

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Úloha humorálních (plasmových) faktorů při infekcích  
plžů schistosomami

The role of humoral factors in the snail immune response  
against schistosomes

Bakalářská práce

Monika Košťáková

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

2010

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli, Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D., za rady a připomínky při vzniku této práce. Zvláštní dík patří také mým přátelům za jejich podporu.

## Obsah:

Abstrakt .....	4
1. Úvod .....	5
2. Charakteristika imunity bezobratlých (plžů) .....	6
3. Rezistence / vnímavost.....	7
4. Přenos rezistence pomocí plazmy .....	7
5. Změny koncentrace plazmy .....	8
6. Humorální faktory .....	9
6.1. Lektiny.....	9
6.2. FRePs.....	14
6.3. MDM.....	16
6.4. Granularin.....	17
6.5. Neuropeptidy .....	18
6.5.1. Schistosomin .....	18
6.5.2. FaRPs.....	19
6.6. Cytokinům podobné molekuly.....	20
Závěr: .....	22
Přehled literatury:.....	23
Primární zdroje:.....	23
Sekundární zdroje:.....	28
Internetové zdroje:.....	28

## Abstrakt

Motolice třídy Digenea, jako *Schistosoma mansoni*, využívají měkkýše, téměř vždy plže, ve svém životním cyklu jako mezihostitele. Obranný systém plžů je složen z imunitních buněk zvaných hemocyty, které jsou hlavními efektory a spolupracují s rozpustnými komponentami. Tyto rozpustné (humorální) faktory mohou ovlivnit přímo larvální stádium parazita i aktivitu hemocytů a také se účastnit při rozpoznávání parazita. Za hlavní složku humorální imunity jsou považovány lektiny, které mají primární roli v „non-self recognition“. Lektinovou aktivitu vykazují také proteiny příbuzné fibrinogenům objevené u *Biomphalaria glabrata*. Jejich unikátní struktura zahrnuje fibrinogenovou a imunoglobulinům-podobnou doménu. Důležitou úlohu v obraně by mohly mít i molekuly podobné cytokinům. V hemolymfě plže je přítomno mnoho různých molekul, jejichž hladiny se mění v průběhu infekce. Odpověď na parazitaci je tudíž velmi komplexní a čeká na další objasnění.

Klíčová slova: *Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea stagnalis*, motolice, schistosomy, plž, humorální imunita, imunitní odpověď, plazmatické proteiny

## Abstract

Digenetic trematodes such as *Schistosoma mansoni* use molluscs, mainly Gastropoda in their life cycle, as their intermediary hosts. The internal defense system (IDS) of snails is composed of immune cells called hemocytes, which are the main effectors and act jointly with soluble components. Humoral factors could influence directly the parasite's larval stage, the activity of hemocytes and also may serve in recognition of the parasite. Lectins are considered to be the main component of humoral immunity. They have a primary role in non-self recognition. Other protein group with lectin-like activity called FRePs was found in *Biomphalaria glabrata*. Their unique structure contains a fibrinogen and an immunoglobulin-like domain. Cytokine-like molecules may play very important role in defense as well. Many molecules are present in hemolymph and their levels change during infection. The response to parasitosis is therefore very complex and still awaits further clarification.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea stagnalis*, trematode, schistosome, snail, humoral immunity, immune response, plasma proteins

## 1. Úvod

Plži (Gastropoda) jsou velkou třídou bezobratlých živočichů, která patří do kmene měkkýši (Mollusca). Obývají jak sladké a slané vody, tak i suchozemské prostředí. Některé druhy, zejména vodních plžů, se uplatňují jako přenašeči motolic. Ve své práci se zaměřuji na schistosomy a obranné reakce humorálního charakteru, které vyvolává jejich přítomnost v mezhospiteli. Schistosomy jsou endoparazité z kmene Platyhelminthes, třídy Trematoda a podtřídy Digenea. Jsou to gonochoristé s výrazným pohlavním dimorfismem. Ve svém životním cyklu využívají dva různé hostitele: teplokrevného obratlovce jakožto definitivního hostitele a vodního plže jakožto mezhospitele. V definitivním hostiteli dochází k sexuálnímu rozmnožování a produkci vajíček. Z těch se po opuštění hostitele ve vodě líhnou miracidia infekční pro plže. Ovšem interakce s mezhospitem je velmi specifická a k uskutečnění cyklu je vhodný jen kompatibilní plž. V plži dochází k přeměně miracidia na primární (mateřskou) sporocystu. V té se vyvíjejí sekundární sporocysty, které asexuálně produkují cercárie. Cercárie unikají z plže do vodního prostředí, kde infikují konečného hostitele, což již není tak specifické. Např. „ptačí“ cercárie se pokouší pronikat také do nespecifických hostitelů, jako jsou savci nebo i člověk. Schistosomózy jsou dle Světové zdravotnické organizace (WHO) jedno z nejrozšířenějších parazitárních onemocnění v tropických a subtropických oblastech, kde je v současné době infikováno více než 207 miliónů lidí (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>). Ze zdravotnického hlediska je nejvýznamnějším vektorem *B. glabrata* (plži rodu *Biomphalaria*), která je mezhospitem motolice *Schistosoma mansoni* způsobující lidskou intestinální schistosomózu (bilharziózu). Dále se jako přenašeči lidských motolic uplatňují plži rodů *Oncomelania* a *Bulinus*.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o úloze humorálních faktorů plžů, a to především složek proteinového charakteru, jejichž koncentrace se v průběhu infekce schistosomami mění a u kterých se předpokládá úloha v imunitním systému. Zaměřuji se zejména na plže *B. glabrata*, přenašeče „lidské“ motolice *S. mansoni*, a *Lymnaea stagnalis*, přenašeče „ptačích“ schistosom rodu *Trichobilharzia*. Studium těchto modelových plžů a jejich interakcí s parazitem se zabývají mnohé laboratoře, které mají k dispozici několik kmenů *B. glabrata* lišících se stupněm rezistence.

## 2. Charakteristika imunity bezobratlých (plžů)

Imunitní systém bezobratlých, na rozdíl od obratlovců, postrádá adaptivní složku - není anticipační, netvoří se protilátky ani imunitní paměť (viz review Loker *et al.*, 2004). Je založen na „pattern“ a „non-self recognition“. IDS („internal defense system“) plžů se skládá z humorální a buněčné složky. Obě tyto komponenty úzce spolupracují.

Existuje několik typů efektorových buněk. Tři typy jsou lokalizované ve tkáních a jediné hemocyty mohou volně cirkulovat v hemolymfě nebo i pronikat do tkání. Hemocyty jsou hlavní zbraní imunitního systému a zároveň se podílejí na produkci různých humorálních faktorů. Strukturně a funkčně jsou podobné savčím makrofágům (McKerrow *et al.*, 1985). Odlišujeme u nich dvě populace: hyalinocyty, což jsou kulaté buňky s malým množstvím lyzozómů (granul) a vysoce fagocytující buňky s pseudopodií obsahující velký počet granul, které se dle této charakteristiky nazývají granulocyty (Hine, 1999). Mezi běžné mechanismy těchto buněk vedoucí k vypořádání se s cizorodým materiálem patří fagocytóza malých objektů (bakterie) a enkapsulace větších (motolice) či produkce reaktivních kyslíkových intermediátů (ROI) a oxidu dusnatého (NO) (Van der Knaap & Loker, 1990). Místo vzniku těchto buněk je spekulativní. U *B. glabrata* a *Bulinus* sp. byla u perikardia nalezena oblast nazvaná APO („amoebocyte producing organ“). Podle některých pozorování se zvýšila mitotická aktivita v této oblasti po inokulaci antigeny *S. mansoni* (Sullivan *et al.*, 2004). U některých plžů, např. u *L. stagnalis*, nebyl tento orgán nalezen, avšak bylo zjištěno, že hemocyty jsou schopny se dělit i v jiných tkáních (Sminia, 1974).

Humorální komponenty můžou interagovat přímo s povrchem patogena, napomáhat v jeho rozpoznání efektorovými buňkami, či ovlivňovat aktivitu těchto buněk. Mezi tyto faktory patří zejména lektiny, ale i bakteriostatické, baktericidní a antivirové faktory (Adema *et al.*, 1991). Dále sem spadají i různé enzymy, např. lyzozomální enzymy jejichž zvýšená hladina je indukována přítomností bakterií (Cheng *et al.*, 1977).

Imunitní systém bezobratlých je i přes svou neadaptabilitu poměrně efektivní a je schopen úspěšně rozeznat a eliminovat patogeny nebo nekompatibilní parazity. V nedávné době byly v plazmě některých plžů objeveny proteiny obsahující domény podobné imunoglobulinům (Hoek *et al.*, 1996; Adema *et al.*, 1997). Tyto proteiny by mohly hrát významnou roli v obranném systému plže.

### 3. Rezistence / vnímavost

Pro schistosomy je typická vysoká mezihostitelská specifita. Miracidium je schopno infikovat pouze některé plže a pouze v některých z nich přežít. Kompatibilita / nekompatibilita plže-motolice je ovlivněna mnoha faktory. Jedním z hlavních je genetický faktor (Newton, 1953; cit. dle: El-Ansary & Al-Daihan, 2006). U dospělých plžů je odolnost vůči infekci dominantně kódovaná jediným genem s Mendelovskou dědičností (Richards, 1973; cit. dle: Miller *et al.*, 2001). Dalším z determinačních faktorů je věk. U *L. stagnalis* bylo dokázáno, že juvenilní amébocyty mají méně účinnou fagocytickou aktivitu, což koreluje s jejich morfológickou nezralostí (Dikkeboom *et al.*, 1985). Také opsonizační a hemaglutinační aktivita byla nižší v plazmě juvenilních plžů než dospělců.

### 4. Přenos rezistence pomocí plazmy

To, zda humorální faktory hrají důležitou roli ve zprostředkování buněčných obranných mechanismů, bylo zkoumáno v rámci *in vitro* experimentů. Přenos rezistence z plže geneticky rezistentního do plže vnímavého je možný pasivním transferem plazmy anebo transplantací hematopoetického orgánu (APO). Rezistentní hemocyty jsou schopny enkapsulovat a cytotoxicky narušit tegument sporocysty (i za nepřítomnosti plazmy), zatímco vnímavé tohoto schopny nejsou (Bayne *et al.*, 1980). Plazma sama o sobě není schopna parazita poškodit. Nicméně vliv plazmy na aktivitu hemocytů byl demonstrován právě v rámci experimentů s přenosem rezistence. Pasivní přenos rezistence byl uskutečněn vpravením plazmy z rezistentního kmene *B. glabrata* do vnímavého, což zapříčinilo zvýšenou odolnost v 60 % případů (Granath & Yoshino, 1984). Neznámý plazmatický faktor byl termolabilní, což naznačovalo, že se jedná o molekulu proteinového charakteru (Vasquez & Sullivan, 2001). Odhadovaná molekulová hmotnost byla v rozmezí 10–30kDa. Přítomnost tohoto faktoru nejspíš zvyšovala aktivitu hemocytů.

Dalším způsobem je přenos rezistence za pomoci transplantace APO (Sullivan & Spence, 1994). V experimentech s plží *B. glabrata* byl transplantován tento orgán z rezistentního plže do vnímavého. Změny ve stupni vnímavosti se projeví až 14 dní po infekci (p.i.). Jako možné vysvětlení se nabízelo, že transplantace APO způsobuje hemocytární chimérismus. Při něm by docházelo k produkci hemocytů s rezistentním fenotypem, které by byly po dosažení dostačujícího množství v hemolymfě příjemce schopny zabít sporocystu. Jiné vysvětlení spočívá

v tom, že hematopoetický orgán produkuje rozpustný plazmatický faktor, který indukuje cytotoxickou reakci u hemocytů příjemce. Pokusy s přenosem plazmy z plžů s APO transplantátem do vnímavých plžů však prokázaly, že se na adoptivní rezistenci spíše než chimerické hemocyty podílejí rozpustné faktory (Vasquez & Sullivan, 2001).

## 5. Změny koncentrace plazmy

Oběhový systém gastropodních měkkýšů je otevřený, takže je parazit přímo kontaktu s tělní tekutinou, která mu slouží zároveň jako zdroj živin, ale i jako místo pro vylučování odpadních látek. Sporocysta *S. mansoni* využívá plazmatické molekuly také při svém maskování před obrannými reakcemi hostitelova imunitního systému (Bayne *et al.*, 1986).

Dle výsledků Zelck *et al.* (1995) infekce *S. mansoni* do tří dnů nijak nezměnila koncentraci plazmatických proteinů u *B. glabrata*. Ovšem v pokročilejších stádiích nákazy (70 dnů p.i.) bylo prokázáno výrazné snížení obsahu proteinů, a to až na jednu třetinu původní hodnoty (Gress & Cheng, 1973).

Při infekci motolicí *Echinostoma parensi* došlo v počátcích nákazy (2 dny p.i.) u vnímavého kmene (M-linie) *B. glabrata* k mírnému zvýšení obsahu proteinů v plazmě se signifikantním nárůstem ve dnech 4, 8 a 30 p.i. (Loker & Hertel, 1987). Výrazný pokles nastal mezi 30.–60. dnem infekce. U rezistentního kmene (10-R2) po mírném nárůstu došlo k poklesu již 8. den. Do 60. dne infekce obsahovala plazma infikovaných plžů polovinu celkového obsahu proteinů oproti kontrolám.

Zdá se, že infekce *E. parensi* a *S. mansoni* vyvolává odlišné odpovědi zejména prvních 30 dní infekce. Pokles v koncentraci plazmatických proteinů po 60. dnu pravděpodobně odráží vyčerpání živin parazitem po dlouhodobé infekci. K úbytku proteinů může také docházet jejich únikem do okolí, když cercárie opouštějí tělo plže. Tento únik proteinů byl potvrzen spektrofotometricky 20. den infekce, a to přítomností extracelulárního hemoglobinu *B. glabrata* ve vodě (Lee & Cheng, 1972).

Studium koncentrace plazmy *Lymnaea collumnella* v průběhu infekce *E. parensi* taktéž prokázalo, že parazitace má vliv na koncentrace jednotlivých složek (Pinheiro *et al.*, 2009). Redukce proteinové složky o 80 % byla pozorována v hemolymfě již 10 dní p.i.. Dále došlo ke změnám v koncentracích glukózy (nárůst 10 dní p.i. a následné snížení) a glykogenu (maximální redukce pozorovaná 30. den p.i.). Další složkou, jejíž množství v plazmě bylo výrazně



změněno 10 dní p.i., je močovina, u které došlo k počátečnímu dvojnásobnému nárůstu koncentrace a následnému poklesu.

## 6. Humorální faktory

### 6.1. Lektiny

Vrozené imunitní mechanismy mnohobuněčných jsou založené na „pattern recognition“ (viz review Medzhitov & Janeway, 2000). V tělních tekutinách či na povrchu buněk se nacházejí strukturně a funkčně heterogenní proteiny tzv. „pattern recognition receptors“ (PRRs). Tyto receptory jsou schopny rozpoznat molekulární struktury asociované s patogeny tzv. „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) a aktivovat imunitní odpověď. Lektiny patří mezi tyto PRRs. Ty se podílejí na „non-self-recognition“ a vážou se na povrchové determinanty potenciálních patogenů. Tato účast lektinů v rozpoznávání a obraně proti cizím objektům, jako jsou parazité, je u bezobratlých zásadní, a to i proto, že u nich nedochází k produkci diverzifikovaných imunoglobulinových molekul.

Lektiny se vyskytují u většiny organismů, od virů a bakterií až po rostliny a živočichy. Tyto proteiny nebo glykoproteiny jsou neenzymatického a neimunoglobulinového charakteru. Jsou schopny rozpoznávat a reverzibilně vázat sacharidové struktury (Lis & Sharon, 1998). Lektiny jsou mono-, di- nebo polyvalentní molekuly; pokud jsou složeny ze dvou či více domén vázajících sacharidy, jsou schopny shlukovat (aglutinovat) buňky s odpovídajícími povrchovými sacharidy. Díky této vlastnosti shlukovat červené krvinky obratlovců, bakterie a kvasinky získaly některé lektiny název aglutininy, v případě krvinek hemaglutininy. Také mohou precipitovat antigenní molekuly z roztoku. Aglutinace i precipitace mohou být inhibovány sacharidovými ligandy, pro které jsou tyto lektiny specifické.

#### *Místo vzniku a výskyt*

Lektiny měkkýšů mohou volně cirkulovat v hemolymfě, anebo být vázány na povrchu hemocytů, což bylo imunocytochemicky prokázáno u *L. stagnalis* (Van der Knaap *et al.*, 1981). Lektiny mohou být na povrch hemocytů vázány reverzibilně a fungovat jako cytofilní receptory pro cizí objekty (Van der Knaap *et al.*, 1983). Místo jejich vzniku bylo doposud identifikováno jen u některých druhů plžů. Produkce hemocyty byla prokázána u plžů *L. stagnalis*

a u adherovaných hemocytů *Planorbarius corneus* (Van der Knaap *et al.*, 1981; Ottaviani, 1988). Množství lektinů v hemolymfě plže se odvíjí od jeho stáří a zdravotního stavu. Plazma juvenilních jedinců vykazuje nižší opsonizační a hemaglutinační aktivitu než plazma dospělců (Dikkeboom *et al.*, 1985).

Vzhledem k tomu, že existuje několik kmenů *B. glabrata*, které se mezi sebou liší stupněm vnímavosti vůči parazitární infekci, bylo cílem zjistit, zda se v plazmě rezistentních plžů nachází nějaký faktor zodpovědný za rezistenci. Pokusy s přenosem plazmy naznačovaly přítomnost takového neznámého faktoru v plazmě rezistentního kmene, který byl schopen aktivovat nečinné hemocyty vnímavých plžů, a ty byly poté schopny usmrtit sporocystu (Granath and Yoshino, 1984). Fryer a Bayne (1989) identifikovali u rezistentních jedinců opsonin, který se nevyskytoval u vnímavých a mohl by být za zmíněný přenos rezistence zodpovědný. Spray a Granath (1990) taktéž pozorovali u rezistentního kmene *B. glabrata* polypeptidy o molekulové hmotnosti 55 kDa, které se nevyskytovaly v hemolymfě vnímavých plžů. Další experiment, při němž došlo k aglutinaci sporocysty fixované glutaraldehydem, naznačoval přítomnost multivalentního vazebného faktoru v plazmě rezistentních kmenů (10-R2, 13-16-R1) plže, nenacházejícího se u vnímavých jedinců M-linie (Loker *et al.*, 1984).

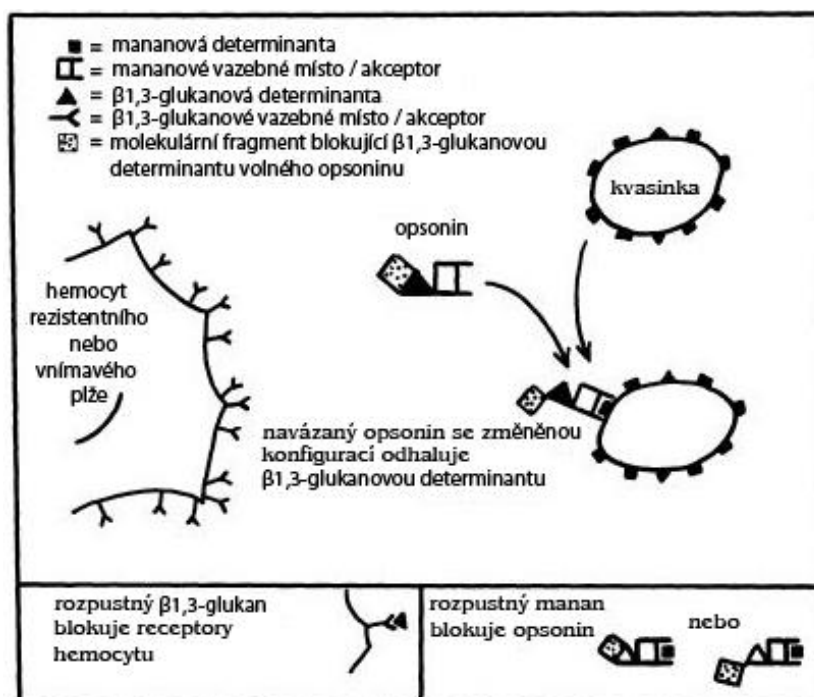
### *Funkce*

Lektiny volně cirkulující v plazmě se mohou vázat na cizorodé povrchy a chovat se jako aglutininy a opsoniny, což umožňuje hemocytům lépe fagocytovat cizorodé částice (Van der Knaap & Loker, 1990). Také dokážou precipitovat rozpustné cizorodé antigeny. Ovšem fagocytóza může proběhnout i v nepřítomnosti plazmatických faktorů. To bylo experimentálně dokázáno např. s kvasinkami usmrcenými teplem (Fryer & Bayne, 1989) nebo latexovými kuličkami (Uchikawa & Loker, 1992).

Při *in vitro* pokusech bylo identifikováno několik mechanismů rozpoznávání cizorodých objektů u dvou kmenů (PR, 13-16-R1) *B. glabrata* (Zelck & Becker, 1992). Přímé navázání imunitních buněk na povrchové sacharidové struktury patogena a následná fagocytóza se odehrává v přítomnosti vápníku. Ten zřejmě aktivuje molekuly na povrchu hemocytů, které se účastní rozpoznávání a vázání se na cizorodý povrch. Druhý způsob nevyžaduje přítomnost vápníku. Cílové buňky mohou být fagocytovány hemocyty, a to za pomoci tzv. přemostujících

molekul, což jsou plazmatické lektiny schopné rozpoznat sacharidové determinanty jak na efektorových, tak na cílových buňkách. Dalším pozorovaným mechanismem je opsonizace, která spočívá v obalení cizorodého materiálu plazmatickými lektiny. V molekule lektinu dojde po navázání ke konformační změně v jeho struktuře a odhalí se dosud skrytá sacharidová doména, která je rozpoznána povrchovými lektinovými receptory hemocytů (Bayne, 1990). Tyto mechanismy fagocytózy zprostředkované lektiny, tedy kalcium závislé a nezávislé, byly taktéž demonstrovány *in vitro* u *L. stagnalis* (Horák, 1998).  $Ca^{2+}$ -dependentní fagocytóza byla inhibována L-fukózou, laminarinem ( $\beta$ 1,3-glukan), mananem a nedostatkem vápníku. Nicméně pomocí heterologních lektinů došlo k stimulaci fagocytózy až na původní úroveň. To se odehrálo zřejmě pomocí tzv. přemostujících molekul mezi efektorovou a cílovou buňkou anebo pomocí opsoninů, které po navázání odhalují atraktivní epitopy pro receptory hemocytů.

V experimentu s kvasinkami bylo zjištěno, že  $\beta$ 1,3-glukan inhibuje fagocytózu hemocyty *B. glabrata*, zatímco manan blokuje opsonizaci (Bayne, 1990). Hemocyty *B. glabrata* exprimují na svém povrchu receptory pro  $\beta$ 1,3-glukanové determinanty. Volný plazmatický opsonin dokáže rozpoznat molekuly mananu kvasinek a vázat se na ně. Jako následek navázání se na mananové determinanty dojde ke konformační změně a opsonin odhalí svou  $\beta$ 1,3-glukanovou skupinu, která je rozpoznána receptorem hemocytu (viz obrázek č. 1).



Obrázek č. 1 – Model opsonizace kvasinek

Bayne 1990 (upraveno)

### *Hemaglutinace*

Hemolymfa *L. stagnalis* (Van der Knaap *et al.*, 1982) i *B. glabrata* (Couch *et al.*, 1990; Hertel *et al.*, 1994) obsahuje faktory schopné aglutinovat obratlovčí erythrocyty. Hemaglutinace je u *L. stagnalis* inhibovatelná různými mono- a polysacharidy (Van der Knaap *et al.*, 1982). Jako nejlepší inhibitor se ukázal monosacharid D-galaktóza. U *B. glabrata* jsou dobrými inhibitory D-glukóza (Michelson & Dubois, 1977), L-fukóza a L-rhamnóza (Couch *et al.*, 1990).

Dle aglutinace můžeme rozlišit u *L. stagnalis* dvě populace, a to plže s hemolymfou typu I a typu II (Van der Knaap *et al.*, 1982). Hemolymfa plžů typu I aglutinovala erythrocyty (lidské, králičí, ovčí) a mikroorganismy (*Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) ve vysokých titrech. Hemolymfa plžů typu II také aglutinovala mikroorganismy, z erythrocytů ovšem jen králičí. Typ hemolymfy má vliv na vývoj parazita; v hemolymfě plžů s typem I byl vývoj *Trichobilharzia ocellata* zpomalen na rozdíl od plžů s typem II (Van der Knaap *et al.*, 1987). Typ hemolymfy u plže se zdá být geneticky determinovaný a pravděpodobně souvisí se stupněm rezistence vůči parazitární nákaze. Zdá se, že rozdíly v aglutinačních titrech plazmy mezi rody a druhy, stejně jako rozdíly mezi jednotlivými populacemi jednoho druhu nejsou až tak neobvyklé (Michelson & Dubois, 1977).

### *Indukce produkce plazmatických lektinů*

Infekce motolicemi může změnit množství plazmatických opsoninů a aglutininů. Infekce *S. mansoni* a *E. parensi* vyvolala různou odpověď v rámci jednoho kmene plže i mezi různými kmeny (M-linie a 10-R2) (Couch *et al.*, 1990). Infekce *E. parensi* vyvolala výrazné zvýšení aglutinačních titerů u M-linie *B. glabrata*, zatímco u 10-R2 byly změny pouze minimální. Také změny při infekci *S. mansoni* nebyly nikterak výrazné jak u kmene M-linie, tak i u 10-R2 s výjimkou nárůstu čtyři dny p. i. u 10-R2 plžů.

Uchikawa a Loker (1992) zkoumali proteiny, které se přichytily na povrch latexových kuliček v průběhu inkubace s plazmou plžů infikovaných *E. parensi*. Na SDS-PAGE gelech byly pozorovány dvě skupiny difúzních proužků v rozmezí molekulových hmotností 150–220 kDa a 75–130 kDa. Tyto skupiny byly označeny jako "group I molecules" (G1M) a "group II molecules" (G2M). Adema (1997), pozoroval u *B. glabrata* ještě třetí skupinu polypeptidů indukovaných infekcí *E. parensi* tvořících difúzní proužek okolo 65 kDa. Stejně jako G1M

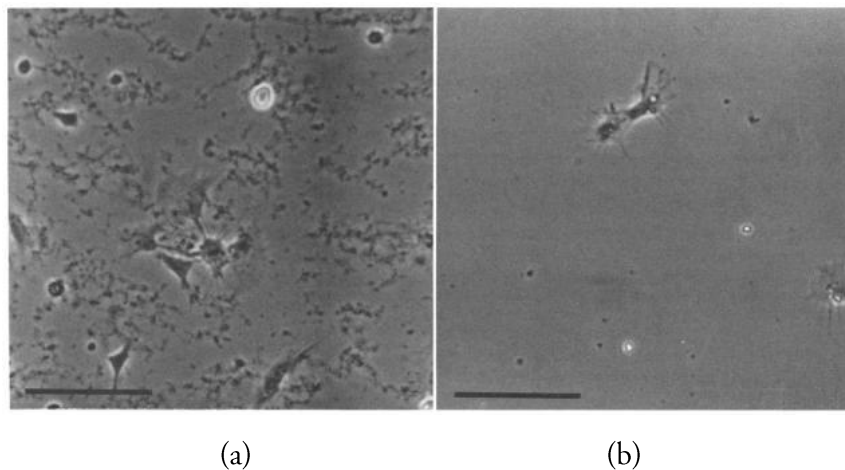
a G2M, tyto polypeptidy vykazují lektinovou aktivitu a také jsou schopné precipitovat produkty sporocysty. Tato precipitace je inhibovatelná monosacharidem L-fukózou.

G1M a G2M se vážou na několik typů cizorodých objektů: G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterie, králíci a lidské erytrocyty, redie a sporocysty *E. parensei* (Hertel *et al.*, 1994). Bakterie a sporocysty *E. parensei* vážou více G1M, zatímco erytrocyty a redie G2M. Dále se G1M a G2M vážou na latexové kuličky (Uchikawa & Loker, 1992).

Funkční význam těchto polypeptidů je třeba objasnit. Aglutinace pravděpodobně přímo nezabraňuje infekci. Zřejmě se však může podílet na odstraňování rozpustných parazitárních tzv. exkrecně-sekrecních produktů (ESP) z hemolymfy infikovaných plžů, pomocí kterých parazité dokážou ovlivnit mnoho funkcí hemocytů (Núñez *et al.*, 1997).

#### *Hemolymfové agregáty*

U plžů *B. glabrata* infikovaných *E. parensei* byl pozorován výskyt agregátů 1–15 dní p.i. (viz obrázek č. 2) (Loker & Hertel, 1987). Součástí agregátů byl polypeptid 190–200 kDa, který se nevyskytoval u kontrol. Agregáty by zřejmě mohly představovat komplex aglutininů a antigenů parazita nebo molekul aglutininů, které se ve vyšších koncentracích staly nerozpustnými (Couch *et al.*, 1990).



Obrázek č. 2: (a) Hemolymfa z plžů *B. glabrata* infikovaných *E. parensei* (b) Kontrola  
Loker & Hertel, 1987 (upraveno)

U *B. glabrata* infikované echinostomou byl pozorován výskyt substance imobilizující miracidia (MIS), která se objevila den po infekci a byla přítomna až do čtrnáctého dne, kdy vymizela (Lie *et al.*, 1980), což koresponduje s časem výskytu uvedených agregátů.

Nicméně výskyt agregátů není jedinou neobjasněnou humorální reakcí. Např. ve studii Matricon-Gondran & Letocart (1999) došlo po vpravení cizorodých částic (zymosan, latexové kuličky) do *B. glabrata* k indukci vzniku tubulárních filament v hemolymfě, a to v několika málo minutách, zatímco při experimentálním zranění a injekci solného roztoku byla reakce minimální.

## 6.2. FRePs

V nedávné době byla v hemolymfě *B. glabrata* infikované *E. parensei* identifikovaná další skupina proteinů nazvaná „fibrinogen-related proteins“ (FRePs) (Adema *et al.*, 1997). Tyto polypeptidy byly v průběhu infekce uvolňovány do hemolymfy z hemocytů a precipitovaly ESP sporocysty *E. parensei*. Z tohoto bylo usuzováno, že by mohly hrát roli v obraně plže v průběhu parazitace.

FRePs mají unikátní strukturu. Na N-konci jejich molekuly se nachází jedna nebo dvě domény podobné molekulám patřícím do imunoglobulinové nadrodiny (IgSF) (Leonard *et al.*, 2001). Dvě tyto domény byly zatím objeveny jen v případě FReP 3 a 7. Na C-konci molekuly je jedna fibrinogenová  $\beta/\gamma$  doména (FBG) (Leonard *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Mezi Ig a FBG doménami se nachází oblast zvaná „interceding region“ (ICR).

Je pravděpodobné, že se některé majoritní FRePs, jako je např. FReP4, vyskytují ve svém nativním uspořádání jako multimery (Zhang *et al.*, 2008). V neredukčních podmínkách byly na SDS-PAGE gelech pozorovány proužky s vyšší molekulovou hmotností, což by odpovídalo výskytu těchto FRePs ve formě tetramerů nebo i vícemerních forem.

Polypeptidy s fibrinogenovými doménami se u obratlovců účastní vytváření krevních sraženin a také mají svůj podíl v rámci imunity. Například fikoliny jsou nejlépe prozkoumané proteiny s FBG doménami u člověka, mají lektinovou aktivitu a jsou schopny aktivovat lektinovou cestu komplementu (Fujita, 2002). Na svém N-konci však nesou namísto Ig domény doménu podobnou kolagenu. FBG doména ve FRePs molekulách vykazuje sekvenční podobnost s lidským plazmatickým proteinem P35 (35 kDa), což je kalcium-dependentní opsonin schopný vázat cizorodý materiál (Matsushita *et al.*, 1996). Molekuly s IgSF jsou známé zejména z imunitních systémů obratlovců.

V obranných systémech bezobratlých byly nalezeny i další molekuly s IgSF doménami. Mezi ně patří např. hmyzí hemolin objevený u můry *Hyalophora cecropia* (Sun *et al.*, 1990) a také MDM („Molluscan defense molecule“) produkovaný granulárními buňkami *L. stagnalis* (Hoek *et al.*, 1996).

FRePs jsou kódovány velkou genovou rodinou. Dodnes bylo identifikováno 14 podrodin těchto proteinů (Zhang *et al.*, 2008). Byla prokázána značná diverzita na mRNA úrovni a také to, že diverzifikace FRePs je způsobena genovou konverzí a bodovou mutací (Zhang *et al.*, 2004). Objev alternativně sestříhaných forem FRePs transkriptů a retrosekvencí ukazuje, že diverzifikace FReP se děje nejen na genové, ale i na transkripční úrovni (Zhang & Loker, 2003).

FRePs mají  $\text{Ca}^{2+}$  závislou lektinovou aktivitu (Adema *et al.*, 1997). Jejich činnost je inhibovatelná monosacharidem L-fukózou. FRePs jsou schopny se vázat na sporocystu a redie *E. parensei* (Hertel *et al.*, 1994). Také z hemolymfy precipitují ESP produkované sporocystou (Adema *et al.*, 1997). Předpokládá se, že se FRePs podílejí na „non-self recognition“. Jejich polymorfismus by mohl zvyšovat šanci jednotlivých plžů rozeznat široké spektrum cizorodých objektů.

Expres některých skupin těchto proteinů je zvýšená v průběhu infekce *E. parensei*. Pomocí kvantitativní PCR (qPCR) byla sledována exprese FRePs v průběhu infekce dvou kmenů (M-linie, BS-90) *B. glabrata* (Hertel *et al.*, 2005). U obou kmenů plžů vystavených *E. parensei* byl pozorován výrazný nárůst v expresi FRePs 2 a 4 s maximem pro FReP2 čtyři dny a pro FReP4 osm dní po expozici. Infekce *S. mansoni* nevyvolala u M-linie plžů změnu v expresi FRePs. Je možné, že nedošlo k rozeznání parazita. Naopak rezistentní plži kmene BS-90 po vystavení *S. mansoni* signifikantně zvýšili expresi FReP2, což svědčí o tom, že došlo nejen k rozpoznání parazita, ale i k výrazné odpovědi na jeho přítomnost.

FRePs mají schopnost rozeznat i velké množství dalších patogenů, jako jsou bakterie ( $G^+$  i  $G^-$ ) a kvasinky. Rozpoznávání různých patogenů se zdá být specifické, jelikož bakterie jsou vázány 95 kDa a/nebo 125 kDa FRePs, zatímco produkty *E. parensei* převážně 65–75 kDa (Zhang *et al.*, 2008).

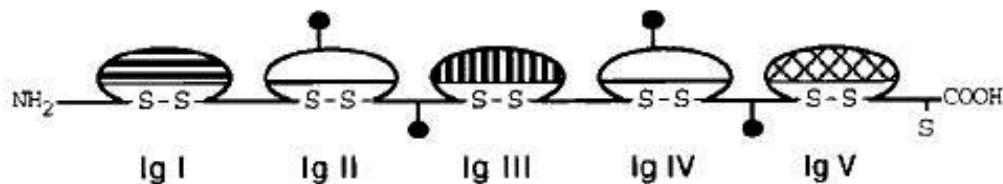
Ačkoliv během infekce *E. parensei* dochází k výraznému zvýšení exprese některých genů kódujících FRePs, *B. glabrata* přesto podlehně infekci. Z tohoto by se dalo vyvodit, že FRePs

v této interakci nemají významnou roli. Nicméně tím, že FREPs precipitují SEP, mohou alespoň částečně přispět k obraně plže.

### 6.3. MDM

Parazité jsou pomocí svých ESP schopni ovlivňovat aktivitu jednotlivých komponent obranného systému plže. Pomocí těchto produktů dokážou např. indukovat uvolňování faktorů z buněk pojivové tkáně, které pak ovlivňují aktivitu hemocytů. Infekce motolicí *T. ocellata* mění expresi v granulárních buňkách *L. stagnalis*. Ty se nacházejí v pojivové tkáni, která obklopuje nervovou tkáň. Granulární buňky obsahují velká sekretorní granula, jejichž proteinový obsah exocytózou uvolňují do hemolymfy (Sminia, 1972).

Diferenčním screeningem cDNA knihoven byl odhalen transkript kódující protein nazvaný „Molluscan defense molecule“ (MDM) (Hoek *et al.*, 1996). Je to jedna z několika molekul identifikovaných u bezobratlých, u které se vyskytuje doména podobná imunoglobulinům. Struktura MDM obsahuje pět těchto imunoglobulinových domén (viz obrázek č. 3). V molekule je přítomno třináct cysteinových skupin. Z toho se jich deset účastní na tvorbě intra-Ig disulfidových můstků, jeden zbytek se nachází na C konci a zřejmě by se mohl podílet na tvorbě můstku mezi dvěma molekulami MDM.



Obrázek č. 3: Struktura MDM. Převzato z Hoek *et al.* (1996)

Struktura MDM je podobná hmyzímu imunoproteinu hemolinu, patřícímu taktéž do imunoglobulinové rodiny (Sun *et al.*, 1990). Hemolin hraje důležitou roli v obraně proti bakteriálním infekcím u hmyzu (Zhao & Kanost, 1996). Oba tyto proteiny sdílí podobnou aminokyselinovou sekvenci s neurobuněčnými adhezivními molekulami (NCAM), nicméně postrádají fibronektinové motivy a sekvenční motivy pro buněčné spojení (Hoek *et al.*, 1996).

V průběhu infekce *T. ocellata* dochází k postupnému snižování exprese genu pro MDM u parazitovaných jedinců, a to až na 21% původní hodnoty (Hoek *et al.*, 1996). Zvýšená exprese



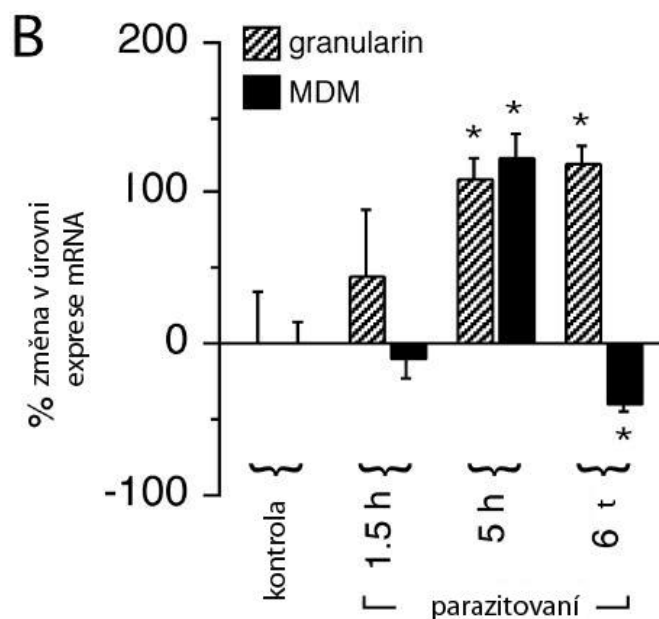
tohoto genu byla pozorována pouze pět hodin po infekci. Počáteční nárůst pravděpodobně odpovídá nespecifické aktivaci imunitního systému v krátké době po nákaze, kdy dochází k eliminaci ciliárních destiček miracidia. MDM pozitivně ovlivňuje fagocytickou aktivitu hemocytů (de Jong-Brink *et al.*, 2001). Zhruba 35 % hemocytů fagocytovalo zymosanové částice při absenci MDM, zatímco 46 % v jeho přítomnosti. Z tohoto vyplývá, že parazit nejspíš dokáže indukovat změny v hladině MDM a tento jeho zásah zřejmě představuje strategii, jak obelstít hostitelský obranný systém.

#### 6.4. Granularin

Granularin je protein sekretovaný granulárními buňkami, které jsou zdrojem imunitních faktorů. V průběhu infekce dochází ke zvýšení jeho exprese (Smit *et al.*, 2004). Tento 62 aminokyselin dlouhý peptid sdílí významnou strukturní podobu s proteiny extracelulární matrix, např. s trombospondinem, Von Willebrandovým faktorem (vWF) a některými transmembránovými proteiny. Von Willebrandův faktor je evolučně konzervovaná doména nacházející se v mnoha sekrečních extracelulárních proteinech. U obratlovců je produkován endoteliálními buňkami a hraje roli při tvorbě krevní sraženiny (Sadler, 1998). V molekule granularinu se nachází jediná tato vWF doména (Smit *et al.*, 2004).

Na rozdíl od MDM, dochází v průběhu infekce ke zvýšení exprese genu pro granularin. Zvýšená exprese tohoto genu je zřejmá již 1,5 h po infekci s výrazným nárůstem 5 hodin p.i. (cca o 100 %) a byla dále zachována, a to až do 6. týdne pozorování (viz graf č. 1). Granularin má vliv na fagocytickou činnost hemocytů. Když byly hemocyty pokusně preinkubovány s granularinem, jejich fagocytická aktivita byla redukována. Avšak pokud byly nejprve inkubovány zymosanové částice s granularinem a poté přidány k hemocytům, tak došlo ke zvýšení této aktivity. Z tohoto výsledku vyplývá, že se granularin chová jako opsonin, který se naváže na cizorodou částici a umožní její rozeznání hemocylem a následnou fagocytózu.

Vzhledem k tomu, že k ovlivnění genové exprese došlo až po infekci (1,5–5 h), naznačovalo by to, že tyto změny byly indukovány přímo parazitem.



Graf č. 1: Porovnání hladin mRNA granularinu a MDM v průběhu infekce  
Smit *et al.* 2004 (upraveno)

## 6.5. Neuropeptidy

Parazitace ovlivňuje fyziologii i chování hostitele. Parazit se snaží pro sebe získat dostatek prostoru a energie, a tudíž si přizpůsobuje jinak nepřátelské prostředí v hostiteli ke svému prospěchu. Během nákazy dochází k interferenci s dvěma hlavními regulačními systémy – IDS a NES (neuroendokrinní systém), které vzájemně úzce spolupracují. Dochází k ovlivnění center řídicích růst, metabolismus a reprodukci. Infekce *T. ocellata* indukuje u *L. stagnalis* zvýšený růst („giant growth“), avšak zároveň s růstem těla nedochází k nárůstu suché hmotnosti (Joosse & Van Elk, 1986). Infikovaní plži taktéž vykazují sníženou reprodukci, vrcholící až parazitární kastrací.

### 6.5.1. Schistosomin

Pomocí neidentifikovaného parazitárního faktoru dochází u *L. stagnalis* k indukci produkce schistosominu. Schistosomin je peptid o 79 aminokyselinách a molekulové hmotnosti 8738 Da (Hordijk *et al.*, 1991). Je syntetizován a uvolňován do hemolymfy z hemocytů a telogliálních (pojivových) buněk v nervové soustavě (de Jong-Brink *et al.*, 2001). Inhibuje

účinek hormonů, které řídí činnost bílkovinné žlázy, ovulaci a kladení vajíček. Také ovlivňuje i LGCs („Light green cells“) regulující růst plže.

U *B. glabrata* nákaza *S. mansoni* ani *E. paraensei* nevyvolala změnu v expresi schistosominu ani v pozdních fázích infekce (Zhang *et al.*, 2009). Při zkoumání odpovědi na bakteriální infekci taktéž nebyly pozorovány změny v hladinách mRNA schistosominu. Z toho se usuzuje, že schistosomin u tohoto plže pravděpodobně nehraje úlohu v obraně. Nicméně to, že s rostoucím věkem dochází ke snížení exprese genu pro schistosomin, by spíše než účast v obraně naznačovalo úlohu ve vývoji plže.

### 6.5.2. FaRPs

V průběhu infekce *T. ocellata* dochází u *L. stagnalis* ke zvýšení exprese genů pro prekurzory neuropeptidů patřících do -RF (FaRPs) rodiny. Tetrapeptid FMRF-amid (Phe–Met–Arg–Phe–NH<sub>2</sub>) byl prvně identifikován u mlže *Macrollista nimbosa* jakožto kardioexcitační agens, jenž by se mohl uvolňovat do hemolymfy (Price & Greenberg, 1977). Tento tetrapeptid-amid byl nalezen pouze u měkkýšů, a to zejména v gangliích, ale i v některých orgánech; např. u *Helisoma trivolvis*, v ledvině, kůži, plášti, slinných žlázách a i v hemolymfě (viz review López-Vera *et al.*, 2008). Nicméně dále byly v nervových systémech mnoha živočichů objeveny proteiny podobné FMRF-amidům (FaRPs). Na jejich C-konci se nachází Arg–Phe–NH<sub>2</sub> (-RF) sekvence a dle této charakteristiky byly pojmenovány jako RF-amidy nebo RF-NH<sub>2</sub>. Vyskytují se jak u bezobratlých, tak u obratlovců. Účastní se rozličných fyziologických procesů zahrnujících základní životní funkce, jako je výživa, reprodukce, vývoj a osmoregulace.

Další skupinou peptidů patřících do rodiny -RFamidů jsou LFRF-amidy. Ty byly nalezeny v gangliích mlže *Fusinus ferrugineus* (Kurachi 1993). Úroveň exprese genů, které kódují FMRFamid a LFRFamidy, je při infekci *L. stagnalis* zvýšená a zůstává tak po dobu nákazy (Hoek *et al.*, 1997). K exprimování LFRF-amidů dochází v bukálních gangliích, v postranních lalocích cerebrálního ganglia a v malých seskupeních („clusters“) cerebrálního ganglia plže (Hoek *et al.*, 2005). FMRF-amidy jsou schopny aktivovat K<sup>+</sup> kanály a způsobit tak hyperpolarizaci buněk (Brussaard *et al.*, 1988; Hoek *et al.*, 2005). Tím dochází k inhibici funkce LGCs a CDCs („Caudodorsal cells“), což u *L. stagnalis* způsobuje potlačení metabolismu a reprodukce.

Nicméně FMRF-amidy mají prokazatelný inhibiční efekt také na fagocytickou aktivitu hemocytů *L. stagnalis* i *B. glabrata* (de Jong-Brink *et al.*, 2001). Protilátkovým značením bylo

zjištěno, že i únikové žlázy *T. ocellata* a *S. mansoni* se podílejí na produkci tohoto neuropeptidu. Vzhledem k tomu, že k ovlivnění genové exprese plže dojde záhy po infikování (1.5-5h) (Hoek *et al.*, 1997), je možné, že tyto změny indukuje přímo parazit a je schopen tak způsobit jak přímou, tak i nepřímou imunosupresi.

## 6.6. Cytokinům podobné molekuly

Cytokiny se jako rozpustné faktory podílejí na imunitních a neuroendokrinních odpovědích a zprostředkovávají interakci mezi různými buněčnými typy. Jsou to evolučně konzervované molekuly vyznačující se pleiotropicitou (účinkem na vícero buněčných typů) a redundancí (více cytokinů má stejný účinek).

Cytokinům podobné molekuly byly nalezeny v různých tkáních bezobratlých, včetně měkkýšů (viz review Ottaviani *et al.*, 2004). Ottaviani (1993) odhalil přítomnost několika proteinů podobných prozánětlivým cytokinům obratlovců, včetně interleukinu 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukinu 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukinu 2 (IL-2), interleukinu 6 (IL-6), a „ $\alpha$  Tumor Necrosis Factor“ (TNF- $\alpha$ ) v hemocytech *P. corneus* a *Viviparus ater*. U *P. corneus* byl jejich výskyt omezen pouze na adherentní („spreading“) hemocyty, které jsou fagocyticky aktivní, zatímco kulaté hemocyty přítomnost interleukinů nevykazovaly. Různé cytokiny (IL-1 $\alpha$ , IL-2, TNF) mohou ovlivnit jeden buněčný typ, např. u *V. ater* a *P. corneus* hemocyty, a zvýšit tak jeho fagocytickou aktivitu a produkci reaktivních dusíkatých intermediátů (Ottaviani *et al.*, 1995).

U *B. glabrata* byl identifikován protein s imunologickou a funkční podobností interleukinu 1 (IL-1) (Granath *et al.*, 1994). V této studii byla prvně prokázána účast cytokinů bezobratlých v imunologické reakci iniciované vniknuvším patogenem. Vnímaví (M-line) a rezistentní (10-R2, 13-16-R1) plži se liší v IL-1 podobné aktivitě v jejich plazmě a expozice *S. mansoni* ovlivňuje tyto kmeny různě. U kmenů M-linie a 10-R2 se hladina IL-1 drasticky snížila následkem infekce, zatímco u 13-16-R1 došlo k zvýšení. Oba dva rezistentní kmeny však udržely výrazně vyšší hladiny IL-1 než vnímavý kmen vystavený *S. mansoni*. Při inkubaci hemocytů s lidským rekombinantním interleukinem 1 (rhIL-1) *in vitro* bylo pozorováno, že rhIL-1 nemá žádný pozorovatelný vliv na fagocytózu, ale že výrazně stimuluje produkci reaktivních kyslíkových intermediátů v hemocytech rezistentních, ne však vnímavých kmenů.

Connors *et al.* (1995) injikovali rhIL-1 $\beta$  do vnímavého plže z M-linie s parazitem redukovanou hladinou IL-1, což způsobilo rychlou aktivaci fagocytózy a produkce superoxidu na

úroveň rezistentních plžů kmene 13-16-R1. Vpravení rhIL-1 $\beta$  do plže infikovaného *S. mansoni* také vyústilo ve výraznou redukci počtu uvolněných cercárií. Snížená produkce cercárií ve vnímavých plžích byla zřejmě zapříčiněna úhynem primárních sporocyst, kdy do tří dnů p.i. došlo k 50% redukci jejich počtu (Connors *et al.*, 1998). IL-1 plže pravděpodobně hraje roli ve vytvoření rezistence *B. glabrata* a také při usmrcení parazita, které přímo nesouvisí s enkapsulací hemocyty. Vzhledem k tomu, že rhIL-1 $\beta$  není sám o sobě pro sporocystu toxický, zřejmě dochází k indukci produkce neznámého humorálního faktoru nebo spuštění mechanismu, který je schopen sporocystu usmrtit.

## Závěr:

Cílem bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o humorálních faktorech, které hrají úlohu v obraně plže při nákaze schistosomami. Obranný systém plžů je tzv. vrozený a sestává z buněčné a humorální složky. Jeho hlavní zbraní jsou hemocyty schopné zabít sporocystu, a to i v nepřítomnosti plazmy. Hemocyty produkují některé z humorálních faktorů podílejících se na imunitní odpovědi, avšak tyto nejsou zdaleka tak dobře charakterizovány. V mnoha studiích byl zkoumán vliv plazmy jako celku, a to jak plazmatické faktory ovlivňují aktivitu hemocytů nebo jaký mají vliv na vitalitu sporocysty. Také byly prováděny experimenty s přenosem rezistence pomocí plazmy či hematopoetického orgánu. Bylo prokázáno, že i humorální faktory jsou důležitým prvkem ovlivňujícím výsledek infekce. Rezistence k parazitární infekci je pravděpodobně výsledkem komplexního procesu zahrnujícího různé mechanismy, které vyúsťují v usmrcení parazita obranným systémem plže. Zřejmě i hladina IL-1 plže hraje roli v ustanovení rezistence plže *B. glabrata*. Mechanismus, pomocí kterého se toto odehrává, není ještě objasněn. Nicméně nejlépe charakterizovanou skupinou plazmatických proteinů jsou lektiny, které se podílejí na „non-self recognition“. Nacházejí se volně v plazmě i na povrchu hemocytů. V nedávné době byla identifikována v plazmě *B. glabrata* také další skupina proteinů s lektinovou aktivitou nazvaná FRePs. Tyto proteiny mají na N konci své molekuly doménu podobnou imunoglobulinům, což je u bezobratlých živočichů poměrně vzácné. *Biomphalaria glabrata* je schopna produkovat velké množství těchto diverzifikovaných FRePs. Tato diverzifikace se děje jak na genové, tak na transkripční úrovni. Objev diverzifikace imunitních molekul u plžů, spolu s dalšími poznatky týkajícími se imunity jiných bezobratlých živočichů, by mohl pozměnit zažité představy o vlastnostech imunitních systémů bezobratlých a jejich adaptabilitě.

Svoji budoucí práci chci zaměřit na pozorování změn v abundanci plazmatických proteinů plžů rodu *Radix*, experimentálně infikovaných motolicemi rodů *Trichobilharzia* a *Fascioloides*, a další charakterizaci těchto proteinů.

## Přehled literatury:

### Primární zdroje:

- Adema C M, Hertel L A, Miller R D a Loker E S. 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 94:8691-8696.
- Adema C M, Van der Knaap W P W a Sminia T. 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences*, 4:201-223.
- Bayne C J. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience*, 40:723-731.
- Bayne C J, Buckley P M a DeWan P C. 1980. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Journal of Parasitology*, 66:413-419.
- Bayne C J, Loker E S a Yui M A. 1986. Interactions between the plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Parasitology*, 92:653-664.
- Brussaard A B, Kits K S, TerMaat A, Van Minnen J a Moed P J. 1988. Dual inhibitory action of FMRFamide on neurosecretory cells controlling egg laying behavior in the pond snail. *Brain Research*, 447:35-51.
- Connors V A, de Buron I a Granath W O, Jr. 1995. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 80:139-148.
- Connors V A, de Buron I, Jourdan J, Theron A, Agner A a Granath W O, Jr. 1998. Recombinant human interleukin-1-mediated killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 84:920-926.
- Couch L, Hertel L A a Loker E S. 1990. Humoral response of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: observations on a circulating hemagglutinin. *Journal of Experimental Zoology*, 255:340-349.
- de Jong-Brink M, Bergamin-Sassen M a Soto M S. 2001. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology*, 123:129-141.
- Dikkeboom R, Van der Knaap W P W, Meuleman E A a Sminia T. 1985. A comparative study on the internal defense of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunology*, 55:547-553.
- El-Ansary A a Al-Daihan S. 2006. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. *Medical Science Monitor*, 12:282-292.

- Fryer S E a Bayne C J. 1989. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain-specific, time-dependent process. *Parasite Immunology*, 11:269-278.
- Fujita T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2:346-353.
- Granath W O, Jr., Connors V A a Tarleton R L. 1994. Interleukin 1 activity in haemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression, and biological function. *Cytokine*, 6:21-27.
- Granath W O, Jr. a Yoshino T P. 1984. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 58:188-193.
- Gress F M a Cheng T C. 1973. Alterations in total serum proteins and protein fractions in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 22:382-390.
- Hertel L A, Adema C M a Loker E S. 2005. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29:295-303.
- Hertel L A, Stricker S A, Monroy F P, Wilson W D a Loker E S. 1994. *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins: binding to bacteria, mammalian erythrocytes, and to sporocysts and rediae of *Echinostoma paraensei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64:52-61.
- Hine P M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9:367-385.
- Hoek R M, Li K W, van Minnen J, Lodder J C, de Jong-Brink M, Smit A B a van Kesteren R E. 2005. LFRFamides: a novel family of parasitism-induced -RFamide neuropeptides that inhibit the activity of neuroendocrine cells in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurochemistry*, 92:1073-1080.
- Hoek R M, Smit A B, Frings H, Vink J M, deJongBrink M a Geraerts W P M. 1996. A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. *European Journal of Immunology*, 26:939-944.
- Hoek R M, vanKesteren R E, Smit A B, deJongBrink M a Geraerts W P M. 1997. Altered gene expression in the host brain caused by a trematode parasite: Neuropeptide genes are preferentially affected during parasitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:14072-14076.
- Horák P, Deme, R. 1998. Lectins and saccharides in *Lymnaea stagnalis* haemocyte recognition. *Comparative Haematology International*, 8:210-218.
- Hordijk P L, Schallig H, Ebberink R H M, Dejongbrink M a Joosse J. 1991. Primary structure and origin of schistosomin, an antigonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Biochemical Journal*, 279:837-842.



- Joosse J a Van Elk R. 1986. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*, 62:1-13.
- Lee F O a Cheng T C. 1972. *Schistosoma mansoni*: alterations in total protein and hemoglobin in the hemolymph of infected *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 31:203-216.
- Leonard P M, Adema C M, Zhang S M a Loker E S. 2001. Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Gene*, 269:155-165.
- Lie K J, Jeong K H a Heyneman D. 1980. Inducement of miracidia-immobilizing substance in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology*, 10:183-188.
- Lis H a Sharon N. 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 98:637-674.
- Loker E S, Adema C M, Zhang S M a Kepler T B. 2004. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198:10-24.
- Loker E S a Hertel L A. 1987. Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. *Journal of Parasitology*, 73:503-513.
- Loker E S, Yui M A a Bayne C J. 1984. *Schistosoma mansoni*: agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 58:56-62.
- López-Vera E, Aguilar M B a Heimer de la Cotera E P. 2008. FMRFamide and related peptides in the phylum Mollusca. *Peptides*, 29:310-317.
- Matricón-Gondran M a Letocart M. 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*: III. observations on tubular helical filaments induced in the hemolymph by foreign material. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74:248-254.
- Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M a Mizuochi T. 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:2448-2454.
- McKerrow J H, Jeong K H a Beckstead J H. 1985. Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 37:341-347.
- Medzhitov R a Janeway C, Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:89-97.
- Michelson E H a Dubois L. 1977. Agglutinins and lysins in the molluscan family *Planorbidae*: a survey of hemolymph, egg-masses, and albumen-gland extracts. *Biological Bulletin*, 153:219-227.
- Miller A N, Raghavan N, FitzGerald P C, Lewis F A a Knight M. 2001. Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *International Journal for Parasitology*, 31:687-696.

- Núñez P E, Molenaar M J, Lageweg W, Li K W a De Jong-Brink M. 1997. Excretory - secretory products of *Trichobilharzia ocellata* and their modulating effects on the internal defence system of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitology*, 114:135-144.
- Ottaviani E. 1988. Immunocytochemical study of agglutinin synthesis in the haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius comeus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). *Bolletino di zoologia*, 55:27 - 29.
- Ottaviani E, Franchini A, Cassanelli S a Genedani S. 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biology of the Cell*, 85:87-91.
- Ottaviani E, Franchini A a Franceschi C. 1993. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195:984-988.
- Ottaviani E, Malagoli D a Franchini A. 2004. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 34:1-25.
- Pinheiro J, Maldonado Junior A a Lanfredi R M. 2009. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. *Parasitology Research*, 106:55-59.
- Price D A a Greenberg M J. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 197:670-671.
- Sadler J E. 1998. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry*, 67:395-424.
- Sminia T. 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 130:497-526.
- Sminia T. 1974. Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. *Cell and Tissue Research*, 150:443-454.
- Smit A B, de Jong-Brink M, Li K W, Sassen M M J, Spijker S, van Elk R, Buijs S P, van Minnen J a van Kesteren R E. 2004. Granularin, a novel molluscan opsonin comprising a single vWF type C domain is up-regulated during parasitisation. *Faseb Journal*, 18:845-847.
- Spray F J a Granath W O, Jr. 1990. Differential binding of hemolymph proteins from schistosome-resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Journal of Parasitology*, 76:225-229.
- Sullivan J T, Pikios S S a Alonzo A Q. 2004. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 90:92-96.
- Sullivan J T a Spence J V. 1994. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. *Journal of Parasitology*, 80:449-453.
- Sun S C, Lindstrom I, Boman H G, Faye I a Schmidt O. 1990. Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, 250:1729-1732.

- Uchikawa R a Loker E S. 1992. *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*: adherence of unaltered or modified latex beads to hemocytes of the host snail *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 75:223-232.
- Van der Knaap W P W, Boerrigter-Barendsen L H, van den Hoeven D S a Sminia T. 1981. Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (Amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research*, 219:291-296.
- Van der Knaap W P W, Doderer A, Boerrigter-Barendsen L H a Sminia T. 1982. Some properties of an agglutinin in the haemolymph of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Biological Bulletin*, 162:404-412.
- Van der Knaap W P W a Loker E S. 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today*, 6:175-182.
- Van der Knaap W P W, Meuleman E A a Sminia T. 1987. Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology Research*, 73:57-65.
- Van der Knaap W P W, Sminia T, Schutte R a Boerrigter-Barendsen L H. 1983. Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: *in vitro* phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*. *Immunology*, 48:377-383.
- Vasquez R E a Sullivan J T. 2001. Further characterization of passively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 87:1360-1365.
- Vasquez R E a Sullivan J T. 2001. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. *Developmental and Comparative Immunology*, 25:561-564.
- Zelck U a Becker W. 1992. *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins, and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*-infected snails. *Experimental Parasitology*, 75:126-136.
- Zelck U E, Becker W a Bayne C J. 1995. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Developmental and Comparative Immunology*, 19:181-194.
- Zhang S M, Adema C M, Kepler T B a Loker E S. 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*, 305:251-254.
- Zhang S M, Leonard P M, Adema C M a Loker E S. 2001. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics*, 53:684-694.
- Zhang S M a Loker E S. 2003. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins. *Developmental and Comparative Immunology*, 27:175-187.

- Zhang S M, Nian H, Wang B, Loker E S a Adema C M. 2009. Schistosomin from the snail *Biomphalaria glabrata*: Expression studies suggest no involvement in trematode-mediated castration. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165:79-86.
- Zhang S M, Nian H, Zeng Y a DeJong R J. 2008. Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: Characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 32:1119-1130.
- Zhang S M, Zeng Y a Loker E S. 2008. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. *Innate Immunity*, 14:175-189.
- Zhao L a Kanost M R. 1996. In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. *Journal of Insect Physiology*, 42:73-79.

#### Sekundární zdroje:

- Newton W L. 1953. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Experimental Parasitology*, 2:242-257.
- Richards C S. 1973. Susceptibility of adult *Biomphalaria Glabrata* to *Schistosoma Mansoni* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22:748-756.

#### Internetové zdroje:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>