	36
2.4.2.1	PCR	37
2.4.3	Příprava plazmidového templátu pro testování účinnosti primerů	37
2.4.3.1	Množení plazmidů	38
2.4.3.2	Izolace plazmidů	38
2.4.3.3	Linearizace plazmidů	38
2.4.3.4	Přečištění linearizovaných plazmidů	38
2.4.4	Testování účinnosti primerů	39
2.4.4.1	qPCR	39
2.4.5	qPCR - měření exprese FmCL1	40
2.4.6	Příprava RNA prób pro lokalizaci transkriptů FmCL1	41
2.4.6.1	Ověření specifity primerů	41
2.4.6.2	Příprava RNA prób značených digoxigeninem (DIG)	42
2.4.7	RNA <i>in situ</i> hybridizace	43
2.4.7.1	Protokol RNA <i>in situ</i> hybridizace	46
	VÝSLEDKY	48
3.1	Detekce exprese cathepsinu L1 u dospělého a miracidíí	48
3.2	Výběr referenčních genů a testování specifity primerů	49
3.3	Testování účinnosti primerů - qPCR	49
3.4	Měření exprese FmCL1 u miracidíí a dospělého <i>F. magna</i>	51
3.5	Normalizace dat	52
3.6	Porovnání exprese FmCL1 mezi dospělci a miracidíí	53
3.7	Lokalizace transkriptů FmCL1 na řezech <i>F. magna</i>	55
	DISKUZE	57
	ZÁVĚR	64
	POUŽITÁ LITERATURA	65

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ESP – exkrečně sekreční produkty

ISH – *in situ* hybridizace

CL – cathepsin L

CB – cathepsin B

CC – cathepsin C

CE – cerkáriová elastáza

CD – cathepsin D

CF – cathepsin F

LAP – leucin aminopeptidáza

LGMN – legumain

qPCR – kvantitativní PCR

Konkrétní enzymy jsou vždy pojmenovány zkratkou příslušného organismu a následně zkratkou enzymu např. cathepsin L *Fascioloides magna* - FmCL

ÚVOD

Zástupci čeledi Fasciolidae představují dvouhostitelské motolice. Definitivními hostiteli jsou domácí či volně žijící přežvýkavci, v některých případech i člověk. Nákaza jaterními fasciolidními motolicemi (např. fasciolóza – *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*; fascioloidóza – *Fascioloides magna*), je závažné onemocnění přežvýkavců i člověka (Lotfy et al. 2008). V celosvětovém měřítku způsobuje nákaza těmito parazity značné hospodářské škody a počet lidských nálezů v případě fasciolózy se odhaduje až na 17 milionů (Mas-Coma et al. 2005, Piedrafita et al. 2010). V souvislosti s vývojem chemoterapeutik a vakcinačních látek namířených proti těmto motolicím jsou pak zkoumány esenciální molekuly, které hrají zásadní roli v biologických procesech napříč celým životním cyklem těchto motolic. Jednou z takových skupin molekul jsou proteolytické enzymy, tzv. peptidázy. Peptidázy se účastní důležitých procesů jako je penetrace do hostitele, migrace tkání, trávení či únik před imunitní odpovědí hostitele (Tort et al. 1999, Delcroix et al. 2006, McKerrow et al. 2006). Současně se řadí mezi abundantní enzymy obsažené v exkrementně-sekrecčních produktech dospělců těchto motolic (Dowd et al. 1994, Jefferies et al. 2001, Robinson et al. 2009).

Nejvíce prozkoumanou skupinou peptidáz jsou tzv. cysteinové peptidázy, kam patří enzymy jako např. cathepsin L, B, legumain a další. Cysteinové peptidázy jsou multifunkční enzymy, jejichž funkce se může v průběhu životního cyklu měnit a stejně tak zřejmě i jejich exprese (Sajid & McKerrow 2002, Robinson et al. 2008a, Rawlings & Salvesen 2013). Výzkum exprese těchto enzymů u jednotlivých stádií motolic nám pak pomáhá pochopit jejich funkci v průběhu životního cyklu a provázanost s jednotlivými procesy. V minulosti bylo prokázáno, že exprese téhož genu se v průběhu životního cyklu konkrétní motolice může dramaticky měnit (Ghoneim et al. 2008, Dvořák et al. 2009, Dolečková et al. 2010). Informaci o úrovni exprese je tedy možné využít také za účelem přípravy a zvýšení účinnosti některých antiparazitárních látek. Parazitovi může být např. znemožněna migrace, pokud bude chemoterapeutikum cíleno na peptidázu určenou k migraci juvenilního stádia (např. CL3 a CB1-3 u NEJ *F. hepatica*), čímž by bylo možné už na počátku zabránit propuknutí infekce (Cancela et al. 2008, Corvo et al. 2009, Norbury et al. 2011).

V této práci jsme se zaměřili na sledování exprese cysteinové peptidázy - cathepsinu L u vývojových stádií *Fascioloides magna* (miracidia a dospělci).

CÍLE PRÁCE

- 1) Zpracovat dostupnou literaturu orientovanou na peptidázy motolic a shrnující zejména informace o úrovni exprese a lokalizaci jednotlivých peptidáz u jednotlivých vývojových stádií motolic.
- 2) Pomocí metod PCR/qPCR ověřit zastoupení katepsinu L u jednotlivých vývojových stádií *Fascioloides magna* a měřit úroveň jeho exprese.
- 3) S využitím metod RNA *in situ* hybridizace se pokusit lokalizovat oblasti s nejvyšší mírou exprese katepsinu L
- 4) Naměřená data porovnat s publikovanými informacemi pro nejpříbuznější parazitické organismy např. *Fasciola hepatica* a *Fasciola gigantica*.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Čeleď Fasciolidae

Motolice z čeledi Fasciolidae jsou jedny z největších, nejznámější a z pohledu veterinární medicíny nejvýznamnějších dvouhostitelských trematod. Tato čeleď v současné době zahrnuje 6 rodů a 9 známých zástupců - *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*, *F. jacksoni*, *F. nyanzae*, *F. tragalaphi*, *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*, *Protofasciola robusta*, *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Lotfy et al. 2008). Ačkoliv se jedná především o jaterní (příp. střevní – *F. buski*, *P. robusta*) parazity velkých herbivorních savců, 3 druhy těchto motolic mohou parazitovat i u člověka (*F. hepatica*, *F. gigantica*, *F. buski*) (Mas-Coma & Bargues 1997, Lotfy et al. 2008). Za bazální fasciolidy této čeledi jsou považovány druhy *Parafasciola robusta* (slon), *F. buski* (prase, člověk) a *P. fasciolaemorpha* (jelenovítí) parazitující v tenkém střevě definitivního hostitele. Jejich mezihostiteli jsou na rozdíl od ostatních zástupců plži čeledi Planorbidae. S postupným geografickým rozšířením, vznikem nových druhů a přizpůsobením se jiným definitivním hostitelům se vyvinula i další orgánová lokalizace parazitů této čeledi. Evolučně mladší motolice *F. hepatica*, *F. gigantica*, *F. jacksoni*, *F. magna* parazitují ve žlučovodech nebo jaterním parenchymu definitivních hostitelů a jako mezihostitelé figurují v životním cyklu plži z čeledi Lymneidae. Všechny motolice čeledi Fasciolidae však procházejí obdobným vývojovým cyklem viz. **Obr. 1.** (Mas-Coma & Bargues 1997, Lotfy et al. 2008, Roberts & Janovy 2009). V této diplomové práci se kromě experimentálního organismu *Fascioloides magna*, věnuji charakterizaci dalších dvou dobře prozkoumaných motolic této čeledi *F. hepatica* a *F. gigantica*.

Dospělci *F. hepatica* i *F. gigantica* bývají lokalizováni ve žlučovodech převážně ovcí, koz a dobytka (příp. člověka). *Fasciola hepatica* je kosmopolitně rozšířená v mírném pásu a *F. gigantica* se vyskytuje v tropickém pásu hlavně Afriky a Asie. V místech, kde dochází k překrývání oblastí výskytu obou druhů (hlavně v Africe a Asii), mohou být u některých zvířecích definitivních hostitelů detekovány oba druhy motolic současně, přičemž může docházet i k jejich hybridizaci. (Ashrafi et al. 2006, Periago et al. 2008, Mas-Coma et al. 2009). Onemocnění, které způsobuje nákaza těmito dvěma druhy, se nazývá fasciolóza a řadí se mezi nejčastější parazitózy světa (Mas-Coma 2004, Mas-Coma et al. 2005, 2009). Nejvíce případů lidské fasciolózy je zaznamenáváno v rámci Evropy hlavně ve Francii, Portugalsku a Španělsku a Velké Británii (Esteban et al. 1998, Keiser & Utzinger 2009). Jižní a východní Asie, hornaté oblasti Jižní Ameriky, oblasti kolem Kaspického moře a údolí Nilu patří mezi endemické oblasti, kde je lidská fasciolóza vážným problémem (Esteban et al. 1998, Mas-Coma et al. 1999, Curtale et al. 2000, Mas-Coma 2004). Veterinární fasciolóza přežvýkavců představuje pak celosvětový problém, jak z hlediska významných ekonomických ztrát (Spithill & Dalton 1998, McManus & Dalton 2006), tak z hlediska možného přenosu na člověka (Mas-Coma et al. 2005). U nakažených kusů dobytka dochází k poklesu produkce mléka i omezení váhového přírůstku, čímž se snižuje výnos masa. Navíc se ke klinickým projevům fasciolózy oslabeného jedince mohou přidružit sekundární bakteriální infekce negativně ještě více ovlivňující kondici zvířat. To má nezřídka za následek až úhyn hlavně mladých zvířat, přičemž u ovcí jsou úhyny častější než u dobytka (Pybus 2001). V souvislosti s každoročními významnými ekonomickými ztrátami, zvyšující se prevalencí lidských nálezů a zdravotním rizikem, které tyto motolice představují, narůstá také význam vědeckých výzkumů zaměřených na boj s těmito parazity. Jednou z možností potenciálních cílů v tomto boji mohou představovat i esenciální molekuly produkované těmito motolicemi, na něž je možné zacílit nejrůznější typy léčiv, nebo které lze využít jako součást vakcinačních přípravků (Piacenza et al. 1999, Mulcahy & Dalton 2001, Dalton et al. 2003a, McManus & Dalton 2006, Changklungmoa et al. 2012). Navíc díky porozumění principům molekulárního fungování nejrůznějších dějů v živém organismu prostřednictvím detailní charakterizace funkcí těchto molekul nám následně umožní poodhalit některé neprobádané oblasti z biologie parazita i jeho hostitele.

Vzhledem k blízké příbuznosti *F. hepatica* a *F. gigantica* s experimentálním organismem této práce *F. magna*, mohou být některé z dříve zaznamenaných poznatků využity při našem výzkumu a současně naše výsledky extrapolovány na zmíněné druhy motolic.

1.1.1 *Fascioloides magna*

Fascioloides magna (Bassi, 1875) je jaterní motolice čeledi Fasciolidae s dvouhostitelským životním cyklem, který zahrnuje jako mezihostitele plže z čeledi Lymnaidae. V našich podmínkách slouží jako mezihostitel vodní plicnatý plž *Galba truncatula*, nicméně byla zaznamenána také přirozená nákaza plžů rodu *Radix* (Erhardová-Kotrlá 1971, Faltýnková et al. 2006, Leontovyč et al. 2014). Primárními definitivními hostiteli *F. magna* jsou zástupci čeledi jelenovitých (Cervidae), u kterých prevalence této nákazy dosahuje v ČR místy až 95% (Erhardová-Kotrlá 1971, Novobilský et al. 2007).

Tento parazit je v České republice nepůvodním druhem, přičemž se jedná o druh do Evropy zavlečený v průběhu 19. století ze Severní Ameriky spolu s jelenci běloocasými (*Odocoileus virginianus*) a jeleny wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) (Swales 1935, Erhardová-Kotrlá 1971). V rámci Evropy se *F. magna* vyskytuje v Chorvatsku, Německu, Polsku, Maďarsku, Rakousku, České Republice a na Slovensku (Majoros G 1994, Majoros et al. 2000, Marinculic et al. 2002, Rajský et al. 2002, Novobilský et al. 2007, Kašný et al. 2012, Sattmann et al. 2014, Demiaszkiewicz et al. 2015, Malcicka 2015). V České Republice byly nákazy *F. magna* zaznamenány především v oblasti Jižních a Středních Čech a Šumavy (Novobilský et al. 2007, Kašný et al. 2012)

Při nákaze definitivního hostitele čeledi Cervidae, jsou dospělí červi *F. magna* o velikosti 2,5 – 10 cm lokalizováni v jaterním parenchymu v pouzdře z pojivové tkáně, které vytváří tělo hostitele reagující na infekční agens. Dosud není prokázáno, zda parazit k tvorbě pseudocysty nějakým způsobem přispívá. Motolice v této jaterní pseudocystě, propojené žlučovody, dospívají a produkují vajíčka, která odcházejí do vnějšího prostředí se stolicí (Swales 1935, Erhardová-Kotrlá 1971). Takoví hostitelé se nazývají specifictí definitivní hostitelé. Tato motolice se ale může vyskytovat i u dalších kopytníků, kteří v životním cyklu parazita hrají roli tzv. nespecifických či netypických hostitelů (Pybus 2001).

V případě nespecifických hostitelů jsou dospělé motolice produkující vajíčka obklopeny v jaterní tkáni pseudocystou, jejíž morfolgie neumožňuje průchod vajíček trávicím traktem do vnějšího prostředí. Životní cyklus parazita je tak přerušen. Nespecifickým hostitelem je např. tur domácí (*Bos primigenius f. taurus*) (Swales 1935, 1936, Pybus 2001).

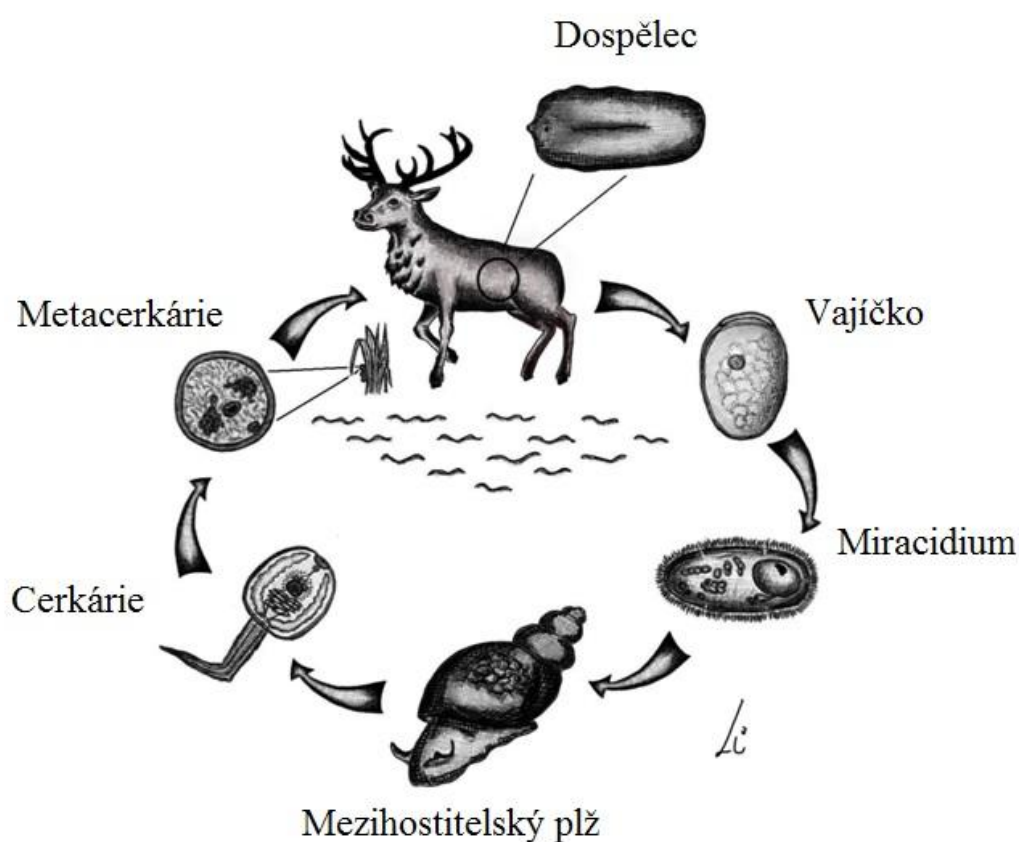
Při nákaze netypických hostitelů nedochází v jaterní tkáni k tvorbě pseudocysty. Motolice tak neustále migrují (nejen) jaterním parenchymem bez dosažení pohlavní dospělosti. Během této migrace často dochází také k proniknutí do plic. Kontinuální migrace nedospělých červů pak může způsobit značné poškození vnitřních orgánů, které může být v pozdní fázi často letální. Netypickým hostitelem *F. magna* je např. koza domácí (*Capra hircus*) nebo ovce domácí (*Ovis aries*) (Erhardová-Kotrlá & Blažek 1970, Foreyt & Todd 1976, Pybus 2001).

1.1.1.1 Životní cyklus *F. magna*

Vzhledem k tomu, že mezihostitelem *F. magna* je vodní plž, je životní cyklus této motolice vázán na vodu. Silnostěnná vajíčka s operkulem se uvolňují z trusu definitivních hostitelů do vodního prostředí a při teplotě 15-30°C po dobu 4-7 týdnů se vyvíjí obrvená larva miracidium, která opouští vajíčko operkulárním otvorem (Swales 1935, Campbell 1961). Miracidium aktivně vyhledává mezihostitele a s využitím obsahu penetračních žláz (pravděpodobně proteolytických enzymů) je schopné penetrovat do těla plže. Se změnou prostředí se miracidium při průchodu do těla plže mění na stádium zvané sporocysta a dochází k započatí asexuálního množení parazita. Postupně vznikají mateřské redie, které následně opouští tělo sporocysty protržením tělní stěny, jehož následkem sporocysta hyne a zbylé zárodky redií dokončují svůj vývoj ve tkáních plže (Swales 1935, Erhardová-Kotrlá 1971). Uvnitř těla mateřských redií dochází obdobným způsobem jako u sporocysty k asexuálnímu množení a vzniku další generace redií – dceřiných redií (Laursen & Yoshino 1999). Jaký je finální počet generací těchto larválních stádií není dosud zcela jasné. Swales (1935) a Erhardová-Kotrlá (1971) se shodují na počtu 2 generací, zatímco Vignoles et al. (2006) zmiňují u velkých plžů *Galba truncatula* přítomnost i třetí generace mírně degenerovaných redií. Kompletní vývoj uvnitř plže trvá 40-58dní (Swales 1935) a doba tohoto vývoje je primárně závislá na teplotě vnějšího prostředí a druhu plže. Je zdokumentováno, že parazit je dokonce schopen v mezihostitelském plži v podobě různých vývojových stádií i přezimovat (Erhardová-Kotrlá 1971). Uvnitř redie vzniká stádium cercárie, která opouští tělo plže, volně

plave a zachytává se na vegetaci. Za pomoci cystogenních žláz se cercárie encystuje, mění se tak na odolné dormantní stádium zvané metacerkárie, které je infekční pro definitivního hostitele. Po pozření metacerkárie spolu s vegetací se metacerkárie ve střevě definitivního hostitele excystuje, juvenilní motolice penetruje střevní stěnu a migruje jaterním parenchymem, kde následně, opouzdřena pojivovou tkání hostitele, dospívá (Erhardová-Kotrlá 1971, Foreyt & Todd 1976). V tzv. pseudocystě dochází k produkci vajíček, která odchází z těla hostitele trávicím traktem a spolu s trusem se dostávají do vnějšího prostředí (Swales 1935, Erhardová-Kotrlá 1971, Malcicka 2015). Podle Erhardová-Kotrlá (1971) mohou dospělé motolice přežívat v hostiteli až 5 let.

Obr. 1. Schéma životního cyklu motolice *Fascioloides magna* (kresba L. Jedličková).



Je zřejmé, že v průběhu životního cyklu se jednotlivá stádia neobejdou bez účinků širokého spektra molekul, které produkují. Předpokládá se také, že konkrétní jednotlivá molekula může být zapojena u různých životních stádií v několika odlišných procesech. Některými z takových molekul mohou být také proteolytické enzymy (peptidázy), které jsou esenciální např. pro úspěšné proniknutí do hostitele, trávení či vyhýbání se imunitnímu systému (Chapman & Mitchell 1982, Carmona et al. 1993, Yoshino et al. 1993, Berasaín et al. 1997, Tort et al. 1999, Caffrey et al. 2004, Delcroix et al. 2007, Dvořák et al. 2008). V případě motolic bylo prokázáno, že některé z těchto enzymů jsou striktně syntetizovány pouze jedním stádiem např. cercáriová elastáza - cercárie *Schistosoma mansoni* (McKerrow 1989, Salter et al. 2002), a jiné mohou mít zastoupení v rámci celého životního cyklu určitých druhů motolic, např. cathepsin L u *F.gigantica* (Ghoneim et al. 2008), cathepsin B u *Trichobilharzia regenti* (Dolečková et al. 2010). Předložená diplomová práce se zabývá problematikou rozdílné exprese cysteinové peptidázy *F. magna*, právě cathepsinu L, v různých stádiích životního cyklu.

1.2 Peptidázy

Jak už bylo zmíněno, peptidázy jsou enzymy, které hrají zásadní roli v životních procesech všech organismů včetně motolic. U dobře prozkoumaných čeledí motolic, jako Fasciolidae a Schistosomatidae bylo prokázáno, že jak u larválních stádií, tak i u dospělých motolic jsou peptidázy důležitou součástí procesů interakce mezi parazitem a hostitelem (Tort et al. 1999, Prowse et al. 2002, Caffrey et al. 2004, Collins et al. 2004, Delcroix et al. 2007, Dvořák et al. 2008). Peptidázy motolic se dostaly do popředí světového výzkumu přibližně ve druhé polovině 20. století (v 1. polovině 20. století, ještě nebyla žádná z peptidáz podrobně zkoumána), což má souvislost také s odhalením detailů životních cyklů jednotlivých druhů motolic. V padesátých letech 20. století byla prokázána proteolytická aktivita sekretů penetračních žláz larválních stádií (cercárií) u jednoho z nejvíce studovaných modelových organismů - *Schistosoma mansoni* (Lee & Lewert 1956, Timms & Bueding 1959, Stirewalt & Kruidenier 1961), později také u dospělců *Fasciola hepatica* (Howell 1966, Rupova & Keilova 1979). S rapidním pokrokem vědy v oblasti molekulární biologie, biochemie a imunologie bylo do dnešní doby charakterizováno velké množství těchto enzymů (**Tab. 1.**),

zejména z důvodu jejich využití jako cílů chemoterapeutik např. inhibitor SmCB (McKerrow et al. 2006, Abdulla et al. 2007) či jako součást vakcín (např. cathepsiny L1 a L2 nebo leucin aminopeptidáza u *F. hepatica*) (Dalton et al. 2003a, McManus & Dalton 2006, Acosta et al. 2008).

Tab. 1. Počet peptidáz u nejvýznamnějších čeledí motolic podle databáze MEROPS (verze 9.13) (<http://merops.sanger.ac.uk>) (Rawlings et al. 2014).

Fascioliae	Schistosomatidae	Paragonimidae	Opisthorchidae	Heterophyidae
13	20	13	123	4

1.2.1 Rozdělení peptidáz

Peptidázy se rozdělují do několika skupin na základě třech hlavních parametrů:

- pozice na aminokyselinovém řetězci, kde enzym katalyzuje hydrolyzu peptidické vazby
- mechanismus katalýzy
- molekulární struktura

Podle **pozice štěpení** peptidické vazby se peptidázy dělí na exopeptidázy, endopeptidázy a omega-peptidázy. Exopeptidázy štěpí tuto vazbu na jednom z konců polypeptidového řetězce (N-konec, C-konec) a dále se člení na aminopeptidázy (odštěpují aminokyselinu z N-konce), di- a tripeptidyl-peptidázy (odštěpují dipeptid nebo tripeptid z N-konce), karboxypeptidázy (odštěpují aminokyselinu z C-konce), peptidyl-dipeptidázy (odštěpují dipeptid z C-konce) a dipeptidázy (štěpí dipeptidy). Endopeptidázy na rozdíl od exopeptidáz štěpí peptidické vazby uvnitř polypeptidového řetězce a omega-peptidázy (schopné štěpit i isopeptidickou vazbu) štěpí peptidickou vazbu bez preference N- nebo C-konce (Barrett et al. 2004).

Mechanismus katalýzy závisí na povaze skupin postranních řetězců, nacházejících se na aminokyselinách aktivního místa enzymu, a jejich vlastnostech (např. u cysteinových peptidáz

SH⁻, u serinových OH⁻) (Barrett et al. 2004). V současnosti jsou peptidázy na základě mechanismu katalýzy rozděleny na tyto skupiny: serinové, cysteinové, threoninové, aspartátové, glutaminové, asparaginové, metalopeptidázy a peptidázy s neznámým mechanismem katalýzy, u kterých je známa pouze nukleotidová sekvence (Rawlings et al. 2014)

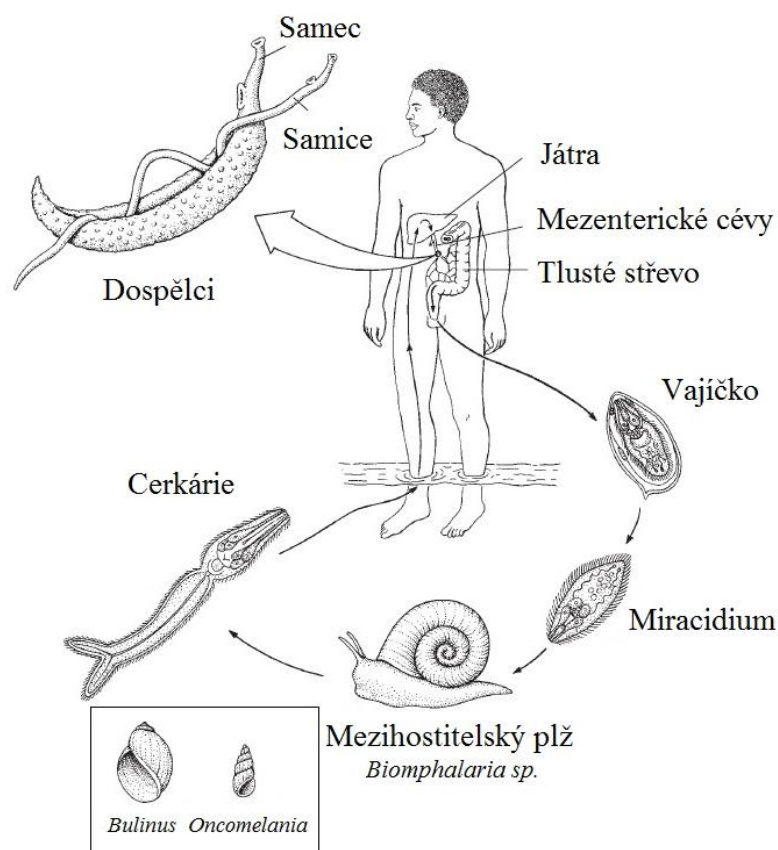
Jako rozšíření současné klasifikace podle katalytického typu bylo zavedeno třídění do rodin a klanů na základě **molekulární struktury**, homologie a také funkce do rodin a klanů (Rawlings & Barrett 1993). Rodina sdružuje skupiny enzymů, ve kterých se každý enzym evolučně vztahuje alespoň k jednomu z dalších enzymů spadajících do téže rodiny, a to na základě celé sekvence, nebo alespoň její konzervované části, která je zodpovědná za katalytickou aktivitu. Skupina rodin, vykazujících vzájemnou evoluční spojitost bez ohledu na statistickou významnost podobnosti sekvencí, je označována jako klan.

1.2.2 Přehled nejvýznamnějších peptidáz vybraných skupin motolic

Vzhledem k námi zvolenému experimentálnímu organismu – *Fascioloides magna* je tato kapitola zaměřena především na peptidázy zástupců čeledi Fasciolidae. U této čeledi bylo dosud identifikováno a prozkoumáno nejvíce proteolytických enzymů ze skupiny cysteinových peptidáz. Bylo prokázáno, že tyto molekuly hrají ve vývoji motolic zásadní roli a jejich funkce i míra exprese se může v průběhu životního cyklu měnit v závislosti na životní strategii jednotlivých stádií viz **Obr. 1**. Například miracidium vyhledává hostitelského plže a využívá peptidázy k penetraci do jeho těla, během svého pohybu ve vodě nepřijímá živiny (Boyunaga et al. 2001). Pokud srovnáme toto larvální stádium například s plně vyvinutým dospělcem, peptidázy jsou využívány hlavně k trávení přijímané krve, nikoliv k penetraci (např. CL1 *F.gigantica*) (Ghoneim et al. 2008). Dále mohou vykonávat rozdílnou funkci v parazitově životním cyklu např. jednotlivé isoformy cysteinových peptidáz. Jejich exprese je tedy v rámci životního cyklu velmi řízena životní strategií daného stádia. U fasciolidních motolic patří mezi nejprozkoumanější enzymy cysteinové peptidázy, např. cathepsin B a L, přičemž u některých z nich byla v souvislosti s jejich funkcí lokalizována i jejich exprese (Dalton et al. 2003b, Meemon et al. 2004, 2010, Beckham et al. 2009)

Jelikož nejvíce prozkoumanými jsou v souvislosti s peptidázami motolice čeledi Schistosomatidae, která zahrnuje dobře prozkoumané organismy *Schistosoma mansoni* a *S. japonicum*, tak jsou některé z poznatků získaných u těchto motolic využity v této práci k doplnění a srovnání podobných informací týkajících se motolic fasciolidních. Vývojový cyklus a životní strategie schistosom se od fasciolidních motolic liší, nicméně obě tyto čeledi vykazují určité společné znaky týkající se např. spektra nejdůležitějších identifikovaných peptidáz a některých jejich funkcí, kterými jsou u čeledi Schistosomatidae podobně jako u čeledi Fasciolidae - cysteinové peptidázy.

Obr. 2. Životní cyklus *S. mansoni* (upraveno podle Roberts & Janovy, 2009).



V rámci ostatních skupin motolic je současný výzkum proteolytických enzymů zaměřen především na několik dalších druhů zejména z čeledi Opisthorchidae (např. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*), Paragonimidae (např. *Paragonimus westermani*) **Tab. 2**. Proto je rešerše informací souvisejících s peptidázami těchto motolic také předmětem této práce a dále budou označovány jako „peptidázy dalších motolic“.

1.2.3 Peptidázy a jejich funkce v kontextu s životním cyklem

Na základě dostupných informací je evidentní, že se funkce většiny uvedených peptidáz mohou překrývat. Je známo, že podobnou funkci mohou zastávat také různé isoformy téhož enzymu, které jsou specificky exprimované v určitém životním stádiu motolice např. FhCL1 - 5 u *F. hepatica* – juvenilní motolice a dospělci (Dalton et al. 2003b, Cancela et al. 2008, Corvo et al. 2009, Robinson et al. 2009, McVeigh et al. 2012). Jsou známy také případy, kdy podobnou funkci může u různých druhů motolic vykonávat zcela jiný enzym jako je tomu například u schistosom, kde je hlavní histolytickou peptidázou CB (Sajid 2003, Dvořák et al. 2005), zatímco u *F. hepatica* plní tuto funkci CL (Dalton et al. 2003b).

Ještě nedávno se trematodologové domnívali, že, z hlediska nezbytnosti pro přežití parazita jsou důležité peptidázy především invazivních stádií a dospělých jedinců např. cathepsiny L a B u *F. hepatica* (Dalton et al. 2003b, Cancela et al. 2008, Robinson et al. 2011). V dnešní době existuje však řada studií prokazujících expresi a značnou esencialitu cysteinových peptidáz také u larválních stádií příp. i vajíček motolic. Například CB ve vajíčkách *F. gigantica* se nejspíše účastní utváření vaječné skořápky. Navíc je možné, že je tento enzym zapojen i do procesu degradace vitelogeninu (prekurzor žloutkového proteinu) v průběhu embryogeneze (Meemon et al. 2004). Dalším známým enzymem produkovaným vajíčkami, ale i miracidii vykazující odlišnou funkci je leucin aminopeptidáza schistosom, jejíž předpokládanou funkcí je naopak degradace vaječné skořápky při líhnutí miracidii z vajíček (Xu & Dresden 1986, McCarthy et al. 2004). Jakmile se miracidium změní ve sporocystu v těle hostitelského plže, předpokládá se, že cysteinové peptidázy exprimované miracidiiem a určené k penetraci do plže, se ve stadiu sporocysty pravděpodobně účastní procesů nutných k započatí či udržování infekce v hostitelském plži (Yoshino et al. 1993).

V následující tabulce (**Tab. 2.**) je uveden přehled peptidáz, jejich funkcí a životní stádium motolice, u které je daný enzym exprimován. Vzhledem k tématu diplomové práce (Expresní profil katepsinu L u jednotlivých vývojových stádií *Fascioloides magna*) a smysluplnosti rozsahu práce, tabulka nezahrnuje všechny dosud identifikované peptidázy, ale pouze ty, u kterých se v literatuře uvádí data alespoň pro dvě vývojová stadia motolic. Peptidázy, které jsou z hlediska výzkumu sice významné, ale dostupná literatura zahrnuje data z výzkumu pouze na dospělých či jiném jednom životním stádiu motolic, nejsou v této práci podrobněji diskutovány.

Tab. 2. Přehled peptidáz identifikovaných u více než jednoho vývojového stádia motolic a jejich předpokládaná funkce.

ENZYM	MOTOLICE	STÁDIUM	PŘEDPOKLÁDANÁ FUNKCE	
cathepsin L	<i>F. hepatica</i>	NEJ, D	možný podíl na formování vajíček, excystace MC, penetrace tkání, trávení, únik před imunitou hostitele	(Carmona et al. 1993, Day et al. 1995, Brindley et al. 1997, Dalton et al. 2003b, Cancela et al. 2008, Ghoneim et al. 2008, Corvo et al. 2009, Dvořák et al. 2009, Young et al. 2011, 2010, Li et al. 2012)
	<i>F. gigantica</i>	V, Mr, Sp, R, C, D		
	<i>S. mansoni</i>	V, Sp, C, Sch, D		
	<i>S. japonicum</i>	V, D		
	<i>C. sinensis</i>	V, C, Me, D		
cathepsin B	<i>F. gigantica</i>	V, Me, NEJ	trávení, migrace, penetrace střevní stěny obměna glykokalyxu	(Caffrey et al. 2002, Sajid 2003, Meemon et al. 2004, Dvořák et al. 2005, McGonigle et al. 2008, Beckham et al. 2009, Dolečková et al. 2010, Chen et al. 2011)
	<i>S. mansoni</i>	C, D		
	<i>S. japonicum</i>	V, C, D		
	<i>T. regenti</i>	V, Mr, Sp, C, Sch, D		
	<i>C. sinensis</i>	Me, D		
cathepsin F	<i>O. viverrini</i>	V, Me, JUV, D	degradace krve a hostitelské tkáně, přežívání uvnitř hostitele	(Kang et al. 2004, 2010, Pinlaor et al. 2009)
	<i>C. sinensis</i>	Me, JUV, D		
cathepsin D	<i>S. japonicum</i>	V, Mr, C, D	migrace, penetrace, trávení hemoglobinu	(Verity et al. 1999)
leucin aminopeptidáza	<i>S. mansoni</i>	V, Mr, C, D	trávení, líhnutí larev z vajíček, penetrace tkáně, únik před imunitou hostitele, remodelace povrchové membrány tegumentu	(Xu & Dresden 1986, Acosta et al. 1998, 2008, McCarthy et al. 2004, van Balkom et al. 2005, Song et al. 2008, Changklungmoa et al. 2012, Kang et al. 2012)
	<i>F. hepatica</i>	V, Mr, Me, NEJ, D		
	<i>F. gigantica</i>	Mr, Me, JUV, D		
	<i>P. westermani</i>	Me, D		
	<i>C. sinensis</i>	Me, JUV, D		

ENZYM	MOTOLICE	STÁDIUM	PŘEDPOKLÁDANÁ FUNKCE	
legumain	<i>S. mansoni</i>	C, D	aktivace jiných peptidáz jako je CL, CB, trávení hemoglobinu a albuminu	(Dalton & Brindley 1996, Caffrey et al. 2000, Chacón et al. 2003, Delcroix et al. 2006, Adisakwattana et al. 2007, Laha et al. 2008, Cancela et al. 2010, Kang et al. 2015)
	<i>F. hepatica</i>	NEJ, D		
	<i>F. gigantica</i>	Me, NEJ, D		
	<i>O. viverini</i>	V, Me, JUV, D		
	<i>C. sinensis</i>	Mc, JUV, D		

V - vajíčko; **Mr** - miracidium; **Sp** - sporocysta; **R** - redie; **C** - cercárie; **Me** - metacercárie; **Sch** - schistosomulum; **NEJ** - z angl. „newly excysted juvenile“, nedospělé motolice, které penetrují střevní stěnu a migrují tělní dutinou až do jater; **JUV** - juvenil, nedospělá motolice, která migruje a žije se jaterní tkání; **D** - dospělec

Tato diplomová práce je primárně zaměřena na analýzu a lokalizaci exprese významné cysteinové peptidázy cathepsin L u jednotlivých vývojových stádií *Fascioloides magna*. Studie dotýkající se tohoto tématu byly již rozpracovány u nejvíce příbuzných motolic *F. hepatica* a *F. gigantica*. Jedním z našich cílů je zjistit, zda se exprese a lokalizace cathepsinu L u vývojových stádií *F. magna* shoduje s poznatky u dalších zástupců motolic čeledi Fasciolidae, jako *F. hepatica* a *F. gigantica*. Následující kapitoly proto budou zaměřeny zejména na dostupné informace o cysteinových peptidázách především fasciolidních motolic.

1.2.4 Cysteinové peptidázy

Obečně je známo, že se cysteinové peptidázy u motolic účastní procesů spojených s únikem před imunitní odpovědí hostitele, s aktivací enzymů (např. aktivace CB, CL, CD legumainem) (Dalton et al. 1996, Sajid 2003, Adisakwattana et al. 2007) s trávením (např. CL, CB – hlavní trávicí peptidázy Fasciolidae a Schistosomatidae) (Brindley et al. 1997, Delcroix et al. 2006, Dvořák et al. 2009), s virulencí (např. CL1 u *F. hepatica*) (Collins et al. 2004, McVeigh et al. 2012), s penetrací, migrací tkání, excystací encystovaných stádií (např. CL, CB, CE) (Salter et al. 2002, Cancela et al. 2008, Dolečková et al. 2009, Chantree et al. 2012), a líhnutím larev (Sajid & McKerrow 2002). Již dlouho známým faktem je, že cysteinové peptidázy jsou velice imunogenní látky, a proto slouží i jako diagnostické markery při nálezích např. *F. hepatica*, *F. gigantica*, *O. viverrini* a *S. mansoni* (např. cathepsin L a B, legumain) (Grogan et al. 1997, Sajid & McKerrow 2002, Laha et al. 2008).

1.2.4.1 Cathepsin L

Cathepsin L byl identifikován v sekretu různých druhů motolic včetně fasciolidních, kde patří mezi nejabundantnější složky (Robinson et al. 2009, Cantacessi et al. 2012). U *F. hepatica* bylo dodnes popsáno přes 20 dalších enzymů z rodiny cathepsinů L, které jsou řazeny do pěti klanů (CL1-CL5) (Robinson et al. 2008b, 2009, Rawlings & Salvesen 2013). Jejich exprese je regulována s ohledem na stádium životního cyklu a koresponduje s migrací parazita tkáněmi hostitele. Např. u fasciolidních motolic je CB exprimován u NEJ, dokud jedinec migruje tkání. Jakmile se vyvine v dospělce, začne se živit krví a produkovat vajíčka, je exprese CB utlumena a hlavní roli trávicí peptidázy přebírá CL (Grams et al. 2001, Robinson et al. 2008b, 2009). U *F. gigantica* bylo zatím identifikováno kolem 10 enzymů z rodiny cathepsinů L (Grams et al. 2001, Irving et al. 2003, Rawlings & Salvesen 2013). Podobně byly u *S. mansoni* identifikovány 3 isoformy cathepsinu L (SmCL1, SmCL2, SmCL3) (Smith et al. 1994, Michel et al. 1995, Dvořák et al. 2009) homologní s geny cathepsinů SjCL1, SjCL2, SjCL3 u *S. japonicum* (Day et al. 1995, Dvořák et al. 2009). Později se však ukázalo, že enzymy SmCL1 i SjCL1 jsou více homologní spíše s cathepsinem F identifikovaným u *P. westermani* než s SmCL2, proto byly tyto dva enzymy nakonec přejmenovány na SmCF1 a SjCF1 a následně přerazeny ke cathepsinům F (Tort et al. 1999, Caffrey et al. 2004).

a) Cathepsin L - Fasciolidní motolice

Tab. 3. Cathepsin L a jeho přítomnost u jednotlivých stádií čeledi Fasciolidae.

ENZYM	STÁDIUM <i>F. hepatica</i>	STÁDIUM <i>F. gigantica</i>
cathepsin L1	D	V, Mr, Sp, R, C, D
cathepsin L2	D	-----
cathepsin L3	NEJ	-----
cathepsin L4	NEJ, D	-----
cathepsin L5	D	-----

Cathepsin L byl identifikován jak u NEJ [„newly excysted juveniles“] (nedospělých motolic, které penetrují střevní stěnu a migrují jaterním parenchymem) i dospělců *F. hepatica* (Carmona et al. 1993, Smith et al. 1993, Harmsen et al. 2004, Corvo et al. 2009). Bylo zjištěno, že existuje několik isoform tohoto enzymu a že některé např. FhCL3 a FhCL4 jsou nejspíše i specificky exprimované jako jediné ze zmíněných cathepsinů L u NEJ s funkcí spojenou s excystací, penetrací střevní stěny a migrací tkáněmí hostitele (Dalton et al. 2003b, Cancela et al. 2008, Robinson et al. 2008b, Norbury et al. 2011, Corvo et al. 2013). CL1 a CL2 byly detekovány v exkrečně sekrečních produktech (ESP) dospělců *F. hepatica* a lokalizovány v buňkách epitelu lemujícího střeva (Jefferies et al. 2001, Dalton et al. 2003b), kde zastávají funkci trávení krve a jaterní tkáň (Tort et al. 1999, Dalton et al. 2003b, Lowther et al. 2009). Bylo zjištěno, že ne všechny CL jsou sekretovány do lumen střeva. Některé isoformy se tak nepochybně uplatňují i při štěpení proteinů na povrchu červa či při normálních buněčných procesech (Chapman & Mitchell 1982, Roche et al. 1997).

Další možnou funkcí je ochrana parazita před napadením imunitním systémem hostitele především u invadujícího NEJ a migrujícího juvenila (Carmona et al. 1993, Smith et al. 1993). Byla zaznamenána imunomodulační/imunosupresivní funkce, kdy sekretované cathepsiny L byly v hostiteli schopné blokovat tvorbu protektivní Th1 odpovědi a pomáhaly tak rozvoji neprotektivní Th2 odpovědi (O'Neill et al. 2001, Dalton et al. 2003b).

Naproti tomu studie věnované konkrétním isoformám cathepsinu L u různých vývojových stádií příbuzné motolice *F. gigantica* se týkají zatím pouze isoformy CL1. Přítomnost tohoto enzymu byla detekována u všech vývojových stádií, nejvyšší zastoupení tohoto enzymu bylo detekováno v exkrementně-sekrecčních produktech (ESP) dospělců. Funkce i lokalizace u dospělých červů se shoduje s výše zmíněnými poznatky o CL1 a CL2 *F. hepatica* (Ghoneim et al. 2008, Meemon et al. 2010).

b) Cathepsin L – Schistosomní motolice

Tab. 4. Cathepsin L a jeho přítomnost u jednotlivých stádií čeledi Schistosomatidae.

ENZYM	STÁDIUM <i>S. mansoni</i>	STÁDIUM <i>S. japonicum</i>
cathepsin L2	V, C, D	V, D
cathepsin L3	V, Sp, C, Sch, D	D

Cathepsiny L2 a L3 jsou enzymy, které se účastní především trávení hemoglobinu, ale také se účastní interakce mezi parazitem a hostitelem (Sajid & McKerrow 2002). U *S. mansoni* byl SmCL2 byl identifikován u dospělců *S. mansoni* a lokalizován v reprodukční soustavě samic a také v canalis gynaecophorus u samce (Michel et al. 1995, Brady et al. 2000), později se však autorům Bogitsh et al. (2001) nepodařilo tento fakt potvrdit. Nicméně SmCL2 byl těmito autory nově lokalizován ve střevě dospělého červa. SmCL2 byl identifikován také v acetabulárních žlázách cercarie *S. mansoni*, takže jeho předpokládaná funkce souvisí zřejmě i s penetrací kůže hostitele (Dalton et al. 1997). SmCL3 se podařilo lokalizovat ve střevě dospělého červa, ale jeho exprese byla potvrzena také ve vajíčkách, sporocystách, cercáriích i ve schistosomulách (Dvořák et al. 2009).

1.2.4.2 Cathepsin B

Cathepsin B je cysteinová peptidáza, u které se funkce mezi čeledí Fasciolidae a Schistosomatidae značně liší. U Fasciolidních motolic se jedná především o migrační funkci spojenou s únikem před imunitním systémem hostitele, zatímco Schistosomy tyto enzymy využívají převážně k trávení hemoglobinu (výjimku tvoří SjCB2 viz dále) (Dalton et al. 2003b, Sajid 2003, Collins et al. 2004, Delcroix et al. 2006).

a) Cathepsin B – Fasciolidní motolice

Tab. 5. Cathepsin B a jeho přítomnost u jednotlivých stádií čeledi Fasciolidae.

ENZYM	STÁDIUM <i>F. hepatica</i>	STÁDIUM <i>F. gigantica</i>
cathepsin B1	NEJ	Me, NEJ, D
cathepsin B2	NEJ	Me, NEJ, JUV
cathepsin B3	NEJ	Me, NEJ

Cancela et al. (2008) poukazují na fakt, že žádný z těchto 3 CB nebyl detekován u dospělce *F. hepatica*. Naproti tomu, bylo ale zaznamenáno několik CB u invazního stádia NEJ (Wilson et al. 1998, Cancela et al. 2008, Beckham et al. 2009). U tohoto stádia byl cathepsin B lokalizován v epitelových buňkách a lumen střeva (Creaney et al. 1996, Wilson et al. 1998, Beckham et al. 2009), kde nejspíše plní obdobnou funkci jako CL (penetrace střevní stěny a migrace tkání, obrana před imunitní odpovědí) (Cancela et al. 2008, McGonigle et al. 2008).

Meemon et al. (2004) detekovali expresi CB1 u invazních stádií i dospělce *F. gigantica*, zatímco CB2 a CB3 byly exprimovány výhradně invazivními stádií. Transkripty CB1 byly u NEJ i dospělce *F. gigantica* lokalizovány v epitelu střeva, ale v případě dospělce také v reprodukční soustavě. Podle Chantree et al. (2012) je FgCB2 u metacerkárie exprimován ve formě inaktivního proenzymu na základně průkazu lokalizace pouze v epitelu střeva. FgCB2 u NEJ a juvenilů byl lokalizován jak v epitelu, tak i v lumen střeva. NEJ nevyužívá CB

k trávení, protože střevo v tomto stádiu životního cyklu má (narozdíl od střeva dospělého) pouze sekreční funkci (Bennett & Threadgold 1973, Wilson et al. 1998). Jakmile NEJ vstoupí do jaterního parenchymu a začne se živit jaterní tkání (mění se na stádium juvenila – JUV), exprese CB se snižuje a zvyšuje se exprese CL (Robinson et al. 2008b).

b) Cathepsin B – Schistosomní motolice

Tab. 6. Cathepsin B a jeho přítomnost u jednotlivých stádií čeledi Schistosomatidae.

ENZYM	STÁDIUM <i>S. mansoni</i>	STÁDIUM <i>S. japonicum</i>	STÁDIUM <i>T. regenti</i>
cathepsin B1	C, D	D	V, Mr, Sp, C, Sch, D
cathepsin B2	D	C, D	V, Mr, Sp, C, Sch, D

Cathepsin B1 byl označen za nejvíce abundantní peptidázu ve střevě *S. mansoni*. Tato peptidáza byla lokalizována jak v lumen, tak i v buňkách střevního epitelu. Na rozdíl od čeledi Fasciolidae, kde je hlavním trávicím enzymem CL1/CL2, klíčovým enzymem v procesu degradace hemoglobinu u Schistosomatidae je zřejmě CB1 (Dalton et al. 2003b, Sajid 2003, Collins et al. 2004, Delcroix et al. 2006). Lokalizace SmCB2 byla potvrzena také v tegumentu a parenchymu samců *S. mansoni* ve větší míře než u samic, kde byl lokalizován pouze v parenchymu. CB2 nejspíše neplní funkci trávicího enzymu, ale spíše pomáhá parazitovi v obraně proti imunitnímu systému hostitele (proces obměny povrchových proteinů parazita) (Caffrey et al. 2002). Dvořák et al. (2008) zmiňují detekci SjCB2 také v sekretu cercárie *S. japonicum*. U cercárií *S. mansoni* je známo, že pro penetraci kůže využívají schistosomy enzym zvaný cercáriová elastáza patřící do skupiny serinových proteáz. Z dostupných poznatků vyplývá, že cercárie velmi příbuzné motolice *S. japonicum* nejspíše využívají SjCB2 místo cercáriové elastázy. Dolečková et al. (2009) zmiňují detekci TrCB2 u *T. regenti* s předpokladem stejné funkce jako SjCB2. Autoři v práci z roku (2010) poukazují na rozdíly v expresi TrCB1 a TrCB2 u jednotlivých stádií. Nejvyšší exprese těchto enzymů byla zaznamenána u schistosomul a dospělců *T. regenti*. Expresní profil se liší u larválních stádií, kdy míra exprese TrCB1 (narozdíl od TrCB2) je na nízké hladině do doby, než parazit dospěje do stádia schistosomuly.

1.2.4.3 Legumain

Asparaginylní endopeptidáza, jinak také nazývaná legumain, je enzym ze skupiny cysteinových peptidáz, který má také významné zastoupení u čeledi Fasciolidae i Schistosomatidae. Intenzivní výzkum tohoto enzymu probíhá hlavně u schistosom, u kterých je významnou součástí kaskády trávicích enzymů a významným antigenem s možným využitím v oblasti léčby schistosomiázy (Dalton & Brindley 1996, Chacón et al. 2003). Jeho předpokládaná funkce u schistosom i fasciolidů ovšem podle dostupné literatury nespočívá v přímé degradaci hostitelských proteinů jako je albumin či hemoglobin, ale ve schopnosti aktivovat jiné enzymy trávicí kaskády (CL, CB, CD, CC, CF). Lokalizace exprese legumainu schistosom i fasciolidů se shoduje s expresí zmíněných trávicích enzymů – gastrodermální buňky střeva. Nevyskytuje se však v exkrementně-sekrecčních produktech (Dalton et al. 1995, Dalton & Brindley 1996, Chacón et al. 2003, Delcroix et al. 2006, Adisakwattana et al. 2007). U *F. gigantica* byly identifikovány dva legumainy FgLGMN1 a FgLGMN2 oba u metacerkárie, juvenila a dospělého, příslušné proteiny byly lokalizovány ve střevním epitelu juvenila a dospělého (Adisakwattana et al. 2007). Legumain *F. hepatica* byl detekován u NEJ a dospělců (Cancela et al. 2010).

1.2.4.4 Cysteinové peptidázy ostatních druhů motolic

V souvislosti se životními stádii motolic čeledi Opisthorchidae bylo také zkoumáno zastoupení několika cysteinových peptidáz, které byly zkoumány hlavně u stádia metacerkárie, juvenila a dospělé. Spektrum detekovaných peptidáz u této čeledi zahrnuje stejně jako u fasciolidních i schistosomních motolic peptidázy jako je CL, CB, CF nebo legumain. Dostupná literatura uvádí značnou příbuznost mezi cysteinovými peptidázami všech tří uvedených čeledí. Není však jasné, do jaké míry se shoduje i jejich funkce (Kang et al. 2004, 2010, 2015, Laha et al. 2008, Pinlaor et al. 2009, Chen et al. 2011, Li et al. 2012). Motolice z čeledi Opisthorchidae představují významné lidské patogeny, způsobující vážné onemocnění, často spojené s rakovinovým bujením. (Lun et al. 2005, Shin et al. 2010) Legumain může do budoucna představovat významný cíl chemoterapeutik při léčbě klonorchíazy (Ju et al. 2009). Mezi zástupce této čeledi patří např. *Clonorchis sinensis* a *Opisthorchis viverrini*.

Cathepsin L – tato peptidáza byla detekována u vajíček, cercárií, metacerkárií a dospělé *C. sinensis*, jeho lokalizace byla vizualizována v epitelu střeva a ve vajíčkách uvnitř uteru dospělého červa, v tegumentu metacerkárie a ústní přísavce a ocásku cercárie (Li et al. 2012).

Cathepsin B – Cathepsin B *C. sinensis* byl detekován u metacerkárie a dospělé, v jehož střevě a exkrečně sekrečních produktech byl i lokalizován (Chen et al. 2011)

Cathepsin F – byl detekován ve vajíčkách, metacerkáriích, juvenilech i dospělých červech *Opisthorchis viverrini*, lokalizován v dospělci ve střevě a reprodukčních orgánech včetně vajíček (Pinlaor et al. 2009). U *C. sinensis* bylo identifikováno 12 cathepsinů F. U metacerkárie, juvenila a dospělé byl vypracován i expresní profil, který naznačuje zvyšující se expresi při dospívání parazita (Kang et al. 2004, 2010).

1.3 Metody využívané pro analýzu genové exprese

K detekci, zda organizmus exprimuje/neexprimuje určité geny lze využít v podstatě jen základní nastavení PCR a cDNA jako templát. Pokud však chceme znát míru exprese určitého genu, porovnávat hladiny exprese mezi různými vzorky nebo dokonce expresi genu lokalizovat, je zapotřebí již speciálních metod. Nejpoužívanější metody k měření genové exprese jsou shrnuty v tabulce **Tab.7.**

V této diplomové práci byla sledována míra exprese cathepsinu L s využitím kvantitativní PCR (qPCR) metody, která umožňuje na základě sledování amplifikace v reálném čase kvantifikovat množství mRNA transkriptů jednotlivých genů. K následné vizualizaci této exprese v tkáních experimentálního organismu jsme zvolili RNA *in situ* hybridizaci, která obecně umožňuje lokalizovat transkripci konkrétního genu (*F. magna* cathepsinu L) a tím i lépe odhadnout jeho funkci. Z výše uvedených důvodů jsou následující kapitoly věnovány právě těmto metodám.

Tab. 7. Nejpoužívanější metody analýzy genové exprese (podle Fryer et al. 2002)

METODA	VYSVĚTLENÍ ZKRATKY
Comparative EST analysis	Comparative Expressed-Sequence-Tag analysis
MPSS	Massively Parallel Signature Sequencing
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
qPCR	Quantitative PCR
Differential - display RT- PCR	Differential – display Reverse Transcription - PCR
Microarray	DNA-čip technologie
Macroarray	Technologie reverzní dot-blot hybridizace
Northern Blot	Memránová hybridizace RNA

1.3.1 qPCR

qPCR je metoda nejčastěji využívaná k detekci různých patogenů, analýzu genové exprese, SNP (single nucleotide polymorphysm) analýzy, analýzy chromosomálních aberací a nově také detekci proteinů pomocí real-time imuno PCR (Kubista et al. 2006, Bustin et al. 2009).

Pomocí qPCR lze na základě sledování přítomnosti a množství cDNA kvalitativně i kvantitativně hodnotit genovou expresi. Při qPCR dochází k PCR amplifikaci cDNA templátu, vzniklého reverzní transkripcí z RNA. Princip metody spočívá v monitoringu nárůstu počtu kopií amplifikovaného úseku v reálném čase, kdy je v časových intervalech automaticky odečítán fluorescenční signál barviva či sondy. Výsledná data (křivky) jsou analyzována pomocí softwaru, nikoliv pomocí gelové elektroforézy.

Metody kvantifikace genové exprese lze rozdělit na dva typy:

- a) absolutní kvantifikace
- b) relativní kvantifikace

Při absolutní kvantifikaci je stanovován vstupní počet kopií sledovaného genu pomocí externího standardu a standardní křivky.

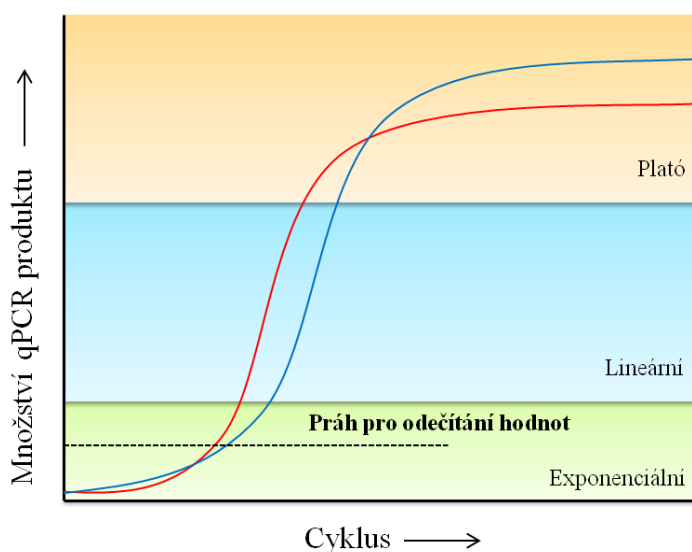
Za účelem relativní kvantifikace se používají tzv. referenční geny, u kterých se předpokládá, že jejich exprese je vysoce stabilní napříč všemi tkáněmi živého organismu. Jedny z nejpoužívanějších referenčních genů jsou např. GAPDH, 18S RNA, β -aktin, aktin (Liu et al. 2012, Kozera & Rapacz 2013). Tyto geny jsou amplifikovány ve stejném standardizovaném procesu jako geny sledované. Výsledky týkající se referenčních genů pak slouží zejména k porovnání a korekci relativních hodnot a na základě těchto výsledků je následně stanovena relativní hodnota exprese sledovaných genů. (Bustin 2000, Livak & Schmittgen 2001, Bustin & Mueller 2005)

Hodnoty odečtu fluorescenčního signálu v průběhu qPCR tvoří esovitě zahnutou amplifikační křivku. Na této křivce rozlišujeme 3 fáze: exponenciální, lineární a plató (**Obr. 3.**).

Při měření míry exprese je nejdůležitější exponenciální fáze křivky, kdy dochází k největšímu nárůstu množství amplifikovaného produktu. V této části křivky je pak také definován tzv. práh, na jehož úrovni má míra signálu vypovídající hodnotu. Místo, kde tato přímka protíná amplifikační křivku, označuje cyklus, ve kterém obsahují všechny amplifikované vzorky stejný počet vzniklých kopií. Z počátku, kdy je množství

amplifikovaného produktu malé nelze fluorescenční signál zachytit, později je ale nárůst produktu exponenciální a účinnost reakce se blíží 100%. V lineární fázi reakce se produkt kumuluje, ale účinnost reakce klesá a reagentie již omezují amplifikaci. Nakonec ve fázi plató ustává akumulace produktu a jeho množství se již nemění z důvodu vyčerpání reakce.

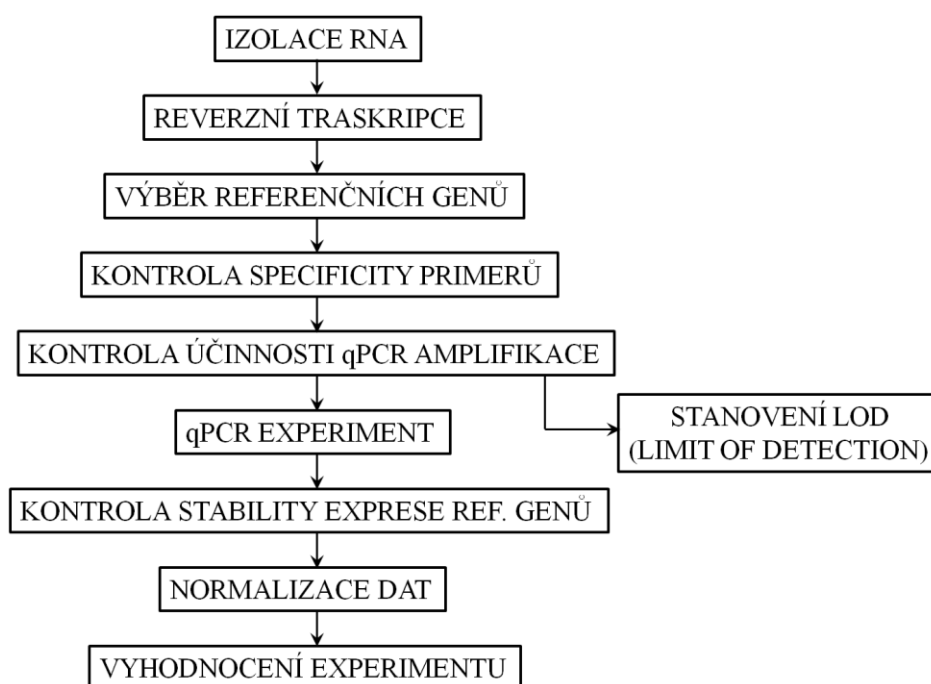
Obr. 3. Fáze qPCR amplifikace (upraveno podle VanGuilder et al. 2008).



1.3.1.1 MIQE guidelines

qPCR je velmi citlivá metoda zahrnující mnoho kroků (viz **Obr. 4.**) a vyžadující vysokou pracovní obezřetnost a preciznost. Mnohé publikované studie s touto tématikou často postrádají dostatek experimentálních dat a brání tak čtenáři nejen kriticky zhodnotit kvalitu prezentovaných výsledků, ale i v čase opakovat uvedené experimenty (Bustin et al. 2009). V souvislosti s touto skutečností vznikla v roce 2009 publikace s názvem „The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ (Bustin et al. 2009). Která shrnuje dosavadní nedostatky v terminologii, postupech i nejčastější konflikty publikovaných dat. Tento návod zahrnuje mimo jiné seznam veškerých informací, které je nutné při správném provedení qPCR a následném publikování výsledků zohlednit.

Obr. 4. Schéma postupu qPCR analýzy podle MIQE (dle Bustin et al. 2009).



1.3.1.2 Využití qPCR

V dnešní době je tato metoda hojně využívána vědci v oblasti výzkumu nádorových onemocnění a vzhledem k její vysoké citlivosti také často k diagnostice různých patogenů např. různé virů a bakterií, Leishmanií (Bernard & Wittwer 2002, Mackay et al. 2002, Beillard et al. 2003, Niesters 2004, De Long et al. 2010). V případě motolic je qPCR využívána k molekulární diagnostice (ten Hove et al. 2008, Kim et al. 2009, Alasaad et al. 2011, Rahman et al. 2011, Cnops et al. 2013, Gordon et al. 2015) a detekci a měření hladin exprese nejrůznějších genů (Smith et al. 2008, Pereira et al. 2011, Cabán-Hernández et al. 2012, Pereira-Júnior et al. 2013, Zeraik et al. 2013), mezi nimiž se poměrně málo objevují peptidázy. Tato metoda byla využita např. u schistosomních motolic k měření hladiny exprese CL a CB (Moertel et al. 2008, Dvořák et al. 2009, Dolečková et al. 2010).

Většina dostupných studií exprese motolic prezentuje měření exprese pouze za použití reverzní transkripce se specifickými primery pro sledovaný gen, případně doplněnou množstvím proteinu získaného z jednotlivých měřených vzorků jako např. SmCL2, FgCL1

(Brady et al. 2000, Ghoneim et al. 2008). Nebo je genová exprese hodnocena pomocí transkriptomových studií (Farias et al. 2011, Young et al. 2011, Cantacessi et al. 2012).

1.3.2 RNA *In situ* hybridizace (ISH)

Analýzu úrovně genové exprese bývá často vhodné doplnit o její lokalizaci, čili vizualizaci mRNA transkriptů ve studované tkáni. *In situ* hybridizace je metoda, která slouží k detekci nukleotidových sekvencí na úrovni buněk, tkáňových řezů až celých organismů (tzv. Wholemount ISH). Tato metoda je založena na komplementárním navázání nukleotidové próby na specifickou cílovou sekvenci RNA. Hybridizací pak v případě sledování exprese genu vzniká RNA-RNA kombinace. Poté co značená próba nasedne na odpovídající sekvenci ve fixované buňce, či tkáni je možné tuto interakci vizualizovat. Tyto próby mohou být značeny radioaktivními, fluorescenčními nebo antigenními bázemi (radioizotopy ³H, ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P; biotin, fluorescein, digoxigenin, alkalická fosfatáza, bromdeoxyuridin). Podle typu použitého značení se pak tato metoda vyhodnocuje pomocí autoradiografie, fluorescenční mikroskopie nebo imunohistochemie. Veškeré tkáňové či buněčné vzorky musí být pro účely *in situ* hybridizace vždy odpovídajícím způsobem fixovány, z důvodu stabilizace nukleových kyselin. (Jin & Lloyd 1997, Jensen 2014).

In situ hybridizace obecně je metoda v dnešní době široce využívána ve výzkumu nádorových onemocnění, diagnostice virových patogenů a genetických chorob (Lebo et al. 1993, Nagarajan & Saikumar 2012, Raquin et al. 2012, Haugg et al. 2014).

V rámci motolic se ISH využívá k lokalizaci různých genů (nejen mRNA i DNA), mezi nimiž jsou také geny peptidáz např. FhCL, FhLAP, FgCB, FgCL, SmCL (Grams et al. 2001, Dalton et al. 2003b, Meemon et al. 2004, 2010, Dillon et al. 2007, Changklungmoa et al. 2012).

1.3.2.1 FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

Tato velice citlivá metoda byla původně používána pro klasifikaci chromozomů. Od té doby se ale její použití v medicíně i biologii značně rozšířilo. FISH se v dnešní době hojně využívá v cytogenetických analýzách jako je mapování chromozomálních genů, charakterizování genetických abnormalit, identifikace genetických abnormalit spojených s genetickými chorobami nebo poruchami souvisejícími s abnormálním růstem tkáně, detekce virových genomů. FISH próby jsou nejčastěji značené biotinem, digoxigeninem nebo fluoresceinem (Jin & Lloyd 1997). Signál vzniklý hybridizací je vizualizován fluorescenční mikroskopií. U této metody lze kombinovat několik specificky značených prób najednou, kdy je každá pak vizualizována jinou barvou. Tento typ FISH se nazývá „Multicolor FISH“. Multicolor FISH umožňuje detekovat mnoho chromozomálních změn v genomu v jediné reakci a spolehlivě se tak uplatňuje při diagnostice (Lee et al. 2001, Jensen 2014).

1.3.2.2 CISH (Chromogenic *in situ* hybridization)

Jedná se o metodu *in situ* hybridizace, která kombinuje FISH a histochemické metody. Často používaná je metoda založená na peroxidázové reakci, kde je hybridizovaná próba značena např. digoxigeninem (DIG). Výslednou barevnou reakci je možné rozeznat v klasickém světelném mikroskopu. Narozdíl od FISH je tato metoda levnější a nevyžaduje vybavení pro fluorescenční mikroskopii. Výhodou také je, že barevná reakce vyvolaná na zkoumaných preparátech je oproti fluorescenci trvalá (Tanner et al. 2000, Hanna & Kwok 2006). Ve všech výše zmíněných studiích týkající se *in situ* hybridizace a peptidáz motolic byla použita chromogenní *in situ* hybridizace.

MATERIÁL A METODIKA

2.1 Sběr materiálu

2.1.1 Dospělci a vajíčka

Vzhledem ke skutečnosti, že definitivními hostiteli *F. magna* jsou zástupci jelenovité zvěře, není možné zavést kompletní cyklus *F. magna* v prostorách PřF UK. Dospělci *F. magna* byli tak sezónně získáváni pitvou odlovené vysoké zvěře v rámci podzimních mysliveckých nahánek (Bušohrad, Gabčíkovo) . Červi byli následně přeneseni do Petriho misky s fyziologickým roztokem (10mM PBS, 150mM NaCl; pH 7,4), kde byli tříděni a vybíráni pouze živí, nepoškození jedinci. Ti byli následně umístěni do čistých Petriho misek s fyziologickým roztokem, kde došlo k odstranění posledních zbytků tkáně a obsahu pseudocysty. Po očištění bylo přistoupeno k okamžité fixaci červů dle potřeb pro jednotlivé protokoly (uvedeny níže). Sběr vajíček probíhal po dokončení pitvy výplachem všech částí jaterní tkáně a veškerého použitého náčiní kohoutkovou vodou. Vajíčka byla následně koncentrována a přečišťována dekantací suspenze, následně byla uchovávána v odstáté kohoutkové vodě ve tmě při 4°C až do použití.

2.1.2 Sběr miracidíí

V laboratorních podmínkách byla miracidia získána inkubací vajíček ve tmě při cca 26°C v Petriho misce s odstátou kohoutkovou vodou po dobu 21-35 dnů. Po uplynutí této doby byly Petriho misky umístěny pod zdroj umělého světla, které indukovalo líhnutí miracidíí. Při samotném sběru bylo využito silné pozitivní fototaxe miracidíí, atrahovaných kuželem světla k okraji Petriho misky, odkud byla odebírána pipetou do centrifugačních zkumavek umístěných na ledu. Chlad výrazně snižuje aktivitu miracidíí, což mělo za následek jejich klesnutí ke dnu zkumavky. Takto vychlazené zkumavky byly posléze centrifugovány tak, aby miracidia přežila (3-5x 15min, 4000 x g, 4°C). Vitalita miracidíí byla po centrifugaci ověřena pozorováním pod světelným mikroskopem. Výsledkem byla koncentrovaná suspenze miracidíí s minimálním obsahem vody, která byla následně nahrazena fixáží (kap. 2.2.1).

2.2 Příprava materiálu pro molekulární analýzy

V přípravě materiálu pro plánovanou analýzu genové exprese byl kladen důraz na shodné zpracování vzorků. K izolaci celkové RNA byl po mnohonásobném testování dalších možností použit kit High Pure tissue isolation kit (Roche) a k přípravě cDNA kit First Strand cDNA synthesis kit (Roche).

2.2.1 Izolace celkové RNA

- Dospělec

Živí dospělci byli po promytí ve fyziologickém roztoku uloženi po jednom do prázdné mikrocentrifugační zkumavky (5 ml) a okamžitě zmrazeni v tekutém dusíku. Takto zamražený materiál byl skladován v -80°C do dalšího zpracování. Pro účely izolace RNA byl zmražený červ při pokojové teplotě sterilní žiletkou urychleně podélně rozdělen na poloviny (bilaterální souměrnost těla dospělého *F. magna* umožňuje plnohodnotnou izolaci RNA i z poloviny těla, protože obsahuje polovinu veškerých orgánů). Pro izolaci celkové RNA byla polovina těla vložena do sterilního skleněného pístového homogenizátoru umístěného na ledu. Dále byly přidány 3 ml lyzačního pufru High pure RNA tissue isolation kit (Roche) a tkáň byla zhomogenizována. Pro účely jednotlivých izolací bylo odebráno vždy 800 μl tohoto homogenátu a dále zpracováno podle protokolu uváděného výrobcem. Zbytek homogenátu byl uchováván v -80°C pro další izolace RNA. Celková RNA byla vyizolována do 60 μl elučního pufru, který je součástí izolačního kitu.

- Miracidia

K vodné suspenzi miracidí (kap. 2.1.2) (cca 100 μl) bylo poté přidáno 800 μl lyzačního pufru z již zmiňovaného kitu pro izolaci celkové RNA. Takto připravený materiál byl uchováván v -80°C do zpracování. K izolaci jednoho vzorku celkové RNA byl použit veškerý objem materiálu (100 μl), který byl rozmrazen a homogenizován elektrickým homogenizátorem. Další zpracování proběhlo podle protokolu výrobce. Výsledná celková RNA byla vyizolována do 20 μl elučního pufru, který je součástí izolačního kitu.

Koncentrace RNA byla měřena na spektrometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) a integrity byla ověřena pomocí gelové elektroforézy.

2.2.2 Reverzní transkripce

Vzhledem ke stůtečnosti, že RNA je molekula velmi nestabilní a náchylná k degradaci, byla celková RNA ihned přepsána do cDNA pomocí kitu First strand cDNA synthesis kit (Roche) podle manuálu výrobce za použití přiložených Oligo(dT) primerů. Již v této fázi jsme k přípravě vzorků přistupovali podle MIQE guidelines zmíněných v kapitolách 1.3.1.1. K účelům analýzy a následného porovnání genové exprese mezi jednotlivými vzorky pomocí qPCR je zapotřebí, aby vstupní množství celkové RNA bylo u všech přepisovaných vzorků stejné. V případě RNA vzorků z dospělců a miracidíí bylo pro přepis do cDNA použito vždy 600 ng celkové RNA. cDNA obou stádií (DcDNA, MRcDNA) byla následně skladována při -20°C.

2.3 Příprava materiálu pro histochemické analýzy

Materiál pro histochemické analýzy, v našem případě pro RNA *in situ* hybridizaci, vyžaduje okamžitou fixaci nukleových kyselin. Pro tyto účely byl na fixaci celých dospělých červů *F. magna* použit Bouinův roztok (Sigma). Živí červi byli vloženi do centrifugační zkumavky (50ml) s Bouinovým roztokem o objemu minimálně 10x větším než byl objem vložené tkáně. Po několika hodinách fixování, kdy došlo ke ztuhnutí tkáně, byl červ sterilní žiletkou rozdělen na čtvrtiny pro zajištění lepší prostupnosti fixáže tkání. Vzorky byly fixovány po dobu 3-4dní. Následně byly zhotoveny parafinové bločky pro přípravu tkáňových řezů.

2.3.1 Zalévání do parafínu

Aby mohly být vzorky zality do parafínu, musela být 75% etanolem vymyta kyselina pikrová (součást Bouinova roztoku), tento proces se opakoval tak dlouho, dokud se kyselina pikrová nepřestala z tkáně uvolňovat. Následovalo odvodnění tkáně etanolovou řadou o zvyšující se koncentraci (75%, 96%, 100%). Takto odvodněná tkáň byla inkubována 2x 15 min v xylenu, který tkáň projasňuje. Poté byly vzorky inkubovány při 56°C v termostatu v nasyceném roztoku xylen/parafin. Prosycení čistým parafínem probíhalo v termostatu 14 hodin při 56°C. Parafínová lázeň byla vyměněna po 1 hodině, poté po 12 hodinách a po finální hodinové lázni byly vzorky zality parafínem do silikonové formy.

Celý proces, včetně časových údajů je uveden v **Tab. 8**. Takto zalité vzorky byly skladovány při pokojové teplotě do dalšího zpracování.

Tab. 8. Shrnutí protokolu zalévání tkáně do parafínu.

Bouinova fixáž	3-4 dny
75% EtOH (vymývání kys. pikrové)	dle potřeby
75% EtOH	3x 30 min
96% EtOH	3x 30 min
100% EtOH	3x 30 min
xylén	2x 15 min
xylen/parafin (56°C)	15 min
parafin I	1 h
parafin II	12 h
parafin III	1 h

2.3.2 Příprava řezů

Na mikrotomu Shandon Finesse ME byly zhotoveny řezy z parafinových bločků (kap. 2.3.1) (5 μ m, 6 μ m, 10 μ m) s použitím kovových čepelek (Thermo Scientific). Jednotlivé řezy byly pokládány na vodní hladinu, aby došlo k jejich napnutí. Poté byly z vodní hladiny pomocí štětce přemístěny na podložní sklíčko SuperFrost® Plus (Thermo Scientific). Jednotlivá sklíčka byla položena na předehřátou plotnu (55°C), aby řezy přilnuly k povrchu a zaschly. Po zaschnutí byly takto připravené vzorky co nejrychleji zpracovány. Maximální doba skladování takto připravených vzorků ve 4°C nepřesáhla 7 dní. Déle skladované vzorky již nebyly v pokusech použity.

2.4 MOLEKULÁRNÍ METODY

2.4.1 Detekce exprese cathepsinu L1 u dospělců a miracidíí

2.4.1.1 PCR

DcDNA i MRcDNA byly naředěny na koncentraci 100 ng/ μ l a použity jako templát v PCR s navrženými specifickými primery pro cathepsin L1 (FmtotalCL1F, FmtotalCL1R), podle sekvence pro FmCL1 *F. magna* (GenBank EU877764.1). Sekvence primerů i parametry reakce, která proběhla na přístroji C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) jsou zaneseny v tabulce **Tab. 9**. K vyhodnocení experimentu byla použita gelová elektroforéza s 1,5% agarózovým gelem obsahujícím Sybr green v 1x TAE pufru (Life Technologies). Jako standard byl použit HyperLadder II (Bioline). Elektroforéza probíhala 30 min při 100V.

Tab. 9. Amplifikace cDNA FmCL1 kódující sekvence.

Složení reakční směsi		Amplifikační cyklus	
12,5 µl	EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Clontech)	94°C	300 s
0,5 µl	FmCL1F (10uM)	94°C	60 s
0,5 µl	FmCL1R (10uM)	58°C	60 s
1 µl	cDNA (100ng/ul)	72°C	60 s
10,5 µl	dH ₂ O	72°C	10 min

↕ 35x

FmtotalCL1F: 5'- ATGCGATTGTTTCATACTCGCTGTCCTC - 3'

FmtotalCL1R: 5'- ATCACGGAAAACGTTTCGACCATCG - 3'

2.4.1.2 Extrakce amplikonů z agarózového gelu

Amplikony FmCL1 byly z gelu vyříznuty za pomoci sterilního skalpelu a DNA byla vyizolována pomocí kitu QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) podle pokynů výrobce. Z vyizolované DNA byly připraveny vzorky pro sekvenační analýzu a zaslány na sekvenaci do sekvenační laboratoře (Seqlab) PřF UK (vzorky byly připraveny podle pokynů této laboratoře <https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna/znaceni-vzorku-a-prijem-materialu>).

2.4.1.3 Klonování do plazmidu pGEM®-T Easy

Produkty extrahované z gelu byly zaligovány do pGEM®-T Easy vektoru za pomoci kitu pGEM®-T Easy vector system I (Promega) podle protokolu výrobce, byly použity 3µl vyizolované DNA z amplikonů. Reakce byla inkubována přes noc ve 4°C v PCR mikrozkušavkách.

2.4.1.4 Transformace buněk XL1-Blue (E.coli)

Kompetentní buňky XL1-Blue (Life Technologies) (50ul) byly šetrně (pomalu) rozmrazeny. Bylo k nim přidáno 5 µl produktu ligační reakce a směs byla inkubována 30 minut na ledu. Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (45 s, 42°C) a umístěny zpátky na led. Poté bylo přidáno 200 ul SOC media (Life Technologies) zahřátého na 37°C a reakční směs byla 2,5 h třepána (37°C, 225 ot./min). Kultivační misky s LB médiem a agarem byly v mezičase potřeny 50 µl Ampicilinu (100nM, Sigma), 30 µl IPTG (100mM Sigma) a 40 µl X-Gal (Life Technologies). Poté bylo aplikováno 50 µl transformovaných buněk a takto připravené kultivační misky byly přes noc inkubovány v termostatu ve 37°C.

2.4.1.5 Kontrolní PCR bakteriálních kolonií a sekvenace

Pro kontrolu, zda proběhla transformace správně, tak aby bylo možno přistoupit k sekvenaci, byly z bakteriálních kolonií pipetou odebrány jednotlivé vzorky a přeneseny do PCR mikrokumavky s 11,5 µl vody. Takto připravená suspenze byla použita jako DNA templát pro PCR (**Tab. 10.**) s použitím primerů M13F/M13R specifických pro použitý vektor. Výsledky byly po gelové elektroforéze vizualizovány v UV světle na 1,5% agarózovém gelu obsahujícím v 1x TAE pufru (Life Technologies) Sybr Green- fluorofor specificky se vážající na DNA a jednotlivých amplikonů. Amplikony, u kterých byl potvrzen inzert, byly vyřiznuty a zpracovány stejným způsobem jako v kapitole 2.4.1.2. a sekvenovány.

Tab. 10. PCR s primery M13F, M13R komplementárních k sekvenci klonovacího vektoru.

Složení reakční směsi		Amplifikační cyklus	
12,5 µl	EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Clontech)	94°C	300s
0,5 µl	M13F (10uM)	94°C	60 s
0,5 µl	M13R (10uM)	55°C	60 s
11,5 µl	DNA	72°C	60 s
		72°C	10 min
M13F: 5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3' M13R: 5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3'			

↑
30x
↓

2.4.2 Výběr referenčních genů a testování specifity primerů

Referenční geny slouží k normalizaci qPCR dat. Jedná se o geny, u kterých se předpokládá stálá úroveň exprese ve všech studovaných vzorcích. Slouží jako vnitřní kontrola k expresním datům a kompenzují rozdíly mezi jednotlivými vzorky (kvalita RNA, množství použitého templátu). Jako referenční geny byly v tomto experimentu zvoleny po důkladném prohledání literárních zdrojů - glycerinaldehyd trifosfát dehydrogenáza (GAPDH), ATP syntáza podjednotka B (ATP5B), cytochrom c oxidáza podjednotka I (COXI) a beta aktin (ACTB). Podle cDNA sekvencí těchto genů byly navrženy specifické primery určené k amplifikaci jejich fragmentů (50-150 bp). Taktéž byly navrženy primery se stejnými parametry pro FmCL1frag podle sekvence zmíněné v kapitole 2.4.1.1. Sekvence navržených primerů a velikosti fragmentů jsou zaneseny v tabulce **Tab. 11**. Navrhování primerů probíhalo s ohledem na jejich pozdější využití v qPCR experimentech, proto byly zvoleny ty krátké fragmenty a všechny primery byly navrženy s co nejpodobnějšími parametry (podíl GC, teplota tání).

Tab. 11. Primery pro amplifikaci referenčních genů a FmCL1.

Primery	Velikost ampliconu
FmCL1fragF 5' - ACCGGAGAGTATAGACTGGCGTGATT – 3' FmCL1fragR 5' - TGCTCAGAAAATGACACCGTGGTTC – 3'	149 bp
FmGAPDHF 5' - TCAGAAGGTCGTTGATGGTCCCT – 3' FmGAPDHR 5' - TCGGGAATGACT TTGCCACAG - 3'	123 bp
FmCOXIF 5' - TTACCTCGTCGGGTGTGTGTGTATG – 3' FmCOXIR 5' - ACTCCCTGCAGAAATAACAGCACCT – 3'	87 bp
FmACTBF 5' - TGCGACGTCGATATTCGAAAGGATCTG – 3' FmACTBR 5' - GCAGTAATTCCTTCTGCATGCGGTC – 3'	103 bp
FmATP5BF 5' - CTTTCCAAGTCGCCGAAGTGTTCA - 3' FmATP5BR 5' - CCAACCATGAAAAAGGCAGCCTCT – 3'	132 bp

2.4.2.1 PCR

Specifická primery z **Tab. 11** byla otestována pomocí PCR, parametry i složení reakce bylo stejné jako v **Tab. 9**. K vyhodnocení výsledků byla provedena gelová elektroforéza jako v předchozích kapitolách (1,5% agarózový gel) a amplicony byly vizualizovány UV světlem a vyříznuty. Následné zpracování proběhlo podle kap. 2.4.1.2 ; 2.4.1.3 ; 2.4.1.4 . Dále byla provedena kontrolní PCR jako v kapitole 2.4.1.5 a vzorky byly zaslány na sekvenaci do sekvenační laboratoře PřF UK jako v kap. 2.4.1.2.

2.4.3 Příprava plazmidového templátu pro testování účinnosti primerů

Optimalizace qPCR metody zahrnuje několik kroků a vyžaduje vysokou spotřebu cDNA materiálu. Z důvodu nedostatku cDNA materiálu bylo v případě testování účinnosti primerů přikročeno k přípravě plazmidového templátu. Jedná se o linearizované plazmidy

kompetentních buněk XL1-Blue (Life Technologie) s inzertem odpovídajícím fragmentům amplifikovaným primery z tabulky **Tab.11**. K přípravě těchto plazmidů byly využity vzorky bakteriálních kolonií z kapitoly 2.4.2.1, u kterých byl sekvenací potvrzen odpovídající inzert.

2.4.3.1 Množení plazmidů

Pipetou odebraný vzorek bakteriální kolonie byl přenesen do 20 ml tekutého LB média s 20 µl ampicilinu (50mg/ml Sigma Aldrich). Vzorek byl následně inkubován v třepačce přes noc (37°C, 225ot./min).

2.4.3.2 Izolace plazmidů

Namnožené plazmidy byly izolovány kitem High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) dle návodu. Plazmidová DNA byla eluována do 100 µl sterilní dH₂O.

2.4.3.3 Linearizace plazmidů

Plazmidy byly linearizovány štěpením pomocí restriktivního enzymu *Sall*. Do štěpící reakce bylo použito celé množství plazmidové DNA (100ul). Byl přidán 11ul Buffer O a 2 µl *Sall*. Reakce probíhala v cycleru C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) 12 hodin ve 37°C, poté následovala inaktivace enzymu při 65°C 20 minut.

2.4.3.4 Přečištění linearizovaných plazmidů

Po dokončení linearizace plazmidů následovalo přečištění reakční směsi pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce. Takto synteticky připravený templát byl naředěn 1:100 a následně uchováván v -20°C.

2.4.4 Testování účinnosti primerů

Aby bylo dosaženo v qPCR experimentu optimální amplifikace a měření exprese bylo co nejpřesnější, je nutné ověřit účinnost qPCR amplifikace u jednotlivých sad primerů z Tab. 11. Při nízké amplifikační účinnosti dochází s každým amplifikačním cyklem k velkým ztrátám v podobě neamplifikovaných kopií a následně tak zkreslení výsledných dat. Optimální účinnost amplifikace se pohybuje v rozmezí 95-105% a určuje, kolik procent přítomných kopií daného templátu je v reakci amplifikováno. Ke sledování amplifikační reakce v reálném čase bylo využito fluorescenční barvivo Sybr Green, které vždy po navázání na dvouvláknový templát vydává fluorescenční signál. Čím více se templát v průběhu amplifikace množí, tím se zvyšuje i intenzita signálu. Tento signál je snímán a reakce je následně vyhodnocena podle křivky vzniklé jeho postupným nárůstem. Hodnoty C_q („cycle of quantification“) udávají cyklus, ve kterém bylo odečítané míry fluorescence dosaženo. V qPCR experimentu byl použit Sybr Green ve formě komerčního qPCR master mixu iQTM SYBR[®] Green Supermix (BioRad).

2.4.4.1 qPCR

Pro qPCR testování účinnosti primerů byla použita jako templát linearizovaná plazmidová DNA z kroku 2.4.3.4 s inzertem odpovídajícím vždy příslušné sadě primerů z **Tab. 11**. K otestování účinnosti primerů byla z plazmidové DNA připravena desítková ředící řada od 1 do 1:10000. Parametry a složení reakce, která proběhla v přístroji BioRad - iQ5 Multicolor Rael - Time PCR Detection System je zaneseno v **Tab. 12**. Vzorky byly testovány v dubletech. Účinnost amplifikace byla po skončení reakce vyhodnocena softwarem qBase+ (Biogazelle).

Tab. 12. qPCR amplifikace / testování účinnosti primerů z Tab. 11.

Složení reakční směsi		Amplifikační cyklus	
6,25 µl	iQ™ SYBR ® Green Supermix (BioRad)	95°C	3 min
0,5 µl	„primerF“ Tab.11	95°C	15s
0,5 µl	„primerR“ Tab.11	58°C	15s
2 µl	plazmidové DNA	72°C	15s
5,25 µl	dH ₂ O	72°C	60s

50x

2.4.5 qPCR - měření exprese FmCL1

Primery z předchozí kapitoly 2.4.4.1, které vyhovovaly kritériím amplifikační účinnosti, byly použity pro výslednou qPCR analýzu. qPCR amplifikační cyklus proběhl podle stejných parametrů jako v **Tab. 12**. Složení reakční směsi se lišilo pouze v použitém templátu. Jako templát byla použita DcDNA a MRcDNA z kapitoly 2.2.2, která byla naředěna 1:100. Do každého vzorku bylo následně přidáno stejné množství cDNA (2 µl). Vzorky byly měřeny v tripletech. Výsledná data byla vyhodnocena softwarem qBase+ (Biogazelle).

2.4.6 Příprava RNA prób pro lokalizaci transkriptů FmCL1

2.4.6.1 Ověření specificity primerů

Pro přípravu RNA prób byly navrženy primery pro fragmenty o velikosti 300-500 nukleotidů podle sekvence CL1 *F. magna* z kap. 2.4.1.1. Sekvence jednotlivých primerů i velikost navržených prób jsou zaneseny v tabulce **Tab. 13**. Pomocí PCR byly tyto fragmenty amplifikovány, parametry reakce a složení reakční směsi je zaneseno v tabulce **Tab. 14**. Jako templát byla použita DcDNA. DcDNA byla naředěna na koncentraci 100 ng/μl. Výsledky PCR byly vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy a amplikony byly vizualizovány na 1,5% agarórovém gelu se Sybr Green v 1x TAE pufru (Life Technologies). Amplikony byly následně vyříznuty z gelu a vzorky byly dále zpracovány jako v kapitole 2.4.1.2 a pro účely sekvenace zaklonovány jako v kapitole 2.4.1.3 a dále zpracovány shodně jako v kapitolách 2.4.1.4 a 2.4.1.5 a zaslány na sekvenaci do sekvenační laboratoře PřF UK (seqlab).

Tab. 13. Primery a velikosti prób pro *in situ* hybridizaci (ISH)

Název primeru	Velikost navržené próby (nt – počet nukleotidů)
FmCL1ish1F: 5' - TGTAATGGTGGATGGATGGAGCGA - 3' FmCL1ish1R: 5' - TAACCTTGATCACCCACCACGAT – 3'	386 nt
FmCL1ish2F: 5' - GCATTTTCGTACCAGGCAAAGGGA – 3' FmCL1ish2R: 5' - TGCACATCCACAGCAACTGCAA – 3'	445 nt
FmCL1ish3F: 5' - AGCTGACGATGAGCACAGACGAA – 3' FmCL1ish3R: 5' - GCTGTTGCCATAGTTCCTGGTACAGT – 3'	412 nt

Tab. 14. Amplifikace navržených fragmentů FmCL1ish1, FmCL1ish2, FmCL1ish3

Složení reakční směsi		Amplifikační cyklus	
12,5 µl	EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Clontech)	94°C	300 s
0,5 µl	„PrimerF“ Tab. 13. (10µM)	94°C	60 s
0,5 µl	„primerR“ Tab. 13. (10µM)	58°C	60 s
1µl	DcDNA (100ng/µl)	72°C	60 s
10,5 µl	dH ₂ O	72°C	10 min

↑
35x
↓

2.4.6.2 Příprava RNA prób značených digoxigeninem (DIG)

Pro přípravu RNA prób značených digoxigeninem byl použit kit DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche). Jako vstupní materiál byly použity plazmidy z pozitivních bakteriálních kolonií v kapitole 2.4.6.1. V těchto koloniích byly sekvenací potvrzeny inzerty odpovídající FmCL1ish1, FmCL1ish2, FmCL1ish3. Tyto plazmidy byly proto namnoženy stejným způsobem jako v kapitole 2.4.3.1 a vyizolovány kitem High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) podle návodu. Plazmidy byly eluovány do 100 µl dH₂O. Na základě dat ze sekvenace z kap 2.4.6.1 byla pomocí softwaru Genious zjištěna orientace inzertu v plazmidu. Aby vytvořené próby byly anti-sense RNA, byly plazmidy linearizovány enzymem *NotI*, který štěpí daný plazmid v místě mezi inzertem a T7 promotorem. Složení štěpící reakce i průběh odpovídá reakci v kapitole 2.4.3.3. Reakce byla následně přečištěna kitem Qiaquick PCR Isolation kit (Qiagen), linearizované plazmidy byly eluovány do 20 µl dH₂O. Následně byly takto připravené plazmidy použity pro výrobu antis-sense RNA prób pomocí kitu DIG RNA Labeling kit SP6/T7 (Roche). Při přípravě prób byla ze zmíněného kitu použita SP6 polymeráza (místo T7). Následný postup probíhal podle protokolu výrobce. Připravené próby byly uchovávány v -80°C.

2.4.7 RNA *in situ* hybridizace

K lokalizaci mRNA transkriptů FmCL1 ve tkáních *F. magna* byly použity parafínové řezy z kapitoly 2.3.2 a RNA próby pro FmCL1 (FmCL1ish2, FmCL1ish3) značené DIG, jejichž příprava je zmíněna v kapitole 2.4.6.2. Experiment RNA *in situ* hybridizace probíhal po dobu 3 dní. Zahrhoval procesy deparafinizace parafínových řezů, přípravu tkáně pro hybridizaci prób a samotnou hybridizaci. Druhý den byly nejprve vymývány nenavázané próby a hybridizační medium. Dále byly aplikovány anti - DIG protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou. Třetí den byly nenavázané protilátky odmyty a hybridizované próby byly kolorimetricky vizualizovány pomocí FastRed TR/Naphtol AS-Mix a pozorovány mikroskopem Olympus BX53 vybaveným kamerou Olympus DP72 nejprve ve světelném poli a poté pod fluorescenčním filtrem TRITC. Podrobný postup je popsán níže. Protokol, podle kterého bylo v této diplomové práci postupováno, byl vyvinut v laboratoři Prof. Greveldinga v Německu pro účely RNA *in situ* hybridizace na lidské motolici *S.mansoni*. Tento prokol byl mírně pozměněn s ohledem na použití odlišné tkáně (*F. magna*), než pro kterou byl tento postup vyvinut. Úpravy protokolu byly diskutovány na pracovišti RNDr. M. Mareše, CSc na ÚOCHB AV ČR, kde je protokol Prof. Greveldinga aktuálně rovněž aplikován.

Přehled použitých chemikálií je shrnut v tabulce **Tab. 15**. Složení některých použitých pufrů je zaneseno v tabulce **Tab. 16**. Většina inkubačních kroků probíhala v kyvetách za dodržování přísných opatření, aby nedošlo ke kontaminaci RNázami. Veškeré laboratorní nástroje, materiál i povrch byl udržován bez přítomnosti enzymů degradujících RNA (RNáz) pomocí dekontaminačního roztoku RNaseZap® RNase Decontamination Solution (Life Technologies), který byl použit podle pokynů výrobce.

Veškeré vodné roztoky byly připraveny z MilliQ H₂O ošetřené dietylpyrokarbonátem (DEPC), dále jen DEPC-H₂O. DEPC-H₂O byla připravena dle pokynů výrobce – ve zkratce: byl přidán 1 ml DEPC do 1l dH₂O a míchána při pokojové teplotě přes noc. Voda byla následně přefiltrována přes 0.22 µm filtr a 2x 20 min klávoována při 121 °C. Tato voda byla použita k přípravě všech roztoků potřebných pro hybridizační experiment. Všechny čerstvě namíchané pufrы (kromě pre,- a hybridizačních pufrů) byly znovu autoklávoovány 1x 20 min při 121°C a použity do 24 hodin.

Tab. 15. Přehled použitých chemikálií pro RNA *in situ* hybridizaci.

Použité chemikálie	
20x SSC (Saline sodium citrate) (Promega)	Kyselina maleinová (Sigma Aldrich)
10x PBS 7.4 (Sigma Aldrich)	Kyselina octová (Penta)
Bezvodý glycerol (Penta)	Montovací medium Fluoromount (Sigma Aldrich)
Deionizovaný formamid (Sigma Aldrich)	NaCl (Sigma Aldrich)
Dextran sulfát, Mw = 500 (Sigma Aldrich)	NaOH (Sigma Aldrich)
Diethylpyrokarbonát (DEPC) (Sigma Aldrich)	Proteináza K (Sigma Aldrich)
EDTA (Sigma Aldrich)	Protilátky Anti-DIG konjugované s alkalickou fosfatázou (AP) (Roche)
Etanol (100%, 96%) (Penta)	Substrát pro AP: FastRed TR/Naphtol AS-Mix (Roche)
Glycin (Penta)	Trizma Base (Sigma Aldrich)
HCl (Penta)	Tween 20 (Sigma Aldrich)
Inaktivované koňské sérum (Life Technologies)	Xylen (Penta)
Kvasinková RNA - Ribonucleic acid from torula yeast (Sigma Aldrich)	

- Použité pufrы a jejich složení

Složení pufrů, použitých pro *in situ* hybridizaci, a konečné koncentrace jednotlivých složek v roztoku je vyjádřeno v tabulce **Tab. 16**. Uvedené pufrы byly připraveny v DEPC-H₂O a klávovány (kromě pre-hybridizačních pufrů) 20 min při 121 °C. Ostatní pufrы jako roztoky etanolové řady (70%, 50% a 30%), 1x PBS, 1x SSC, 2x SSC, 0,2% glycin, 0,2M HCl, 20% kyselina octová a 20% glycerol byly připraveny rozpuštěním příslušného množství látky v DEPC-H₂O a následně klávovány (kromě roztoků etanolu a kyselin) 20 min při 121 °C.

Tab. 16. Složení pufrů pro RNA *in situ* hybridizaci.

PK (Proteináza K) pufr	MAB (Maleic acid buffer)	Substrátový pufr
100mM Tris	0,1 M kyselina maleinová	0,1M Tris
50mM EDTA	0,15 M NaCl	0,4M NaCl
pH 8,0	pH 7,5	pH 8,2
Pre-hybridizační pufr A		Pre-hybridizační pufr B
1mg/ml kvasinkové RNA (Ribonucleic acid from torula yeast)		50% deionizovaný formamid
5x SSC		1% Tween 20
1x PBS		10% dextran sulfát
RNA próba (Tab. 13)		

2.4.7.1 Protokol RNA *in situ* hybridizace

Sklička s parafinovými řezy byla inkubována v xylenu (2x 5min), následně ve 100% etanolu (2x 5min) a poté následovala série 5minutových inkubací v etanolové řadě (96%, 70%, 50%, 30%). Pro finální zavodnění vzorků byla sklička inkubována 5 minut v DEPC-H₂O. Poté byly vzorky inkubovány 20 min v 0,2M HCl. Dále byly vzorky pre-inkubovány 5 min v PK pufru (**Tab. 16.**) předeřtém na 37°C. Následně byla přidána Proteináza K (1 ug/ml) a inkubace probíhala dalších 17 minut při 37°C. Po štěpení proteinázou K byly vzorky inkubovány 5 min v roztoku 0,2% glycinu. 20% kyselina octová byla vychlazena na 4°C a jednotlivá sklička do ní byla na 15s ponořena a přesunuta na 5 min do kyvety s 1xPBS. Poté proběhla inkubace ve 20% glycerolu po dobu 15 minut, vzorky byly poté krátce opláchnuty 2x SSC a položeny na 10-12min na předeřtý termoblok (70°C). Po uplynutí inkubační doby byla sklička krátce zchlazena na -80°C. Současně byly naředěny příslušné próby (FmCL1ish2, FmCL1ish3; 1:100) v pre-hybridizačním pufru A (**Tab. 16.**) a byly inkubovány při 70°C. Po 10-12 minutách byl tento roztok krátce zchlazen na ledu a smíchan s pre-hybridizačním pufrům B (**Tab. 16.**) za vzniku hybridizačního pufru, který byl ihned aplikován na skličko s histologickými řezy. Takto připravené vzorky překryté krycím skličkem byly ve vlhké komůrce inkubovány při 42°C přes noc (16 - 18 h).

Druhý den byly vzorky inkubovány ve 42°C v 2x SSC s 0,1% Tween 20 po dobu 15 minut. Dále následovalo 15 minut inkubace v 1x SSC při pokojové teplotě. Poté byly vzorky přemístěny do pufru MAB (angl. „maleic acid buffer“) (**Tab. 16.**) a inkubovány 5 min. Byl připraven 4% blokovací roztok přidáním koňského tepelně inaktivovaného séra do pufru MAB a vzorky v něm byly 30 minut inkubovány. Následně byly na vzorek aplikovány komerční anti-DIG protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou naředěné 1: 500 ve 2% blokovacím roztoku. Řezy byly takto inkubovány ve tmě při 4°C do následujícího dne (16 - 18 hodin).

Další den byly vzorky oplachovány 2x 20 minut v MAB pufru. Poté byla provedena pětiminutová inkubace v substrátovém pufru (**Tab. 16.**). Nakonec byl aplikován FastRed TR/Naphtol AS-Mix dle pokynu výrobce, jakožto substrát pro alkalickou fosfatázu. V časových intervalech (viz. dále) byl monitorován vznik barevného produktu, který indikoval přítomnost a lokalizaci hledané mRNA.

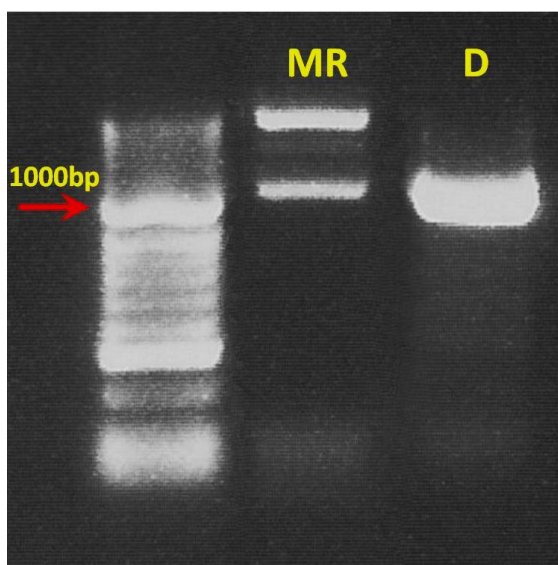
Vyvíjení reakce bylo sledováno v časovém rozmezí 5 - 28 hodin. Z počátku bylo vyvíjení sledováno v krátkých časových intervalech (5-10 min), zhruba po 1 hodině, kdy nebyla pozorována tvorba barevného precipitátu, byly intervaly prodlouženy (30 min – 1h). Pro zastavení reakce byly vzorky ponořeny do DEPC-H₂O, zamontovány do vodou ředitelného média Fluoromount a přikryty krycím sklíčkem. Po zaschnutí byly okraje krycího sklíčka zalakovány a v co nejkratší době pozorovány pod mikroskopem. Vzorky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX53 vybaveným kamerou Olympus DP72 jednak v klasickém světelném poli a následně také ve fluorescenčním spektru za použití filtru TRITC.

VÝSLEDKY

3.1 Detekce exprese cathepsinu L1 u dospělce a miracidii

Prostřednictvím PCR a s využitím specifických primerů FmtotalCL1F/FmtotalCL1R byly z cDNA dospělců (D) i miracidii (MR) *F. magna* získány amplikony o velikosti cca 1000 bp (**Obr. 9**). Tyto vzorky byly osekvenovány a získané sekvence byly podrobeny analýze v programu Genious. Pomocí online nástroje BLASTn v databázi NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) byly tyto sekvence identifikovány jako cathepsin L1 *F. magna*. (EU877764.1). U miracidii byl zaznamenán vznik dvou amplikonů o velikosti cca1000 bp a 2000 bp (**Obr. 9**). Oba byly sekvenovány a vyhodnoceny, obě sekvence odpovídají FmCL1. Sekvence většího amplikonu obsahovala několik inzercí sekvencí o délce několika desítek nukleotidů. Amplikony o velikosti 1000 bp byly klonovány, přítomnost inzertu v 10 narostlých bakteriálních koloniích MR a D byla zkontrolována prostřednictvím PCR a získaná amplifikovaná DNA byla opět sekvenována. Všechny sekvence odpovídaly FmCL1.

Obr. 9. Detekce FmCL1 v cDNA dospělce (D) a miracidii (MR) (1,5% agarózový gel se Sybr Green)



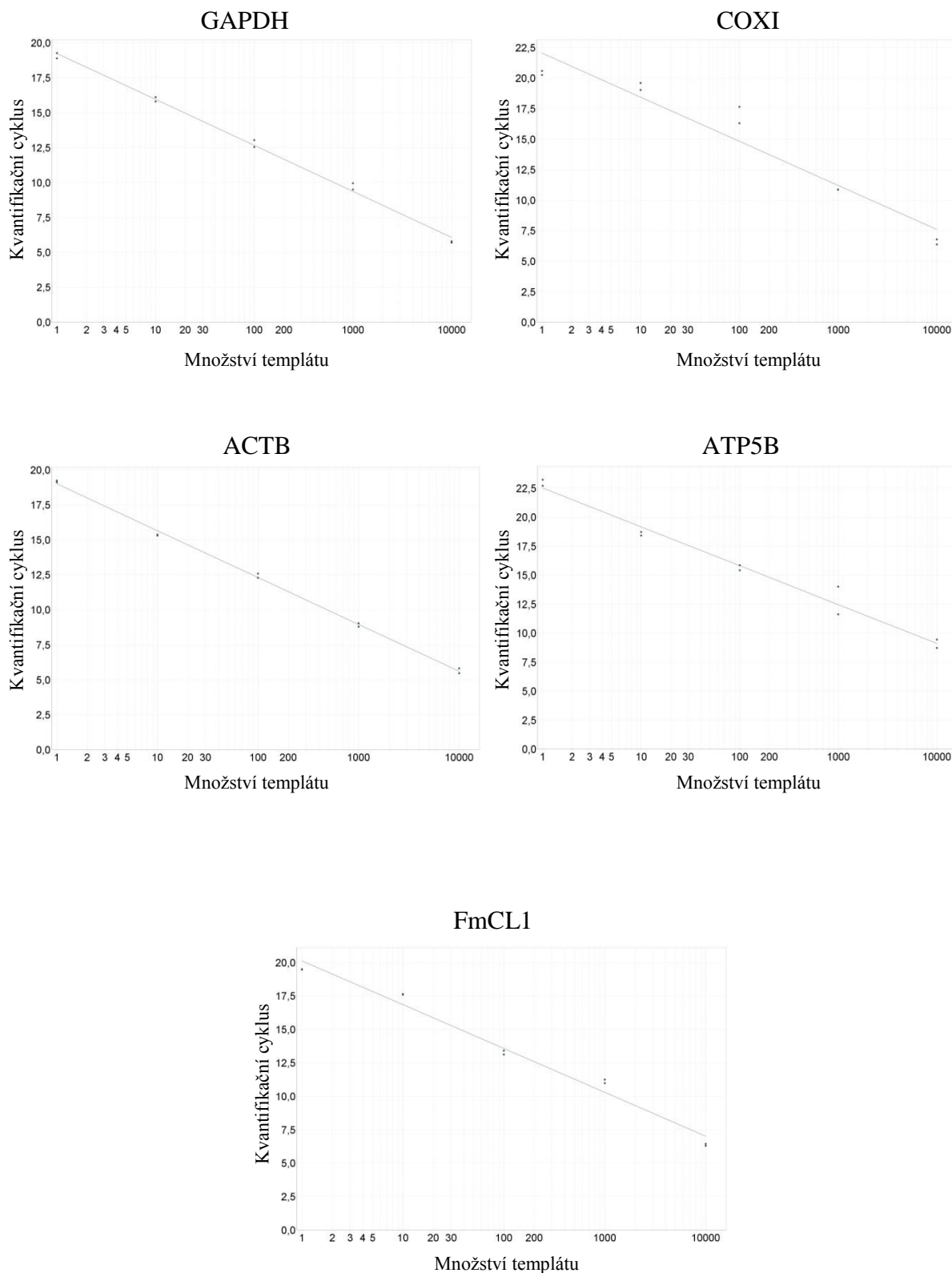
3.2 Výběr referenčních genů a testování specifity primerů

Jako referenční geny byly vybrány geny GAPDH, ACTB, ATP5B, COXI jakožto zástupci často využívaných referenčních genů. Pomocí PCR byly fragmenty referenčních genů i fragment FmCL1 úspěšně amplifikovány z MRcDNA i DcDNA. Specifita primerů byla ověřena následnou sekvenací. Analýzou v BLASTn bylo potvrzeno, že jednotlivé sekvence odpovídají fragmentům vybraných genů.

3.3 Testování účinnosti primerů - qPCR

U jednotlivých sad primerů byla testována amplifikační účinnost s využitím qPCR. Z důvodu velké spotřeby nebyla jako templát k těmto účelům použita cDNA ani jednoho ze stádií (D či MR). Jako templát pro jednotlivé reakce byla zhotovena desítková ředící řada plazmidové DNA se zaklonovaným inzertem odpovídajícím jednotlivým párům primerů z **Tab. 11**. Na základě vzniklé standardní křivky byla spočítána účinnost podle vzorce $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, kde slope vyjadřuje hodnotu sklonu této křivky. Optimální účinnost primerů by se měla pohybovat v rozmezí 95-105%. V našem případě byla amplifikační účinnost vyhodnocena pomocí softwaru qBase+ (Biogazelle) a bylo zjištěno, že kromě COXI genu bylo této účinnosti dosaženo. Z důvodu nesplnění požadovaných kritérií (účinnost 95-105%) byl gen COXI z dalších analýz vyřazen. Ostatní geny byly shledány z hlediska amplifikační účinnosti primerů jako vyhovující. Výsledky pro jednotlivé geny jsou uvedeny v tabulce **Tab. 17**. Na obrázku **Obr. 10** jsou získané standardní křivky, podle nichž byla vypočítána amplifikační účinnosti primerů u jednotlivých genů.

Obr. 10. Standardní křivky GAPDH, COXI, ACTB, ATB5B a FmCL1 (export z Qbase+). Je-li účinnost amplifikace rovna 100%, rozdíl v kvantifikačním cyklu mezi jednotlivými ředěními použitého templátu je cca 3,33 cyklu.



Tab. 17. Amplifikační účinnosti primerů jednotlivých genů (analyzováno v qBase+).

Gen	Amplifikační účinnost
FmCL1	102,1%
GAPDH	101,3%
ACTB	98,9%
ATP5B	98,8%
COXI	89,1%

3.4 Měření exprese FmCL1 u miracidíí a dospělce *F. magna*

Po dosažení nezbytné úrovně optimalizace byla k finálnímu měření exprese FmCL1u obou stádií byla použita DcDNA a MRcDNA. Pro analýzu byly použity 3 biologické replikáty (cDNA ze 3 dospělých červů a 3 sběrů miracidíí) a 3 technické replikáty (reakce probíhala v tripletech jednotlivých vzorků). Vzorky FmCL1 i referenční geny byly amplifikovány v jednom qPCR běhu. Data byla následně vyhodnocena pomocí softwaru qBase+ (Biogazelle).

Před samotným vyhodnocením pokusu, zda je/není exprese CL1 u těchto stádií rozdílná byla zhodnocena kvalita získaných dat (např. signifikantní rozdíly mezi technickými replikáty, negativní kontroly, „melting křivky“). Technické replikáty byly podrobeny kontrole a pomocí online nástroje QuickCalcs (GraphPad software) byly z analýzy vyloučeny vzorky, jejichž rozdíl hodnoty Cq („cycle of quantification“) v rámci tripletu byl signifikantní ($p < 0,5$). Dále byly analyzovány křivky pro negativní kontroly, které splnily všechna aplikovaná kritéria. Při kontrole křivek tání („melting křivky“), bylo ověřeno, že v rámci reakce došlo k amplifikaci pouze jednoho produktu v každém vzorku.

3.5 Normalizace dat

K normalizaci dat podle referenčních genů je třeba provést tzv. geNorm analýzu, jejíž výsledek nám pomůže určit, které z testovaných genů jsou nejstabilněji exprimované případně v jaké kombinaci je pro vyhodnocení experimentu použít. Pro optimální analýzu je vhodné otestovat alespoň 8 genů (čím více, tím lépe) a 10 biologických replikátů. Striktní minimum pro geNorm analýzu jsou 3 kandidáti pro referenční geny a 2 biologické replikáty. Normalizovat data pouze podle jednoho referenčního genu se nedoporučuje.

geNorm analýza byla provedena v softwaru qBase+ na vzorcích FmGAPDH, FmATP5B, FmACTB. Vypočtená hodnota M u jednotlivých genů udává, které geny jsou nejstabilněji exprimované a je zanesena v tabulce **Tab. 18**. Limitní hranice pro M byla stanovena na $M < 1$. Podle tohoto kritéria vychází jako nejstabilněji exprimovaný gen GAPDH. Ostatní geny jsou mírně nad hranicí. S ohledem na tuto skutečnost bylo nakonec přistoupeno k normalizaci dat na základě jediného genu GAPDH.

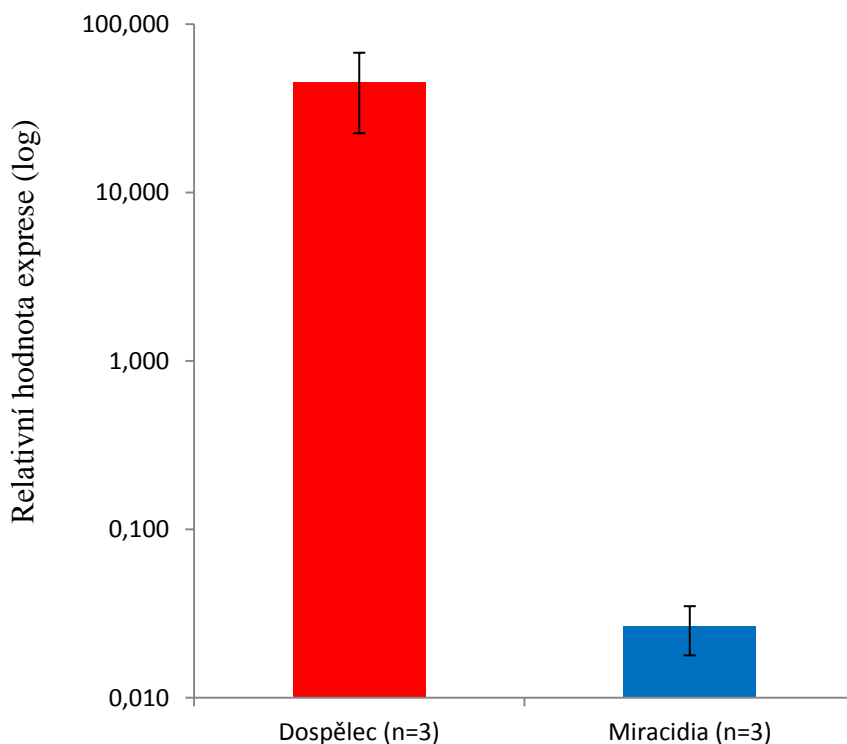
Tab. 18. Hodnoty M pro referenční geny GAPDH, ACTB, ATP5B (analýza geNorm; qBase+).

Referenční gen	Vypočtená hodnota M
GAPDH	0,766
ACTB	1,106
ATP5B	1,110

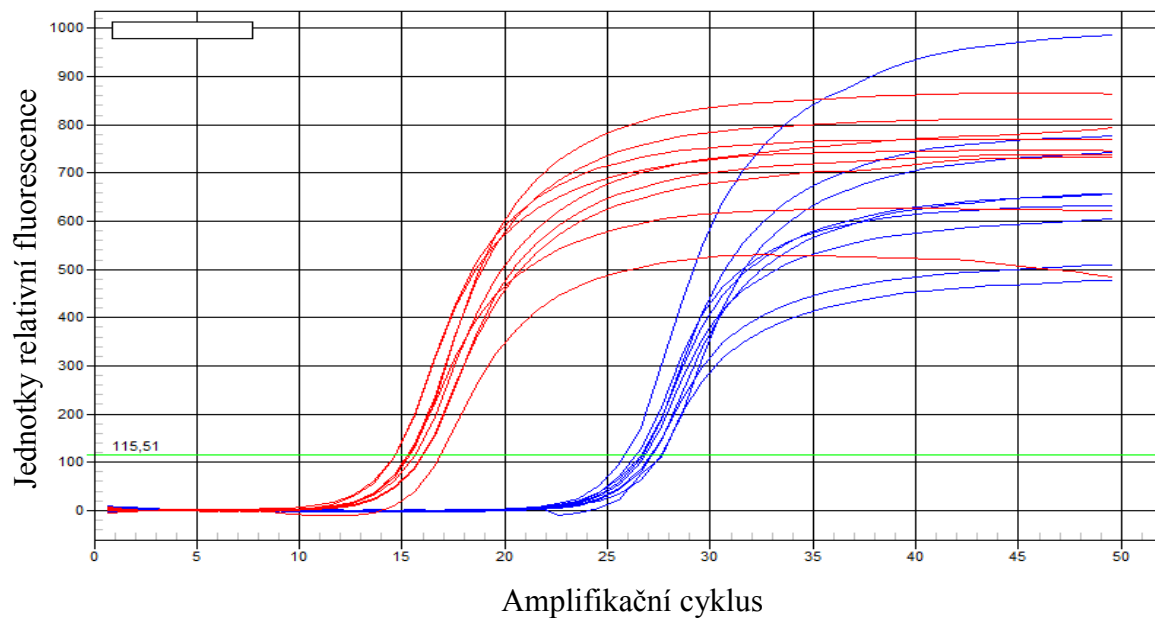
3.6 Porovnání exprese FmCL1 mezi dospělci a miracidii

Po normalizaci dat podle GAPDH byly odečteny hodnoty exprese pro jednotlivá stádia. Výsledky vyjadřují vyšší expresi FmCL1 u dospělců než u miracidii (**Obr.11.**). Tuto skutečnost již před samotnou analýzou dat předběžně naznačil charakter amplifikačních křivek, kdy u vzorků cDNA z dospělého dochází k zachycení fluorescenčního signálu při amplifikaci FmCL1 mnohem dříve než u miracidii, což naznačuje značný rozdíl v počátečním množství kopií FmCL1 (**Obr. 12.**). V analýze byly porovnány cDNA ze 3 dospělců a 3 sběrů miracidii. Podle dat vyhodnocených v qBbase+, které odpovídají grafu na **Obr. 11.**, vychází relativní hladina exprese dospělců téměř 1700x vyšší než u miracidii.

Obr. 11. Graf porovnání průměrné hodnoty exprese FmCL1 u dospělců a miracidii (normalizováno podle GAPDH).



Obr. 12. Amplifikační křivky znázorňující nárůst fluorescence. Červeně dospělec, modře miracidia.



3.7 Lokalizace transkriptů FmCL1 na řezech *F. magna*

Byly navrženy primery pro přípravu 3 hybridizačních prób pro gen FmCL1 FmCL1ish1, FmCL1ish2 a FmCL1ish3. Specificita primerů byla potvrzena sekvenací, pomocí softwaru Genious byly identifikovány příslušné sekvence odpovídající navrženým fragmentům o velikosti 386 nt, 445 nt, 412 nt.

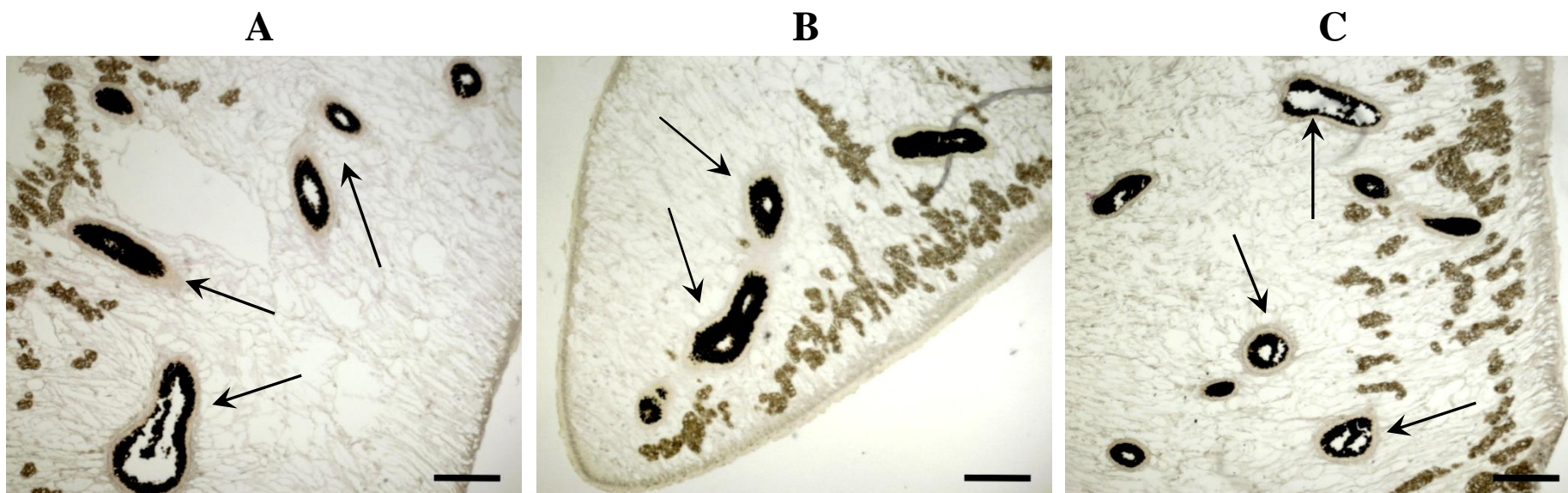
Obr. 13. Amplifikace FmCL1ish1, FmCL1ish2, FmCL1ish3 (1,5% agarózový gel se Sybr Green).



Připravené anti - sense RNA próby byly označeny digoxigeninem, zatím pouze FmCL1ish2 a FmCL1ish3 (z důvodu technické kapacity) byly dle vypracovaného protokolu pro RNA *in situ* hybridizace otestovány v ředění 1:100 na 6 μm řezech. Specifická barevná reakce nebyla na řezech z dospělého *F. magna* v tomto pilotním experimentu lokalizována. Při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu byla navíc zjištěna vysoká autofluorescence tkáně dospělého červa, která mohla zkreslit výsledky. Jako negativní kontrola sloužil řez, který byl inkubován v hybridizačním pufru bez prób (**Obr.18.**). Vzorčky byly vyvolávány 6 h 20 min.

Obr.18. Výsledky RNA *in situ* hybridizace prób FmCL1ish2 a FmCL1ish3.

Na obrázku **A** je 6 μ m řez inkubovaný s próbou FmCL1ish2, je patrné mírné růžovo-oranžové zbarvení kolem střeva (označené šipkami). Nicméně podobně zbarvený je i celý parenchym. Výsledkem úspěšné hybridizace by měl být silně červený signál, který zde nebyl pozorován. Obrázek **B** ukazuje pro porovnání negativní kontrolu k těmto vzorkům. Na obrázku **C** je řez inkubovaný s próbou FmCL1ish3. Na tomto obrázku není patrný žádný barevný signál. Při porovnání s negativní kontrolou vypadá tento obrázek **C** shodně. Měřítka odpovídá 250 μ m.



DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo porovnat expresi cathepsinu L u vývojových stádií *F. magna* a pokusit se lokalizovat mRNA transkripty tohoto genu v těle dospělého červa. Za tímto účelem byly v naší laboratoři zavedeny metody qPCR a RNA *in situ* hybridizace. Obě tyto metody vyžadují jako vstupní materiál vysoce kvalitní RNA, která byla v našem případě nejvíce limitujícím faktorem pro qPCR experimenty. Selhání aplikace klasických postupů izolace RNA nás vedlo k optimalizaci izolační metody, která byla následně aplikována na všechna životní stadia *F. magna*. Tímto bylo zjištěno, že nejvhodnější metodu prozatím představuje izolace kitem High Pure Tissue isolation kit (Roche). Touto metodou se podařilo získat RNA z dospělců a miracidíí bez známek degradace, nicméně nevýhodou byla vyšší spotřeba materiálu, což byl problém zejména v případě miracidíí a ostatních larválních stádií. Pokus o izolaci RNA z vajíček *F. magna* touto metodou byl bohužel neúspěšný. Přesto, že se podařilo porušit vaječné skořápky a izolovat tak RNA z obsahu vajíček, nebyla touto metodou žádná RNA vyizolována. Toto může být způsobeno například špatným pronikáním RNA fixačního roztoku přes stěnu vajíčka a tím zvýšením náchylnosti RNA zárodku k degradaci. V několika dalších pokusech bylo vyloučeno zanesení kolonky (pomocí které byla RNA izolována) zbytky skořápek předcházející opakovanou centrifugací supernatantu. Přesto použité postupy nebyly nejspíše pro izolaci RNA z vajíček vhodné. Materiál (RNA) z ostatních stádií se nepodařilo izolovat v dostatečném množství získat (30 μ l o koncentraci 120 ng/ μ l RNA). Analýza qPCR proto byla prozatím založena na stádiu miracidia a dospělého. Vzhledem k omezenému množství RNA materiálu z miracidíí nebyl u této metody stanoven např. detekční limit (LOD), který je definován jako nejnižší detekovatelná koncentrace templátu ve vzorku, při které je úspěšně detekováno 95% testovaných vzorků (Bustin et al. 2009). Amplifikační účinnost primerů byla za účelem úspory materiálu testována na syntetickém templátu nikoliv na cDNA jednotlivých stádií.

Po úspěšné izolaci RNA z miracidíí a dospělců a splnění všech potřebných nároků na kvalitu, jsme přistoupili k samotné qPCR s cílem stanovit míru exprese FmCL u tak odlišných stádií jakými jsou dospělec a miracidium. Miracidium je volně žijící larvální stádium, které nepřijímá potravu a ve vodním prostředí aktivně vyhledává mezihostitelského plže s využitím energie získané z aerobního metabolismu při odbourávání zásob glykogenu.

Naopak dospělec je schopen přijímat nutrienty z vnitřního prostředí hostitele a energii získávat na rozdíl od miracidia s využitím procesů anaerobního metabolismu (Lloyd & Barrett 1983, Tielens et al. 1984, 1991, Halton 1997, Boyunaga et al. 2001, Moss 2009). Z tohoto hlediska se použití miracidíí a dospělců *F. magna* jeví jako vhodný a zajímavý model pro experiment zaměřený na ověření naší hypotézy o předpokládané rozdílné expresi FmCL1 mezi těmito dvěma stádii. S přihlednutím k biologii těchto dvou stádií (miracidium, dospělec) a předpokládané funkci CL u fasciolidních motolic např. penetrace, migrace tkání, trávení, obrana před imunitním systémem hostitele (Carmona et al. 1993, Dowd et al. 1995, Prowse et al. 2002, Yamasaki et al. 2002, Dalton et al. 2003b, Ghoneim et al. 2008, Robinson et al. 2008b) lze předpokládat, že u miracidia, se FmCL1 nejspíše účastní penetrace do těla mezihostitelského plže, nicméně tato funkce nebyla zatím prokázána. Navíc FmCL by mohl být u miracidíí přítomen již ve formě proteinu obsaženého především v penetračních žlázách, jako cathepsin B u miracidia *S.mansoni*, jehož lokalizaci v penetračních žlázách nevylihnutého miracidia zmiňují autoři Dresden et al. (1983). V takovém případě by se dalo předpokládat, že exprese FmCL1u tohoto stádia bude na minimální úrovni. Naopak u dospělého lokalizovaného v pseudocystě v jaterním parenchymu je FmCL1 pravděpodobně exprimován ve vysoké míře a účastní trávení krve (Dalton et al. 2003b, Collins et al. 2004, Lowther et al. 2009).

Jedinou prací zabývající se expresí cathepsinu L u různých stádií fasciolidních motolic je studie Ghoneim et al. (2008) u *F. gigantica*. Autoři ve své studii prokázali expresi FgCL1 u všech vývojových stádií ovšem míra této exprese nebyla stanovena. Autorům se podařilo také zjistit, že množství FgCL1 získané z ESP dospělců bylo 1,5x větší než v homogenátu miracidíí. U FgCL1 přítomného v miracidíích se autoři rovněž domnívají, že se nejspíše uplatňuje při procesech penetrace do mezihostitelského plže. U dospělého pak tyto data autoři komentují jako výsledky podporující hypotézu, že se FgCL1 podílí právě na trávení hostitelských proteinů, penetraci tkání či úniku imunitní odpovědi hostitele. Studie zaměřené na porovnávání exprese peptidáz mezi jednotlivými stádii motolic za využití qPCR jsou známy pouze u schistosom (např. cathepsin L3, cathepsin B1,B2) (Dvořák et al. 2009, Dolečková et al. 2010). S výsledky studie Dvořák et al. (2009) nelze naše výsledky srovnávat, jelikož lze předpokládat, že s ohledem na jiný druh motolice bude funkce cathepsinu L *S. mansoni* odlišná. Funkci hlavní trávicí peptidázy u *S. mansoni* pravděpodobně zastává

cathepsin B (Dříve identifikovaný SmCL1 patří navíc již do skupiny cathepsinů F) (Tort et al. 1999, Sajid 2003, Caffrey et al. 2004, Dvořák et al. 2005).

V námi realizovaných experimentech byla exprese FmCL1 potvrzena nejdříve s využitím klasické PCR s templátovou cDNA z miracidíí a dospělce, kdy se podařilo amplifikovat produkty o velikosti cca 1000 bp, u kterých byla následně potvrzena shoda se sekvencí FmCL1, a to jak u dospělce, tak u miracidíí. U miracidíí však došlo také k amplifikaci dalšího produktu odpovídajícího podle markeru velikosti cca 2000 bp. Tento produkt byl také osekvenován a bylo zjištěno, že se jednalo rovněž o FmCL1. Rozdílná velikost tohoto ampliconu byla dána inzercí úseků nukleotidů v cDNA v sekvenci FmCL1, které značí nejspíše přítomnost intronů. Tento produkt byl amplifikován zřejmě díky kontaminaci RNA genomickou DNA, která vznikla nejspíše neošetřením izolované RNA DNazou, z důvodu možných následných vysokých ztrát RNA (Heinrich et al. 2007). Použitím DNazy po izolaci RNA dochází k odstranění veškeré DNA ze vzorku a tedy k eliminaci genomické kontaminace (Ziegler et al. 1992, Huang et al. 1996, Sanyal et al. 1997, Bustin 2002, Heinrich et al. 2007). Při izolaci vzorků RNA pro qPCR experiment, byl tento krok vždy zahrnut jako součást protokolu zmiňovaného izolačního kitu (High Pure Tissue isolation kit, Roche obsahuje DNazu I).

Při měření hladiny exprese FmCL1 v cDNA miracidíí a dospělce byla použita metoda qPCR. Tento qPCR experiment představoval pilotní pokus v testování exprese jednoho genu na omezeném počtu dospělých jedinců a miracidíí *F. magna*. Experiment byl proveden primárně za účelem implementace problematiky genové exprese do helmintologické laboratoře, seznámením se se souvisejícími metodickými postupy a k následnému navržení optimálního přístupu v dalších experimentech. Výsledky prvotních testovacích pokusů měření exprese FmCL1s využitím qPCR odhalily, že FmCL1 je ve vyšší míře pravděpodobně exprimován u dospělců (1700x) než u miracidíí. Nicméně jedná se zatím pouze o primární data, podmínky experimentu je nutné dále optimalizovat.

Ideální počet testovaných biologických replikátů k získání skutečně reprezentativního souboru hodnot relativní genové exprese u dospělců i miracidíí, je alespoň 10. Naše podmínky však zatím umožnily testovat pouze 3 biologické replikáty od obou stádií. Při takto nízkém počtu testovaných biologických replikátů dochází k částečnému zkreslení průměrné hodnoty relativné exprese. Na druhou stranu i tak mají výsledná data určitou vypovídající hodnotu.

Dále je třeba přihlídnout také výsledkům testu stability exprese zvolených referenčních genů. V našem případě byly jako referenční geny zvoleny GAPDH, COXI, ACTB a ATP5B. Tyto geny byly po konzultaci s odborníkem Richardem Nádvorníkem, Ph.D (SEQme s.r.o.) zvoleny náhodně podle nejčastěji využívaných genů v dostupné literatuře a dat dostupných z transkriptomu *F. magna* (Piantoni et al. 2008, Dvořák et al. 2009, Turabelidze et al. 2010, Cabán-Hernández et al. 2012, Cantacessi et al. 2012, Liu et al. 2012, Kundu et al. 2013). Prozatím neexistuje způsob, který by umožňoval předem určit, které geny budou stabilně exprimovány a které nikoliv a jako vhodný referenční gen může ve finále sloužit jakýkoliv gen se stabilní expresí (Bustin 2000, de Jonge et al. 2007, Goulet et al. 2007, Bustin et al. 2009). Vytipovaných kandidátů na referenční geny bylo na počátku experimentu mnohem více než čtyři výše zmíněné. Avšak většinu vybraných genů se nepodařilo identifikovat v transkriptomu *F. magna* a tím získat informaci o jejich sekvenci (např. β mikrotubulin, hypoxantin fosforibozyl transferáza, calnexin, cyklofilin a další). Analýza byla nakonec provedena pouze se třemi referenčními geny, jelikož dodatečně byl vyloučen ještě COXI při testování účinnosti primerů, z důvodu nízké amplifikační účinnosti (Livak & Schmittgen 2001, Kubista et al. 2006, VanGuilder et al. 2008, Bustin et al. 2009).

Pomocí softwaru Qbase+ (Biogazelle) byla tzv. geNorm analýzou otestována stabilita jednotlivých referenčních genů (Bustin 2002, Hellemans et al. 2007, Hellemans & Vandesompele 2014). V rámci experimentu byly nakonec otestovány 3 referenční geny na 3 biologických replikátech, čili jakési striktní minimum bylo podle manuálu Qbase+ dodrženo. Po provedení analýzy byly získány hodnoty tzv. geNorm M (hodnota M určuje stabilitu exprese daného genu). Interval, ve kterém se limitní hodnoty M mohou pohybovat, se liší na základě testovaných vzorků. Pokud se jedná o normalizaci genomické DNA, hodnota M by měla být menší než 0,2 ($M < 0,2$). Jedná-li se o analýzu vzorků velmi homogenních např. kultury stejných typů buněk, pak by hodnota M měla být menší než 0,5 ($M < 0,5$). Jestliže se testují vzorky velmi heterogenní (např. různé typy buněk a tkání, vzorky z rozdílných organismů) mohou být referenční geny více variabilní a akceptovatelné hodnoty M se v tomto případě mohou pohybovat až do $M < 1$. Hodnota $M < 1$ je maximální akceptovatelný limit.

Vyšší hodnoty M již značí nutnost úpravy experimentu a nelze na základě nich geny označit za stabilně exprimované (Hellemans et al. 2007, Hellemans & Vandesompele 2011, 2014, Yang et al. 2015). V našem případě se jedná sice o stejné organizmy v různé fázi životního cyklu, nicméně stavba těla i složení orgánů je zcela odlišné (Dinnik & Dinnik 1956,

Erhardová-Kotrlá 1971). Na základě tohoto faktu spadají naše vzorky spíše do kategorie heterogenních vzorků a parametr pro hodnotu M byl nastaven na $M < 1$. Toto kritérium splnil z testovaných genů pouze GAPDH, což znamená, že z 3 testovaných referenčních genů je GAPDH nejstabilněji exprimován.

K normalizaci dat jsme tedy následně přistupovali na základě předpokladu, že GAPDH představuje gen stabilně exprimovaný a data byla normalizována pouze na základě hodnot získaných z GAPDH (Cabán-Hernández et al. 2012, Garske et al. 2013, Zeraik et al. 2013). Normalizace na základě jediného referenčního genu se dnes již nedoporučuje, ačkoliv většina studií publikovaných i v impaktovaných časopisech je často založena právě na této neoptimální metodě normalizace (Suzuki et al. 2000, Tricarico et al. 2002, Vandesompele et al. 2002, Bustin et al. 2009, Dvořák et al. 2009, Ojalvo et al. 2009, Dolečková et al. 2010, Pereira et al. 2011). Normalizace podle jediného genu je podle Bustin et al. (2009) přípustná pouze ve chvíli, kdy lze prokázat opravdu velmi stabilní expresi daného genu na opravdu širokém souboru dat. Optimální počet referenčních genů není daný, vždy je třeba tyto geny otestovat a za pomoci algoritmu (např. geNorm, BestKeeper, NormFinder) určit, které a jaký počet z referenčních genů je pro normalizaci dat v dané studii optimální (Vandesompele et al. 2002, Andersen et al. 2004, Pfaffl et al. 2004, Bustin et al. 2009).

Co se týče statistického vyhodnocení výsledných dat, v našem případě nelze použít žádný ze statistických testů. Parametrický test nelze provést, protože ho není možné aplikovat na tak malý soubor dat, na takto malém souboru nelze určit, zda mají data normální distribuci. Pokud bychom přistoupili k neparametrickému testu, z důvodu nedostatku dat by výsledná hodnota p vyšla tímto způsobem vždy nesignifikantní. Výsledky našeho qPCR experimentu tedy v tuto chvíli nelze statisticky vyhodnotit, avšak tuto skutečnost jsem diskutovala několikrát se specialistou v oboru, Richardem Nádvorníkem, Ph.D (SEQme s.r.o), který doporučil výsledky i v této omezené podobě prezentovat

V případě našeho experimentu tedy výsledná data podléhají určitému zkreslení, které je způsobeno nejen nedostatečným množstvím otestovaných biologických replikátů, ale především neoptimální normalizační strategií. Následná optimalizace vyžaduje experiment rozšířit. Přesto, že se jedná pouze o primární data týkající se relativní exprese FmCL1, nepředpokládáme, že by se výsledek analýzy po rozšíření experimentu naprosto změnil. Je

však možné, že po další optimalizaci podmínek nebude například rozdíl v expresi FmCL1 mezi dospělci a mirácií tak markantní.

V rámci diplomové práce jsem se rovněž pokusila i o lokalizaci mRNA transkriptů FmCL1 na parafinových histologických řezech dospělého červa. K tomuto účelu byla využita metoda RNA *in situ* hybridizace, která představuje moderní a efektivní přístup v lokalizaci proteinů v buňkách, tkáních či orgánech motolic. Na rozdíl od časově náročných imunohistologických přístupů, které vyžadují zdlouhavé přípravy zahrnující produkci rekombinantních proteinů a následnou imunizaci laboratorních zvířat za účelem získání protilátek (Bogitsh et al. 2001, McCarthy et al. 2004, Bukovsky et al. 2008), je lokalizace pomocí *in situ* hybridizace rychlejší proces vyžadující znalost pouze známé sekvence lokalizovaného genu.

Tato metoda byla již testována také na fasciolidních motolicích *F.hepatica* a *F.gigantica* (Dalton et al. 2003b, Meemon et al. 2004, 2010). Univerzální protokol pro *in situ* hybridizaci prozatím neexistuje a každá laboratoř zatím nezávisle optimalizuje svůj vlastní přístup. My jsme během aplikace této metody využili poznatků prezentovaných v pracích Dalton et al. (2003b), Meemon et al. (2004, 2010), Quack et al. (2009), Coqswell et al. (2011), Laurer et al. (2011) s tím, že i v tomto případě jsme provedli pilotní experiment.

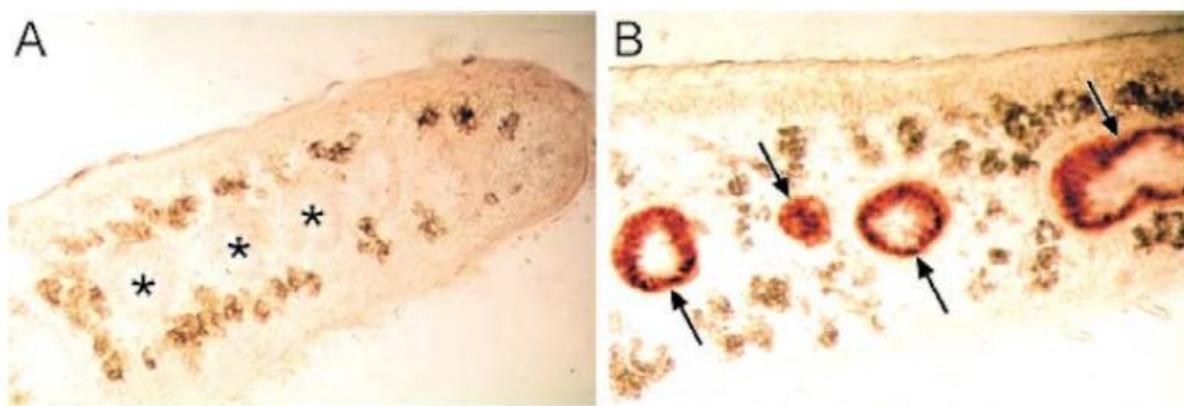
Na základě sekvence FmCL1 z transkriptomu *F. magna* byly navrženy a připraveny RNA próby (Cantacessi et al. 2012). Tyto próby byly následně použity dle protokolu pro RNA *in situ* hybridizaci, který byl vyvinut v laboratoři Prof. Greveldinga v Německu pro organismus *S. mansoni* (Quack et al. 2009, Leutner et al. 2011, Hahnel et al. 2014). Tento protokol využívá detekci chromogenního signálu.

Při pozorování výsledku inkubací ve světelném mikroskopu nebyl na histologických řezech dospělci *F. magna* jednoznačně rozeznán specifický chromogenní signál potvrzující úspěšnou hybridizaci RNA prób. Při použití próby FmCL1ish2 v ředění 1:100 (kapitola 3.7; **Obr. 18. A**) bylo na řezech pozorováno pouze velmi slabé růžovo-oranžové zabarvení v oblastech kolem střeva *F. magna*, nicméně podobně byl zabarven i veškerý parenchym. K vytvoření jasně rozlišitelného červeného precipitátu nedošlo. Použití FastRed TR/Naphtol AS-Mix (Sigma Aldrich) (Speel et al. 1992, Dalton et al. 2003b, Lauter et al. 2011), umožňuje při pozorování pod filtrem TRITC detekovat fluorescenční signál vzniklého precipitátu, který by mohl teoreticky odpovídat slabé chromogenní reakci v okolí střeva. Nicméně z důvodu silné autofluorescence tkáně nebylo možné ani tento signál jasně definovat.

Dříve byl takto lokalizován FhCL pomocí *in situ* hybridizace DNA prób ve střevě *F.hepatica* (Dalton et al. 2003b) (**Obr. 19.**)

Obr. 19. Lokalizace FhCL pomocí DNA *in situ* hybridizace (Dalton et al. 2003b).

A - negativní kontrola, * označuje střevo; B - řez *F.hepatica* (20 um) s hybridizovanými próby, šipkou je označené střevo, po jehož vnitřním obvodu je zřejmý silný červený precipitát značící reakce sondy s transkripty FhCL.



Na základě studií publikovaných Dalton et al.(2003b) a Meemon et al. (2004, 2010) lze i v případě *F. magna* předpokládat lokalizaci FmCL1 primárně v buňkách střeva dospělého červa, které jsou předpokládaným místem lokalizace a sekrece všech trávicích peptidáz motolic (Skelly & Shoemaker 2001, McCarthy et al. 2004, Dvořák et al. 2009, Kang et al. 2010, 2012).

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá porovnáním exprese cathepsinu L1 u miracidíí a dospělců *F. magna* s využitím qPCR a dále lokalizací mRNA transkriptů tohoto genu na řezech tkání dospělého červa s využitím RNA *in situ* hybridizace.

Pomocí PCR bylo potvrzeno zastoupení FmCL1 v cDNA miracidíí a dospělců *F. magna*. V pilotních qPCR experimentech zaměřených na expresi FmCL1 byla u těchto dvou stádií získána data prokazující vyšší expresi FmCL1 u dospělců než u miracidíí. Zároveň byla v protokolu odhalena kritická místa, která vyžadují následnou optimalizaci, kdy je vhodné celý experiment rozšířit a zopakovat. V následujících experimentech bude počet testovaných biologických replikátů navýšen alespoň na 10 dospělých jedinců a 10 nezávislých sběrů miracidíí *F. magna*. Z transkriptomu *F. magna* byly již vybrány další potenciální referenční geny, např. beta tubulin (TUBB), ubiquitin C (UBC), tata box binding protein (TBP) a tyrosin 3 monooxygenáza (YWHAZ), které by doplnili set stávajících referenční genů pro optimální geNorm analýzu a následnou přesnější normalizaci dat. Výsledkem zmíněné optimalizace by měl být manuál aplikovatelný v naší laboratoři při testování exprese dalších enzymů trávicí kaskády *F. magna* v širším měřítku (např. geny cathepsinu B, D).

Vzhledem k časové náročnosti a metodické obtížnosti proběhl prozatím pouze pilotní experiment lokalizace FmCL1. Transkripty FmCL1 se pomocí RNA *in situ* hybridizace v tomto pilotním experimentu nepodařilo jednoznačně lokalizovat. Na základě výsledků opakovaných experimentů bude provedena optimalizace použitého protokolu.

V započaté práci budu pokračovat během doktorského studia, kdy budou mnohé z mých pilotních experimentů dotaženy a realizovány na všech vývojových stádiích *F. magna*.

POUŽITÁ LITERATURA

Abdulla M-H, Lim K-C, Sajid M, McKerrow JH, Caffrey CR (2007). Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med.* 4, e14.

Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF (2008). *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158, 52–64.

Acosta D, Goñi F, Carmona C (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 84, 1–7.

Adisakwattana P, Viyanant V, Chaicumpa W, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Sobhon P, Grams R (2007). Comparative molecular analysis of two asparaginyl endopeptidases and encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156, 102–16.

Alasaad S, Soriguer RC, Abu-Madi M, El Behairy A, Jowers MJ, Baños PD, Píriz A, Fickel J, Zhu X-Q (2011). A TaqMan real-time PCR-based assay for the identification of *Fasciola* spp. *Vet. Parasitol.* 179, 266–71.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–50.

Ashrafi K, Valero MA, Panova M, Periago M V, Massoud J, Mas-Coma S (2006). Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitol. Int.* 55, 249–60.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds) (2004). Handbook Of Proteolytic Enzymes, 2nd ed. *Elsevier Academic Press.*

Beckham SA, Piedrafita D, Phillips CI, Samarawickrema N, Law RHP, Smooker PM, Quinsey NS, Irving JA, Greenwood D, Verhelst SHL, Bogyo M, Turk B, Coetzer TH, Wijeyewickrema LC, Spithill TW, Pike RN (2009). A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1601–1612.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J (2003). Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474–86.

Bennett CE, Threadgold LT (1973). Electron microscope studies of *Fasciola hepatica* 13 Fine structure of newly excysted juvenile. *Exp. Parasitol.* 34, 85–99.

Berasaín P, Goñi F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J. Parasitol.* 83, 1–5.

Bernard PS, Wittwer CT (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* 48, 1178–1185.

Bogitsh BJ, Dalton JP, Brady CP, Brindley PJ (2001). Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. *J. Parasitol.* 87, 237–241.

Boyunaga H, Schmitz MG, Brouwers JF, Van Hellemond JJ, Tielens AG (2001). *Fasciola hepatica* miracidia are dependent on respiration and endogenous glycogen degradation for their energy generation. *Parasitology* 122, 169–173.

Brady CP, Brindley PJ, Dowd AJ, Dalton JP (2000). *Schistosoma mansoni*: differential expression of cathepsins L1 and L2 suggests discrete biological functions for each enzyme. *Exp. Parasitol.* 94, 75–83.

Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, Day SR, Wong JY, Smythe ML, McManus DP (1997). Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 1–9.

Bukovsky A, Gupta SK, Bansal P, Chakravarty S, Chaudhary M, Svetlikova M, White RS, Copas P, Upadhyaya NB, Van Meter SE, Caudle MR (2008). Production of monoclonal antibodies against recombinant human zona pellucida glycoproteins: utility in immunolocalization of respective zona proteins in ovarian follicles. *J. Reprod. Immunol.* 78, 102–14.

Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23–39.

Bustin SA (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.

Bustin SA, Mueller R (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci. (Lond).* 109, 365–379.

Cabán-Hernández K, Gaudier JF, Espino AM (2012). Characterization and differential expression of a ferritin protein from *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 182, 54–61.

Caffrey CR, Mathieu MA, Gaffney AM, Salter JP, Sajid M, Lucas KD, Franklin C, Bogyo M, McKerrow JH (2000). Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 466, 244–248.

Caffrey CR, McKerrow JH, Salter JP, Sajid M (2004). Blood “n” guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 20, 241–8.

- Caffrey CR, Salter JP, Lucas KD, Khiem D, Hsieh I, Lim K-C, Ruppel A, McKerrow JH, Sajid M (2002).** SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 49–61.
- Campbell WC (1961).** Notes on the egg and Miracidium of *Fascioloides magna*,(Trematoda). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 308–319.
- Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Durán R, Roche L, Zaha A, Carmona C, Tort JF (2008).** A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie* 90, 1461–75.
- Cancela M, Ruétalo N, Dell’Oca N, da Silva E, Smircich P, Rinaldi G, Roche L, Carmona C, Alvarez-Valín F, Zaha A, Tort JF (2010).** Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* 11, 227.
- Cantacessi C, Mulvenna J, Young ND, Kasny M, Horak P, Aziz A, Hofmann A, Loukas A, Gasser RB (2012).** A deep exploration of the transcriptome and “excretory/secretory” proteome of adult *Fascioloides magna*. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1340–53.
- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP (1993).** Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 9–17.
- Cnops L, Soentjens P, Clerinx J, Van Esbroeck M (2013).** A *Schistosoma haematobium*-specific real-time PCR for diagnosis of urogenital schistosomiasis in serum samples of international travelers and migrants. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2413.
- Cogswell A a, Collins JJ, Newmark P a, Williams DL (2011).** Whole mount *in situ* hybridization methodology for *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 178, 46–50.
- Collins PR, Stack CM, O’Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, Mousley A, Stewart M, Maule AG, Dalton JP, Donnelly S (2004).** Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: Propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J. Biol. Chem.* 279, 17038–17046.

Corvo I, Cancela M, Cappetta M, Pi-Denis N, Tort JF, Roche L (2009). The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167, 41–7.

Corvo I, O'Donoghue AJ, Pastro L, Pi-Denis N, Eroy-Reveles A, Roche L, McKerrow JH, Dalton JP, Craik CS, Caffrey CR, Tort JF (2013). Dissecting the active site of the collagenolytic cathepsin L3 protease of the invasive stage of *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2269.

Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC (1996). *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* 83, 202–15.

Curtale F, Hammoud ES, El-Wakeel A, Mas-Coma S, Savioli L (2000). Human fascioliasis, an emerging public health problem in the Nile Delta, Egypt. *Res. Rev. Parasitol.* 60, 129–134.

Dalton JP, Brindley PJ (1996). Schistosome asparaginyl endopeptidase SM32 in hemoglobin digestion. *Parasitol. Today* 12, 125.

Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A (2003a). Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int. J. Parasitol.* 33, 621–640.

Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ (1997). The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 114 (Pt 2, 105–12.

Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ (1996). Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64, 1328–34.

Dalton JP, Hola-Jamriska L, Brindley PJ (1995). Asparaginyl endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 111 (Pt 5, 575–80.

Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM (2003b). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33, 1173–1181.

Day SR, Dalton JP, Clough KA, Leonardo L, Tiu WU, Brindley PL (1995). Characterization and Cloning of the Cathepsin L Proteinases of *Schistosoma japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1–9.

De Jonge HJM, Fehrmann RSN, de Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps W a, de Vries EGE, van der Zee AGJ, te Meerman GJ, ter Elst A (2007). Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2, 1–5.

De Long SK, Kinney K a, Kirisits MJ (2010). QPCR assays to quantify genes and gene expression associated with microbial perchlorate reduction. *J. Microbiol. Methods* 83, 270–274.

Delcroix M, Medzihradsky K, Caffrey CR, Fetter RD, McKerrow JH (2007). Proteomic analysis of adult *S mansoni* gut contents. *Mol. Biochem. Parasitol.* 154, 95–7.

Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvořák J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH (2006). A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J. Biol. Chem.* 281, 39316–39329.

Demiaszkiewicz AW, Kuligowska I, Pyziel AM, Lachowicz J, Kowalczyk R (2015). Extension of occurrence area of the American fluke *Fascioloides magna* in south-western Poland. *Ann. Parasitol.* 61, 93–96.

Dillon GP, Illes JC, Isaacs H V, Wilson R a (2007). Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount *in situ* hybridization. *Parasitology* 134, 1589–1597.

Dinnik JA, Dinnik NN (1956). Observations on the succession of redial generations of *Fasciola gigantica* Cobbold in a snail host. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 7, 397–419.

Dolečková K, Albrecht T, Mikeš L, Horák P (2010). Cathepsins B1 and B2 in the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*: Distinct gene expression profiles and presumptive roles throughout the life cycle. *Parasitol. Res.* 107, 751–755.

Dolečková K, Kašný M, Mikeš L, Cartwright J, Jedelský P, Schneider EL, Dvořák J, Mountford AP, Craik CS, Horák P (2009). The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Int. J. Parasitol.* 39, 201–11.

Dowd AJ, McGonigle S, Dalton JP (1995). Fasciola Hepatica Cathepsin L Proteinase Cleaves Fibrinogen and Produces a Novel Type of Fibrin Clot. *Eur. J. Biochem.* 232, 241–246.

Dowd AJ, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP (1994). Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur. J. Biochem.* 223, 91–98.

Dresden MH, Sung CK, Deelder a M (1983). A monoclonal antibody from infected mice to a Schistosoma mansoni egg proteinase. *J. Immunol.* 130, 1–3.

Dvořák J, Delcroix M, Rossi A, Vopálenský V, Pospíšek M, Sedinová M, Mikeš L, Sajid M, Sali A, McKerrow JH, Horák P, Caffrey CR (2005). Multiple cathepsin B isoforms in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *Int. J. Parasitol.* 35, 895–910.

Dvořák J, Mashiyama ST, Braschi S, Sajid M, Knudsen GM, Hansell E, Lim K-C, Hsieh I, Bahgat M, Mackenzie B, Medzihradzsky KF, Babbitt PC, Caffrey CR, McKerrow JH (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* 90, 345–58.

Dvořák J, Mashiyama ST, Sajid M, Braschi S, Delcroix M, Schneider EL, McKerrow WH, Bahgat M, Hansell E, Babbitt PC, Craik CS, McKerrow JH, Caffrey CR, Dvořák J, Mashiyama ST, Sajid M, Braschi S, Delcroix M, Schneider EL, McKerrow WH, Bahgat M, Hansell E, Babbitt PC, Craik CS, McKerrow JH, Caffrey CR (2009). SmCL3, a gastrodermal cysteine protease of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e449.

Erhardová-Kotrlá B (1971). The Occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Academia Prague.

Erhardová-Kotrlá B, Blažek K (1970). Artificial infestation caused by the fluke *Fascioloides magna*. *Acta vet.* 39, 287–295.

Esteban JG, Bargues MD, Mas-Coma S (1998). Geographical Distribution , Diagnosis and Treatment of Human Fascioliasis : a Review. 58, 13–42.

Faltýnková A, Horáčková E, Hirtová L, Novobilský A, Modrý D, Scholz T (2006). Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitol.* 51.

Farias LP, Tararam CA, Miyasato PA, Nishiyama MY, Oliveira KC, Kawano T, Verjovski-Almeida S, Leite LC de C (2011). Screening the *Schistosoma mansoni* transcriptome for genes differentially expressed in the schistosomulum stage in search for vaccine candidates. *Parasitol. Res.* 108, 123–35.

Foreyt WJ, Todd a C (1976). Development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. *J. Parasitol.* 62, 26–32.

Fryer RM, Randall J, Yoshida T, Hsiao L-L, Blumenstock J, Jensen KE, Dimofte T, Jensen R V, Gullans SR (2002). Global analysis of gene expression: methods, interpretation, and pitfalls. *Exp. Nephrol.* 10, 64–74.

Garske AK, Lawyer CR, Peterson BM, Illig KR (2013). Adolescent changes in dopamine D1 receptor expression in orbitofrontal cortex and piriform cortex accompany an associative learning deficit. *PLoS One* 8, e56191.

Ghoneim MA, El-Kirdasy AF, Goher AK, Moussa WM, El-Ballal SS, Moussa AA (2008). Expression of cathepsin L1 gene of *Fasciola gigantica* in different development stages. *J. Appl. Sci.* 4, 2071–2078.

Gordon CA, Acosta LP, Gobert GN, Jiz M, Olveda RM, Ross AG, Gray DJ, Williams GM, Harn D, Li Y, McManus DP (2015). High prevalence of *Schistosoma japonicum* and *Fasciola gigantica* in bovines from Northern Samar, the Philippines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003108.

Goulet B, Sansregret L, Leduy L, Bogyo M, Weber E, Chauhan SS, Nepveu A (2007). Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Mol. Cancer Res.* 5, 899–907.

Grams R, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Suchart Upatham E, Viyanant V (2001). Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Int.* 50, 105–114.

Grogan J, Rotmans P, Ghoneim H, Deelder A, Yazdanbakhsh M, Klinkert MQ (1997). Recognition of *Schistosoma mansoni* cathepsins B and L by human IgG1 and IgG4 antibodies. *Parasite Immunol.* 19, 215–20.

Hahnel S, Quack T, Parker-Manuel SJ, Lu Z, Vanderstraete M, Morel M, Dissous C, Cailliau K, Grevelding CG (2014). Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Front. Genet.* 5, 170.

Halton D (1997). Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes. *Int. J. Parasitol.* 27, 693–704.

Hanna WM, Kwok K (2006). Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod. Pathol.* 19, 481–487.

Harmsen MM, Cornelissen JBWJ, Buijs HECM, Boersma WJA, Jeurissen SHM, van Milligen FJ (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int. J. Parasitol.* 34, 675–82.

Hagg AM, Rennspiess D, Hausen A Zur, Speel E-JM, Cathomas G, Becker JC, Schrama D (2014). Fluorescence *in situ* hybridization and qPCR to detect Merkel cell polyomavirus physical status and load in Merkel cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 1–30.

Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U (2007). Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int. J. Legal Med.* 121, 136–142.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.

Hellemans J, Vandesompele J (2014). Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis., *in: Biassoni, R., Rassi, A. (Eds.), Quantitative Real-Time PCR.* Humana Press, pp. 19–26.

Hellemans J, Vandesompele J (2011). qPCR data analysis—unlocking the secret to successful results., *in: PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide.* Caister Academic Press, p. 139.

Howell RM (1966). Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature* 209, 713–714.

Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS (1996). Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *Biotechniques* 20, 1012–4, 1016, 1018–20.

Chacón N, Losada S, Bermúdez H, Cesari I, Hoebeke J, Noya O (2003). Immunogenicity of polymerizable synthetic peptides derived from a vaccine candidate against schistosomiasis: the asparaginyl endopeptidase (Sm32). *Immunol. Lett.* 88, 199–210.

Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Kueakhai P, Meemon K, Riengrojpitak S, Sobhon P (2012). Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* 131, 283–291.

Chantree P, Wanichanon C, Phatsara M, Meemon K, Sobhon P (2012). Characterization and expression of cathepsin B2 in *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* 132, 249–256.

Chapman CB, Mitchell GF (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 11, 165–178.

Chen W, Wang X, Li X, Lv X, Zhou C, Deng C, Lei H, Men J, Fan Y, Liang C, Yu X (2011). Molecular characterization of cathepsin B from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products and assessment of its potential for serodiagnosis of clonorchiasis. *Parasit. Vectors* 4, 149.

Irving JA, Spithill TW, Pike RN, Whisstock JC, Smooker PM (2003). The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *J. Mol. Evol.* 57, 1–15.

Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM (2001). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics* 1, 1128–32.

Jensen E (2014). Technical Review: *in situ* hybridization. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 00, 1349–1353.

Jin L, Lloyd R V (1997). *In situ* hybridization: methods and applications. *J. Clin. Lab. Anal.* 11, 2–9.

Ju J-W, Joo H-N, Lee M-R, Cho S-H, Cheun H-I, Kim J-Y, Lee Y-H, Lee K-J, Sohn W-M, Kim D-M, Kim I-C, Park BC, Kim T-S (2009). Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms. *Proteomics* 9, 3066–78.

Kang J-M, Bahk Y-Y, Cho P-Y, Hong S-J, Kim T-S, Sohn W-M, Na B-K (2010). A family of cathepsin F cysteine proteases of *Clonorchis sinensis* is the major secreted proteins that are expressed in the intestine of the parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 7–16.

Kang J-M, Ju H-L, Ju J-W, Sohn W-M, Kim T-S, Bahk Y-Y, Hong S-J, Na B-K (2012). Comparative biochemical and functional properties of two leucine aminopeptidases of *Clonorchis sinensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 182, 17–26.

Kang J-M, Lee J, Ju H-L, Ju JW, Kim J-H, Pak JH, Kim T-S, Hong Y, Sohn W-M, Na B-K (2015). Characterization of a gut-associated asparaginyl endopeptidase of *Clonorchis sinensis*. *Exp. Parasitol.* 153, 81–90.

Kang TH, Yun DH, Lee EHB, Chung YB, Bae YA, Chung JY, Kang I, Kim J, Cho SY, Kong Y (2004). A cathepsin F of adult *Clonorchis sinensis* and its phylogenetic conservation in trematodes. *Parasitology* 128, 195–207.

Kašný M, Beran L, Siegelová V, Siegel T, Leontovyč R, Beránková K, Pankrác J, Košťáková M, Horák P (2012). Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Vet. Med. (Praha)*. 57, 101–109.

Keiser J, Utzinger J (2009). Food-borne trematodiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 466–483.

Kim E-M, Verweij JJ, Jalili A, van Lieshout L, Choi M-H, Bae YM, Lim MK, Hong S-T (2009). Detection of *Clonorchis sinensis* in stool samples using real-time PCR. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 513–8.

Kozera B, Rapacz M (2013). Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54, 391–406.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125.

Kundu A, Patel A, Pal A (2013). Defining reference genes for qPCR normalization to study biotic and abiotic stress responses in *Vigna mungo*. *Plant Cell Rep.* 32, 1647–1658.

Laha T, Sripa J, Sripa B, Pearson M, Tribolet L, Kaewkes S, Sithithaworn P, Brindley PJ, Loukas A (2008). Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis. *Int. J. Infect. Dis.* 12, e49–e59.

Laursen JR, Yoshino TP (1999). *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports in vitro miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. *Parasitology* 118 (Pt 2, 187–94.

Lauter G, Söll I, Hauptmann G (2011). Two-color fluorescent *in situ* hybridization in the embryonic zebrafish brain using differential detection systems. *BMC Dev. Biol.* 11, 43.

- Lebo R V, Martelli L, Su Y, Li L, Lynch E, Mansfield E, Pua KH, Watson DF, Chueh J, Hurko O (1993).** Prenatal diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by multicolor *in situ* hybridization. *Am. J. Med. Genet.* 47, 441–50.
- Lee C, Lemyre E, Miron PM, Morton CC (2001).** Multicolor fluorescence *in situ* hybridization in clinical cytogenetic diagnostics. *Curr. Opin. Pediatr.* 13, 550–5.
- Lee CL, Lewert RM (1956).** Quantitative studies of the collagenase-like enzymes of cercariae of *Schistosoma mansoni* and the larvae of *Strongyloides ratti*. *J. Infect. Dis.* 99, 1–14.
- Leontovyč R, Košťáková M, Siegelová V, Melounová K, Pankrác J, Vrbová K, Horák P, Kašný M (2014).** Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC Vet. Res.* 10, 41.
- Leutner S, Beckmann S, Grevelding CG (2011).** Characterization of the cGMP-dependent protein kinase smcGK1 of *Schistosoma mansoni*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 637–648.
- Li Y, Huang Y, Hu X, Liu X, Ma C, Zhao J, Wu Z, Xu J, Yu X (2012).** 415-kDa Cathepsin L protease from *Clonorchis sinensis*: expression, characterization, and serological reactivity of one excretory-secretory antigen. *Parasitol. Res.* 111, 673–80.
- Liu D, Shi L, Han C, Yu J, Li D, Zhang Y (2012).** Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. *PLoS One* 7.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lloyd GM, Barrett J (1983).** *Fasciola hepatica*: carbohydrate metabolism of the adult. *Exp. Parasitol.* 56, 81–8.

- Lotfy WM, Brant S V, DeJong RJ, Thanh H Le, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RPVJ, Perera VBVP, Laursen JR, Loker ES, Le TH, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RPVJ, Perera VBVP, Laursen JR, Loker ES (2008).** Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 248–255.
- Lowther J, Robinson MW, Donnelly SM, Xu W, Stack CM, Matthews JM, Dalton JP (2009).** The importance of pH in regulating the function of the *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine protease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e369.
- Lun Z-R, Gasser RB, Lai D-H, Li A-X, Zhu X-Q, Yu X-B, Fang Y-Y (2005).** Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China. *Lancet. Infect. Dis.* 5, 31–41.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002).** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–305.
- Majoros G S V (1994).** Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. *Parasitol. Hungarica* 28, 27–38.
- Majoros G, Erdélyi K, Sztojkov V (2000).** Occurrence of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Trematoda: Digenea) in Hungary. *Magy. Állatorvosok Lapja* 122, 469–474.
- Malcicka M (2015).** Life history and biology of *Fascioloides magna* (Trematoda) and its native and exotic hosts. *Ecol. Evol.* 5, 1381–97.
- Marinculic A, Dzakula N, Janicki Z, Hardy Z, Lucinger S, Zivicnjak T (2002).** Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia- a case report. *Vet. Arh.* 72, 319–325.
- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD (1999).** Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull. World Health Organ.* 77, 340–6.
- Mas-Coma S (2004).** Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian Journal Trop. Med. Public Heal.* 35, 1–11.

- Mas-Coma S, Bargues MD (1997).** Human liver flukes: A review. *Res. Rev. Parasitol.* 57, 145–218.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA (2005).** Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255–78.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009).** Fasciola, Lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control., in: *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd., pp. 41–146.
- McCarthy E, Stack C, Donnelly SM, Doyle S, Mann VH, Brindley PJ, Stewart M, Day TA, Maule AG, Dalton JP (2004).** Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 703–14.
- McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, Day TA, Maule AG (2008).** The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int. J. Parasitol.* 38, 149–55.
- McKerrow JH (1989).** Molecular and biochemical studies of the cercarial proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 209–210.
- McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M (2006).** Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 497–536.
- McManus DP, Dalton JP (2006).** Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 Suppl, S43–S61.
- McVeigh P, Maule AG, Dalton JP, Robinson MW (2012).** *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microbes Infect.* 14, 301–10.
- Meemon K, Grams R, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P (2004).** Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136, 1–10.

- Meemon K, Khawsuk W, Sriburee S, Meepool A, Sethadavit M, Sansri V, Wanichanon C, Sobhon P (2010).** Fasciola gigantica: Histology of the digestive tract and the expression of cathepsin L. *Exp. Parasitol.* 125, 371–379.
- Michel A, Ghoneim H, Resto M, Klinkert MQ, Kunz W (1995).** Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in Schistosoma mansoni. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 7–18.
- Moertel L, Gobert GN, McManus DP (2008).** Comparative real-time PCR and enzyme analysis of selected gender-associated molecules in Schistosoma japonicum. *Parasitology* 135, 575–83.
- Moss GD (2009).** The excretory metabolism of the endoparasitic digenean Fasciola hepatica and its relationship to its respiratory metabolism. *Parasitology* 60, 1.
- Mulcahy G, Dalton JP (2001).** Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with Fasciola hepatica (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 70, 83–86.
- Nagarajan K, Saikumar G (2012).** Fluorescent in-situ hybridization technique for the detection and localization of classical swine fever virus in infected tissues. *Vet. Arh.* 82, 495–504.
- Niesters HGM (2004).** Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 5–11.
- Norbury LJ, Beckham S, Pike RN, Grams R, Spithill TW, Fecondo J V, Smooker PM (2011).** Adult and juvenile Fasciola cathepsin L proteases: different enzymes for different roles. *Biochimie* 93, 604–11.
- Novobilský A, Horáčková E, Hirtová L, Modrý D, Koudela B (2007).** The giant liver fluke Fascioloides magna (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitol. Res.* 100, 549–553.
- O'Neill SM, Mills KH, Dalton JP (2001).** Fasciola hepatica cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific interferon-gamma production in vivo. *Parasite Immunol.* 23, 541–547.

- Ojalvo LS, King W, Cox D, Pollard JW (2009).** High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *Am. J. Pathol.* 174, 1048–64.
- Pereira RV, Cabral FJ, Gomes MS, Baba EH, Jannotti-Passos LK, Carvalho O, Rodrigues V, Afonso RJCF, Castro-Borges W, Guerra-Sá R (2011).** Molecular characterization of SUMO E2 conjugation enzyme: Differential expression profile in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 109, 1537–1546.
- Pereira-Júnior OS, Pereira RV, Silva CS, Castro-Borges W, Sá RG, Cabral FJ, Silva SH, Soares CS, Morais ER, Moreira ÉBC, Magalhães LG, De Paula FM, Rodrigues V (2013).** Investigation on the 19S ATPase proteasome subunits (Rpt1-6) conservation and their differential gene expression in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 112, 235–242.
- Periago M V, Valero MA, El Sayed M, Ashrafi K, El Wakeel A, Mohamed MY, Desquesnes M, Curtale F, Mas-Coma S (2008).** First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infect. Genet. Evol.* 8, 51–8.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004).** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C (1999).** Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* 67, 1954–61.
- Piantoni P, Bionaz M, Graugnard DE, Daniels KM, Akers RM, Loor JJ (2008).** Gene expression ratio stability evaluation in prepubertal bovine mammary tissue from calves fed different milk replacers reveals novel internal controls for quantitative polymerase chain reaction. *J. Nutr.* 138, 1158–1164.
- Piedrafita D, Spithill TW, Smith RE, Raadsma HW (2010).** Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol.* 32, 572–81.

Pinlaor P, Kaewpitoon N, Laha T, Sripa B, Kaewkes S, Morales ME, Mann VH, Parriott SK, Suttiprapa S, Robinson MW, To J, Dalton JP, Loukas A, Brindley PJ (2009). Cathepsin F cysteine protease of the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e398.

Prowse R k, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW (2002). *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol.* 24, 57–66.

Pybus M (2001). Liver flukes., in: *Pybus, M.J., Samuel, W.M., Kocan, A.A. (Eds.), Prarasitic Diseases of Wild Mammals.* Iowa State University Press, pp. 121–149.

Quack T, Knobloch J, Beckmann S, Vicogne J, Dissous C, Grevelding CG (2009). The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PLoS One* 4, e6998.

Rahman SMM, Bae YM, Hong S-T, Choi M-H (2011). Early detection and estimation of infection burden by real-time PCR in rats experimentally infected with *Clonorchis sinensis*. *Parasitol. Res.* 109, 297–303.

Rajský D, Čorba J, Várady M, Špakulová M, Cabadaj R (2002). Control of fascioloidosis (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in red deer and roe deer. *Helminthologia* 39, 67–70.

Raquin V, Wannagat M, Zouache K, Legras-Lachuer C, Moro CV, Mavingui P (2012). Detection of dengue group viruses by fluorescence *in situ* hybridization. *Parasit. Vectors* 5, 243.

Rawlings ND, Barrett AJ (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290, 205–18.

Rawlings ND, Salvesen G (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed. Elsevier Academic Press.

Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2014). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42, 503–509.

Roberts LS, Janovy J (2009). Foundations of parasitology, 8th ed. Janice Roerig-Blong.

Robinson MW, Corvo I, Jones PM, George AM, Padula MP, To J, Cancela M, Rinaldi G, Tort JF, Roche L, Dalton JP (2011). Collagenolytic activities of the major secreted cathepsin L peptidases involved in the virulence of the helminth pathogen, fasciola hepatica. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5.

Robinson MW, Dalton JP, Donnelly S (2008a). Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem. Sci.* 33, 601–8.

Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S (2009). An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen Fasciola hepatica: proteins associated with invasion and infection of the mammalian hos. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 1891–1907.

Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, Stack CM, Padula M, Herbert B, Dalton JP (2008b). Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen Fasciola hepatica: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1111–1123.

Roche L, Dowd a J, Tort J, McGonigle S, MacSweeney a, Curley GP, Ryan T, Dalton JP (1997). Functional expression of Fasciola hepatica cathepsin L1 in Saccharomyces cerevisiae. *Eur. J. Biochem.* 245, 373–380.

Rupova L, Keilova H (1979). Isolation and some properties of an acid protease from Fasciola hepatica. *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* 61, 83–91.

Sajid M (2003). Functional expression and characterization of Schistosoma mansoni cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131, 65–75.

Sajid M, McKerrow JH (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1–21.

- Salter JP, Choe Y, Albrecht H, Franklin C, Lim KC, Craik CS, McKerrow JH (2002).** Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 24618–24624.
- Sanyal A, O’Driscoll SW, Bolander ME, Sarkar G (1997).** An effective method of completely removing contaminating genomic DNA from an RNA sample to be used for PCR. *Mol. Biotechnol.* 8, 135–7.
- Sattmann H, Hörweg C, Gaub L, Feix AS, Haider M, Walochnik J, Rabitsch W, Prosl H (2014).** Wherefrom and whereabouts of an alien: The American liver fluke *Fascioloides magna* in Austria: An overview. *Wien. Klin. Wochenschr.* 126, 23–31.
- Shin H-R, Oh J-K, Masuyer E, Curado M-P, Bouvard V, Fang Y-Y, Wiangnon S, Sripa B, Hong S-T (2010).** Epidemiology of cholangiocarcinoma: an update focusing on risk factors. *Cancer Sci.* 101, 579–85.
- Skelly PJ, Shoemaker CB (2001).** *Schistosoma mansoni* proteases Sm31 (cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae. *J. Parasitol.* 87, 1218–1221.
- Smith AM, Dalton JP, Clough KA, Kilbane CL, Harrop SA, Hole N, Brindley PJ (1994).** Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 11–19.
- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP (1993).** Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 1–8.
- Smith RE, Spithill TW, Pike RN, Meeusen ENT, Piedrafita D (2008).** *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Cloning and characterisation of 70 kDa heat-shock proteins reveals variation in HSP70 gene expression between parasite species recovered from sheep. *Exp. Parasitol.* 118, 536–542.
- Song S-M, Park J-H, Kim J, Kim S-I, Hong Y-C, Kong H-H, Chung D-I (2008).** Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitol. Int.* 57, 334–41.

- Speel EJ, Schutte B, Wiegant J, Ramaekers FC, Hopman a H (1992).** A novel fluorescence detection method for *in situ* hybridization, based on the alkaline phosphatase-fast red reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1299–1308.
- Spithill T, Dalton J (1998).** Progress in Development of Liver Fluke Vaccines. *Parasitol. Today* 14, 224–228.
- Stirewalt MA, Kruidenier FJ (1961).** Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. *Exp. Parasitol.* 11, 191–211.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000).** Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29, 332–7.
- Swales WE (1936).** Further studies on *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917, as a parasite of ruminants. *Can. J. Res.* 14d, 83–95.
- Swales WE (1935).** The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) the large liver fluke of ruminants, in Canada With observation on the bionomics of the larval stages and intermediate hosts, pathology of *Fascioloides magna* and control measures. *Can. J. Res.* 12, 177–215.
- Tanner M, Gancberg D, Di Leo a, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J (2000).** Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am. J. Pathol.* 157, 1467–1472.
- Ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L (2008).** Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 179–85.
- Tielens AG, van den Heuvel JM, van den Bergh SG (1984).** The energy metabolism of *Fasciola hepatica* during its development in the final host. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 301–7.

- Tielens AGM, van de Pas FAM, van den Heuvel JM, van den Bergh SG (1991).** The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 181–184.
- Timms AR, Bueding E (1959).** Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 14, 68–73.
- Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP (1999).** Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv. Parasitol.* 43, 161–266.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin S a, Orlando C (2002).** Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem.* 309, 293–300.
- Turabelidze A, Guo S, Dipietro L a (2010).** Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair Regen.* 18, 460–466.
- Van Balkom BWM, van Gestel RA, Brouwers JFHM, Krijgsveld J, Tielens AGM, Heck AJR, van Hellemond JJ (2005).** Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. *J. Proteome Res.* 4, 958–66.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008).** Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44, 619–626.
- Verity CK, McManus DP, Brindley PJ (1999).** Developmental expression of cathepsin D aspartic protease in *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1819–1824.
- Vignoles P, Novobilský A, Rondelaud D, Bellet V, Treuil P, Koudela B, Dreyfuss G (2006).** Cercarial production of *Fascioloides magna* in the snail *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasitol. Res.* 98, 462–7.

- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW (1998).** *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* 88, 85–94.
- Xu YZ, Dresden MH (1986).** Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Parasitol.* 72, 507–11.
- Yamasaki H, Mineki R, Murayama K, Ito A, Aoki T (2002).** Characterisation and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *Int. J. Parasitol.* 32, 1031–1042.
- Yang Y, Wen Y jun, Cai YN, Vallée I, Boireau P, Liu MY, Cheng SP (2015).** Serine proteases of parasitic helminths. *Korean J. Parasitol.* 53, 1–11.
- Yoshino TP, Lodes MJ, Rege AA, Chappell CL (1993).** Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 79, 23–31.
- Young ND, Hall RS, Jex AR, Cantacessi C, Gasser RB (2010).** Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnol. Adv.* 28, 222–31.
- Young ND, Jex AR, Cantacessi C, Hall RS, Campbell BE, Spithill TW, Tangkawattana S, Tangkawattana P, Laha T, Gasser RB (2011).** A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica*--biological and biotechnological implications. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1004.
- Zeraik AE, Rinaldi G, Mann VH, Popratiloff A, Araujo APU, DeMarco R, Brindley PJ (2013).** Septins of Platyhelminths: Identification, Phylogeny, Expression and Localization among Developmental Stages of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–14.
- Ziegler BL, Lamping C, Thoma S, Thomas CA (1992).** Single-cell cDNA-PCR: removal of contaminating genomic DNA from total RNA using immobilized DNase I. *Biotechniques* 13, 726–9.