

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



Katepsin L z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*)
Cathepsin L from the hard tick *Ixodes ricinus*

Bakalářská práce

Pavel Talacko

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

.....

Pavel Talacko

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Michaelu Marešovi, CSc. za ochotu a trpělivost při vedení této práce. Dále děkuji Mgr. Martinu Hornovi, CSc., Mgr. Jindřichu Srbovi a Mgr. Zuzaně Kovářové za cenné rady a nezištnou pomoc při řešení nejrůznějších problémů. V neposlední řadě děkuji všem ostatním členům laboratoře za vstřícnost a ochotu kdykoliv poradit.

Za posouzení práce děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc.

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
APS	peroxodisíran amonný
AMC	7-amido-4-methylkumarin
Boc	terc-butyloxykarbonyl
Bz	benzoyl
CA-074	[L-3-trans(propylkarbamoyl)oxiran-2-karbonyl]-L-isoleucyl-L-Prolin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DMK	diazomethylketon
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
E-64	N-[N-(L-3-transkarboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]agmatin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FPLC	"Fast protein liquid chromatography"
Hb	hovězí hemoglobin
HPLC	"High performance liquid chromatography"
HSA	lidský sérový albumin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
Ig	imunoglobuliny
IL	interleukin
kDa	kilodalton
M6P	manosa-6-fosfát
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
Na-Acetát	sodno-acetátový pufr
PEG	polyethylenglykol
PTH	fenylthiohydantoin
PVDF	polyvinyliden fluorid
pI	izoelektrický bod
RNA	ribonukleová kyselina

RP-HPLC	"Reversed phase HPLC"
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného
SGE	extrakt ze slinných žláz
SMMTS	S-methylmethanthiosulfonát
TEMED	N,N,N',N'tetramethylethyldiamin
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Z	benzyloxykarbonyl

Zkratky aminokyselin:

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová
C	Cys	cystein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	kyselina glutamová
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
L	Leu	leucin
K	Lys	lysin
M	Met	methionin
F	Phe	fenylalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin
V	Val	valin

Abstrakt

Klíšťata patří mezi významné parazity člověka, kteří přenášejí řadu patogenů. V Evropě je hlavním druhem klíště obecné *Ixodes ricinus* přenášející bakterii *Borrelia burgdorferi* (způsobující Lymfskou boreliosu) a vir klíšťové encefalitidy. Při trávení proteinů z krve hrají důležitou roli katepsinové proteasy v žaludku klíštěte. Tato práce se zabývá katepsinem L, který je znám jako významná cysteinová trávící proteasa klíšťat.

Byl připraven rekombinantní katepsin L z *I. ricinus*, který byl chromatograficky izolován z kultivačního media expresního systému *Pichia pastoris*. Izolovaný katepsin L byl charakterizován pomocí N-koncového proteinového sekvenování a pomocí značení fluorescenční aktivní značkou Green-DCG-04. Analýza substrátové a inhibiční specifity katepsinu L pomocí peptidových substrátů a inhibitorů prokázala Z-FR-AMC jako vhodný substrát s pH optimem 3,5 a Z-FF-DMK jako účinný inhibitor. Byla zjištěna schopnost katepsinu L degradovat proteinové substráty HSA a hemoglobin v silně kyselém prostředí (pH 3,5-4,5).

Proteolytická aktivita se stejnými charakteristikami jako byly určeny u rekombinantního katepsinu L byla identifikována v extraktu ze slinných žláz a ve slinách klíštěte *I. ricinus*. Jde o první nález katepsinové proteasy ve slinách klíšťat. Lze předpokládat, že katepsin L sekretovaný do slin se může uplatnit při interakci klíštěte a hostitele.

Klíčová slova: cysteinové proteasy, katepsin L, klíště, *I. ricinus*, substrátová a inhibiční specifita, proteomické aktivní značení

Abstract

Ticks are globally important parasites involved in transmission of a wide variety of infectious agents. The most common tick species found in Europe is the hard tick *Ixodes ricinus*, which transmits bacterium *Borrelia burgdorferi* (a causative agent of Lyme disease) or tick-borne encephalitis virus. Cathepsin proteases are important in the process of digestion of blood proteins in the tick gut. This work is focused on cathepsin L, an important digestive cysteine protease of ticks.

Recombinant *I. ricinus* cathepsin L was expressed in *Pichia pastoris* and separated from the culture medium by chromatographic purification. N-terminal protein sequencing and labeling by activity-based probe Green-DCG-04 were used for characterization of purified cathepsin L. Substrate and inhibitor specificity were analyzed using peptide substrates and inhibitors. This analysis showed that Z-FR-AMC is a suitable substrate with pH optimum 3.5, and that Z-FF-DMK is an efficient inhibitor. It was demonstrated that cathepsin L cleaves protein substrates in strongly acidic environment (pH 3.5-4.5).

Cathepsin L-like proteolytic activity was demonstrated in salivary gland extract and in saliva of the *I. ricinus* tick. The presence of a cathepsin protease in tick saliva is reported here for the first time. This finding suggests that cathepsin L is secreted into the saliva and can be involved in tick-host interactions.

Key words: cysteine proteases, cathepsin L, tick, *I. ricinus*, substrate and inhibitor specificity, proteomic activity-based labeling

(In Czech)

Obsah

Seznam zkratk	4
Abstrakt	7
Abstract	8
Obsah	9
1. Krev sající parazit	12
1.1. Klíšťata	12
1.1.1. Taxonomické zařazení klíšťat	12
1.1.2. Životní cyklus klíšťat	13
1.1.3. Zdroj živin	14
1.1.4. Interakce mezi klíštětem a hostitelem	14
1.1.4.1. Protizánětlivé působení a ovlivnění imunitní odpovědi hostitele	15
1.1.4.2. Ovlivnění krevní srážlivosti	16
1.1.5. Přenos patogenů	17
1.2. Proteolytické systémy u klíšťat	18
1.2.1. Proteasy ve slinách	18
1.2.2. Trávicí proteolysa	19
1.3. Proteolytické enzymy	19
1.3.1. Klasifikace proteas	20
1.3.1.1. Serinové proteasy	20
1.3.1.2. Aspartátové proteasy	20
1.3.1.3. Metaloproteasy	21
1.3.1.4. Cysteinové proteasy	21
1.3.1.4.1. Mechanismus katalýzy	21
1.3.1.4.2. Substrátová specifita	23
1.3.1.4.3. Struktura	23
1.3.1.4.4. Rozdělení cysteinových proteas	24
1.3.1.4.5. Inhibitory cysteinových proteas	26
1.3.1.4.6. Katepsin L	27
2. Cíl práce	30
3. Materiál a metody	30
3.1. Materiál	30

3.1.1.	Rekombinantní katepsin L a biologické materiály	30
3.1.2.	Chemikálie	31
3.1.2.1.	Pufry	31
3.1.2.2.	Substráty	31
3.1.2.3.	Inhibitory	31
3.1.2.4.	Ostatní chemikálie.....	32
3.2.	Přístroje a vybavení	33
3.3.	Metody	35
3.3.1.	Chromatografické metody	35
3.3.1.1.	Gelová chromatografie	35
3.3.1.2.	Iontoměničová chromatografie na koloně Mono S.....	35
3.3.2.	Precipitační metody.....	36
3.3.2.1.	Acetonová precipitace proteinů	36
3.3.3.	Příprava extraktu ze slinných žláz klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	36
3.3.4.	Analytické metody	36
3.3.4.1.	Stanovení obsahu proteinů ve vzorku	36
3.3.4.2.	Degradace proteinových substrátů rekombinantním..... katepsinem L	37
3.3.4.3.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS	37
3.3.4.4.	Tricinová elektroforéza	38
3.3.4.5.	Přenos proteinů na membránu	38
3.3.4.6.	Určení N-koncové sekvence aminokyselin	39
3.3.4.7.	Značení pomocí aktivitní fluorescenční značky	39
3.3.4.8.	Stanovení enzymové aktivity.....	39
3.3.4.8.1.	Závislost enzymové aktivity na pH	40
3.3.4.8.2.	Určení inhibiční specifity.....	40
3.3.4.8.3.	Určení substrátové specifity.....	41
4.	Výsledky	42
4.1.	Charakterizace proteolytické aktivity v biologických materiálech	42
4.1.1.	Extrakt ze slinných žláz klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	42
4.1.1.1.	Závislost proteolytické aktivity na pH	42
4.1.1.2.	Inhibiční specifita proteolytické aktivity.....	43
4.1.2.	Sliny z klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	44

4.1.2.1.	Závislost proteolytické aktivity na pH	44
4.1.2.2.	Inhibiční specifita proteolytické aktivity.....	44
4.1.2.3.	Značení katepsinu L aktivní fluorescenční značkou.....	45
4.2.	Rekombinantní katepsin L z klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	46
4.2.1.	Izolace z produkčního systému v kvasince <i>Pichia pastoris</i>	46
4.2.1.1.	Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie	46
4.2.1.2.	Purifikace katepsinu L pomocí iontoměničové chromatografie.....	46
4.2.2.	Biochemické vlastnosti rekombinantního katepsinu L	48
4.2.2.1.	Závislost proteolytické aktivity na pH	48
4.2.2.2.	Substrátová specifita	48
4.2.2.3.	Inhibiční specifita.....	49
4.2.2.4.	Značení katepsinu L aktivní fluorescenční značkou.....	50
4.2.2.5.	Degradace proteinových substrátů.....	51
4.2.2.5.1.	Časová závislost degradace proteinových substrátů.....	51
4.2.2.5.2.	Závislost degradace proteinových substrátů na pH.....	52
4.2.3.	Určení N-koncové aminokyselinové sekvence katepsinu L.....	53
5.	Diskuse	54
6.	Závěr.....	57
	Seznam použité literatury	59

1. Krev sající parazité

Parazit je organismus, který získává živiny z jiného organismu – hostitele.

Krev sající parazit je získává z krve svého hostitele. Tato práce se zabývá parazity žijícími vně hostitele (ektoparazité), jejichž typickými zástupci jsou kromě klíšťat například veš, blecha nebo komár. Většinou svým sáním způsobují kožní reakce (dermatitidy), svědění a jejich medicínální význam je zejména v přenosu nebezpečných patogenů.

Příjem potravy zahrnuje vyhledání hostitele, nasátí jeho krve a následně trávení živin, které u klíšťat probíhá zejména intracelulárně v buňkách střevní tkáně. Pro vyhledání hostitele parazit využívá vedle infračerveného záření pachové a optické stimuly. Také se orientuje podle gradientu oxidu uhličitého v jeho okolí. Sání může probíhat minuty až desítky minut, u klíšťat i dny.

Rozeznáváme parazity solenofágní a thelmofágní. Solenofágní parazité sají krev přímo z cévy tak, že svým ústním ústrojím vytvoří podtlak. Patří sem vši, ploštice, blechy a komáři. Thelmo-fágní parazité sají z drobných hematomů vytvořených krví vylitou z poškozených cév. Řadíme sem například muchničky, klíště nebo ovády.¹

1.1. Klíšťata

Patří mezi obligátní parazity, což znamená, že hostitele potřebují pro svůj vývoj.¹

1.1.1. Taxonomické zařazení klíšťat

Nadříše: *Eukarya*

Říše: *Animalia* (živočichové)

Kmen: *Athropoda* (členovci)

Třída: *Chelicerata* (klepítkatci)

Řád: *Acarina* (roztoči)

Podřád: *Ixodida* (klíšťata)

Čeleď: *Ixodidae* (klíšťovití)

Argasidae (klíšťákovití)



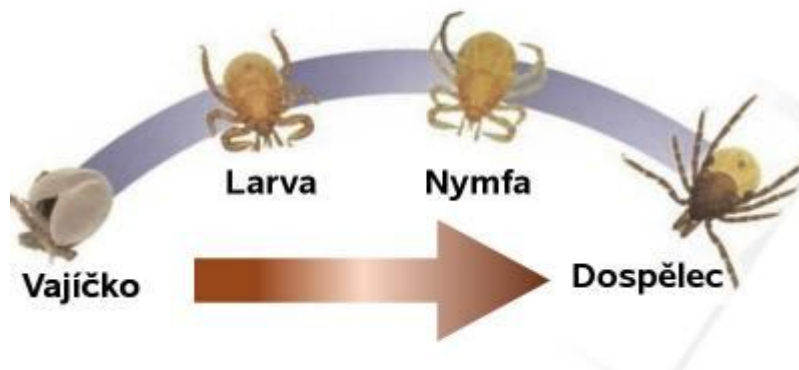
Obr. 1.1.1.: Klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Převzato z²

Do čeledi *Ixodidae* je přiřazeno 683 druhů. Představuje tak 80% z celkového počtu 867 druhů tvořících podřád *Ixodida*. Nejvýznamnějším rodem čeledi *Ixodidae* je rod *Ixodes* zahrnující 241 druhů. Klíšťata rodu *Ixodes* procházejí tříhostitelským životním cyklem a jen několik druhů je přizpůsobeno pro parazitování na větších savcích. Jedním z nejznámějších zástupců tohoto rodu je klíšťe obecné *Ixodes ricinus* (obr. 1.1.1. str. 12).³

1.1.2. Životní cyklus klíšťat

Podle počtu hostitelů, které klíšťe během svého životního cyklu vystřídá, rozeznáváme klíšťata jednohostitelská, dvouhostitelská a tříhostitelská. Jednohostitelská klíšťata sají ve všech stádiích na jednom hostiteli aniž by ho opouštěla a metamorfózu prodělávají na hostiteli. U dvouhostitelských klíšťat saje larva na jednom hostiteli, přeměňuje se na něm v nymfu, která se po nasátí pouští a vyhledává druhého hostitele, který může a nemusí být stejného druhu jako hostitel první. Larvy tříhostitelských klíšťat se po nasátí na prvním hostiteli pouští, přeměňují se v nymfu, která saje na druhém hostiteli a poté opět odpadá a dospívá. Dospělec (imago) pak vyhledává třetího hostitele (obr. 1.1.2.).³

Páření probíhá obvykle na hostiteli. Samička dospělce se následně nasaje, samec již nesaje. Nasátá samička pak v závislosti na druhu produkuje 1000 až 18 000 vajíček a následně hyne.² Počet vajíček je nejvyšší u klíšťat prodávajících tříhostitelský cyklus. Nejmenší je naopak u jedinců s jednohostitelským cyklem. Dospělý samec může na hostiteli vydržet i několik měsíců.³ Před každým sáním může mít klíšťe půl roku až rok klidové stadium, kdy nesaje. Celý cyklus trvá od jednoho roku do tří let.⁴



Obr. 1.1.2.: Životní cyklus klíšťete. Převzato z⁴

1.1.3. Zdroj živin

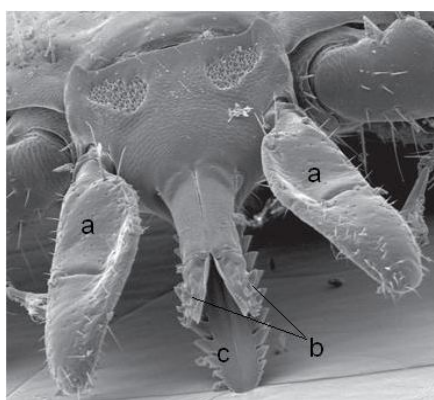
Živiny získává klíště z krve hostitele. Sání klíštěte trvá i několik dní a objem nasáté krve může přesáhnout jeden mililitr. Nasátá krev je nejprve zahuštěna tak, že objem nasáté krve se během několika desítek minut zmenší asi na třetinu. Následuje hemolýza erythrocytů a trávení proteinů hydrolytickými enzymy, které je štěpí na jednotlivé aminokyseliny, které jsou dále použity v metabolismu. ¹

Z proteinů je v krvi nejvíce zastoupen hemoglobin v červených krvinkách, který je hlavním zdrojem proteinů pro krev sající parazity. Fragменты získané degradací hemoglobinu navíc klíštěti mohou sloužit jako obranné molekuly vzhledem k jejich antimikrobiální aktivitě. ⁵

1.1.4. Interakce mezi klíštětem a hostitelem

Aby klíště zvýšilo pravděpodobnost setkání s hostitelem, vylézá na vegetaci, kde zaujímá vyčkávací polohu s roztaženým předním párem nohou. Po setkání s hostitelem a vyhledání vhodného místa pro sání klíště nejprve pomocí chelicer proniká skrz kůži hostitele a následně vsouvá hypostom (ozubený „sosák“) (obr. 1.1.4.). Poté se klíště upevní v ráně vyloučením tzv. cementové vrstvy proteinové povahy. ¹

Kromě sání krve klíště také do rány vstříkne sliny, které obsahují koktejl nízkomolekulárních a proteinových molekul. Tyto látky svojí biologickou aktivitou ovlivňují hemostatické a zánětlivé procesy hostitele a jeho imunitní odpověď ve prospěch parazita. ⁷



Obr. 1.1.4.: Ústní ústrojí klíštěte zobrazené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Po stranách roztažené palpy (a), uprostřed chelicery (b) a ozubený hypostom (c). Upraveno podle ⁶

1.1.4.1. Protizánětlivé působení a ovlivnění imunitní odpovědi hostitele

Důležitým prozánětlivým mediátorem je histamin. Má vazodilatační účinky a je jednou z příčin alergických reakcí. Je vylučován mastocyty, bazofily a krevními destičkami, jejichž degranulace je vyvolávána aktivací receptorů pro IgE.⁸ Ve slinách klíšťat jsou přítomny proteiny strukturně příbuzné lipokalinům (struktura beta soudku, váží malé, hydrofobní molekuly) – histakaliny. Jsou to proteiny schopné vázat histamin a znemožňovat tak jeho působení jako prozánětlivého mediátoru.^{9, 10}

Dalším důležitým obranným nástrojem hostitele je komplement. Komplement je složkou humorální imunity a aktivuje se dvěma možnými způsoby označovanými jako klasická a alternativní cesta. Výsledkem je tvorba proteinového komplexu způsobujícího penetraci cytoplazmatické membrány patogenu nebo napadené buňky a produkce prozánětlivých a chemotaktických faktorů (C3a, C5a). Aktivace komplementu je jedna z prvních reakcí imunitního systému hostitele po napadení klíštětem, a představuje hrozbu jak pro klíště samotné, tak pro patogeny klíštětem přenášené.¹¹

Pro klíště je tedy nezbytné zabránit aktivaci komplementu. Pokusy s extrakty slinných žláz (SGE) některých druhů klíšťat skutečně prokázaly schopnost inhibovat komplement.

Například u extraktu ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus* byla zjištěna schopnost modifikovat C3 protein, který poté tvoří neaktivní formu C3 konvertasy, která je důležitou složkou alternativní cesty aktivace komplementu.^{12, 13}

Do hemolymfy klíštěte se přes střevní stěnu vstřebávají i imunoglobuliny třídy IgG, které mohou být pro klíště nebezpečné. Tyto protilátky jsou v hemolymfě vázány na tzv. imunoglobuliny vázící proteiny (Imunoglobulin Binding Proteins) a převedeny do slinných žláz, odkud jsou exkretovány do hostitele.¹⁴ Z toho mohou profitovat různé patogeny přenášené klíštětem, které tak nejsou ohroženy specifickými protilátkami.¹¹

Aktivaci buněčné imunitní odpovědi hostitele se klíště brání produkcí molekul schopných vázat cytokiny. Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému. Mnoho klíšťat se tak brání účinku neutrofilů vázáním interleukinu 8 (IL-8), který je jejich hlavním chemotaktickým faktorem. Anti IL-8 aktivita byla prokázána jak u extraktu ze slinných žláz, tak u samotných slin několika druhů čeledi *Ixodidae*.¹⁵ V přítomnosti SGE nebo slin byla snížena i produkce interleukinu 2 (IL-2) lymfocyty. Tento účinek byl přiřazen tzv. IL-2 vázajícímu proteinu (IL-2BP). IL-2 je jedním z hlavních autokrinních faktorů důležitých

pro růst a proliferaci TH₁ lymfocytů a snížením jeho vylučování se tak klíště brání aktivaci imunitní odpovědi založené na těchto buňkách.^{16, 11}

1.1.4.2. Ovlivnění krevní srážlivosti

Hemostatický systém zahrnuje tři základní způsoby, jak zabránit úniku krve: vazokonstrikce, agregace krevních destiček a aktivace koagulační kaskády. Všechny tyto děje spolu úzce souvisejí. Pro úspěšné sání klíštěte je nezbytné tyto děje omezit.⁷

Vazokonstrikce

Vazokonstrikce je ovlivňována zejména serotoninem a tromboxanem A₂ (metabolit kyseliny arachidonové). Jejím výsledkem je snížení krevního toku v cévě. Ve slinách klíšťat jsou přítomny vazodilatátory lipidové povahy, které aktivací adenylátcyklasy (respektive guanylátcyklasy) způsobí zvýšení intracelulární koncentrace cAMP (resp. cGMP), což vyústí ve svalovou relaxaci. Patří sem například prostacyklin nebo prostaglandin E₂, které byly nalezeny u druhu *I. dammini* resp. *I. scapularis*.^{7, 17}

Agregace krevních destiček

Aktivace krevních destiček (trombocytů) může být způsobena interakcí s kolagenem, thrombinem, tromboxanem A₂ a ADP. Po aktivaci trombocytů dochází k jejich agregaci a produkci vazokonstrikčních látek.

Ve slinách klíšťat jsou přítomny látky, které jsou schopny zabraňovat agregaci destiček a jejich interakci s fibrinovou sítí.⁷ Agregaci krevních destiček zabraňuje například enzym apyrasa, který znemožňuje stimulaci agregace pomocí ADP tím, že štěpí fosfodiesterovou vazbu adenosin tri a difosfátů. Tento enzym byl nalezen například ve slinách *Ornithodoros savignyi*.^{7, 18, 19}

Koagulační kaskáda

Koagulační kaskáda je spouštěna při poranění a výsledkem řady enzymatických reakcí je aktivace prothrombinu na thrombin, který štěpí fibrinogen na aktivní fibrin. Fibrin polymeruje a tvoří síť fibrinových vláken, která utvoří krevní sraženinu a poskytne oporu „zátku“ z krevních destiček.²⁰

Ve slinách klíšťat je přítomno mnoho molekul, které jsou schopny zabránit aktivaci koagulační kaskády. Děje se to zejména znemožněním aktivace prothrombinu. Existují ale i inhibitory různých dalších faktorů koagulační kaskády (např. VIIa, Xa). Tyto faktory patří mezi serinové proteasy a jsou inhibovány inhibitory Kunitzova typu.²¹

1.1.5. Přenos patogenů

Klíšťata přenášejí řadu patogenních mikroorganismů jako jsou prvoci, riketsie, spirochéty a viry. Tyto patogeny způsobují infekční onemocnění, z nichž nejrozšířenější je pravděpodobně lymská boreliosa a klíšťová encefalitida.

K přenosu patogenů a propuknutí infekce významně pomáhá chemické složení slin klíšťat. Bylo prokázáno, že infekčnost patogenů v přítomnosti SGE je mnohem vyšší. Jedná se o tzv. slinami aktivovaný přenos.^{11,7}

Lymská boreliosa

Lymská boreliosa je způsobena spirochétami *Borrelia burgdorferi*. V Evropě je tato bakterie přenášena zejména díky druhům *I. ricinus*, *I. hexagonus* a *I. uriae*.²² Hlavním rezervoárem *B. burgdorferi* (rezervoárem se rozumí organismus, ze kterého se při sání nakazí neinfikované klíště) v Evropě jsou ptáci a malí savci, jako hraboš nebo plch obecný. V Severní Americe je to zejména křečik dlouhoocasý.

Onemocnění bylo pojmenováno podle obce Lyme ve státě Connecticut v USA, kde byla choroba poprvé popsána. V místě sání klíštěte se nejprve asi 7-10 dní od sání objeví rudý pupen, který se postupně zvětšuje (*Erythema chronicum migrans*; obr. 1.1.5.). Po rozšíření bakterie krví hostitele se zarudlá místa objevují i na jiných částech těla, dochází ke zvětšování uzlin a mohou se vyskytnout karditidy, lymfocytická meningitida a poškození muskuloskeletárního systému.^{23,24}



Obr. 1.1.5.: *Erythema chronicum migrans*. Převzato z²⁵

Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida je onemocnění virového původu způsobené virem klíšťové encefalidity. Poprvé byl virus popsán australanem Shneiderem v roce 1931.

Tento RNA virus patří mezi flaviviry a napadá centrální nervový systém. Existují dva typy tohoto viru – východní a západní, které se mírně odlišují průběhem onemocnění. Hlavním rezervoárem jsou malí hlodavci a vektorem pro přenos je klíště. Za přenos na člověka jsou zodpovědné druhy *I. persulcatus* a *I. ricinus*. Inkubační doba viru v hostiteli klíštěte je obvykle 7-14 dní. Poté se infekce projeví horečkou, bolestmi hlavy, nevolnostmi, zvracením. Dochází k zánětu mozkových blan, meningoencefalitidě a meningoencefalomyelitidě.^{26,27}

1.2. Proteolytické systémy u klíšťat

1.2.1. Proteasy ve slinách

Ve slinách klíšťat byla pomocí knihovny komplementární DNA (cDNA knihovny) slinných žláz prokázána přítomnost metaloproteas patřících do rodiny reprotolysinu. Tyto enzymy jsou podobné metaloproteasám stejné rodiny obsažených v hadím jedu.²⁸ Charakteristickým strukturním znakem těchto proteas je přítomnost zinek vázající katalytické domény a zbytku methioninu vzdáleného od počátku této domény asi 25 aminokyselin. U těchto metaloproteas byla pozorována fibrinolytická a želatinasová aktivita. Taková aktivita spirochétám *B. burgdorferi* usnadňuje průnik do hostitele. Dále fibrinolysou zabraňují tvorbě krevní zátky, která by klíštěti znemožnila sání.²⁹

Dalším proteolytickým enzymem nalezeným ve slinných žlázách klíštěte *Boophilus microplus* je metaloendopeptidasa schopná štěpit bradykinin díky své kininasové aktivitě. Bradykinin je biologicky aktivní nonapeptid uplatňující se v regulaci krevního tlaku a rozvoji zánětlivé odpovědi imunitního systému. Tento enzym je aktivován v přítomnosti thiolových skupin a iontů kovů, z nichž nejvýraznějším aktivátorem je Mn^{2+} .³⁰

1.2.2. Trávicí proteolysa

Trávení u klíšťat probíhá převážně intracelulárně. Díky tomu je v lumenu střeva přítomno minimum proteas, což představuje vhodné prostředí pro přežití různých patogenů.^{7,31}

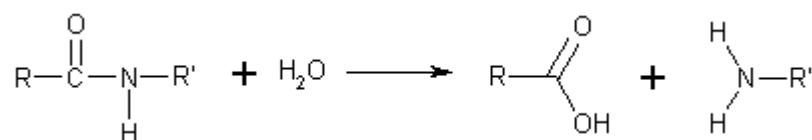
Ve střevní tkáni klíšťat i ostatních krev sajících parazitů byla nalezena řada proteas sloužících převážně k degradaci hemoglobinu. Hemoglobin je řadou proteas rozštěpen na malé peptidové fragmenty, které mohou být dále využity v metabolismu. Například u druhu *I. ricinus* byla zjištěna přítomnost cysteinových proteas papainového typu - katepsinu L, B a C, dále aspartátové proteasy katepsinu D a asparaginylní endopeptidasy (legumainu). Podobné složení trávicích proteas je přítomno i ve střevních tkáních krevniček *Schistosoma japonicum* a *Schistosoma mansoni*. Většina těchto enzymů je schopná degradovat hemoglobin v kyselé oblasti pH. Míra exprese těchto enzymů je značně zvýšena v průběhu sání a po nasátí klíštěte, kdy klíště tráví nasáté živiny.^{31, 32}

Nicméně u krev sajících parazitů byla popsána i přítomnost serinových proteas, které byly navíc sekretovány do lumen střeva. Tyto proteasy jsou podobné trypsinu a chymotrypsinu, ale mají pH optimum v kyselé oblasti kolem hodnoty pH 5. Byla u nich zjištěna hemolytická aktivita. Sekrece byla však výrazně zvýšena až asi po 96 hodinách po nasátí.³³

1.3. Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy (proteasy, proteinasy, peptidasy) jsou enzymy, které katalyzují štěpení peptidové vazby (obr. 1.3. str. 20). Patří mezi hydrolytické enzymy, což jsou enzymy katalyzující štěpení vazeb za účasti molekuly vody.

Ke štěpení může docházet od konce polypeptidového řetězce a enzymy provádějící toto štěpení se nazývají exopeptidasy. Podle toho, zda štěpí od N-koncové nebo C-koncové aminokyseliny, rozlišujeme aminopeptidasy respektive karboxypeptidasy. Enzymy štěpící na určitých místech uvnitř řetězce se nazývají endopeptidasy.³⁴



Obr. 1.3.: Schematický popis hydrolýzy peptidové vazby katalyzované proteasami. Upraveno podle ³⁴

1.3.1. Klasifikace proteas

Podle toho, jakým mechanismem dochází ke štěpení peptidové vazby v aktivním místě enzymu, rozdělujeme proteasy do čtyř hlavních skupin.

1.3.1.1. Serinové proteasy

Jsou nejvíce prozkoumanou skupinou proteolytických enzymů. Patří sem například trávicí enzymy jako trypsin, chymotrypsin nebo elastasa. Jejich charakteristickým znakem je aktivní místo ve tvaru prohlubně na povrchu enzymu. Jak název napovídá, klíčovou roli při štěpení peptidové vazby má zbytek serinu v aktivním místě. Dalším typickým znakem je přítomnost katalytické triády Asp-His-Ser, po které je možné přenášet náboj z asparaginu uloženého uvnitř enzymu až na serin v aktivním místě. Jedná se o tzv. nábojovou štafetu. Jako intermediát při štěpení vzniká kovalentně vázaný substrát na enzym. ³⁵

1.3.1.2. Aspartátové proteasy

Do této skupiny enzymů patří například žaludeční trávicí enzymy pepsin a chymosin. Tyto proteasy mají pH optimum převážně v kyselé oblasti. Katalytické místo je tvořeno dvěma karboxyly, z nichž jeden je donorem protonu, a druhý, v karboxylátové formě, působí jako nukleofil. Nedochozí zde k tvorbě kovalentního intermediátu, neboť se jedná o čistě acidobazický mechanismus katalýzy. ³⁵

1.3.1.3. Metaloproteasy

Pro tyto proteasy je typická tvorba komplexu s iontem kovu, který je nezbytný pro správnou funkci aktivního místa. Patří sem například karboxypeptidasa A štěpící polypeptidový řetězec od C-konce nebo leucinaminopeptidasa štěpící naopak od N-konce.³⁵

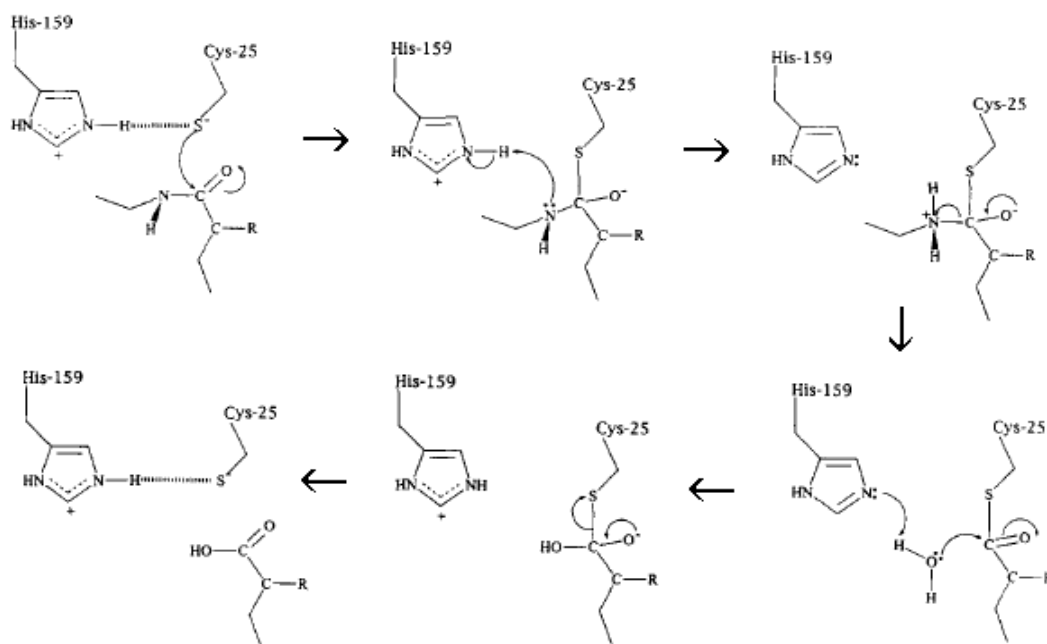
1.3.1.4. Cysteinové proteasy

Cysteinové proteasy hrají důležitou úlohu v intracelulární degradaci proteinů v lysosomech. Lysosom je jednomembránová organela obsahující velké množství proteolytických enzymů, z nichž většinu tvoří právě cysteinové proteasy. Proteolýza zde probíhá za nízkého pH a výsledkem štěpení jsou dipeptidy a aminokyseliny, které difundují přes lysosomální membránu a jsou tak k dispozici pro další metabolismus.^{36, 37}

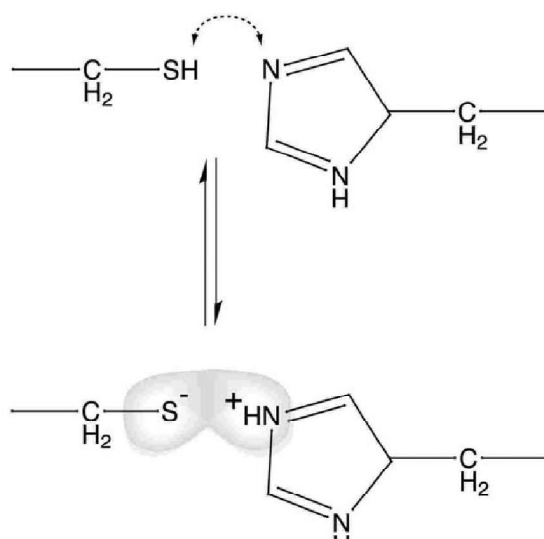
1.3.1.4.1. Mechanismus katalýzy

Mechanismus působení cysteinových proteas je podobný mechanismu proteas serinových, jen jako nukleofil v aktivním místě nepůsobí hydroxyl serinu, nýbrž thiolová skupina cysteinu, podle které jsou tyto proteasy pojmenovány. Cystein v aktivním místě hraje klíčovou roli v reakčním mechanismu, kdy jako nukleofil napadá karbonylový uhlík peptidové vazby. Poté vzniká tetraedrický intermediát, kdy je uhlíkový atom štěpené peptidové vazby kovalentně navázán thioesterovou vazbou na enzym přes atom síry cysteinu (obr. 1.3.1.4.1. a str. 22).³⁸

Nukleofilita thiolové skupiny je dále zvyšována interakcí s prostorově blízkým zbytkem histidinu. Histidin zde působí jako akceptor protonu a vzniká tak imidazolium-thiolátový systém, který je v rovnováze s nenabitými formami těchto zbytků (obr. 1.3.1.4.1. b str. 22). Jedná se o takzvanou katalytickou diádu.⁴⁰



Obr. 1.3.1.4.1.a: **Mechanismus štěpení peptidové vazby cysteinovými proteasami.** Upraveno podle ³⁹



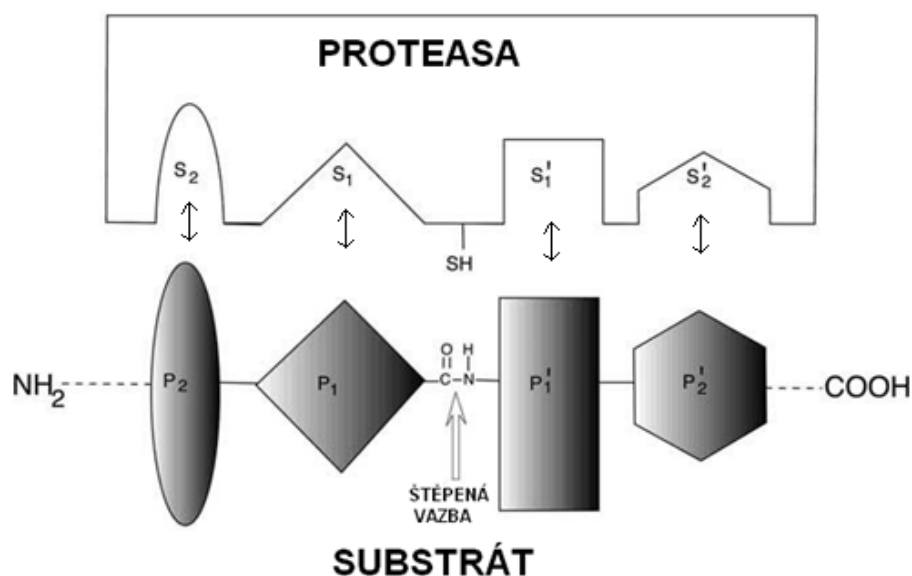
Obr. 1.3.1.4.1.b: **Katalycká diáda.** Zobrazena je rovnováha nenabitých forem cysteinu a histidinu s ionizovanými formami. Šedě je označena oblast oblaku delokalizovaných elektronů. Převzato z ⁴⁰

Vznikající tetraedrický intermediát obsahující oxyanion je stabilizován zbytkem glutaminu. Vytváří se takzvaná oxyaniontová jáma. Tento způsob stabilizace však není pro katalýzu naprosto nezbytný, jak tomu je u serinových proteas, nicméně zvyšuje se tak efektivita enzymu. ⁴¹

1.3.1.4.2. Substrátová specifita

Před štěpením peptidové vazby musí nejprve dojít k vazbě substrátu do aktivního místa. Efektivita navázání substrátu je ovlivněna jak chemickým prostředím v daném místě, které je tvořeno zbytky aminokyselin daného enzymu, tak vlastnostmi substrátu. Mezi důležité vlastnosti ovlivňující vazbu substrátu do aktivního místa patří velikost substrátu a aktivního místa a celkově přístupnost štěpené peptidové vazby, dále polarita, rozložení nábojů a hydrofobicita.

Pro rozštěpení peptidové vazby je tak třeba mnoha interakcí mezi zbytky aminokyselin pro správnou fixaci substrátu. Nejdůležitější jsou obvykle interakce mezi dvěma zbytky předcházejícími štěpené peptidové vazbě a dvěma zbytky za touto vazbou, označované jako P_2 , P_1 resp. P_1' , P_2' pro aminokyseliny substrátu, kterým odpovídají vazebná podmísta označovaná S_2 , S_1 resp. S_1' , S_2' v aktivním místě enzymu (obr. 1.3.1.4.2.).⁴⁰



Obr. 1.3.1.4.2.: Důležité interakce mezi aminokyselinovými zbytky kolem štěpené vazby substrátu a aminokyselinami proteasy. Zobrazeny jsou interagující vazebná podmísta proteasy S_2 , S_1 resp. S_1' , S_2' a interagující aminokyseliny substrátu P_2 , P_1 resp. P_1' , P_2' . Šipkou je označena štěpená vazba. Upraveno podle⁴⁰

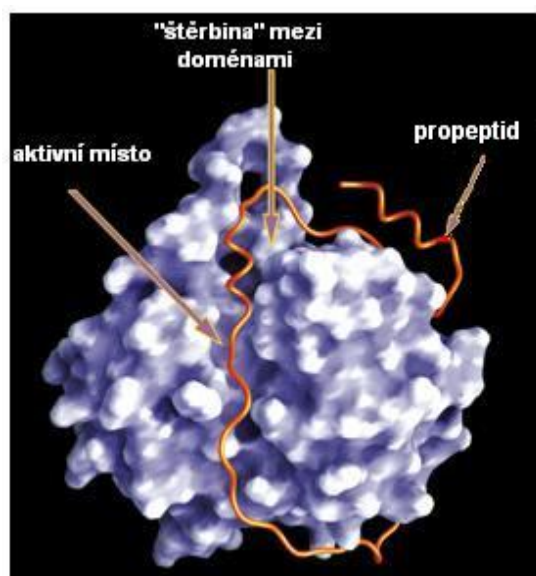
1.3.1.4.3. Struktura

Cysteinové proteasy sestávají ze dvou relativně velkých, globulárních domén. Mezi nimi se nachází oblast, ve které je lokalizováno aktivní místo (obr. 1.3.1.4.3. str. 24). Po

vstupu substrátu do této oblasti může, při jeho vhodné struktuře a orientaci, dojít ke štěpení peptidové vazby.³⁸

Cysteinové proteasy jsou syntetizovány jako neaktivní proenzymy o velikosti 37-55 kDa, které jsou dále transportovány do lysozomu a aktivovány. Aktivní formy jsou monomerní a mají molekulové hmotnosti v rozsahu 23-30 kDa (kromě katepsinu C, který se vyskytuje ve formě homotetrameru).^{37,42}

Součástí proenzymu je propeptid, který je při aktivaci od molekuly enzymu odstraněn proteolytickým štěpením, a zralý enzym tak nabývá svoji enzymovou aktivitu. Bylo ukázáno, že prosegmenty těchto enzymů působí efektivně jako jejich inhibitory a dále jsou důležité pro správné složení a transport nově syntetizovaného proteinu.⁴³⁻⁴⁶



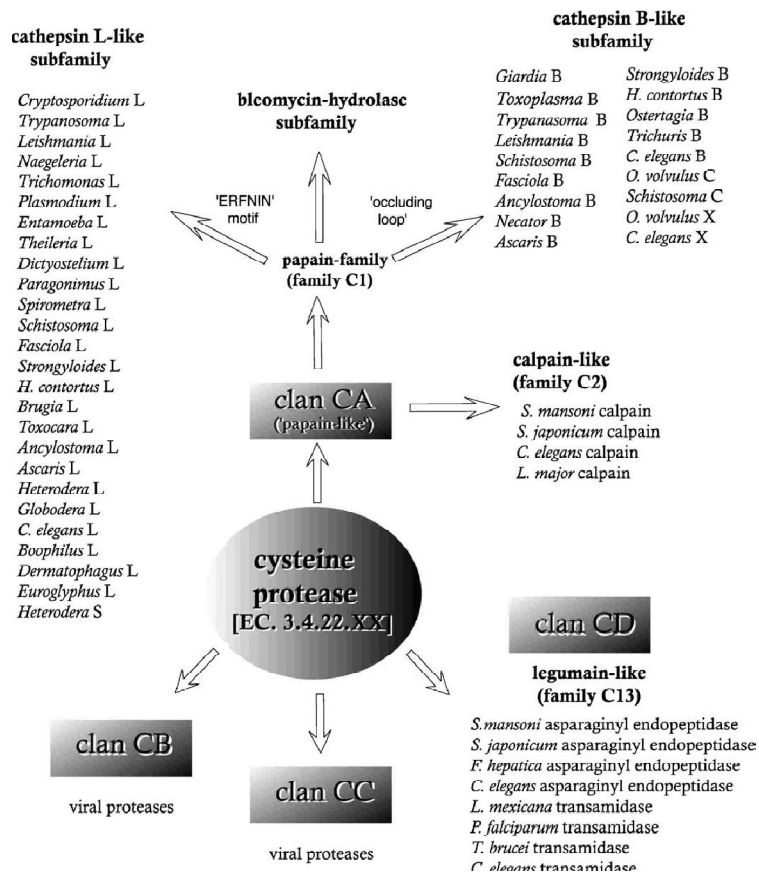
Obr. 1.3.1.4.3.: **Strukturální model katepsinu B.** Šipkami je označeno aktivní místo, propeptid a „štěrbina“ mezi levou a pravou doménou. Patrná je i flexibilní smyčka regulující přístup do aktivního místa (nahore). Upraveno podle⁴⁶

1.3.1.4.4. Rozdělení cysteinových proteas

Cysteinové proteasy se v závislosti na jejich struktuře rozdělují do dvou hlavních klanů (obr. 1.3.1.4.4. str. 25). Jedná se o klan CA (cysteinové proteasy papainového typu) a klan CD (cysteinové proteasy typu legumainu).

První se podařilo izolovat a purifikovat cysteinovou proteasu z rostliny *Carica papaya*, podle které byla pojmenována papain. Papain byl také první cysteinovou proteasou, jejíž prostorová struktura byla vyřešena. Klan proteas papainového typu se

podle strukturních charakteristik rozděluje do rodin C1 (rodina papainu) a C2 (rodina kalpainu), jejíž zástupci nejsou lokalizováni v lysosomu, ale v cytoplazmě. Papainová rodina se dále dělí na tři podrodiny - proteasy typu katepsinu B, proteasy typu katepsinu L a podrodinu bleomycin hydrolasy.^{40,47}



Obr. 1.3.1.4.4.: Rozdělení cysteinových proteas a jejich využití parazitickými organismy. Převzato z⁴⁰

Proteasy typu katepsinu L obsahují typický strukturní motiv zvaný ERFNIN (viz. níže). Pro proteasy typu katepsinu B je charakteristická přítomnost takzvané flexibilní smyčky, kterou ostatní typy cysteinových proteas postrádají, a jejíž přítomnost enzymu poskytuje dipeptidyl karboxypeptidasovou aktivitu. Proteasy obsahující tuto smyčku tak nemají pouze endopeptidasovou aktivitu, jako většina ostatních cysteinových proteas, ale zároveň i exopeptidasovou aktivitu.⁴⁰

1.3.1.4.5. Inhibitory cysteinových proteas

V této kapitole budou diskutovány dvě významné skupiny inhibitorů cysteinových proteas: endogenní proteinové inhibitory, které jsou přirozeně přítomny v živých organismech a hrají roli při regulaci proteolytické aktivity, a syntetické inhibitory.

Endogenní inhibitory

Existuje několik rodin endogenních inhibitorů cysteinových proteas, z nichž nejrozšířenější v savčích tkáních je cystatinová super rodina. Ta se dále dělí na rodinu stefinu, cystatinu a kininogenu.

Stefinové inhibitory jsou asi 100 aminokyselin dlouhé, neglykosylované polypeptidy postrádající disulfidové vazby. Inhibitory rodiny cystatinu jsou polypeptidové řetězce o velikosti 110-120 aminokyselin. Stejně jako stefiny jsou neglykosylované, ale obsahují dva disulfidické můstky.

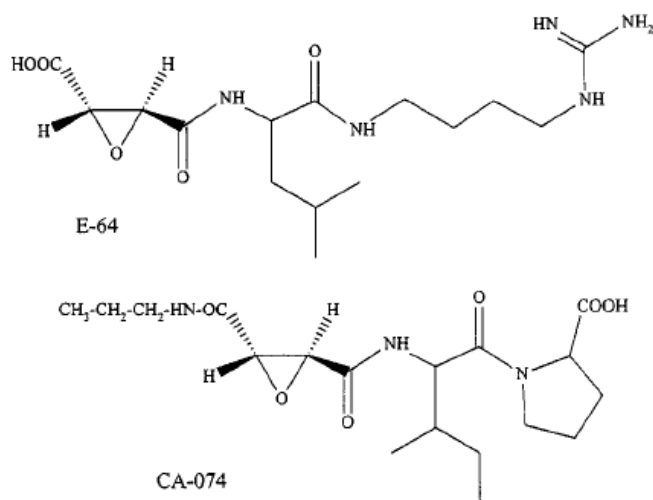
Kininogeny jsou skupina vysokomolekulárních proteinových inhibitorů cysteinových proteas. Rozdělují se na vysokomolekulární kininogen (120 kDa) a nízkomolekulární kininogen (50-80 kDa). Obsahují tři domény, z nichž každá sekvenčně odpovídá polypeptidovému řetězci cystatinů. Tyto tři domény tvoří spolu s dekapeptidem kininem N-terminální těžký řetězec, z kterého je po translaci odštěpen 18 aminokyselinový signální peptid. Tato část je společná pro oba typy kininogenů. Ty se od sebe liší lehkým C-terminálním řetězcem. Jedná se o glykosylované proteiny, které jsou prekurzory vasodilatačních peptidů bradykininu a kallidinu.⁴⁷

Nízkomolekulární syntetické inhibitory

Dělí se na alosterické inhibitory, které neinteragují přímo s aktivním centrem, a na inhibitory vážící se do aktivního místa. Ty se zde mohou vázat buď kovalentně nebo nekovalentně a interakce může být reversibilní nebo ireversibilní. Reversibilní inhibice se většinou objevuje u nekovalentních inhibitorů, zatímco ireversibilní inhibitory se vždy váží kovalentně a trvale tak zablokují enzym.

Syntetické inhibitory často obsahují peptidovou část, která slouží pro rozeznání a fixaci enzymem, a nukleofilní skupinu schopnou atakovat cysteinový zbytek v aktivním místě. Patří sem například syntetické deriváty mikrobiálních aldehydických inhibitorů - leupeptiny, chymostatiny nebo antipain.

Jinou významnou skupinou jsou epoxysukcinylové deriváty. Nejznámějším zástupcem této skupiny je E-64. Ten byl poprvé izolován v roce 1978 z extraktu kultury *Aspergillus japonicus*. Dalším inhibitorem patřícím do této skupiny je syntetický derivát CA-074, který je selektivním inhibitorem katepsinu B (obr. 1.3.1.4.5.).^{47,48}



Obr. 1.3.1.4.5.: **Struktura inhibitoru cysteinových proteas E-64 a selektivního inhibitoru katepsinu B CA-074.** Upraveno podle⁴⁷

1.3.1.4.6. Katepsin L

Katepsin L byl poprvé popsán v roce 1971, jako enzym izolovaný z krysích jaterních lysosomů, který je schopen degradovat proteiny.⁴⁹ V lidském organismu jsou jeho abnormální aktivity pozorovány při řadě patologií, jako například při vstřebávání kostní tkáně, kdy cysteinové proteasy hrají hlavní roli při degradaci mezibuněčného prostoru, nebo při rozvoji nádorových onemocnění.^{50,51}

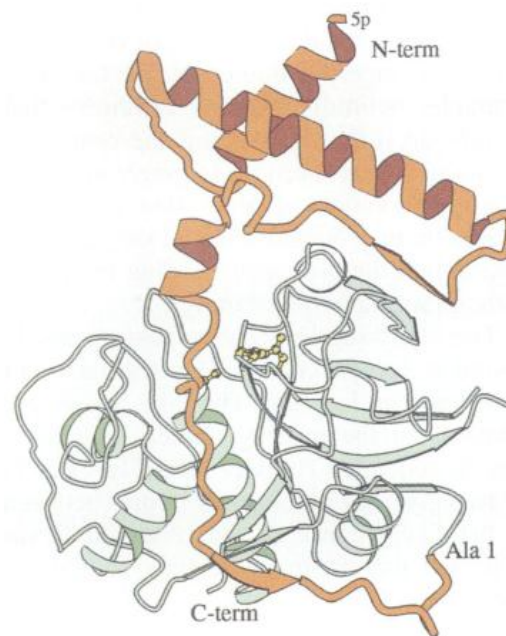
Katepsin L je nezbytný i pro antigenní prezentaci buněk thymu, kde je zodpovědný za štěpení invariantního řetězce při tvorbě komplexů glykoproteinů MHC (hlavní histokompatibilní komplex) druhé třídy s peptidovými fragmenty určenými k prezentaci na povrchu buňky.⁵²

Je členem klanu CA cysteinových proteas a je po něm pojmenována jedna z podrodin rodiny papainu. Pro proteasy typu katepsinu L (jsou to zejména katepsin S a K) je charakteristická substrátová specifita upřednostňující arginin v místě P₁ (obr 1.3.1.4.2 str. 23).

do Golgiho aparátu a odtud do lysozomu. Zde je pod vlivem kyselého pH přeměněn na aktivní formu.⁵⁵

Pro transport do lysozomu je důležitá posttranslační modifikace na N-vázaných oligosacharidech prokatepsinu L. V Golgiho aparátu jsou tyto oligosacharidy fosforylovány za vzniku manosa-6-fosfátového zbytku (M6P). Ten je rozeznáván M6P receptorem. Po vazbě prokatepsinu L na tento receptor se tvoří clathrinové vezikuly, které fúzí s endosomy. Disociace glykoproteinu od M6P receptoru je způsobena kyselým prostředím v endosomech.⁵⁶

Molekulová hmotnost zralého krysího katepsinu L se pohybuje kolem 23 kDa, isoelektrický bod různých forem se pohybuje od 5,8 do 6,1 a nejvyšší enzymovou aktivitu vykazuje okolo pH 5,0.⁵⁷



Obr. 1.3.1.4.6.b: **Trojrozměrný model katepsinu L.** Oranžově je zobrazen propeptid, žlutě jsou označeny katalytické aminokyseliny. Převzato z⁴³

2. Cíl práce

Klíště obecné *I. ricinus* je v Evropě nejvýznamnější druh klíštěte, který se účastní přenosu patogenů. Při sání klíště injikuje do hostitele sliny obsahující řadu biologicky aktivních látek, které ve výsledku umožní klíštěti úspěšný příjem krve. Při trávení proteinů z krve hrají důležitou roli katepsinové proteasy v žaludku klíštěte. Tato práce se zabývá katepsinem L, který je znám jako významná trávicí proteasa klíštěte, nicméně jeho přítomnost a funkce ve slinách klíštěte dosud nebyla studována.

Řešeny budou následující úkoly:

- Analyzovat pomocí biochemických metod proteolytickou aktivitu extraktu ze slinných žláz a slin klíštěte *I. ricinus* a zjistit, zdali tyto biologické materiály obsahují katepsin L.
- Vypracovat izolační postup pro katepsin L z *I. ricinus*, který byl produkován jako rekombinantní protein v expresním systému *P. pastoris*.
- Provést biochemickou charakterizaci tohoto rekombinantního katepsinu L, zejména určit pH optimum proteolytické aktivity a testovat substrátovou a inhibiční specifitu.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Rekombinantní katepsin L a biologické materiály

Rekombinantní prokatepsin L byl exprimován v kvasince *Pichia pastoris* a byl dodán ve formě lyofilizovaného kvasinkového media. Dále byly dodány vypreparované slinné žlázy a sliny klíštěte *Ixodes ricinus*. Vše bylo poskytnuto Dr. Petrem Kopáčkem, Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice.

3.1.2. Chemikálie

3.1.2.1. Pufry

Pufr pro ionexovou chromatografii:

nanášecí: 0,2 M sodno-acetátový (Na-Acetát), pH 4,0 10 x koncentrovaný

eluční: 0,2 M Na-Ac, pH 4,0; 1 M NaCl

Pufr pro degradaci proteinů:

0,1/0,2 M citrát-fosfát, pH 2,5 - 7,5

Pufr pro značení fluorescenční značkou:

0,1/0,2 M citrát-fosfát, pH 4,0

Pufr pro kinetická měření:

SGE: 0,1/0,2 M citrát -fosfát, pH 2,1 - 8,0

sliny: 50 mM Na-Ac pufr, pH 3,5 - 6,0

rekombinantní enzym: 0,1/0,2 M citrát-fosfát, pH 2,5 - 7,8

3.1.2.2. Substráty

Bachem, Švýcarsko:

Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (Boc-QAR-AMC); Bz-Phe-Val-Arg-AMC (Bz-FVR-AMC); Z-Phe-Arg-DMK (Z-FF-DMK); Z-Arg-Arg-AMC (Z-RR-AMC)

3.1.2.3. Inhibitory

Výrobce:

Sigma, USA

E-64

pepstatin

cílový enzym:

cysteinové proteasy

aspartátové proteasy

EDTA	metaloproteazy
Pefabloc	serinové proteazy

Bachem, Švýcarsko

CA-074	katapsin B
Z-FF-DMK	katapsin L

3.1.2.4. Ostatní chemikálie

Aktivitní značku Green-DCG-04 s navázanou fluorescenční skupinou Bodipy 530/55 poskytl Dr. M. Bogyo, Stanford University, USA.

Sigma, USA:

močovina, dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'tetramethyl ethylendiamin (TEMED), akrylamid, hovězí hemoglobin (Hb), lidský sérový albumin (HSA)

Fluka, Německo:

dithiotreitol (DTT), dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, N,N'methylenbisakrylamid, S-methylmethanthiosulfonát (SMMTS), polyethylenglykol (PEG), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS)

Serva, Německo:

Coomassie Brilliant Blue, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), peroxodisíran amonný (APS)

Lachema, ČR:

chlorid sodný, ethanol, hydroxid sodný, k. octová, methanol, bromfenolová modř

Penta, ČR:

glycerol

Hmotnostní standardy pro SDS PAGE:

Page Ruler Unstained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas, Lotyšsko

Hmotnostní standardy pro tricínovou elektroforézu:

Ultra Low Range Molecular Weight Marker - Sigma, USA

Vzorkový pufr pro Tricínovou elektroforézu:

Sample Buffer for SDS Ultra Low Molecular Weight Marker - Sigma, USA

3.2. Přístroje a vybavení

Analytické váhy AE 163 - Mettler, Švýcarsko

Předvážky Mettler Toledo - Mettler, Švýcarsko

Centrifugy:

Micro Centrifuge - Carl-Roth, Německo

Heraeus - Biofuge Fresco DJB Labcare, Velká Británie

Vakuová odparka Speed Vac Concentrator - Thermosavant, USA

Filtr Hydrophilic PES 0,22 µm - Millipore, USA

UltrafreeMC Microcentrifuge filter 0,22 µM - Millipore, USA

Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios - Tecan, Rakousko

Fluorescenční scanner Typhoon - GE Healthcare Life, Švédsko

pH metr pH Pracitronic MW 870 - Pracitronic, Německo

Termoblok - Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR

Vortex LTM2 - Vývojové dílny ČSAV

Vertikální elektroforéza - BioRad, USA

Blotovací zařízení - BioRad, USA

FPLC ÄKTA Explorer - GE Healthcare Life, Švédsko

proteinový sekvenátor Procise 491 - Applied Biosystems, USA

spektrofotometr Pye Unicam PU 8610 - Philips, UK

sonikátor Soniprep 150 - MSE, UK

konduktometr Dual Star - Thermo Scientific, USA

inkubátor QBD4 - Grant, UK

automatické pipety – Gilson, Francie

Kolony a nosiče:

MonoS HR 5/5 - GE Healthcare Life, Švédsko

Sephadex G25 - Amersham Biosciences, USA

Komerční soupravy:

BCA Protein Assay Kit - Thermo Scientific, USA

Ostatní vybavení:

Superloop 50 ml - GE Healthcare Life, Švédsko

polyviniliden fluoridová (PVDF) membrána - Millipore, USA

3.3. Metody

3.3.1. Chromatografické metody

3.3.1.1. Gelová chromatografie

V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6 g lyofilizovaného media z kvasinky *Pichia pastoris*. Tento roztok byl nanesen na kolonu Sephadex G25 ekvilibrovanou destilovanou vodou. Průtok kolonou byl $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a sbírány byly frakce o objemu 10 ml. Celý proces probíhal při teplotě 4°C . Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl monitorován měřením absorpance frakcí při 280 nm, obsah solí byl monitorován měřením vodivosti.

3.3.1.2. Iontoměničová chromatografie na koloně Mono S

K 50 ml proteinové frakce získané z media *P. pastoris* pomocí gelové chromatografie bylo přidáno 5 ml 0,2 M Na-Acetátového pufru pH 4 a dithiotreitol (DTT) na finální koncentraci 1 mM. Katepsin L se v této reakční směsi autoaktivoval 10 min při laboratorní teplotě, a poté byl přidán reverzibilní inhibitor cysteinových proteas S-methylmethanthiosulfonát (SMMTS; finální koncentrace 5 mM).⁶⁵ Pro navázání inhibitoru SMMTS byl roztok ponechán 10 min při laboratorní teplotě.

Tento materiál byl separován iontoměničovou chromatografií na koloně Mono S HR 5/5 pomocí FPLC. Pro chromatografii bylo použito pH 4, které bylo zvoleno podle teoretické hodnoty pI 5,22 vypočítané pro aktivní katepsin L.⁵⁹ Kolona byla ekvilibrována 5 ml nanášecího pufru. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta dalšími 5 ml nanášecího pufru a eluce katepsinu L byla prováděna pomocí elučního pufru s lineárním gradientem 1 M NaCl (1% za min). Sbírány byly 2 ml frakce, průtok byl $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Průběh separace byl monitorován měřením absorpance při 280 nm.

Složení pufrů:

Nanášecí pufr: 0,2 M Na-Acetátový pufr, pH 4

Eluční pufr: 0,2 M Na-Acetátový pufr, pH 4, 1 M NaCl

3.3.2. Precipitační metody

3.3.2.1. Acetonová precipitace proteinů

Při acetonové precipitaci byly ke vzorku přidány 4 objemy vychlazeného acetonu, čímž bylo dosaženo finální koncentrace acetonu 80%. Roztok se nechal stát 20 min při -20°C. Následně byl roztok centrifugován (16 000 x g, 10 min, 4°C) a po odsání supernatantu odpařen na vakuové odparce SpeedVac. Při přípravě pro elektroforézu na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (SDS PAGE) bylo k vzorku po vysušení přidáno 12 µl vzorkového pufru pro SDS PAGE a směs byla inkubována 5 min při 75°C. Tento postup byl použit pro přípravu vzorků pro SDS PAGE u značení proteas ve slinách pomocí aktivní značky Green-DCG-04 (kap. 3.3.4.7. str.39).

3.3.3. Příprava extraktu ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Ke slinným žlázám získaným preparací z 10 samic klíšťat nasátých 5 dní na morčeti bylo přidáno 250 µl extrakčního pufru (50 mM Na-Acetát, pH 4,5). Žlázy byly homogenizovány teflonovým pístem ve skleněném homogenizátoru při 4°C. Homogenizátor byl následně propláchnut 2 x 125 µl extrakčního pufru. Získaný vzorek byl sonikován 3 x 10 s pomocí sonikátoru Soniprep 150. Po sonikaci byl přidán detergent CHAPS o výsledné koncentraci 1%. Směs byla protřepána a centrifugována (15 min, 16 000 x g, 4°C) a poté byla provedena centrifugační filtrace supernatantu pomocí filtru Ultrafree Milipore 0,45 µm. Filtrát byl opět centrifugován (10 min, 10 000 x g, 4°C). Získaný supernatant byl skladován při -80°C.

3.3.4. Analytické metody

3.3.4.1. Stanovení obsahu proteinů ve vzorku

Pro stanovení obsahu proteinů ve vzorku byl použit BCA Protein Assay Kit. Tato metoda využívá schopnost proteinů redukovat ionty Cu^{2+} na Cu^+ . Redukované ionty měďné pak reagují s bicinchoninovou kyselinou za vzniku barevného komplexu s absorpčním maximem při 562 nm. Absorbance tohoto komplexu je lineárně závislá na koncentraci proteinu. Kalibrační přímka byla sestrojena pomocí standardů BSA o

koncentracích 0-2 mg.ml⁻¹ rozpuštěného ve vodě. Stanovení bylo prováděno v jamkách mikrotitrační destičky přidáním 10 µl vzorku získaného separací iontoměničovou chromatografií na systému FPLC (kap.3.3.1.2. str. 35), případně standardu, k 200 µl BCA činidla. Směs se nechala 15 min inkubovat při 37°C a byla změřena absorbance při 562 nm. Koncentrace proteinů ve vzorku byla vypočítána pomocí vytvořené standardní přímky.

3.3.4.2. Degradace proteinových substrátů rekombinantním katepsinem L

Reakční směs o objemu 70 µl obsahovala 5 µl katepsinu L (kap.3.3.1.2.); 2,5 mM DTT; 0,1/0,2 M citrát-fosfátový pufr pH 3,5 (v případě měření pH závislosti pufru o pH 2,5-7,5); 0,6 mg.ml⁻¹ hovězího hemoglobinu (Hb) resp. 0,4 mg.ml⁻¹ lidského sérového albuminu (HSA). Tato směs byla inkubována při 37°C a v určitých časových intervalech bylo odebíráno 10 µl vzorku v případě HSA resp. 6 µl v případě Hb. Reakce byla okamžitě po odebrání zastavena přidáním 2 µl 6x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS PAGE v případě HSA a 6 µl 2x koncentrovaného vzorkového pufru pro Tricinovou elektroforézu v případě Hb. Směs byla inkubována 5 min při 75 °C. Při použití inhibitoru E-64 byla jeho koncentrace ve směsi 10 µM. Vzorky HSA byly posléze analyzovány pomocí SDS PAGE a vzorky Hb pomocí Tricinové elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS.

3.3.4.3. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí 0,1% SDS byla využita pro kontrolu čistoty proteinu po purifikaci, analýzu vzorků získaných degradací HSA a Hb a zobrazování katepsinu L pomocí specifických fluorescenčních značek. Pro přípravu gelů byl použit postup dle Laemmliho.⁶⁰ Vzorky o objemu 12 µl byly nanášeny na vertikální elektroforézu Bio-Rad o rozměrech gelu 80 x 60 x 0,7 mm. Použity byly 15% gely, ve kterých byly proteiny fixovány inkubací 15 min v roztoku 50% ethanolu a 12% kyseliny octové. Vizualizace proteinů byla provedena pomocí roztoku Coomasie Brilliant Blue R250.⁶¹

Složení 6x koncentrovaného zásobního roztoku vzorkového pufru pro SDS PAGE:
100 mM Tris-Cl, pH 6,8
30% glycerol
10% SDS
0,6 M DTT
0,18 mM bromfenolová modř

3.3.4.4. Tricinová elektroforéza

Tricinová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS byla využita pro analýzu fragmentů hemoglobinu vzniklých jeho degradací katepsinem L. Gel byl připraven postupem podle Schäggera.⁶² K reakční směsi o objemu 6 μ l byly přidány 6 μ l 2x koncentrovaného vzorkového pufru pro Tricinovou elektroforézu. Tyto vzorky byly nanášeny na vertikální elektroforézu Bio-Rad o rozměrech gelu 80 x 60 x 0,7 mm. Použily se 16% gely s 6 M močovinou, ve kterých byly proteiny fixovány inkubací 15 min v roztoku 50% ethanolu a 12% kyseliny octové. Vizualizace proteinů byla provedena pomocí Coomasie Brilliant Blue R250.⁶¹

3.3.4.5. Přenos proteinů na membránu

Proteiny byly přenášeny z gelu SDS PAGE na PVDF membránu. Gel, podložky, filtrační papíry a PVDF membrána byly ekvilibrovány 15 min v přenosovém pufru (25 mM Tris-Cl pH 8,3; 192 mM glycin; 20% methanol) a poté byly navrstveny na sebe v pořadí: anoda, podložka, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, podložka, katoda. Proteiny byly přenášeny působením konstantního napětí 100 V po dobu 1 h. Proteiny na membráně byly obarveny pomocí roztoku Coomasie Brilliant Blue.⁶¹ Membrána byla odbarvena 50% metanolem a promyta 3 x 15 min vodou. Pás s proteinem byl vystřižen a využit pro určení N-koncové sekvence aminokyselin.

3.3.4.6. Určení N-koncové sekvence aminokyselin

Vzorek katepsinu L (eluční frakce z FPLC) byl nejprve separován pomocí SDS PAGE a přenesen na PDVF membránu. Část membrány obsahující protein byla vystřižena. Určení N-koncové sekvence aminokyselin provedl Ing. Z. Voburka na ÚOCHB AV ČR pomocí automatického Edmanova odbourávání na proteinovém sekvenátoru ABI Procise 491. Jednotlivé PTH deriváty aminokyselin byly analyzovány pomocí RP-HPLC.

3.3.4.7. Značení pomocí aktivní fluorescenční značky

Pro značení cysteinových endoproteas typu katepsinu B a katepsinu L byla použita afinitní značka Green-DCG-04 s navázanou fluorescenční skupinou Bodipy 530/550.⁶³ Reakční směs o objemu 10 µl obsahovala 5 µl enzymu získaného separací iontoměničovou chromatografií na systému FPLC (kap. 3.3.1.2. str. 35) 2,5 mM DTT, 0,1% PEG a aktivní značku Green-DCG-04 (finální koncentrace 2 µM). Směs byla do 10 µl doplněna 0,1/0,2 M citrát-fosfátovým pufrům pH 4. Tento roztok byl inkubován ve tmě 1 h při 37°C. Následně byly přidány 2 µl 6x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS PAGE a byla provedena SDS PAGE. Po ukončení elektroforézy a promytí gelu 3x 10 min v destilované vodě byl gel analyzován na fluorescenčním skeneru Typhoon při excitační vlnové délce 532 nm a emisním filtrem propouštějícím záření o vlnové délce 550 nm. Při použití specifických inhibitorů proteas byl do směsi před přidáním fluorescenční značky nejprve napipetován inhibitor o koncentraci 10 µM a směs byla ponechána 20 min při 37°C. Použity byly následující inhibitory: inhibitor cysteinových proteas E-64, inhibitor katepsinu B CA-074, inhibitor katepsinu L Z-FF-DMK.

3.3.4.8. Stanovení enzymové aktivity

Aktivita katepsinu L byla stanovena měřením fluorescence vzniklé štěpením fluorogenních peptidových substrátů s fluorescenční značkou AMC. Měření bylo prováděno při 37°C v mikrotitračních destičkách na spektrometru GENios. Fluorescence produktu byla měřena při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm.

3.3.4.8.1. Závislost enzymové aktivity na pH

Pro stanovení enzymové aktivity při různých pH byly použity následující enzymové preparáty: katepsin L produkovaný v kvasince *Pichia pastoris* (po aktivaci zablokovaný reverzibilním inhibítorem a přečištěným na koloně Mono S); extrakt ze slinných žláz; sliny klíštěte. K enzymové směsi o objemu 90 µl bylo těsně před měřením přidáno 10 µl substrátové směsi, aby výsledná koncentrace substrátu byla 250 µM. Aktivita byla měřena jako rychlost štěpení fluorogenního substrátu enzymem.

Složení enzymových směsí:

Pro katepsin L: 2 µl 500 x ředěné eluční frakce z FPLC vykazující proteolytickou aktivitu; 2,5 mM DTT; 0,1/0,2 M citrát-fosfát pH 3,5;

Pro SGE: 10 µl 10x ředěného SGE; 2,5 mM DTT; 0,1 % PEG; 0,1/0,2 M citrát-fosfát pH 2,1-8,0

Pro sliny: 10 µl 10x ředěných slin; 2,5 mM DTT; 0,1 % PEG; 50 mM Na-Acetát, pH 3,5-6,0

3.3.4.8.2. Určení inhibiční specifity

Pro určení inhibiční specifity byly použity stejné enzymové preparáty jako pro určení závislosti aktivity na pH (kap. 3.3.4.8.1.).

Inhibiční směs byla vytvořena přidáním inhibítoru do enzymové směsi. Po přidání inhibítoru byla směs 20 min inkubována při 37°C. Do jamek mikrotitrační destičky pak bylo přidáváno 90 µl inhibiční směsi a 10 µl substrátové směsi, aby výsledná koncentrace substrátu byla 250 µM. Měřena byla zbytková aktivita katepsinu L jako rychlost štěpení fluorogenního substrátu enzymem.

Použité inhibitory a jejich finální koncentrace:

E-64.....inhibitor cysteinových proteas; 10 µM

CA-074.....inhibitor katepsinu B; 1 µM

Z-FF-DMK....inhibitor katepsinu L; 1 µM

EDTA.....inhibitor metaloproteas; 1 mM

Pefabloc.....inhibitor serinových proteas; 0,1 mM

pepstatin.....inhibitor aspartátových proteas; 1 μ M

Složení inhibičních směsí:

Pro katepsin L: 2 μ l 500 x ředěné eluční frakce z FPLC vykazující proteolytickou aktivitu; 2,5 mM DTT; 0,1/0,2 M citrát-fosfát pH 3,5; inhibitor (CA- 074, E-64, Z-FF-DMK, Pefabloc, pepstatin, EDTA)

Pro SGE: 10 μ l 10x ředěného SGE; 2,5 mM DTT; 0,1 % PEG; 0,1/0,2 M citrát-fosfát pH 3,5; 5,0; 6,5 inhibitor (CA-074, E-64, Z-FF-DMK)

Pro sliny: 10 μ l 10x ředěných slin; 2,5 mM DTT; 0,1 % PEG; 50 mM Na-Acetát pH 3,5; 5,0; 6,0 ; inhibitor (CA-074, E-64)

3.3.4.8.3. Určení substrátové specifity

Pro určení substrátové specifity byl použit katepsin L (eluční frakce FPLC)(kap. 3.3.1.2. str. 35).

Do mikrotitrační destičky bylo přidáno 90 μ l enzymové směsi, ke které bylo těsně před měřením přidáno 10 μ l substrátové směsi, aby výsledná koncentrace substrátu byla 250 μ M. Použity byly následující peptidové fluorogenní substráty: Z-FR-AMC, Z-RR-AMC, Bz-FVR-AMC, Boc-QAR-AMC. Aktivita byla měřena jako rychlost štěpení fluorogenního substrátu enzymem.

Složení enzymové směsi:

2 μ l 500 x ředěné eluční frakce z FPLC vykazující proteolytickou aktivitu; 2,5 mM DTT; 0,1/0,2 M citrát-fosfát pH 3,5

4. Výsledky

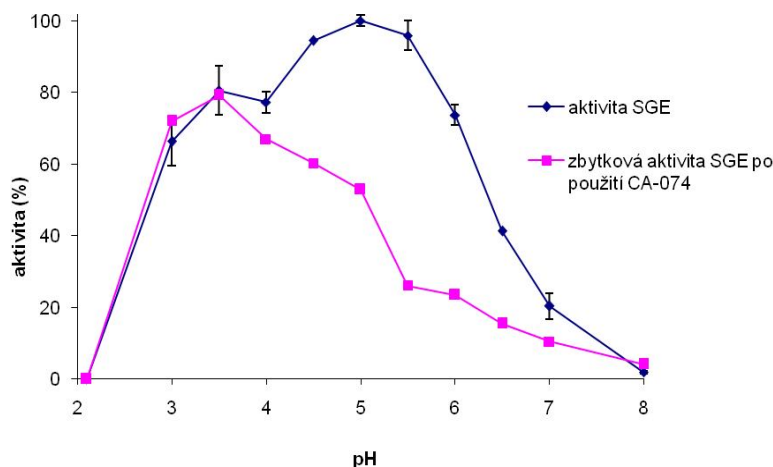
4.1. Charakterizace proteolytické aktivity v biologických materiálech

4.1.1. Extrakt ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Pro měření byl použit extrakt ze slinných žláz (SGE), jehož příprava je popsána v kapitole 3.3.3. (str. 36).

4.1.1.1. Závislost proteolytické aktivity na pH

Závislost proteolytické aktivity SGE klíštěte *I. ricinus* na pH byla stanovena pomocí syntetického fluorogenního substrátu Z-FR-AMC. Je patrné štěpení tohoto substrátu v širokém rozmezí pH 3,0-6,0 s maximem při pH 5,0 (obr. 4.1.1.1.). Zároveň je patrná zvyšující se míra inhibice specifickým inhibitorem katepsinu B CA-074 s rostoucím pH, což ukazuje na působení katepsinu B při těchto hodnotách pH. Katepsin B klíštěte *I. ricinus* má maximální aktivitu právě kolem pH 5. ⁵⁸



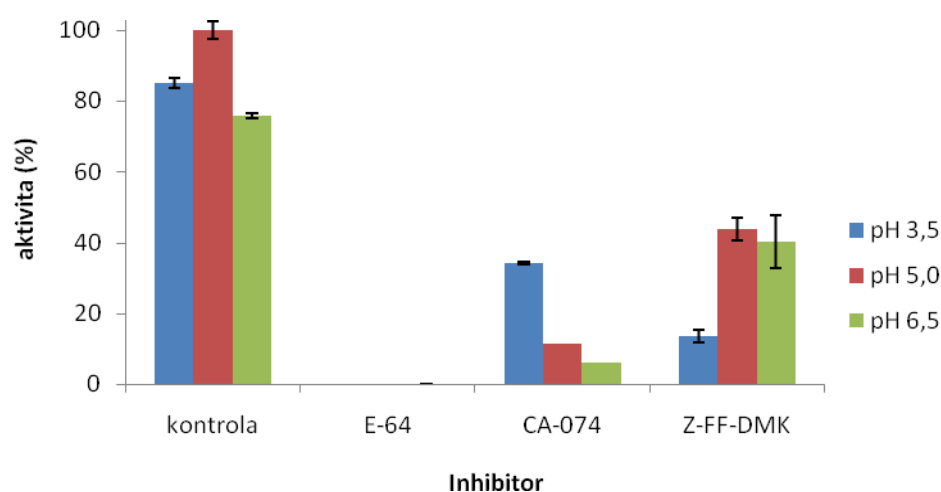
Obr. 4.1.1.1.: **Závislost enzymové aktivity SGE na pH.** Aktivita byla stanovena se substrátem Z-FR-AMC (modrá křivka) a paralelně se stejným substrátem v přítomnosti inhibitoru katepsinu B CA-074 (červená křivka). Stanovení aktivity v prostředí o různém pH je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.1.2. Inhibiční specifita proteolytické aktivity

Inhibiční specifita proteolytické aktivity SGE byla určena měřením enzymové aktivity se substrátem Z-FR-AMC v přítomnosti selektivních inhibitorů. Aktivita byla měřena v prostředích o třech různých hodnotách pH: 3,5; 5,0; 6,5 v 0,1/0,2 M citrát-fosfátovém pufru. Při každém pH byla měřena aktivita v přítomnosti inhibitoru cysteinových proteas E-64, inhibitoru katepsinu B CA-074 a inhibitoru katepsinu L Z-FF-DMK. Jako kontrola byly použity neinhibované vzorky (obr. 4.1.1.2.).

Výsledek měření potvrdil maximum enzymové aktivity neinhibované kontroly při pH 5,0, jak bylo stanoveno v předcházejícím měření (kap. 4.1.1.1. str. 42). Z inhibičního specifity SGE je patrná přítomnost katepsinu L, který má nejvyšší aktivitu v oblasti pH 3,5 – 4,0 (kap. 4.2.2.1. str. 48), neboť při pH 3,5 byla zjištěna nejvyšší inhibice v přítomnosti Z-FF-DMK.

Enzymová aktivita při pH 5,0 a 6,5 patří katepsinu B, díky vysoké míře inhibice v přítomnosti CA-074.

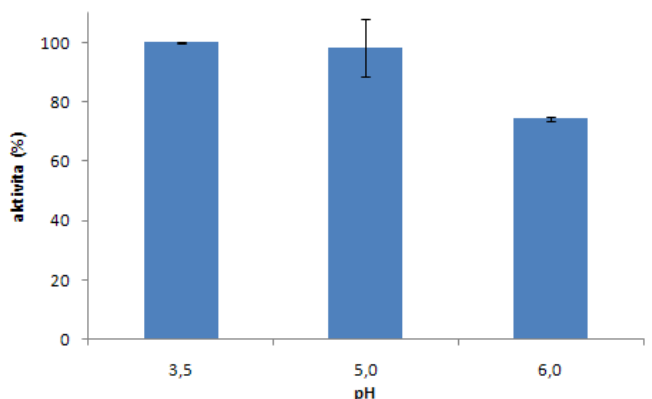


Obr. 4.1.1.2.: **Inhibiční specifita proteolytické aktivity SGE.** Byla měřena se substrátem Z-FR-AMC při pH 3,5;5;6,5 a v přítomnosti inhibitoru cysteinových proteas E-64, inhibitoru katepsinu B CA-074 a inhibitoru katepsinu L Z-FF-DMK. Jako kontrola bylo použito měření aktivity bez přítomnosti inhibitorů. Stanovení aktivity je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.2. Sliny z klíštěte *Ixodes ricinus*

4.1.2.1. Závislost proteolytické aktivity na pH

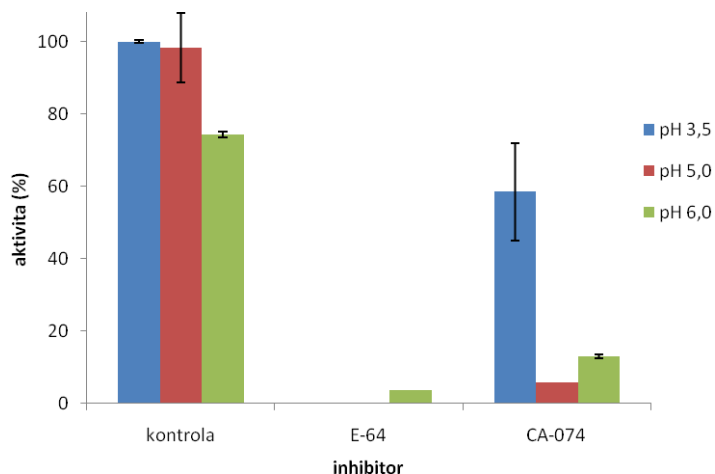
Stanovení proteolytické aktivity ve slinách klíštěte bylo provedeno se substrátem Z-FR-AMC. Z důvodu nedostatku materiálu byla aktivita měřena v 50 mM Na-Acetátových pufrech pouze při třech různých hodnotách pH 3,5; 5,0; 6,0. Byl zaznamenán mírný pokles aktivity při pH 6,0 (obr. 4.1.2.1.). Široký rozsah pH, ve kterém sliny vykazují proteolytickou aktivitu s použitým substrátem, je dán spolupůsobením katepsinu B a katepsinu L, jejichž přítomnost byla prokázána v následujících kapitolách (kap. 4.1.2.2. str. 44, kap. 4.1.2.3. str.45).



Obr. 4.1.2.1: **Závislost proteolytické aktivity slin na pH.** Aktivita byla měřena se substrátem Z-FR-AMC při vyznačených hodnotách pH. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.2.2. Inhibiční specifita proteolytické aktivity

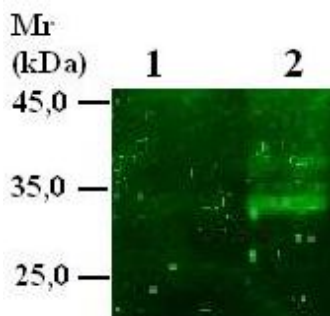
Proteolytická aktivita slin v přítomnosti inhibitorů byla měřena se substrátem Z-FR-AMC v prostředích o pH 3,5; 5,0; 6,0. Jako inhibitory byly použity inhibitor cysteinových proteas E-64 a inhibitor katepsinu B CA-074. Úplná inhibice proteolytické aktivity při všech hodnotách pH v přítomnosti E-64 ukazuje na přítomnost cysteinových proteas. Inhibitor katepsinu B CA-074 vykazuje nejnižší míru inhibice při pH 3,5 (obr. 4.1.2.2. str. 45). Tuto zbytkovou aktivitu lze tedy připsat katepsinu L, jehož proteolytická aktivita má v této oblasti pH svoje maximum (kap. 4.2.2.1. str. 48). Inhibiční specifita proteolytické aktivity slin klíštěte *I. ricinus* tak ukazuje na přítomnost katepsinu B a katepsinu L.



Obr. 4.1.2.2.: **Inhibiční specifita proteolytické aktivity slin.** Proteolytická aktivita slin byla měřena se substrátem Z-FR-AMC v prostředích o vyznačených pH v přítomnosti inhibitoru cysteinových proteas E-64 a inhibitoru katepsinu B CA-074. Jako kontrola byl použit neinhibovaný vzorek. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.2.3. Značení katepsinu L aktivní fluorescenční značkou

Katepsin L přítomný ve slinách byl značen aktivní značkou Green-DCG-04 obsahující fluorescenční skupinu Bodipy 530/550. Tato značka se specificky váže na cysteinové endoproteasy typu katepsinu L a katepsinu B. V dráze 1 je kontrola, kdy bylo aktivní místo cysteinových proteas před značením zablokováno inhibitorem cysteinových proteas E-64. Nemohlo tak dojít k vazbě aktivní značky. V dráze 2 je vzorek, který byl před značením inkubován s inhibitorem CA-074 pro omezení interference katepsinu B. Značen tak byl pouze katepsin L (obr. 4.1.2.3.).



Obr. 4.1.2.3.: **Značení katepsinu L přítomného ve slinách fluorescenční značkou.** Značení bylo provedeno pomocí aktivní značky Green-DCG-04 s navázanou fluorescenční skupinou Bodipy 530/550.

Dráha 1: Kontrola preinkubovaná s inhibitorem cysteinových proteas E-64.

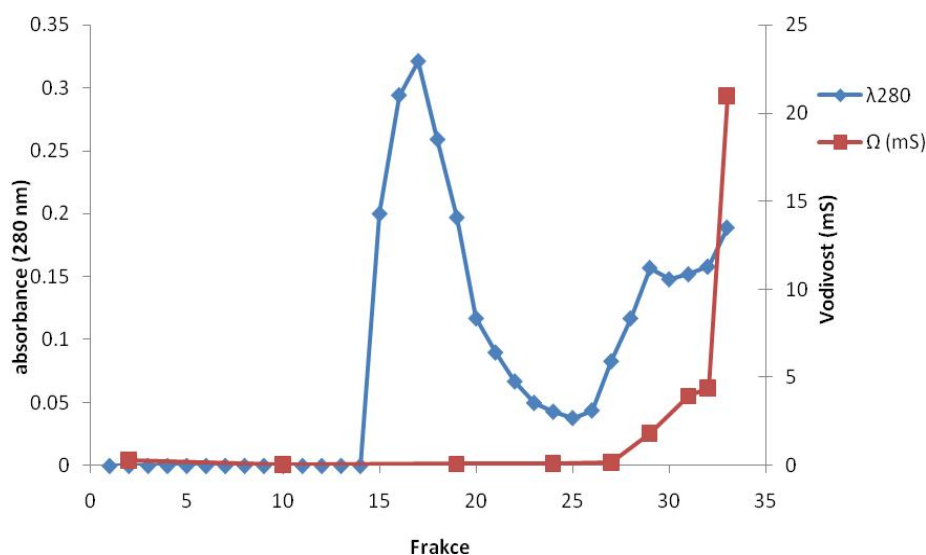
Dráha 2: Vzorek slin preinkubovaný s inhibitorem katepsinu B CA-074 a fluorescenční značkou. Inhibitor byl použit pro omezení interference katepsinu B.

4.2. Rekombinantní katepsin L z klíštěte *Ixodes ricinus*

4.2.1. Izolace z produkčního systému v kvasince *Pichia pastoris*

4.2.1.1. Příprava proteinové frakce pomocí gelové chromatografie

Na kolonu Sephadex G25 bylo nanášeno ve vodě rekonstituované médium z kvasinky *P. pastoris*. Kolona byla ekvilibrována destilovanou vodou, která sloužila i jako eluční roztok. Po změření absorbance při 280 nm a vodivosti jednotlivých frakcí byly spojeny frakce, které obsahovaly největší množství proteinu a zároveň byly úspěšně zbaveny solí (obr. 4.2.1.1.). Frakce 15-20 byly spojeny a nasazeny na kolonu Mono S (kap. 4.2.1.2.).



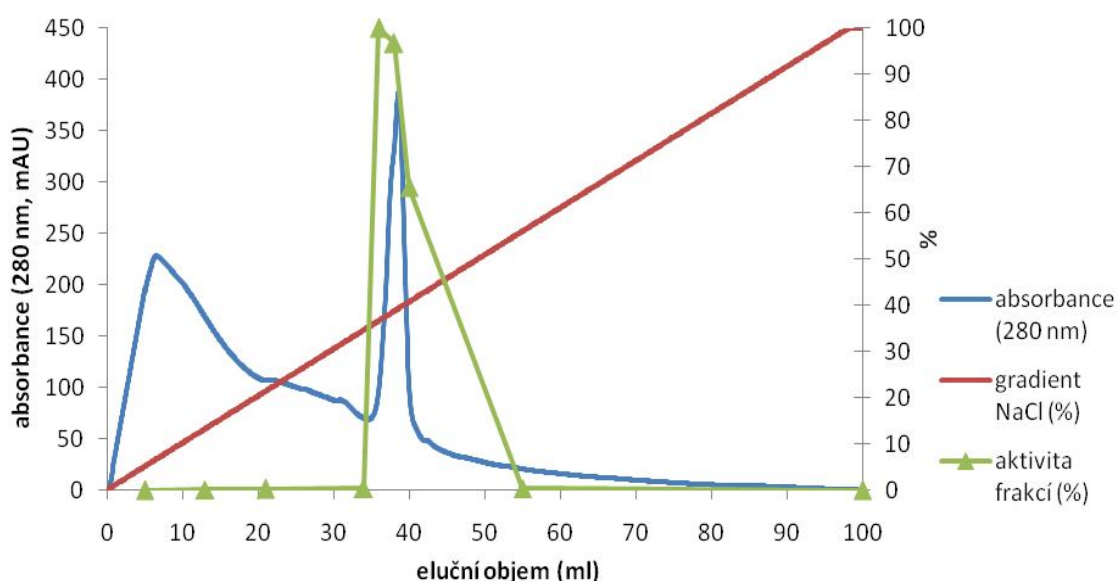
Obr. 4.2.1.1. **Příprava proteinové frakce z kultivačního media *P. pastoris* pomocí gelové chromatografie.** Separace probíhala na koloně Sephadex G25, která byla ekvilibrována v destilované vodě. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (modrá křivka), obsah solí byl zjišťován měřením vodivosti jednotlivých frakcí (červená křivka).

4.2.1.2. Purifikace katepsinu L pomocí iontoměničové chromatografie

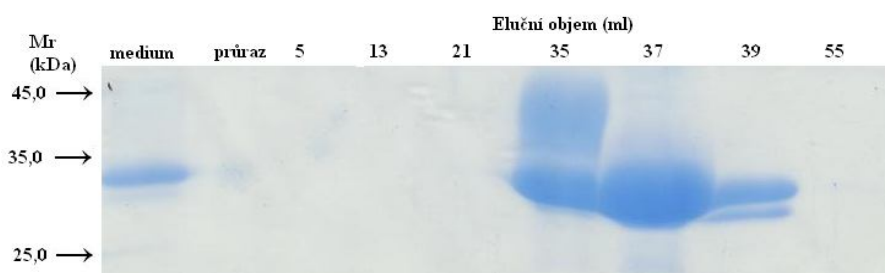
Katepsin L byl separován pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S HR 5/5. Na kolonu byla nanášena proteinová frakce media z *P. pastoris* obsahující katepsin L (kap. 4.2.1.1.). Eluce z kolony probíhala rostoucím lineárním gradientem 1 M NaCl v Na-Acetátovém pufru pH 4. Přítomnost proteinů byla detekována měřením absorbance

při 280 nm (obr. 4.2.1.2. a). V chromatografických frakcích byla měřena proteolytická aktivita pomocí substrátu Z-FR-AMC a byla zjištěna v materiálu odpovídajícím hlavnímu absorpčnímu vrcholu v oblasti frakcí o elučním objemu 35-40 ml. Vzorky vybraných frakcí byly analyzovány pomocí SDS PAGE, kde se potvrdila přítomnost katepsinu L (s přibližnou molekulovou hmotností 33 kDa) ve frakcích s proteolytickou aktivitou (obr. 4.2.1.2. b).

A



B



Obr. 4.2.1.2. Separace katepsinu L pomocí iontoměničové chromatografie.

(A) Separace byla provedena na koloně Mono S systému FPLC, na kterou byla aplikována proteinová frakce kultivačního media z *P. pastoris*. Eluce probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl v 0,2 M Na-Acetátovém pufru pH 4. Sbírány byly frakce po 2 ml (osa x). Průběh separace byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (hlavní osa y). Gradient NaCl je vyjádřen v procentech na vedlejší ose y, procenta aktivity jsou normalizována na 100% nejvyšší naměřené hodnoty a jsou vynesena na vedlejší osu y.

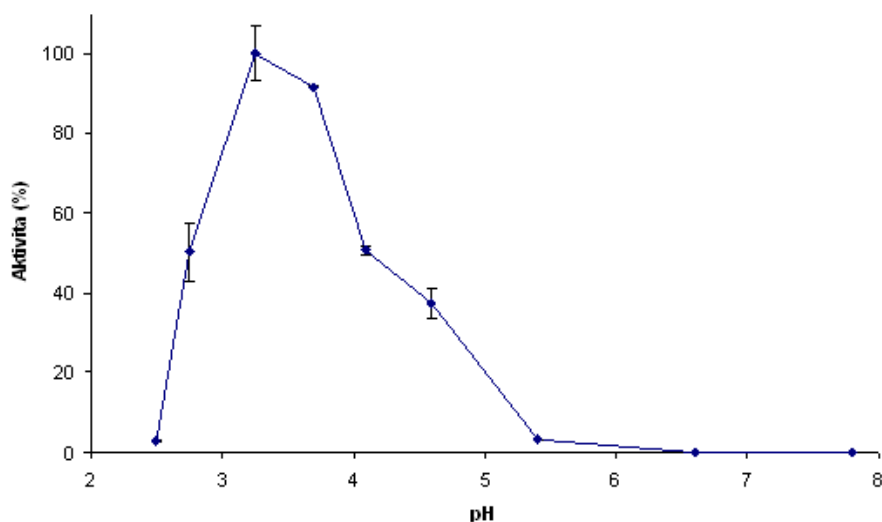
(B) Analýza vybraných chromatografických frakcí pomocí SDS PAGE: vzorek nanášený na kolonu (medium), frakce nenavázaná na kolonu (průraz), chromatografické frakce s vyznačeným elučním objemem. Proteiny jsou barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R250.

Frakce s aktivním materiálem byly spojeny a byl stanoven obsah proteinů. Tento údaj umožnil vypočítat izolační výtěžek zhruba 1 mg aktivního katepsinu L z 1 l kultivačního media *P. pastoris*.

4.2.2. Biochemické vlastnosti rekombinantního katepsinu L

4.2.2.1. Závislost proteolytické aktivity na pH

Závislost proteolytické aktivity rekombinantního katepsinu L (eluční frakce FPLC, kap. 4.2.1.2. str. 46) produkovaného v kvasince *P. pastoris* byla měřena v pufoch citrát-fosfát o pH 2,5-7,8. Stanovovala se míra štěpení syntetického fluorogenního substrátu Z-FR-AMC. V oblasti pH < 3,0 je vidět prudký pokles aktivity. Maximální aktivita se nacházela kolem pH 3,5. Nad pH 4 aktivita opět klesá (obr. 4.2.2.1.)

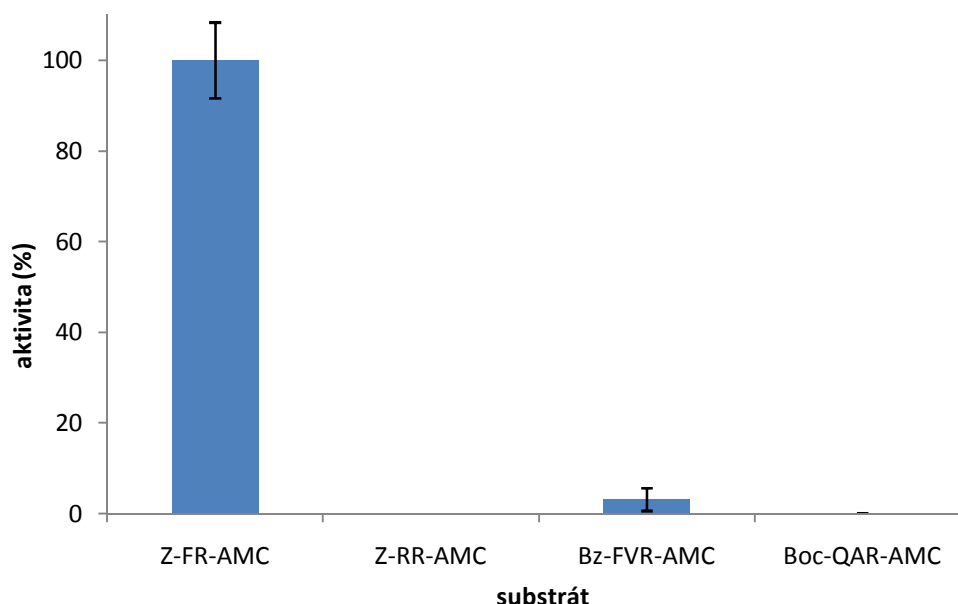


Obr. 4.2.2.1.: **Závislost proteolytické aktivity katepsinu L na pH.** Aktivita byla stanovena se substrátem Z-FR-AMC. Stanovení aktivity v prostředí o různém pH je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.2.2. Substrátová specifita

Substrátová specifita katepsinu L byla testována při pH 3,5 s různými syntetickými fluorogenními substráty: Z-FR-AMC – substrát specifický pro katepsin L a B, Z-RR-AMC – specifický substrát pro katepsin B, Bz-FVR-AMC a Boc-QAR-AMC – substráty

používané pro cysteinové endoproteasy rodiny papainu. Podle očekávání byl dobře štěpen substrát Z-FR-AMC, který je standardně používán pro stanovení aktivity katepsinů L. Zhruba 25 krát nižší aktivitu vykazoval katepsin L se substrátem Bz-FVR-AMC (obr. 4.2.2.2.). Měření potvrzuje preferenci přítomnosti argininu v pozici P₁ a hydrofobní aminokyseliny na pozici P₂.^{40, 53}

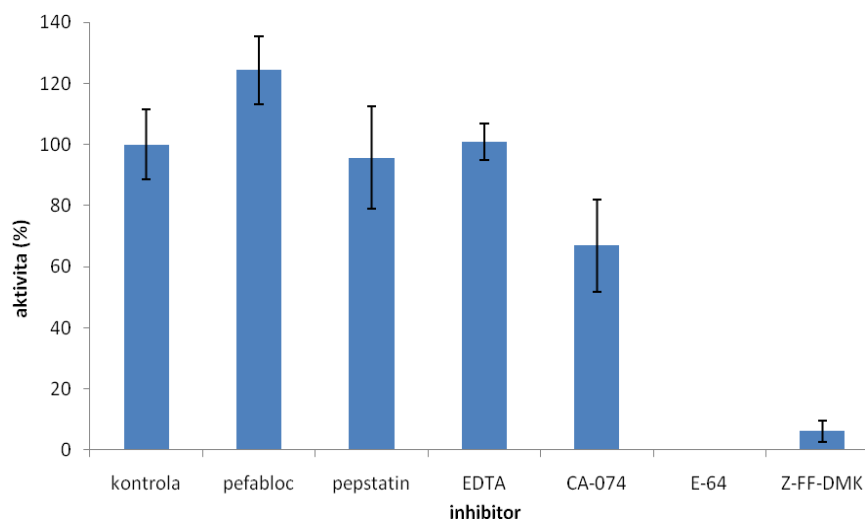


Obr. 4.2.2.2.: **Substrátová specifita katepsinu L.** Substrátová specifita katepsinu L byla měřena při pH 3,5 se čtyřmi substráty: Z-FR-AMC – specifický pro katepsin B a L, Z-RR-AMC – specifický pro katepsin B, Bz-FVR-AMC a Boc-QAR-AMC – používané pro cysteinové endopeptidasy rodiny papainu. Stanovení aktivity je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.2.3. Inhibiční specifita

Inhibiční specifita katepsinu L byla testována při pH 3,5 se syntetickým fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. Jako kontrola byla použita aktivita neinhibovaného enzymu.

Jako inhibitory byly použity Pefabloc (inhibitor serinových proteas), pepstatin (inhibitor aspartátových proteas), EDTA (inhibitor metaloproteas), CA-074 (inhibitor katepsinu B), E-64 (inhibitor cysteinových proteas), Z-FF-DMK (inhibitor katepsinu L). Podle očekávání byla enzymová aktivita zcela inhibována inhibitorem cysteinových proteas E-64 a specifickým inhibitorem katepsinu L Z-FF-DMK (obr. 4.2.2.3. str. 50). Enzym tak má inhibiční specifitu proteolytické aktivity odpovídající katepsinu L.



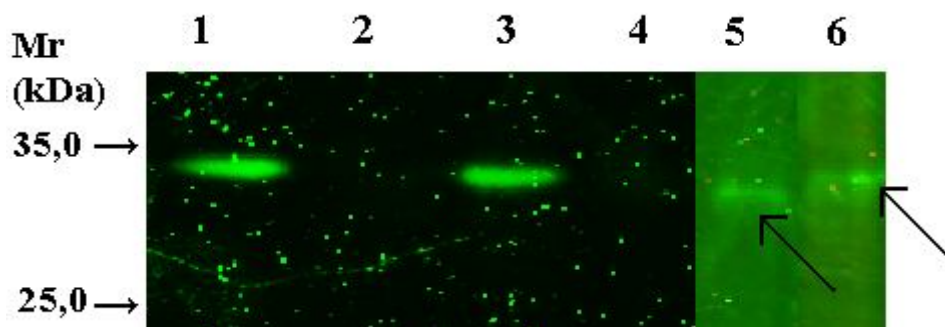
Obr. 4.2.2.3.: **Inhibiční specifita katepsinu L.** Pro stanovení aktivity v přítomnosti selektivních proteasových inhibitorů byl použit substrát Z-FR-AMC. Měření bylo prováděno při pH 3,5. Použité inhibitory: Pefabloc – inhibitor serinových proteas, pepstatin – inhibitor aspartátových proteas, EDTA – inhibitor metaloproteas, CA-074 – inhibitor katepsinu B, E-64 – inhibitor cysteinových proteas a Z-FF-DMK – inhibitor katepsinu L. Stanovení aktivity je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% aktivity neinhibované kontroly (osa y).

4.2.2.4. Značení katepsinu L aktivní fluorescenční značkou

Pro značení katepsinu L byla použita aktivní značka Green-DCG-04 s navázanou fluorescenční skupinou Bodipy 530/550. Vzorky byly po označení a provedení SDS PAGE vizualizovány na fluorescenčním skeneru Typhoon. Dráha 1 obsahuje neinhibovaný enzym. V dráze 2 byl použit inhibitor cysteinových proteas E-64, v dráze 3 inhibitor katepsinu B CA-074 a v dráze 4 inhibitor katepsinu L Z-FF-DMK. Podle předpokladu se značka navázala pouze na vzorek obsahující inhibitor katepsinu B a na neinhibovanou kontrolu, zatímco vzorky s inhibitorem cysteinových proteas a inhibitorem katepsinu L byly zablokovány. V dráze 5 je pro srovnání katepsin L exprimovaný v *Escherichia coli* a v dráze 6 byl značen obsah střevní tkáně klíštěte *I. ricinus* (obr. 4.2.2.4. str. 51).

Forma produkovaná prokaryotním organismem *E. coli* má o 2-3 kDa menší molekulovou hmotnost oproti formě produkované v *P. pastoris* a přirozenému enzymu. Tento rozdíl lze vysvětlit nepřítomností N-glykosylace na proteinu z *E. coli*, způsobené absencí glykosylačního systému u prokaryot. Zbylé dvě testované formy jsou pravděpodobně glykosylované, neboť sekvence katepsinu L klíštěte *I. ricinus* obsahuje dva sekvenční signály pro potenciální N-glykosylaci. Tímto signálem je sekvence

Asn-X-Ser/Thr, kde X je libovolná aminokyselina kromě prolinu.³¹



Obr. 4.2.2.4. Značení katepsinu L fluorescenční značkou. Pro značení byla použita aktivní značka Green-DCG-04. Značení bylo blokováno v přítomnosti inhibitorů CA-074 (inhibitor katepsinu B), Z-FF-DMK (inhibitor katepsinu L) a E64 (inhibitor cysteinových proteas).

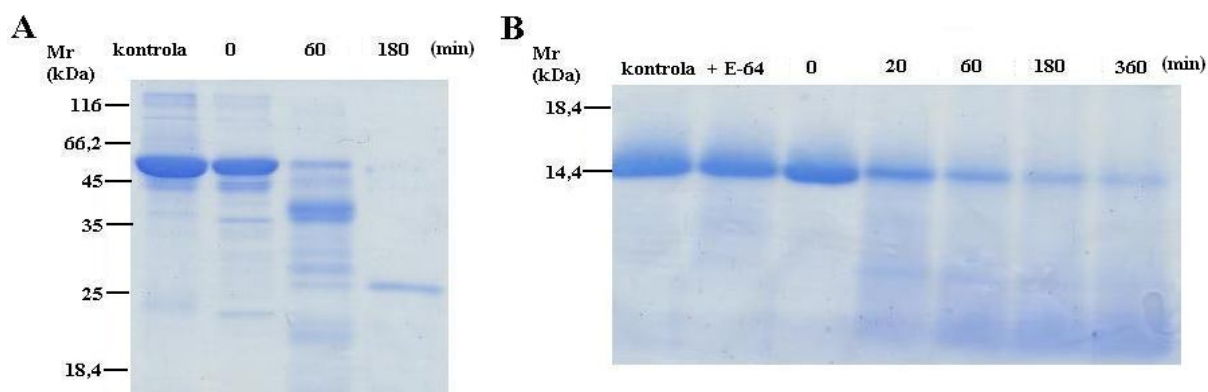
Dráha: Mr - relativní molekulová hmotnost v kDa
V dráhách 1-4 byl použit katepsin L exprimovaný v *P. pastoris*
1 - kontrola - značený enzym bez použití inhibitoru
2 - inhibice pomocí E64
3 - inhibice pomocí CA-074
4 - inhibice pomocí Z-FF-DMK
5 - katepsin L exprimovaný v *E. coli* (označen šipkou)
6 - značení homogenátu střevní tkáně klíštěte *I. ricinus* (označeno šipkou)

4.2.2.5. Degradace proteinových substrátů

4.2.2.5.1. Časová závislost degradace proteinových substrátů

Jako proteinové substráty určené k monitorování časové závislosti degradace katepsinem L byly použity HSA a Hb. Reakce probíhala při pH 3,5. Reakční směs byla inkubována při 37°C a vzorky byly odebírány v daných časových intervalech. Jako kontrola byl použit vzorek bez přidaného enzymu a vzorek s enzymem inhibovaným inhibitorem cysteinových proteas E-64. Obě kontroly byly inkubovány 360 min při 37°C. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R250.⁶¹

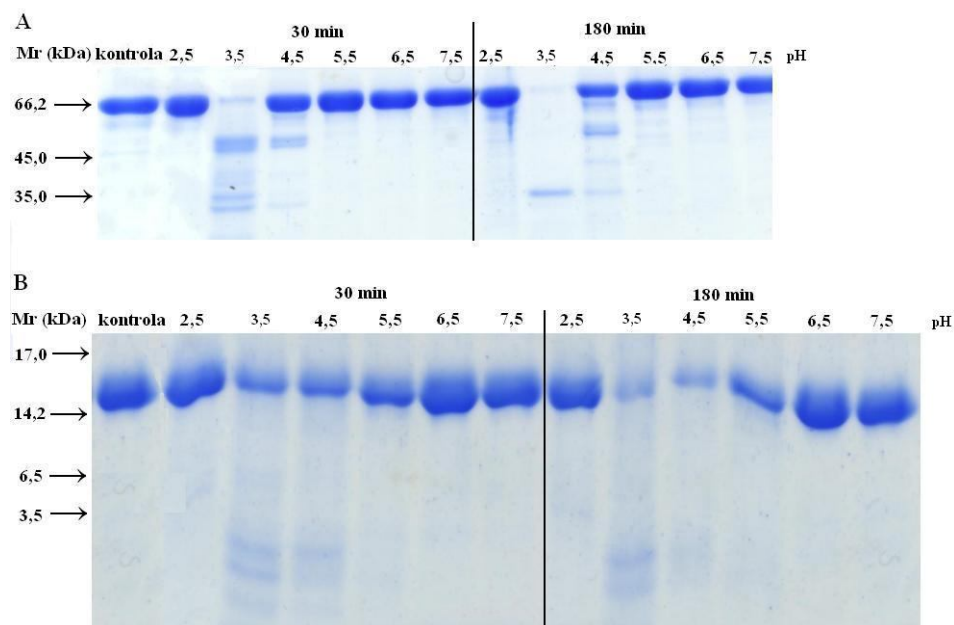
V obou případech dochází s postupujícím časem k degradaci počátečního substrátu 50 kDa HSA (obr. 4.2.2.5.1. a str. 52) a 16 kDa Hb (obr. 4.2.2.5.1. b str. 52). Zároveň s degradací proteinových substrátů dochází k tvorbě fragmentů o nižších molekulových hmotnostech. V časovém rozvoji je vidět postupná degradace větších fragmentů a akumulace menších fragmentů.



Obr. 4.2.2.5.1.: **Časová závislost degradace HSA a hovězího hemoglobinu.** Katepsin L byl v pufru o pH 3,5 inkubován s HSA (A) nebo Hb (B) jako substrátem. V daných časových intervalech byly odebrány alikvoty, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE. Jako kontrola byly použity vzorky neobsahující enzym a obsahující enzym inhibovaný inhibitorem cysteinových proteas E-64.

4.2.2.5.2. Závislost degradace proteinových substrátů na pH

Enzym byl se substrátem inkubován při daném pH při 37°C. Ve dvou časových intervalech byl odebrán vzorek a reakce byla zastavena přidáním vzorkového pufru.



Obr. 4.2.2.5.2.: **Závislost degradace proteinových substrátů katepsinem L na pH.** Substrát byl inkubován s enzymem při 37°C v prostředích o různých pH a ve dvou časových intervalech byl odebrán vzorek.

A: Degradace HSA katepsinem L. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS PAGE. Je vidět výrazné štěpení substrátu při pH 3,5 a při pH 4,5.

B: Degradace Hb katepsinem L. Vzorky byly analyzovány pomocí Tricinové elektroforózy.

Reakční směs byla analyzována pomocí SDS PAGE v případě HSA resp. pomocí Trycinové elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS v případě hemoglobinu. U obou substrátů je již po 30 min patrná nejvyšší degradace při pH 3,5 a u hemoglobinu je poměrně výrazná degradace substrátu i při pH 4,5 (obr. 4.2.2.5.2 str. 52). Po 180 min se projevilo štěpení HSA enzymem při pH 4,5, u hemoglobinu byla po 180 min patrná mírná degradace i v pH 5,5.

4.2.3. Určení N-koncové aminokyselinové sekvence katepsinu L

Sekvenování aminokyselin N-koncové části katepsinu L provedl Ing. Z. Voburka (ÚOCHB AV ČR). Sekvenován byl aktivní katepsin L izolovaný z produkčního systému *P. pastoris*. Při aktivaci došlo k autokatalytickému odštěpení 102 aminokyselin dlouhého propeptidu z molekuly zymogenu. Při odstranění propeptidu dochází ke štěpení peptidové vazby mezi aminokyselinami Ser¹¹⁸ - Leu¹¹⁹ (obr. 4.2.3.). V analogické poloze se nachází i vazba štěpená při aktivaci savčích katepsinů.⁶⁶

**VSYQEV LGAEWSAFKAKHGKSYVSETEEVFRLKI YMENRHKIAKHNEKYARGEVPYSMAMNEFGDM
LHHEFVSTRNGFKRNYKDQPREGSTYLEPENIEDFS**LPKTVDWRTKGAVTPVKNQGQCGSCWAFSA
TGSLEGQHFRKSGSMVSLSEQNLVGCSTDFGNNGCEGGLMDDAFKYIRANKGIDTEKSYPYNGTDG
TCHFVKSTVGATDSGFVDIKEGSETQLKKAVATVGPISVAIDASHESFQFYSDGVYDEPECDSESL
DHGVLVVGYGTLNGTDYWFVKNSWGTWTGDEGYIRMSRNKKNQCGIASSASIPLV

Obr. 4.2.3.: Určení N-koncové sekvence aminokyselin katepsinu L.

Aktivní enzym produkovaný v *P. pastoris* byl po izolaci sekvenován a byla určena N-koncová sekvence aminokyselin (podtržena). Sekvence tzv. aktivačního peptidu (propeptidu) byla z exprimované molekuly zymogenu autokatalyticky odstraněna (kurzíva tučně).

5. Diskuse

Úkolem bakalářské práce bylo analyzovat proteolytickou aktivitu extraktu ze slinných žláz (SGE) a slin klíštěte *I. ricinus*. Dalším cílem bylo získání rekombinantního katepsinu L z kultivačního media kvasinky *Pichia pastoris* v čisté formě a jeho biochemická charakterizace.

Při testování proteolytické aktivity SGE byla při použití substrátu specifického pro katepsin L a katepsin B zjištěna nejvyšší aktivita při pH 5,0. Toto maximum se při aplikaci specifického inhibitoru katepsinu L posouvá do oblasti pH 3,5 a aktivita při pH > 5,0 klesá. Testováním inhibiční specifity proteolytické aktivity SGE se prokázalo působení katepsinu L v oblasti kolem pH 3,5 a působení katepsinu B v oblasti kolem pH 5,0.

Analýzou proteolytické aktivity slin byla opět prokázána přítomnost katepsinu L a katepsinu B. Tyto katepsinové proteasy jsou tedy exprimovány v buňkách slinných žláz a poté dochází k jejich sekreci do slin klíštěte, kde se mohou uplatnit při řadě biochemických pochodů důležitých při interakci klíštěte s hostitelem.

Nalezení cysteinových proteas typu katepsinu L a katepsinu B ve slinách klíštěte *I. ricinus* tak rozšiřuje znalosti o proteolytických systémech přítomných ve slinách krev sajících parazitů. Zde byly dosud pozorovány zejména metaloproteasy²⁸⁻³⁰ a dále inhibitory serinových a cysteinových proteas, které působí jako biologicky aktivní látky regulující např. koagulační kaskádu a imunitní a zánětlivé procesy.^{10, 12-15,20,21,64} V případě katepsinů L a B se tedy jedná o první nález proteas tohoto typu ve slinách klíšťat. Jejich přesnou funkci nicméně zbývá objasnit.

Dalším cílem byla izolace a biochemická charakterizace rekombinantního katepsinu L. Aminokyselinová sekvence prokatepsinu L byla určena z cDNA knihovny střevní tkáně klíštěte *I. ricinus*, kde je tento enzym exprimován.³¹ Význam enzymu spočívá v jeho účasti při trávicí proteolyse ve střevní tkáni klíštěte.^{31,32} V rámci spolupráce s Parazitologickým ústavem AV ČR (Dr. P. Kopáček) byla získána kultivační media expresního systému v kvasince *P. pastoris* obsahující produkovaný rekombinantní katepsin L z *I. ricinus*.

Enzym byl z kultivačního media získán pomocí kombinace gelové a iontoměničové chromatografie. Pro úspěšnou izolaci bylo klíčovým krokem reverzibilní zablokování izolované proteasy inhibitorem S-methylmethanthiosulfonátem, který enzym během

chromatografických postupů stabilizoval a účinně zabránil jeho autodegradaci. Úspěšnost izolace katepsinu L byla potvrzena určením jeho N-koncové aminokyselinové sekvence. K odštěpení propeptidu došlo v analogické poloze jako u savčích homologů. Potvrdila se tak i úspěšnost aktivace proenzymu, která je podobná procesu in vivo. Lze přepokládat, že tato aktivace probíhá autoaktivačním mechanismem v kyselém pH, který je znám i u katepsinů L z jiných organismů.

Purifikovaný enzym byl biochemicky charakterizován. Jeho optimální aktivita je při pH 3,5. Toto pH optimum bylo nalezeno i pro stejný katepsin L exprimovaný v *E. coli* a pro katepsin L přirozeně se vyskytující ve střevní tkáni *I. ricinus*.^{32,58} Toto výrazně kyselé pH optimum je specifické pro katepsin L klíštěte *I. ricinus*. Obvyklé hodnoty pH optima pro proteasy typu katepsinu L (např. u savců) se většinou pohybují v rozmezí pH 5,0-5,5.⁵⁷ Fyziologický význam extrémně nízkého pH optima u katepsinu L z klíštěte není znám, ale může souviset s lokalizací v kyselých trávicích organelách buněk střevní tkáně klíštěte, jejichž funkce může být regulována pomocí pH.

Testována byla inhibiční a substrátová specifita katepsinu L. Jako specifický inhibitor katepsinu L funguje Z-FF-DMK. Aktivita katepsinu L je zcela blokována skupinovým inhibitorem cysteinových proteas E-64. Při analýze substrátové specifity se jako vhodný substrát ukázal Z-FR-AMC. Opět se jedná o analogii se savčími katepsiny L.

Protože fyziologickou funkcí katepsinu L ve střevní tkáni klíštěte je trávení proteinů, byla zjišťována schopnost degradace proteinových substrátů HSA a hemoglobinu. Nejprve byl zjišťován časový profil degradace, kdy s postupujícím časem vznikaly základní degradační produkty o nižších molekulových hmotnostech, které byly dále degradovány. pH optimum tohoto procesu bylo nalezeno při pH 3,5, tedy stejné, jaké bylo nalezeno při měření aktivity se syntetickým fluorogenním substrátem. Hemoglobin byl navíc efektivně degradován i při pH 4,5. Podařilo se potvrdit předchozí předpoklad, že katepsin L je schopen jako endoproteasa zahájit degradaci proteinových substrátů a efektivně je štěpit na malé fragmenty.³² Pravděpodobně se tedy podílí na úvodní fragmentaci proteinů při trávení ve střevě klíštěte.

Biochemická charakterizace katepsinu L dále obsahovala testování schopnosti proteomické aktivitní značky Green-DCG-04 vázat se do aktivního místa katepsinu L. Byla zjištěna efektivní interakce této aktivitní značky, která byla specificky blokována inhibitorem cysteinových proteas E-64 a inhibitorem katepsinu L Z-FF-DMK. Tohoto

proteomického nástroje bylo využito pro identifikaci katepsinu L ve slinách klíštěte jako další důkaz jeho přítomnosti.

Molekula katepsinu L z klíštěte *I. ricinus* obsahuje dva sekvenční signály pro N-glykosylaci. Rekombinantní protein exprimovaný eukaryotním organismem *P. pastoris* vykazoval analogické biochemické vlastnosti jako forma tohoto enzymu exprimovaná v *E. coli*, a tedy postrádající glykosylaci.⁵⁸ Přítomnost glykosylace tak samotnou proteolytickou aktivitu katepsinu L významně neovlivňuje a sacharidové části proteinu mají pravděpodobně jinou úlohu, jíž může být například správné směrování enzymu při vezikulárním transportu.⁵⁶

6. Závěr

Práce se zabývala analýzou proteolytické aktivity extraktu ze slinných žláz a slin klíštěte *Ixodes ricinus* se zřetelem na katepsin L. Tento enzym byl zároveň studován jako rekombinantní protein produkovaný v expresním systému *Pichia pastoris*.

Při práci s biologickým materiálem z klíštěte byly dosaženy následující výsledky:

- V extraktu ze slinných žláz (SGE) byla prokázána proteolytická aktivita hydrolyzující substrát Z-FR-AMC. Testování specifických inhibitorů prokázalo, že na této proteolytické aktivitě se podílí katepsin L a katepsin B.
- Hlavní proteolytická aktivita SGE pro substrát Z-FR-AMC je v oblasti pH 3-6. Katepsin L vykazuje optimální aktivitu při pH 3,5 po eliminaci aktivity katepsinu B specifickým inhibitorem CA-074.
- Analýza proteolytické aktivity ve slinách klíštěte pro substrát Z-FR-AMC prokázala, že obsahují katepsin L a B, z čehož byl učiněn závěr, že tyto enzymy jsou produkovány v SGE a následně sekretovány do slin. Lze tedy předpokládat, že obě proteasy se mohou uplatnit při interakci klíštěte a hostitele.
- Identifikace katepsinu L a B ve slinách byla provedena pomocí následujících přístupů: a) Určení inhibiční specifity pomocí specifických inhibitorů. b) Měření pH závislosti proteolytické aktivity. c) Značení katepsinu L pomocí proteomické fluorescenční značky Green-DCG-04, která se váže do aktivního místa proteasy a umožňuje vizualizaci na SDS PAGE.

Při práci s rekombinantním katepsinem L exprimovaným v kvasince *P. pastoris* byly dosaženy následující výsledky:

- Byl vypracován dvoustupňový chromatografický protokol pro izolaci katepsinu L z kultivačního media *P. pastoris* umožňující získat čistý enzym ve výtěžku zhruba 1 mg na 1 l media.
- Izolovaný katepsin L byl charakterizován pomocí N-koncového proteinového sekvenování a pomocí značení aktivního místa proteomickou fluorescenční značkou Green-DCG-04.

- Analýza substrátové specifity katepsinu L pomocí sady fluorogenních peptidových substrátů prokázalo Z-FR-AMC jako vhodný substrát. S tímto substrátem bylo změřeno pH optimum = 3,5.
- Testování inhibiční specifity katepsinu L pomocí selektivních proteasových inhibitorů ukázalo Z-FF-DMK jako účinný inhibitor.
- Byla prokázána schopnost katepsinu L degradovat proteinové substráty HSA (při pH 3,5) a hemoglobin (při pH 3,5-4,5).

Seznam použité literatury

- ¹ Volf, P.; Horák, P. *Paraziti a jejich biologie*; Triton: Praha, 2007.
- ² http://www.bio.usyd.edu.au/Social_InsectsLab/Nate/images/4/tick.jpg (10. 2. 2010).
- ³ Jongejans, F.; Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology* **2004**, *129*, 3-14.
- ⁴ http://kliste.cz/clanek/27/zivotni_cyklus_klistat (15. 12. 2009).
- ⁵ Sonenshine, D. E.; Hynes, W. L.; Ceraul, S. M.; Mitchell, R. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor Variabilis* contribute to bacterial control. *Exp. Appl. Acarol.* **2005**, *36*, 207–223.
- ⁶ Stafford, K. B. *Tick Management Handbook*; The Connecticut Agricultural Experiment Station: New Haven, 2007.
- ⁷ Valenzuela, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology* **2004**, *129*, 83–94.
- ⁸ Hořejší, V.; Bartůňková, J. *Základy imunologie*; Triton: Praha, 2005.
- ⁹ Paesen, G. C.; Adams, P. L.; Nuttal, P. A.; Stuart, D. L. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Acta Biochim. Biophys.* **2000**, *1482*, 92–101.
- ¹⁰ Andersen, J. F. Structure and mechanism in salivary proteins from blood-feeding arthropods. *Toxicon* **2009**, 1–10.
- ¹¹ Nuttal, P. A. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* **2004**, *129*, 177–189.
- ¹² Lawrie, Ch. H. Ixodes Ticks: Serum Species Sensitivity of Anticomplement Activity. *Exp. Parasitol.* **1999**, *93*, 207–214.
- ¹³ Lawrie, Ch. R. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in Ixodes ricinus ticks. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 31–38.
- ¹⁴ Wang, H. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 286–295.
- ¹⁵ Hajnická, V.; Kocáková, P.; Sláviková, M.; Slovák, M. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* **2001**, *23*, 483–489.
- ¹⁶ Gillespie, R. D.; Dolan, M. C.; Piesman, J.; Titus, R. G. Identification of an IL-2 Binding Protein in the Saliva of the Lyme Disease Vector Tick, *Ixodes scapularis*. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 4319–4327.
- ¹⁷ Ribeiro, J. M. C.; Makoul; Robinson, D. R. Ixodes dammini: Evidence for Salivary Prostacyclin Secretion. *J. Parasitol.* **1988**, *74* (6), 1068–1069.
- ¹⁸ Mans, B. J.; Coetzee, J.; Louw, A. I.; Gaspar, A. R. M.; Neitz, A. W. H. Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* **2000**, *24*, 271–282.
- ¹⁹ Stutzer, Ch.; Mans, B. J.; Neitz, A. W. H.; Maritz-Olivier, Ch. *Ornithodoros savignyi*: Soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Exp. Parasitol.* **2009**, *122*, 318–327.
- ²⁰ Andrade, B. B.; Teixeira, C. R.; Barral, A.; Barral-Netto, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2005**, *77* (4), 665–693.
- ²¹ Corral-Rodríguez, M. Á.; Macedo-Ribeiro, S.; Pereira, P. J. B.; Fuentes-Prior, P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 579–595.
- ²² Piesman, J.; Gern, L. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* **2004**, *129*, 191–220.
- ²³ Nadelman, R. B.; Wormser, G. P. Lyme borreliosis. *Lancet* **1998**, *352*, 557–565.

- ²⁴ Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie*; Marvil: Praha, 1999.
- ²⁵ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1027.htm> (27. 12. 2009).
- ²⁶ Labuda, M.; Nuttall, P. A. Tick-borne viruses. *Parasitology* **2004**, *129*, 221–245.
- ²⁷ Dumpis, U.; Crook, D.; Oksi, J. Tick-Borne Encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *28*, 882–890.
- ²⁸ Valenzuela, J. G.; Francischetti, I. M. B.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 2843–2864.
- ²⁹ Francischetti, I. M. B.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)olytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 869–875.
- ³⁰ Bastiani, M.; Hillebrand, S.; Horn, F.; Kist, T. B. L.; Guimaraes, J. A.; Termignoni, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiolactivated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 1439–1446.
- ³¹ Sojka, D.; Franta, Z.; Horn, M.; Hajdušek, O.; Caffrey, C. R.; Mareš, M.; Kopáček, P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit. Vectors* **2008**, *1*, 7.
- ³² Horn, M.; Nussbaumerová, M.; Šanda, M.; Kovářová, Z.; Srba, J.; Franta, Z.; Sojka, D.; Bogyo, M.; Caffrey, C. R.; Kopáček, P.; Mareš, M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: Mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (10), 1053–1063.
- ³³ Miyoshi, T.; Tsuji, N.; Islam, M. K.; Alim, M. A.; Hatta, T.; Huang, X.; Fujisaki, K. A set of serine proteinase paralogs are required for blood-digestion in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol. Int.* **2008**, *57*, 499–505.
- ³⁴ Karlson, P. *Základy biochemie*; Academia: Praha, 1971
- ³⁵ Vodrážka, Z. *Biochemie*; Academia: Praha, 2007.
- ³⁶ Turk, V.; Turk, B. Lysosomal cysteine proteases and their protein inhibitors: Recent developments. *Acta Chim. Slov.* **2008**, *55*, 727–738.
- ³⁷ Kirschke, H.; Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. *Lysosomal cysteine proteinases*, 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 1998.
- ³⁸ Chapman, H. A.; Riese, R. J.; Shi, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, *59*, 63–68.
- ³⁹ Beveridge, A. J. A theoretical study of the active sites of papain and S195C rat trypsin: Implications for the low reactivity of mutant serine proteinases. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1355–1365.
- ⁴⁰ Sajid, M.; McKerrow, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *120*, 1–21.
- ⁴¹ Ménard, R.; Carriere, J.; Laflamme, P.; Plouffe, C.; Khouri, H. E.; Vernet, T.; Tessier, D. C.; Thomas, D. Y.; Storer, A. C. Contribution of the Glutamine 19 Side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8924–8928.
- ⁴² Turk, D.; Janjic, V.; Štern, I.; Podobnik, M.; Lamba, D.; Dahl, S. W.; Lauritzen, C.; Pedersen, J.; Turk, V.; Turk, B. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain addend to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J.* **2001**, *20* (23), 6570–6582.

- ⁴³ Coulombe, R.; Grochulski, P.; Sivaraman, J.; Ménard, R.; Mort, J. S.; Cygler, M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* **1996**, *15* (20), 5492–5503.
- ⁴⁴ Tao, K.; Stearns, N. A.; Dong, J.; Wu, Q.; Sahagian, G. G. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311* (1), 19–27.
- ⁴⁵ Carmona, E.; Dufour, É.; Plouffe, C.; Takebe, S.; Mason, P.; Mort, J. S.; Ménard, R. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8149–8157.
- ⁴⁶ Cygler, M.; Sivaraman, J.; Grochulski, P.; Coulombe, R.; Storer, A. C.; Mort, J. S. Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure* **1996**, *4*, 405–416.
- ⁴⁷ Otto, H. H.; Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133–171.
- ⁴⁸ Yamamoto, A.; Tomoo, K.; Hara, T.; Murata, M.; Kitamura, K.; Ishida, T. Substrate specificity of bovine cathepsin B and its inhibition by CA074, based on crystal structure refinement of the complex. *J. Biochem.* **2000**, *127*, 635–643.
- ⁴⁹ Bohley, P.; Kirschke, H.; Langner, J.; Ansorge, S.; Wiederanders, B.; Hanson, H. Intracellular protein breakdown. *Tissue Proteinases*; North-Holland: Amsterdam, **1971**; pp 187–219. cit. dle citace ³⁷
- ⁵⁰ Yagel, S.; Warner, A. H.; Nellans, H. N.; Lala, P. K.; Waghorne, C.; Denhardt, D. T. Suppression by Cathepsin L Inhibitors of the invasion of amnion membranes by murine cancer cells. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 3553–3557.
- ⁵¹ Kakegawa, H.; Nikawa, T.; Tagami, K.; Kamioka, H.; Sumitani, K.; Kawata, T.; Drobnič-Kosorok, M.; Lenarčič, B.; Turk, V.; Katunuma, N. Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett.* **1993**, *321*, 247–250.
- ⁵² Nakagawa, T.; Roth, W.; Wong, P.; Nelson, A.; Farr, A.; Deussing, J.; Villadangos, J. A.; Ploegh, H.; Peters, C.; Rudensky, A. Y. Cathepsin L: Critical role in Ii degradation and CD4 T Cell selection in the thymus. *Science* **1998**, *280* (5362), 450–453.
- ⁵³ Fujishima, A.; Imai, Y.; Nomura, T.; Fujisawa, Y.; Yamamoto, Y.; Sugawara, T. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. *FEBS Lett.* **1997**, *407* (1), 47–50.
- ⁵⁴ Karrer, K. M.; Peiffer, S. L.; DiTomas, M. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 3063–3067.
- ⁵⁵ Ishidoh, K.; Kominami, E. Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol. Chem.* **2002**, *383* (12), 1827–1831.
- ⁵⁶ Braulke, T.; Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 605–614.
- ⁵⁷ Kirschke, H.; Wiederanders, B.; Ansorge, S.; Bohley, P. Cathepsin L: A new proteinase from rat-liver lysosomes. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *74* (2), 293–301.
- ⁵⁸ Srba, J. Rekombinantní cysteinové peptidasy klíš'at. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, **2009**.
- ⁵⁹ http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html (3.5.2010)
- ⁶⁰ Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- ⁶¹ Blakesley, R. W.; Boezi, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **1977**, *82* (8), 580–582.
- ⁶² Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 16–22.

- ⁶³ Fonovic, M.; Bogyo, M. Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert Rev. Proteomics* 2008, 5, 721–730.
- ⁶⁴ Lebouille, G.; Rochez, C.; Louahed, J.; Rutti, B.; Brossard, M.; Bollen, A.; Godfroid, E. Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, 66 (3), 225–233.
- ⁶⁵ Chowdhury, S. F.; Joseph, L.; Kumar, S.; Tulsidas, T. R.; Bhat, S.; Ziomek, E.; Menard, R.; Sivaraman, J.; Purisima, E. O. Exploring inhibitor binding at the S' subsites of cathepsin L. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1361–1368.
- ⁶⁶ Yamaji, K.; Tsuji, N.; Miyoshi, T.; Khyrul Islam, M.; Hatta, T.; Abdul Alim, M.; Anisuzzaman; Takenaka, A.; Fujisaki, K. Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol. Int.* 2009, 58, 232–237.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou:	Číslo OP:	Datum vypůjčení:	Poznámka: