

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Prolyl endopeptidasa z klíštěte *Ixodes ricinus*
Prolyl endopeptidase from the tick *Ixodes ricinus*

Olívia Petrválská

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele RNDr. Michaela Mareše CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, 28.5.2012

Olívia Petrválská

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Michaelovi Marešovi CSc. za trpělivost a ochotu při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinovi Hornovi CSc., Mgr. Pavle Fajtové a členům celé laboratoře za jejich vstřícnost a pomoc při řešení všech praktických problémů. Za odborné posouzení celé práce děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi CSc. Na závěr děkuji své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
AMC	7-amino-4-methyl-kumarin
APS	peroxodisíran amonný
Bis-tris propan	1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]- propan
BoPC	BodipyTMR-Ala-Ala-Pro-CMK
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CMK	chloromethylketon
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
E-64	N-[N-(L-3-trans-karboxyoxirin-2-karbonyl)-L- leucin]-agmatin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1- propan sulfonát
IsPEP	prolylendopeptidasa z klíštěte <i>I. scapularis</i>
leupeptin	N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-argininal
Pefabloc	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluorid
pepstatin A	isovaleryl-L-val-L-val-statyl-L-alanyl-statin
PEG	polyethylenglykol
PEP	prolylendopeptidasa
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RFU	relativní fluorescenční jednotka
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SmPEP	prolylendopeptidasa z krevničky stěvní

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TLCK	N- α -tosyl-L-lysinyl-chloromethylketon
TPCK	N-tosyl-L-fenylalaninyl-chloromethylketon
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Z	benzyloxycarbonyl

Abstrakt

Klíšťata jsou významnými parazity a vektory patogenů. Na území České republiky je klíště obecné (*Ixodes ricinus*) nejrozšířenějším druhem, který přenáší lymfskou boreliózu a klíšťovou encefalitidu. Proteasy klíšťat jsou potenciální molekulární cíle pro vývoj nových vakcín proti těmto parazitům. Tato práce se zaměřuje na biochemickou analýzu prolylendopeptidasy z klíštěte obecného, která dosud nebyla studována. Prolylendopeptidasa byla detekována v extraktu ze střevní tkáně klíštěte pomocí jednak měření enzymové aktivity a dále vizualizací na elektroforéze SDS-PAGE metodou fluorescenčního afinitního značení. Prolylendopeptidasa se pravděpodobně účastní procesu proteolytického trávení krevních proteinů, protože její specifická aktivita byla nejvyšší ve střevní tkáni a tato aktivita vzrůstala v průběhu procesu sání a zpracování potravy. Biochemická analýza ukázala, že enzymová aktivita prolylendopeptidasy je (1) závislá na volném cysteinovém zbytku v blízkosti aktivního místa, (2) optimální v oblasti pH 8-9, (3) selektivně inhibována peptidovými inhibitory Z-Ala-Pro-CMK a Z-Pro-Pro-CHO.

Klíčová slova: prolylendopeptidasa, proteolýza, enzymová aktivita, substrátová specifita, klíště

Abstract

The ticks are important blood-feeding parasites and vectors of pathogens. The hard tick *Ixodes ricinus* is the most common species in the Czech Republic that transmits Lyme disease and tick-borne encephalitis. Proteases of the ticks are potential drug targets for the development of new vaccines against these parasites. This work is focused on biochemical analysis of a prolyl endopeptidase from *I. ricinus*, which has not been studied so far. The prolyl endopeptidase was identified in the extract from the tick gut tissue by the measurement of enzyme activity and by visualization on SDS-PAGE after labelling with activity-based probe. The tick prolyl endopeptidase is probably involved in the proteolytic digestion of host blood proteins based on the highest specific activity found in the gut tissue and its upregulation during the blood-feeding period. Biochemical analysis showed that the enzymatic activity of prolyl endopeptidase is (1) dependent on a free cysteine residue in a close proximity of the active site, (2) optimal at a pH range between 8 and 9, and (3) selectively inhibited by peptide inhibitors Z-Ala-Pro-CMK and Z-Pro-Pro-CHO.

Key words: prolyl endopeptidase, proteolysis, enzyme activity, substrate specificity, tick

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratek	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Obsah	8
1. Literární úvod	10
1.1. Parazité	10
1.1.1. Krev sající členovci.....	10
1.2. Klíšťata (<i>Ixodida</i>).....	11
1.2.1. Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	11
1.2.2. Morfologie klíštěte obecného.....	11
1.2.3. Sací ústrojí klíštěte obecného.....	12
1.2.4. Životní cyklus klíštěte obecného.....	13
1.3. Trávení klíštěte.....	14
1.3.1. Trávicí trakt klíštěte	14
1.3.2. Fyziologie trávení.....	14
1.3.3. Trávení krevních proteinů	16
1.3.4. Zpracování hemu.....	16
1.4. Interakce klíštěte s hostitelem	17
1.4.1. Vyhledání hostitele	17
1.4.2. Regulace srážení krve hostitele	18
1.4.3. Regulace imunitního systému hostitele	19
1.5. Klíště jako vektor významných patogenů	19
1.5.1. Lymská borelióza.....	19
1.5.2. Klíšťová encefalitida.....	21
1.6. Proteasy	21
1.6.1. Klasifikace proteas	22
1.6.2. Serinové proteasy	23
1.6.3. Prolylendopeptidasa.....	24
2. Cíl práce.....	25
3. Materiál a metody	26

3.1. Materiál.....	26
3.1.1. Biologický materiál	26
3.1.2. Chemikálie.....	26
3.2. Přístroje a vybavení.....	26
3.3. Metody	27
3.3.1. Příprava extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného.....	27
3.3.2. Stanovení koncentrace bílkovin.....	27
3.3.3. Kinetické stanovení enzymové aktivity.....	28
3.3.4. Fluorescenční značení afinitní značkou.....	29
4. Výsledky.....	31
4.1. Detekce aktivity PEP ve střevu klíštěte obecného	31
4.2. Inhibiční specifita PEP z klíštěte obecného	31
4.2.1. Vliv skupinově selektivních inhibitorů proteas na aktivitu PEP.....	31
4.2.2. Vliv inhibitorů serinových proteas na aktivitu PEP	33
4.2.3. Vliv rtuťnatých kationtů na aktivitu PEP	35
4.3. Závislost aktivity PEP na pH	37
4.4. Dynamika PEP ve střevu klíštěte obecného v průběhu sání	38
4.5. Specifická aktivita PEP ve tkáních klíštěte obecného	39
4.5.1. Porovnání aktivity PEP ve vybraných tkáních	39
4.5.2. Inhibice aktivity PEP ve vybraných tkáních.....	40
4.6. Vizualizace PEP pomocí fluorescenční afinitní značky.....	42
4.7. Identifikace sekvence PEP v genomu klíštěte <i>Ixodes scapularis</i>.....	44
5. Diskuse	47
6. Závěr	49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50

1. Literární úvod

1.1. Parazité

Parazitismus je typ soužití mezi organismy různého druhu, při kterém jeden organismus (**parazit**) využívá druhý organismus (**hostitel**) jako zdroj potravy i jako stálé nebo dočasné životní prostředí. Svému hostiteli tak přímo nebo nepřímo škodí. Každý parazit využívá ve svém životním cyklu minimálně jednoho hostitele. Jako koncový hostitel bývá označován ten, u kterého parazit stráví nejvíce času a většinou zde probíhá i reprodukce. Jiným hostitelům, kde se parazit vyvíjí, říkáme dočasní.

Parazitismus může být obligátní nebo fakultativní. Obligátní parazit není bez svého hostitele schopen přežít či rozmnožovat se. Fakultativní parazit je schopen samostatného života bez hostitele, příležitostně však na něm parazituje. Parazity lze dále rozdělit na endoparazity a ektoparazity. Endoparaziti žijí uvnitř těla hostitele a ektoparaziti na povrchu těla hostitele [1].

1.1.1. Členovci sající krev

Členovci sající krev jsou parazité, pro které je krev obratlovců hlavním zdrojem živin. Tyto členovce dělíme na **dočasné (temporární)** a **trvalé (permanentní)** parazity. Permanentní paraziti sající krev, mezi které patří např. vši a kloši, se nevzdalují od hostitele a sají na něm opakovaně v průběhu celého životního cyklu. Naproti tomu temporární členovci sající krev, např. komáři, ovádi či ploštice, sají poměrně krátce (několik minut) a poté hostitele opouští. Příjem potravy má u členovců sajících krev tři fáze:

- 1) Vyhledání hostitele (tato fáze odpadá u trvalých parazitů)
- 2) Nasátí krve
- 3) Zpracování potravy v trávicím traktu

První fáze je nesmírně důležitá pro dočasné parazity. K vyhledání hostitele využívají pachové a optické stimuly a též infračervené záření vyzařující z těla hostitele.

Členovci sající krev jsou nepříjemní paraziti, kteří bodáním vyvolávají dermatitidy a svědění. Jejich nebezpečí spočívá v tom, že slouží jako přenašeči různých patogenů, přičemž některé z nich mohou vyvolat velmi závažná onemocnění [2].

1.2. Klíšťata (*Ixodida*)

Klíšťata patří mezi obligátní ektoparazity. Na území ČR se téměř výhradně setkáváme s klíšťetem obecným (*Ixodes ricinus*), (obr. 1). Další dva druhy vyskytující se na našem území jsou piják lužní (*Dermacentor reticulatus*), který má zdobený štítek a klíšť lužní (*Haemophysalis concina*), světle hnědé klíšťe. Nebezpečnost klíšťat spočívá zejména v jejich schopnosti přenášet závažná onemocnění. Některá klíšťata však poškozují svého hostitele pouhým sáním, a to prostřednictvím toxinů vylučovaných ve slinách. Tímto způsobem vyvolávají u hostitele paralýzu. Mezi „paralytické“ druhy patří např. australský *Ixodes holocyclus*, nebo některé americké druhy již zmíněného rodu *Dermacentor* [2].

1.2.1. Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Taxonomické zařazení

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Třída: Pavoukovci (*Arachnida*)

Řád: Roztoči (*Acari*)

Čeleď: Klíšťatovití (*Ixodidae*)

Rod: Klíšťe (*Ixodes*)

Druh: Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

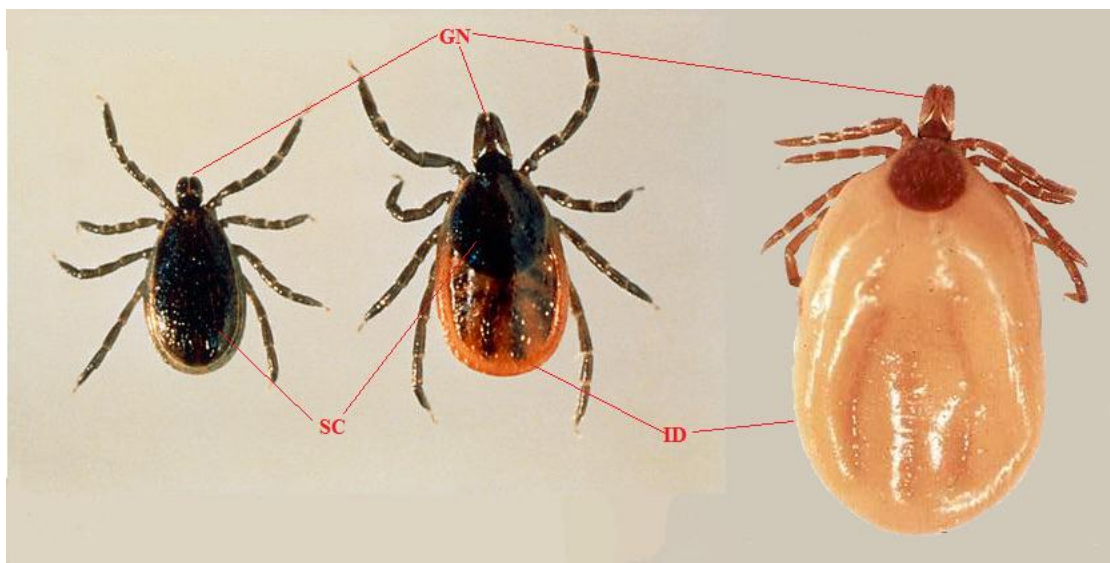
[3]



Obr.1: Klíšťe obecné. Převzato z [4].

1.2.2. Morfologie klíšťete obecného

Dospělá klíšťata (samičky i samečkové) mají na hřbetní straně těla tvrdý štítek černé barvy (scutum), který u samců kryje téměř celé tělo (obr. 2, str. 12). U samiček v nenasátém stavu kryje třetinu až polovinu velmi elastické idiosomy. Idiosoma je jakýsi vak, který má v nenasátém stavu červenou barvu, v nasátém stavu mnohonásobně zvětší objem a zšedne. Gnathosoma je ta část klíšťete, která vyčnívá z obrysu těla a je vybavena sacím ústrojím [2].



Obr. 2: Klíště obecné - dospělý samec (vlevo), dospělá nenasátá samice (uprostřed) a dospělá samice v plně nasátém stavu (vpravo). GN – gnathosoma, SC – scutum (štítek), ID – idiosoma. Velikosti klíšťat nejsou vzájemně proporcionální. Upraveno podle [5,6].

1.2.3. Sací ústrojí klíštěte obecného

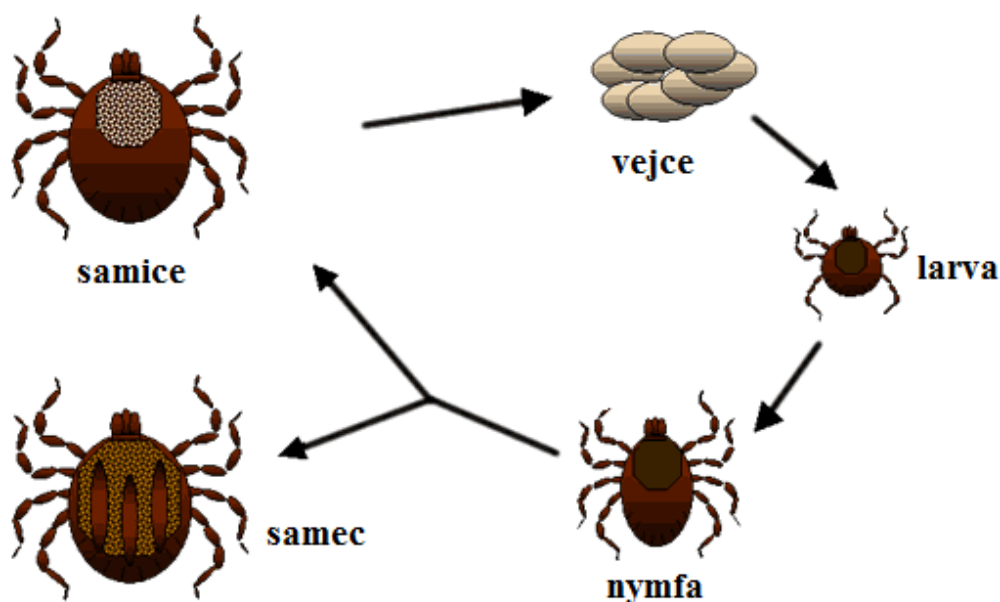
Nejnápadnějším útvarem sacího ústrojí klíštěte (obr. 3) je **hypostom**, na kterém nacházíme koncentrické řady zahnutých zoubků. Hypostom je dále obklopen párem chelicery a pedipalp, které chrání sací ústrojí. Při napadení hostitele jsou chelicery posouvány směrem od hostitele, čímž klíště zatlačí do pokožky hypostom. Z počátku je hypostom to jediné, co drží klíště na hostiteli, a to právě za pomoci zoubků. Tyto zoubky tvoří spirály, proto při vyjímání klíštěte nezáleží na směru vytáčení. Po průniku do tkáně začne klíště vylučovat sliny, které obsahují látku schopnou vytvořit tzv. cementovou vrstvu kolem hypostomu, a tak je klíště schopno držet se na hostiteli pevněji [7].



Obr. 3: Sací ústrojí klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). H – hypostom, Ch – chelicery, P – pedipalpy. Upraveno podle [8].

1.2.4. Životní cyklus klíštěte obecného

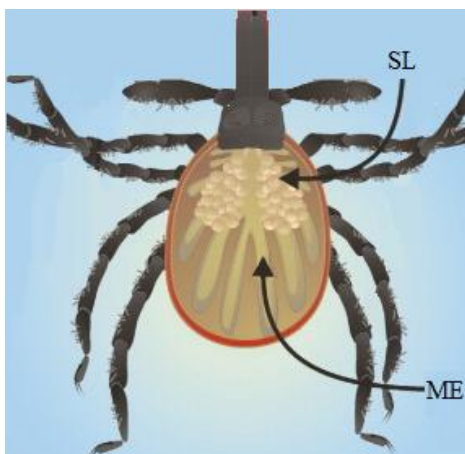
Vývojový cyklus klíštěte obecného (obr. 4) má 4 stadia. Z vajíčka se vylíhne šestinohá **larva**, která se po nasátí a odpadnutí promění v další vývojové stadium – **nymfu**. Po druhém nasátí se mění v dospělého jedince, přičemž nymfa i dospělec jsou osminozí. Samečkové již nesají, jen vyhledají samici a oplodní ji na těle hostitele nebo mimo něj. Plně nasáté dospělé samičky po odpadnutí kladou několik tisíc vajec. Obě pohlaví po rozmnožení hynou. Cyklus tedy zahrnuje tři hostitele a trvá v rozmezí jednoho až pěti let. Člověk se může stát hostitelem jakéhokoliv vývojového stadia. Aktivita klíšťat začíná již dva týdny po posledním sněhu. Nejhojnější výskyt dospělých klíšťat je v květnu a v září [9].



Obr. 4: Životní cyklus klíštěte obecného. Z vajíček se líhne larva, která se po prvním nasátí promění v nymfu a ta po druhém nasátí v dospělého samce nebo v dospělou samici, která po třetím nasátí klade vajíčka a poté hynie. Upraveno podle [10].

1.3. Trávení klíštěte

1.3.1. Trávicí trakt klíštěte



Klíštěcí střevo, tzv. mesenteron, tvoří podstatnou část těla klíštěte (obr. 5). Jeho epitel je opatřen trávicími buňkami, kde probíhá trávení. Staré trávicí buňky, které jsou zahlceny nestrávenými zbytky, jsou vypuzeny do lumen střeva a jsou nahrazeny buňkami novými [2].

Obr. 5: Trávicí trakt klíštěte. SL – slinné žlázy, ME – mesenteron. Upraveno podle [11].

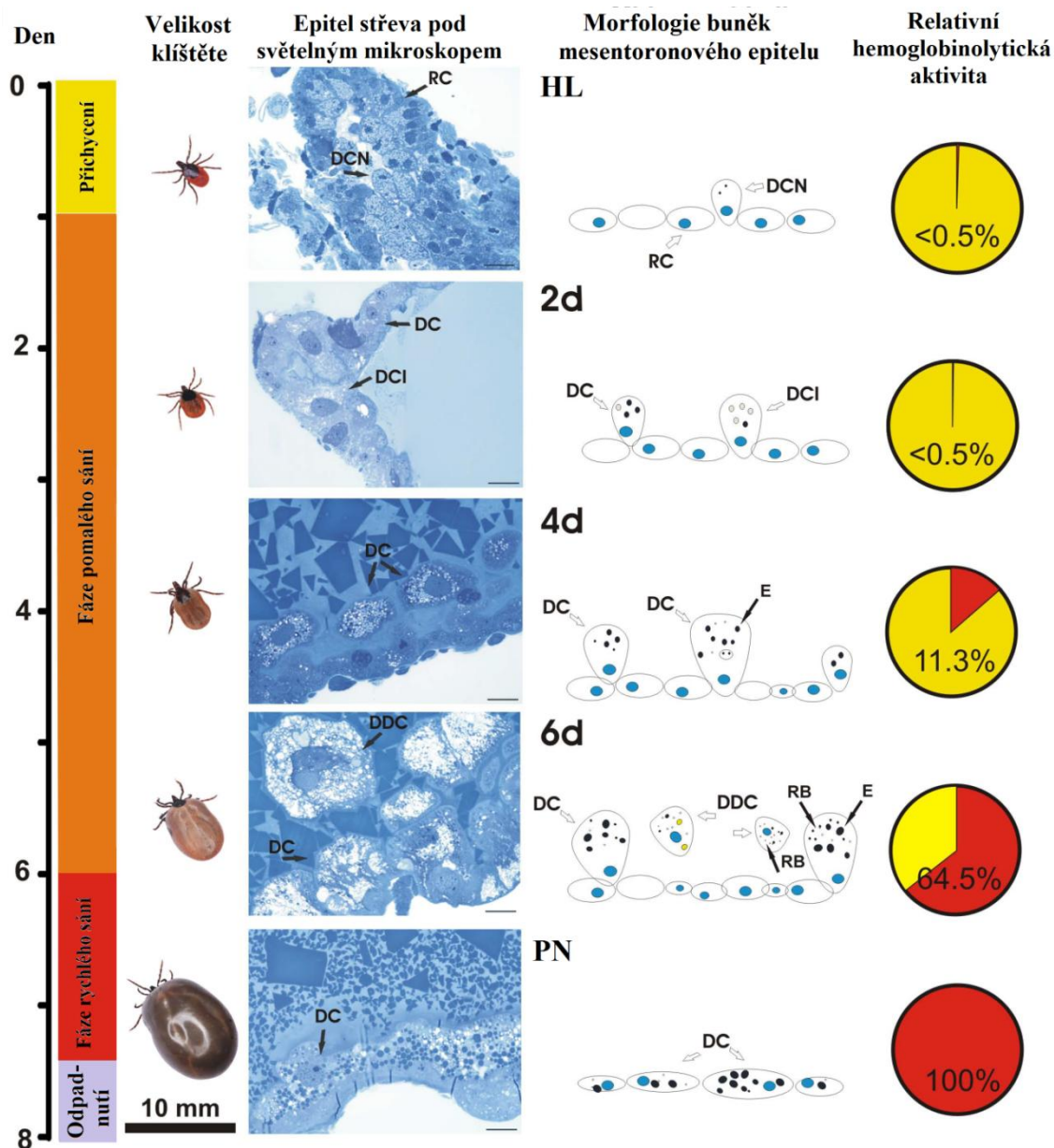
1.3.2. Fyziologie trávení klíštěte

Trávení klíštěte je proces intracelulární, nikoliv extracelulární, jak je tomu u většiny členovců. Většina trávicích procesů probíhá ve specializovaných trávicích vakuolách trávicích buněk.

Dospělé samičky druhu *I. ricinus* sají krev 7-8 dní. Sání je rozděleno na fáze, které se vzájemně liší rychlostí nasávání krve, aktivitou trávicích enzymů a morfologií trávicích buněk (obr. 6, str. 15).

V nenasátém klíštěti je mesenteronový epitel tvořen nediferenciovanými kmenovými buňkami a několika diferenciovanými trávicími buňkami, které zůstaly v těle jako pozůstatek z nymfálního stadia. V průběhu prvního dne sání lumen střeva pomalu expanduje s prvním přísunem hostitelské krve a kmenové buňky začínají růst a diferenciovat se v počáteční trávicí buňky. Enzymatická aktivita je do druhého dne od přisátí sotva měřitelná.

V průběhu prvních čtyř dní trávicí buňky dále rostou a vykazují znaky endocytózy hemoglobinu a jeho trávení. V buňkách se začíná objevovat přebytečný hem ve formě agregátů nebo velké endosomy a lipidické vakuoly. V průběhu této tzv. fáze pomalého sání je možné sledovat první trávicí buňky odchlípující se z mesenteronového epitelu a počáteční nárůst v enzymatické aktivitě.



Obr. 6: Fáze krmení klíštěte. HL – hladové klíště, 2d – dva dny od přisátí, 4d – čtyři dny od přisátí, 6d – šest dní od přisátí, PN – plně nasáté klíště, RC – rezervní buňky, DCN – trávicí buňky jako pozůstatek z nymfálního stadia, DCI – počáteční trávicí buňky, DC – trávicí buňky, E – endosomy, RB – nestrávené zbytky. Upraveno podle [12].

Nejmarkantnější změny v morfologii střevního epitelu jsou pozorovatelné v průběhu fáze rychlého sání (kolem šestého dne od přisátí), kdy jsou trávicí buňky plně rozšířené, přeplněné odpadními produkty trávení, velkými endosomy a lipidickými

inkluzemi. Trávicí buňky se odchlípují do lumenu střeva bez jakýchkoliv znaků lyze a pravděpodobně jsou v této formě vyloučeny. Enzymatická aktivita zde dosahuje kolem 65 % maximální kapacity.

Nejvíce krve je nasáto v průběhu posledních 24 až 48 hodin sání klíštěte. Klíště v této fázi nasaje přibližně dvě třetiny celé své krevní potravy. Mesenteronový epitel se výrazně liší od toho v předešlé fázi. Je tvořen hladkými trávicími buňkami, které zůstávají v kontaktu s epitelem, již se neodchlípují. Kmenové a počáteční trávicí buňky nejsou pozorovány a aktivita trávicích enzymů dosahuje maxima [12].

1.3.3. Trávení krevních proteinů

Až 80 % krevních proteinů obratlovců tvoří hemoglobin a albumin, proto jsou pro klíště hlavními zdroji aminokyselin. Trávicí buňky endocytují váčky obsahující krev z lumen střeva, přičemž bylo zjištěno, že hemoglobin buňka endocytuje prostřednictvím receptorů na jejím povrchu. Hemoglobin a albumin pak putují do speciálních trávicích vakuol, které jsou různé pro oba proteiny. Probíhá zde hydrolyza těchto proteinů za účasti trávicích proteas [13].

Trávení hemoglobinu vyžaduje kyselé prostředí (pH od 3 do 4,5) a účastní se jej 5 typů proteas: 3 cysteinové (katepsin B, L a C), aspartatová (katepsin D) a asparaginová endopeptidasa (legumain). Katepsin L, katepsin C a legumain jsou přítomny ve všech stádiích životního cyklu klíšťat včetně vajec. Katepsin B a katepsin D ve vejcích přítomny nejsou. Tyto proteasy jsou společně exprimovány do konce fáze pomalého sání, což naznačuje jejich spolupráci v tzv. hemoglobinolytické kaskádě enzymů [14].

Produkty vzniklé hydrolysou poté putují do hemolymfy prostřednictvím bazální membrány trávicích buněk [13].

1.3.4. Zpracování hemu

Při trávení hemoglobinu vzniká značné množství hemu (prostetická skupina hemoglobinu), který klíště dál neštěpí. Hem je pro klíště jedna z esenciálních látek, protože klíště nemá schopnost syntetizovat jej *de novo*, ale v průběhu trávení vzniká množství daleko převyšující potřeby klíštěte [15]. Přebytek hemu je toxický, protože je schopný katalyzovat tvorbu kyslíkových radikálů, které mohou poškodit DNA a další důležité látky

v buňce [13]. Také interaguje s membránovými lipidy, čímž narušuje dvouvrstvou strukturu membrán. Pro klíště je tedy nevyhnutná schopnost detoxikace hemu. Jak již bylo zmíněno, agregáty hemu v trávicích buňkách se začínají objevovat až čtvrtý den od přisátí. V prvních dnech sání vzniká jen malé množství hemu v důsledku nízké aktivity trávicích enzymů a veškerý hem putuje do hemolymfy, kde se navázaný na hemolipoprotein zvaný HeLp distribuuje po těle. V pozdějších stádiích se v trávicích buňkách začnou tvořit nové orgány – **hemosomy**, kde je hem uskladněn ve formě nekystalických agregátů. Není zde volný, ale interaguje s proteinovými komponenty organel prostřednictvím karboxylových skupin propionátů [15].

1.4. Interakce klíštěte s hostitelem

Sání klíštěte je poměrně dlouhý a značně komplexní proces. Samotné přisátí je pro hostitele fyzikálním i chemickým zásahem, který by za normálních okolností vyvolal silnou imunitní odpověď. I přes imunitní obranu hostitele klíště k hostiteli zůstává přisáto a dosahuje plného nasátí. Úspěšné krmení klíšťat spočívá v mechanismu, kterým klíště obchází přirozenou ochranu hostitele. Tímto mechanismem jsou chemické látky obsažené ve slinných žlázách, které klíště sekretuje do slin v případě přisátí [16].

1.4.1. Vyhledání hostitele

Hladová klíšťata vylezou na vegetaci a číhají na hostitele ve své typické vyčkávací poloze (obr. 7). Důležitým orgánem pro zjištění blízkosti hostitele je **Hallerův orgán**. Je to jamka umístěná na předním páru nohou se smyslovými brvami vnímajícími teplo, koncentraci oxidu uhličitého a další chemické sloučeniny [2].



Obr. 7: Klíště obecné číhající na hostitele. Upraveno podle [17].

1.4.2. Regulace srážení krve hostitele

Srážení krve

Srážení krve je velmi důležitý proces, který chrání živočichy před vylitím krve mimo cévu. Má tři části: agregaci trombocytů (krevních destiček), koagulaci (vytvoření krevní sraženiny) a vazokonstrikci (zúžení cévy). Tyto procesy jsou úzce propojené.

Agregaci vytvoří trombocyty volnou zátku. Aby k tomu došlo, je nutné je nejdříve aktivovat, což je možné třemi hlavními aktivátory – trombinem, kolagenem a ADP. Krevní destičky přítomnost těchto látek zaregistrují pomocí povrchových receptorů.

Krevní koagulace je kaskáda dějů zahrnujících přeměnu protrombinu na trombin, který štěpí rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin. Fibrin tak začne polymerizovat a vytvoří síť, na kterou se naváže volná zátka agregovaných krevních destiček, čímž se zacelí místo poranění.

Vazokonstrikce je způsobena serotoninem a tromboxanem A₂, které jsou sekretovány do krve trombocyty při jejich aktivaci. Jejím cílem je snížení průtoku krve [18].

Mechanismy klíštěte zabraňující srážení krve

Klíště výše zmíněné procesy účinně inhibuje chemickými látkami obsaženými ve slinách, které vylučuje do ranky při kousnutí a v průběhu celé doby nasávání [18].

Agregace krevních destiček je zastavena látkami zabraňujícími vzájemnou interakci trombocytů, a to pomocí proteinů blokujících jejich povrchové receptory. U druhu *Dermacentor variabilis* bylo zjištěno, že tuto roli hraje například protein variabilin. Dalším způsobem inhibice jsou látky, které inhibují všechny tři aktivátory. Většina členovců sajících krev využívá enzymu apyrasy, který hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu ATP a ADP [18].

Koagulaci klíště inhibuje různými látkami blokujícími některé faktory v koagulační kaskádě (mezi takové látky patří např. madanin [19]) nebo přímým blokováním samotného trombinu [18].

Pro zabránění vazokonstrikce klíštěcí sliny obsahují vazodilatační látky jako např. prostacyklin a prostaglandin E₂, které aktivují adenylátcyklázu nebo guanylátcyklázu, což

vede ke tvorbě cAMP a cGMP. Tyto látky působí na buňky hladkého svalstva cévy a způsobují relaxaci svaloviny [18].

1.4.3. Regulace imunitního systému hostitele

Poranění cévy způsobuje zánět, který má negativní vliv na bezproblémové krmení se klíštěte. Zánět je doprovázen otokem a bolestivostí, a tedy hostitel klíště zaregistruje a bude se snažit parazita odstranit z povrchu svého těla. Proto je pro klíště důležité zánět potlačit.

Vzniku zánětu se účastní buňky neutrofilů, makrofágy, mastocyty, bazofily, eozinofily, lymfocyty a látky jimi produkovány, např. chemokiny, cytokiny a lipidové mediátory. K protizánětlivým mechanismům klíštěte patří inhibice působení neutrofilů, které produkují látky spouštějící fagocytózu antigenu. Dále klíště blokuje tvorbu chemokinů, látek produkovaných makrofágy, které mají signální funkci pro ostatní bílé krvinky. Prokázána byla suprese interleukinu-8, který atrahuje neutrofilů. Dalším protizánětlivým mechanismem je přítomnost proteinů vázajících histamin, které brání vazbě histaminu na receptory T lymfocytů, které tak zůstanou neaktivní [18].

1.5. Klíště jako vektor významných patogenů

Klíště pro člověka jako takové nebezpečné není, ale představuje přenašeče nebezpečných infekcí. Na území ČR je klíště vektorem dvou závažných onemocnění a to lymfské boreliózy a klíšťové encefalidity. Patogeny způsobující tyto nemoci mají schopnost vertikálního (transovariálního) přenosu, tzn. infikovaná matka je schopna nakazit svoje potomky [2]. Do těla hostitele se přenáší slinami a bylo zjištěno, že látky obsažené ve slinách klíštěte usnadňují tento přenos – tzv. slinami aktivovaný přenos [20].

1.5.1. Lymfská borelióza

Původce, zdroj a cesty šíření

Lymfská borelióza je bakteriální nemoc způsobena spirochétou *Borrelia burgdorferi*, která byla objevena v roce 1982 v americkém Old Lyme. Hlavními rezervoáry této bakterie v přírodě jsou některé druhy drobných hlodavců a ptáků. Zvířata jsou vůči

samotné nemoci většinou málo citlivá. Až 75% larev klíšťat sajících z nakažené zvěře se infikuje [21].

Průběh a příznaky nemoci

Nemoc má několik stadií (jejich počet závisí na odolnosti jedince a na tom, zda je nemoc léčená). První stadium se vyznačuje infekcí kůže v místě přisátí klíštěte, která se objevuje v rozmezí 5 dní až 7 týdnů od přisátí. Další ložiska mohou putovat na jiná místa kůže, tzv. *erythrema migrans*. Kožní infekce je doprovázena zvýšenou teplotou a bolestivostí svalů. *Erythrema migrans* je růžově zahnědlá skvrna s ostrým okrajem (obr. 8), která se v prvních dnech rychle zvětšuje a od středu bledne. U více než 80% infikovaných lidí nemoc nepostupuje do dalších stadií.

Ve druhém stadiu borreliie již pronikají skrz cévy a dostávají se tak do dalších buněk těla, kde způsobují akutní postižení orgánů – nejčastěji nervů, očí a kloubů. V některých případech může nemoc začít bez kožních projevů nebo jsou jen nevýrazné a pacient je přehlédne. Tato fáze obvykle nastupuje ve 3.-4. týdnu od nakažení a je doprovázena tvorbou protilátek v organismu.

U zlomku procenta pacientů přechází nemoc do třetího stadia, které je stadiem chronickým. Navazuje na postižení orgánů a projevuje se jako neuroborelióza (zánět periferních nervů, zánět mozkových blan a kořenů, zánět míchy a míšních kořenů a zánět mozku), oční borelióza (obrna svalů oka, zánět optického nervu a zánět rohovky) a borreliová artritida [21].



Obr. 8: Erythrema migrans. Převzato z [22].

1.5.2. Klíšťová encefalitida

Původce, zdroj a cesty šíření

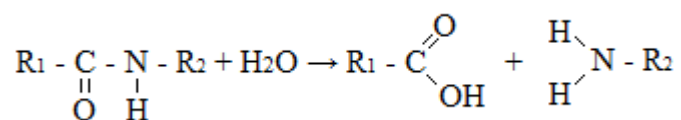
Nemoc je způsobena RNA virem klíšťové encefalitidy. Hlavním rezervoárem jsou drobní hlodavci. Vyšší zvěř hraje minoritní roli v šíření tohoto viru. Pro člověka existují dva možné způsoby nákazy – kousnutím infikovaného klíštěte nebo požitím nepasterizovaného mléka nakaženého zvířete [23].

Průběh a příznaky nemoci

Inkubační doba trvá 7-14 dnů (při požití mléka se tato doba zkrátí na 3-4 dny). Tato nemoc probíhá ve dvou fázích. Příznaky první fáze, která trvá 2-7 dní, jsou horečky, bolesti hlavy a kloubů, zvracení. Druhá fáze přichází po klidovém období trvajícím 2-10 dní. Ta se projevuje vyšší horečkou (o 1-2 °C) a příznaky meningitidy nebo meningoencefalitidy [23].

1.6. Proteasy

Proteasy (též proteinasy, peptidasy nebo proteolytické enzymy) jsou enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu proteinového řetězce (obr. 9). Jsou početnou skupinou proteinů (bylo zjištěno, že až 2 % genomu většiny organismů jsou tvořeny geny pro proteasy nebo jejich homologa) [24]. V biologických systémech působí jako pozitivní nebo negativní efektoři mnoha biologických procesů, kde vystupují buď jako nespecifické katalyzátory proteinové degradace nebo jako vysoce selektivní regulátory fyziologických funkcí [25].



Obr. 9 : Schéma hydrolyzy peptidové vazby.

1.6.1. Klasifikace proteas

Proteasy lze klasifikovat z mnoha různých hledisek. Nejdůležitější jsou dle mechanismu účinku, dle reakce, kterou katalyzují a dle homologie v molekulární struktuře.

Dle mechanismu účinku rozdělujeme proteasy na základě katalytické skupiny do sedmi tříd: serinové, cysteinové, treoninové, aspartátové, glutamátové, asparaginové a metaloproteasy. Několik proteas má neznámý mechanismus účinku.

Proteasy v principu katalyzují jedinou reakci, a to hydrolýzu peptidové vazby, ale žádná z nich nekatalyzuje reakce na všech typech peptidových vazeb. Proteasy vykazují jistou míru selektivity a jednou z forem selektivity pro proteasy je místo v polypeptidickém řetězci, kde peptid štěpí. Na tomto základě proteasy dělíme na:

- Endopeptidasy – štěpí uvnitř řetězce, ale nikoliv na jeho C- a N-koncích. Jsou to enzymy iniciující trávení, kde štěpí celé proteiny na menší peptidy.
- Oligopeptidasy - endopeptidasy působící pouze na peptidy.
- Omega-peptidasy - nevyžadují ke své funkci volný N- nebo C-konec. Peptidovou vazbu štěpí blízko těchto konců.
- Exopeptidasy - ke své funkci vyžadují volný N- nebo C-konec nebo oba. Peptidovou vazbu štěpí maximálně za třetí aminokyselinou od konce. Exopeptidasy se dále dělí na:
 - Aminopeptidasy – hydrolyzují koncovou vazbu u volného N-konce uvolňující přitom 1 aminokyselinu.
 - Karboxypeptidasy - hydrolyzují koncovou vazbu u volného C-konce uvolňující přitom 1 aminokyselinu.
 - Dipeptidyl-peptidasy – odštěpují dipeptid na N-konci polypeptidu substrátu.
 - Tripeptidyl-peptidasy – odštěpují tripeptid na N-konci polypeptidu substrátu.
 - Peptidyl-dipeptidasy - odštěpují dipeptid na C-konci polypeptidu substrátu.
 - Dipeptidasy - štěpí pouze dipeptidy.

Klasifikace na základě molekulární struktury a homologie proteas je nejmladší, protože je závislá na datech získaných z aminokyselinové sekvence a trojrozměrné struktury pro velké množství proteas, které byly získány až v devadesátých letech. Od této doby začaly být proteasy tříděny do klanů a do rodin. Proteasy v rámci jedné rodiny

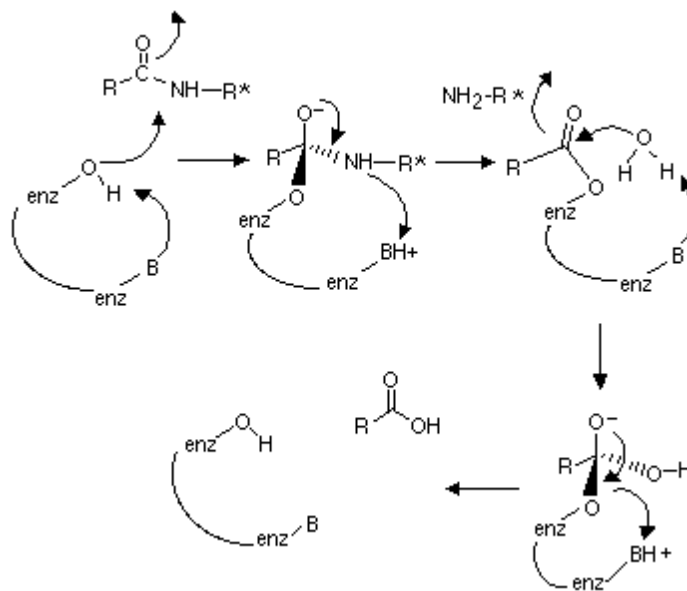
vykazují homologii v aminokyselinové sekvenci. Klan seskupuje evolučně příbuzné rodiny [24].

1.6.2. Serinové proteasy

V současnosti je známo 12 klanů a 51 rodin této třídy proteas [24]. U většiny serinových proteas je v aktivním místě lokalizována tzv. katalytická triáda Asp, His, Ser, ale existují také další kombinace jako např. diáda Ser, Lys nebo His, Ser. Vždy jde o serin v kombinaci s jinými aminokyselinami, z nichž alespoň jedna je bazická, čímž je zajištěna silná nukleofilita hydroxylové skupiny serinu [26].

Obecný mechanismus katalýzy

Proton hydroxylové skupiny serinu vytváří vodíkovou vazbu s bazickou skupinou enzymu, která je součástí aktivního místa, čímž se tato hydroxylová skupina stane silným nukleofilem (obr. 10). Ten potom atakuje karbonyl peptidové vazby substrátu, přičemž vzniká tetrahedrání acylový meziproduct. Bazická skupina s navázaným protonem interaguje s aminoskupinou

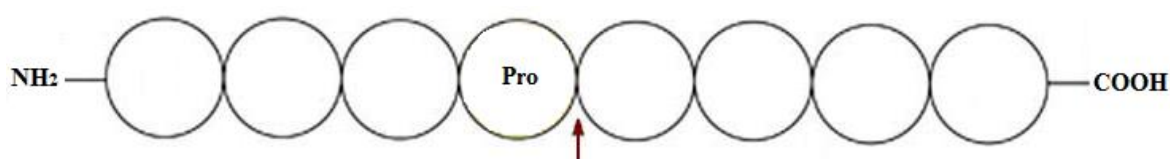


Obr. 10: Schéma katalýzy serinových proteas, převzato z [28].

peptidové vazby substrátu, čímž se tetrahedrání intermediát rozpadá. Řetězec substrátu se rozštěpí za tvorby acylenzymového intermediátu. Voda, která se vždy vyskytuje v aktivním místě a jež je nutná ke katalýze, nejprve vytvoří vodíkový můstek s bazickou skupinou enzymu, čímž se opět stane silnějším nukleofilem a atakuje karbonylový uhlík substrátu kovalentně navázaného na katalytický serin enzymu. Vzniká tetrahedrání intermediát, který je destabilizován přenosem protonu z bazické skupiny enzymu na serinový kyslík, čímž dojde k regeneraci enzymu a k uvolnění produktu [27].

1.6.3. Prolylendopeptidasa

Prolylendopeptidasa (prolyloligopeptidasa) je serinová proteasa zařazena do klanu SC a rodiny S9, pro kterou je typická katalytická triáda Ser, Asp, His [24]. Je to první proteasa rodiny S9, která byla objevena, izolována a charakterizována, a to jako enzym štěpící oxytocin v lidské děloze [29]. Savčí PEP je složena z cca 710 aminokyselin o relativní molekulové hmotnosti cca 80 kDa [30]. Štěpí oligopeptidy uvnitř řetězce na C-koncové straně zbytku prolinu (obr. 11) [31].



Obr. 11: Substrátová specifita prolylendopeptidasy. Šipka ukazuje štěpenou peptidovou vazbu s prolinovým zbytkem v pozici P_1 peptidového substrátu. Upraveno podle [32].

Struktura prolylendopeptidasy

Třírozměrná struktura byla vyřešena pro prasečí a lidskou prolylendopeptidasu [24]. Na obr. 23 (str. 46), je zobrazena struktura prasečí PEP. Obsahuje dvě kovalentně navázané domény: α/β hydrolasovou doménu a tzv. „ β -propeller“. α/β hydrolasová doména obsahuje katalytickou triádu Ser554, His680, Asp641. Na N-konci nalézáme dva antiparalelní β -listy a dva α -helixy, které jsou navázány k C-koncové oblasti nekovalentními interakcemi. V C-koncové oblasti se nalézá 8 β -listů, které jsou centrálně stočeny a většinou paralelní. „ β -propeller“ tvoří charakteristickou strukturu ze 4 antiparalelních β -listů 7× se opakujících. Listy jsou paprscitě stočeny a vytvářejí v jejich středu tunel [33].

2. Cíl práce

Proteasy představují perspektivní cílové molekuly při vývoji nových vakcín proti klíšťatům, které zabraňují sání klíšťat na hostiteli, a tak snižují riziko přenosu patogenů. Střevní proteasy, které klíště obecné (*Ixodes ricinus*) využívá při trávení krevních proteinů, již studovány byly. Žádná z těchto proteas ale není schopna štěpit peptidovou vazbu obsahující zbytek prolinu. Tuto funkci by mohla mít prolylendopeptidasa, která v klíštěti obecném doposud nebyla identifikována.

Dílčí cíle bakalářské práce jsou následující:

- Detekovat aktivitu prolylendopeptidasy klíštěte obecného v extraktu ze střevní tkáně a porovnat tuto aktivitu s dalšími tkáněmi.
- Charakterizovat tuto enzymovou aktivitu určením hodnoty pH optima a analýzou specifity k selektivním inhibitorům proteas.
- Vizualizovat prolylendopeptidasu z klíštěte obecného na elektroforéze SDS–PAGE metodou fluorescenčního afinitního značení.
- Zjistit závislost enzymové aktivity prolylendopeptidasy ve střevní tkáni na době sání klíštěte.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

Střevní tkáň klíšťat poskytl Dr. Petr Kopáček z Parazitologického ústavu, BC AV ČR, České Budějovice. Střeva klíšťat byla vypreparována z dospělých samic klíštěte obecného, a to z nenasátých samic a ze samic po 2-8 dnech sání na morčatech. Střeva byla následně zbavena obsahu, opláchnuta v roztoku obsahujícím 10 mM Na-fosfát, 0,15 M NaCl pH 7,4 a zamražena při -80°C.

3.1.2. Chemikálie

Substráty a inhibitory

Bachem, Švýcarsko: Z-Gly-Pro-AMC, Z-Pro-Pro-CHO

Sigma, USA: PMSF, pepstatin A, E-64, leupeptin, Pefabloc, TLCK, TPCK,
3,4-dichloroisokumarin

ÚOCHB AV ČR: Z-Ala-Pro-CMK, BoPC

Ostatní chemikálie

Fermentas, Lotyšsko: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Penta, ČR: ethanol, hydroxid sodný, hydroxid draselný, kyselina chlorovodíková, aceton, chlorid rtuťnatý

Pierce, USA: BCA Protein Assay Kit

Sigma, USA: DTT, EDTA, SDS, TEMED, Tris-HCl, akrylamid, Bis-tris propan, DMSO, N,N-methylenbisakrylamid, CHAPS, PEG, bromfenolová modř, APS, Coomassie Brilliant Blue R250

3.2. Přístroje a vybavení

Analytické váhy AE 163

Mettler, Švýcarsko

Centrifuga Beckman J2-MI	<i>Beckman, USA</i>
Centrifuga Eppendorf 5415D	<i>Eppendorf, Německo</i>
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	<i>Thermosavant, USA</i>
Ultrafree-MC Microcentrifuge filter, 0,45 µm	<i>Millipore, USA</i>
Mikrodestičková čtečka Infinite M1000	<i>Tecan, Rakousko</i>
Fluorescenční skener Typhoon Imager	<i>GE Healthcare life sciences, USA</i>
pH metr	<i>Thermo scientific, USA</i>
Sonikátor Soniprep 150 MSE	<i>Hielscher, Německo</i>
Termoblok	<i>Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR</i>
Vertikální elektroforesa	<i>Bio-Rad, USA</i>

3.3. Metody

3.3.1. Příprava extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného

K zamražené střevní tkáni ze 6 klíšťat *I. ricinus* bylo přidáno 500 µl vychlazeného 50 mM Na-fosfátového pufru pH 7,3. Směs byla homogenizována na ledu ve skleněném homogenizátoru s teflonovým pístem a poté sonikována třikrát po dobu 10 s. Potom byla směs centrifugována (13000× g, 10 min, 4°C). Byl odebrán supernatant S1 a k peletě bylo přidáno 300 µl vychlazeného 50 mM Na-fosfátového pufru pH 7,3. Tato směs byla opět homogenizována na ledu. Pak k ní byl přidán supernatant S1 a 100 µl 10% roztoku CHAPS. Směs byla extrahována 10 min při 4°C a poté centrifugována (13000× g, 10 min, 4°C). Výsledný supernatant byl filtrován pomocí Ultrafree-MC Microcentrifuge filter, 0,2 µm (10000× g, 5 min, 4°C) a skladován v -80°C. Před skladováním byl do části extraktu přidán inhibitor E-64 (vysledná koncentrace 10 µM).

3.3.2. Stanovení koncentrace bílkovin

Ke stanovení koncentrace bílkovin v extraktu byla použita komerční sada BCA Protein Assay Kit. K sestavení kalibrační přímky byly použity roztoky BSA o koncentracích v rozmezí 0-2000 µg/ml. K 10 µl vzorků a standardů bylo přidáno 200 µl činidla. Směsi byly inkubovány 10 min při 37°C. Poté byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 595 nm. Koncentrace bílkovin v extraktu byla poté odečtena z kalibrační přímky.

3.3.3. Kinetické stanovení enzymové aktivity

Měření aktivity PEP s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC

Princip stanovení aktivity PEP spočívá v měření intenzity fluorescence, která vzniká jako důsledek enzymatického štěpení substrátu Z-Gly-Pro-AMC s uvolněním AMC. Z úvodní přímkové závislosti intenzity fluorescence na čase byla určena směrnice, která udává aktivitu enzymu v jednotkách RFU/s. Aktivita PEP byla měřena při teplotě 37°C v mikroděstičce pomocí fluorescenční čtečky Tecan Infinite M1000 při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm. Do jamek mikroděstičky bylo pipetováno 10 µl enzymové směsi (E-mix) a 70 µl pufru. Směs byla inkubována 5 min při 37°C. Poté bylo přidáno 20 µl vytemperované substrátové směsi (S-mix) a pak bylo zahájeno měření fluorescence.

- E-mix: 0,05 – 0,5 µl extraktu (7,3 mg proteinu na ml), doplněno pufrům na 10 µl
- S-mix: 0,5 µl Z-Gly-Pro-AMC (10 mM zásobní roztok v DMSO) + 19,5 µl pufru
- pufr: 0,1 M Tris-HCl pH 8,0

Měření inhibice aktivity PEP

Do mikroděstičky bylo pipetováno 10 µl enzymové směsi (E-mix), 10 µl inhibiční směsi (I-mix) a 60 µl pufru. Směs byla inkubována po dobu 15 min při 37°C. Po uplynutí doby inkubace bylo ke směsi přidáno 20 µl vytemperované substrátové směsi (S-mix) a byla měřena zbytková aktivita enzymu na fluorescenční čtečce Tecan Infinite M1000 vždy paralelně s kontrolou (aktivita enzymu bez přídavku inhibitoru). Stejně experimentální uspořádání bylo použito pro měření aktivace PEP v přítomnosti DTT a EDTA.

- E-mix: 0,05–0,5 µl extraktu (7,3 mg proteinu na ml), doplněno pufrům na 10 µl
- I-mix: inhibitor v pufru (desetinásobná koncentrace oproti koncentracím v testu uvedených v Tabulkách 1 (str. 31) a 2 (str. 34))
- S-mix: 0,5 µl Z-Gly-Pro-AMC (10 mM zásobní roztok v DMSO) + 19,5 µl pufru
- pufr: 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 nebo Tris-HCl pH 8,0 obsahující 1 mM EDTA a 2 mM DTT

Měření závislosti aktivity PEP na pH

Do mikroděstičky bylo pipetováno 10 μ l enzymové směsi (E-mix) a 70 μ l pufru. Směs byla inkubována po dobu 5 min při 37°C. Po uplynutí doby inkubace bylo ke směsi přidáno 20 μ l vytemperované substrátové směsi (S-mix) a byla měřena aktivita enzymu na fluorescenční čtečce Tecan Infinite M1000. Aktivita PEP byla měřena paralelně pro různé hodnoty pH pufru se stejným množstvím extraktu v testu.

- E-mix: 0,05 μ l extraktu (7,3 mg proteinu na ml), doplněno pufrům na 10 μ l
- S-mix: 0,5 μ l Z-Gly-Pro-AMC (10 mM zásobní roztok v DMSO) + 19,5 μ l vody
- pufr: 0,1 M Bis-tris propan pH v rozmezí 6,0–10,0 obsahující 1 mM EDTA a 2 mM DTT

3.3.4. Fluorescenční značení afinitní značkou

Afinitní značení rekombinantní SmPEP

Do mikrozkušavky byly pipetovány 2 μ l enzymové směsi (PEP-mix 1 nebo PEP-mix 2) a 8 μ l pufru. Takto vzniklá směs byla inkubována 30 min při 37°C. Po ukončení doby inkubace bylo do mikrozkušavky přidáno 5 μ l směsi s afinitní značkou (BoPC-mix). Reakce, která probíhala ve tmě 30 min při 37°C byla ukončena přidáním 3 μ l 6 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE obsahujícího redukční činidlo. Vzorky byly inkubovány 5 min při 100°C a poté rozděleny pomocí elektroforézy SDS-PAGE.

- PEP-mix 1: 2,5 μ l SmPEP (3,4 mg proteinu na ml) + 22,5 μ l pufru
- PEP-mix 2: 2,5 μ l SmPEP (3,4 mg proteinu na ml) + 2,5 μ l Z-Ala-Pro-CMK (1 mM zásobní roztok v DMSO) + 20 μ l pufru
- BoPC-mix: 2 μ M BoPC v DMSO
- Pufr: 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 obsahující 0,05% PEG a 0,5% CHAPS
- 6 \times koncentrovaný vzorkový pufr: 375 mM Tris-HCl pH 6,8 obsahující 6% SDS, 48% glycerol, 9% 2-merkaptoethanol a 0,03% bromfenolové modři

Afinitní značení extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného

Do mikrozkušavky bylo pipetováno 10 μ l extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného (7,3 mg proteinu na ml), 20 μ l pufru a 20 μ l inhibiční směsi (I-mix 1 nebo I-mix 2). Reakční směs byla inkubována 30 min při 37°C. Po ukončení doby inkubace bylo do mikrozkušavky přidáno 25 μ l směsi s afinitní značkou (BoPC-mix). Reakce probíhala 30 min při 37°C ve tmě. Poté bylo ke směsi přidáno 300 μ l 100% acetonu o teplotě -20°C a poté byla směs inkubována 30 min při -20°C. Potom byly vzorky centrifugovány (13000 \times g, 10 min, 4°C). Supernatant byl odebrán a peleta byla vysušena na vakuové odparce SpeedVac při teplotě 75°C. K peletě bylo přidáno 15 μ l pufru a 3 μ l 6 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE obsahujícího redukční činidlo a směs byla inkubována 5 min při 100°C. Takto připravené vzorky byly naneseny na elektroforézu SDS-PAGE.

- I-mix 1: pufr
- I-mix 2: 1 μ l Z-Ala-Pro-CMK (1 mM zásobní roztok v DMSO) +19 μ l pufru
- BoPC-mix: 2 μ M BoPC v DMSO
- Pufr: 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 obsahující 0,05% PEG a 0,5% CHAPS
- 6 \times koncentrovaný vzorkový pufr: 375 mM Tris-HCl pH 6,8 obsahující 6% SDS, 48% glycerol, 9% 2-merkaptoethanol a 0,03% bromfenolové modři

Elektroforéza SDS-PAGE

Elektroforéza SDS-PAGE byla provedena v přítomnosti 0,1% SDS metodou dle Laemmliho [34]. Na vertikální elektroforéze *Bio-Rad* byl použit 15 % akrylamidový rozdělovací gel o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm. Na elektroforézu byly aplikovány vzorky reakčních směsí z afinitního značení o objemu 10 μ l.

Vizualizace na SDS-PAGE

Polyakrylamidový gel po ukončení elektroforézy byl 3 \times promyt destilovanou vodou a následně snímán na fluorescenčním skeneru Typhoon s excitačním laserem o vlnové délce 532 nm a emisním filtrem o vlnové délce 580 nm. Poté bylo provedeno obarvení proteinů v gelu pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 (10 min) a následně odbarvení v roztoku obsahujícím 45% ethanol a 10% kyselinu octovou (30 min).

4. Výsledky

4.1. Detekce aktivity PEP ve střevu klíštěte obecného

Pomocí kinetického testu se specifickým fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC byla detekována nativní forma PEP z klíštěte obecného měřením enzymové aktivity v extraktu ze střevní tkáně z dospělých samic klíštěte obecného v šestý den sání. Hydrolýzou tohoto substrátu byla prokázána přítomnost PEP v extraktu.

4.2. Inhibiční specifita PEP z klíštěte obecného

4.2.1. Vliv skupinově selektivních inhibitorů proteas na aktivitu PEP

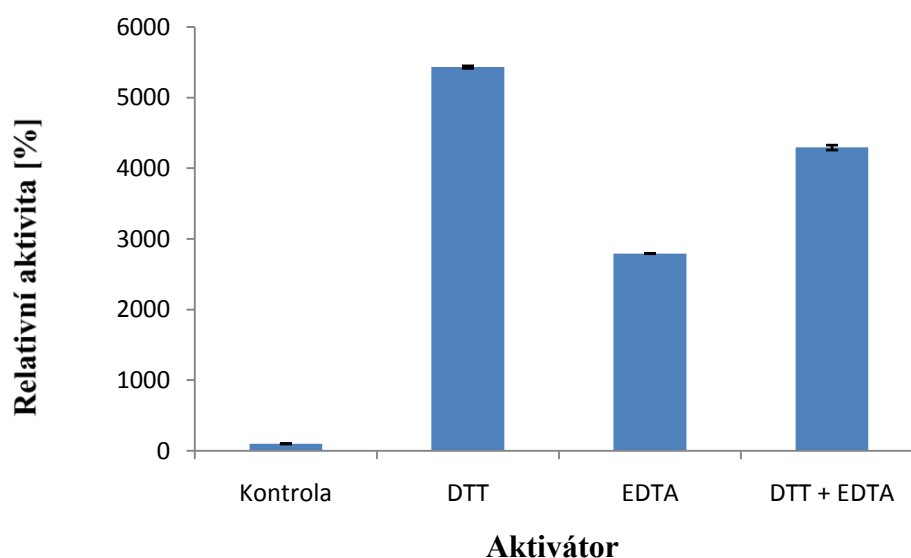
Inhibiční specifita PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného byla testována s vybranými skupinově selektivními proteasovými inhibitory a aktivátory (Tabulka 1). Extrakt ze střevní tkáně byl inkubován s příslušným inhibitorem nebo aktivátorem a poté byla stanovena aktivita PEP pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC. Zbytková aktivita byla vztažena k aktivitě neinhibovaného extraktu.

Tabulka 1: Skupinově selektivní proteasové inhibitory a aktivátory testované v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného.

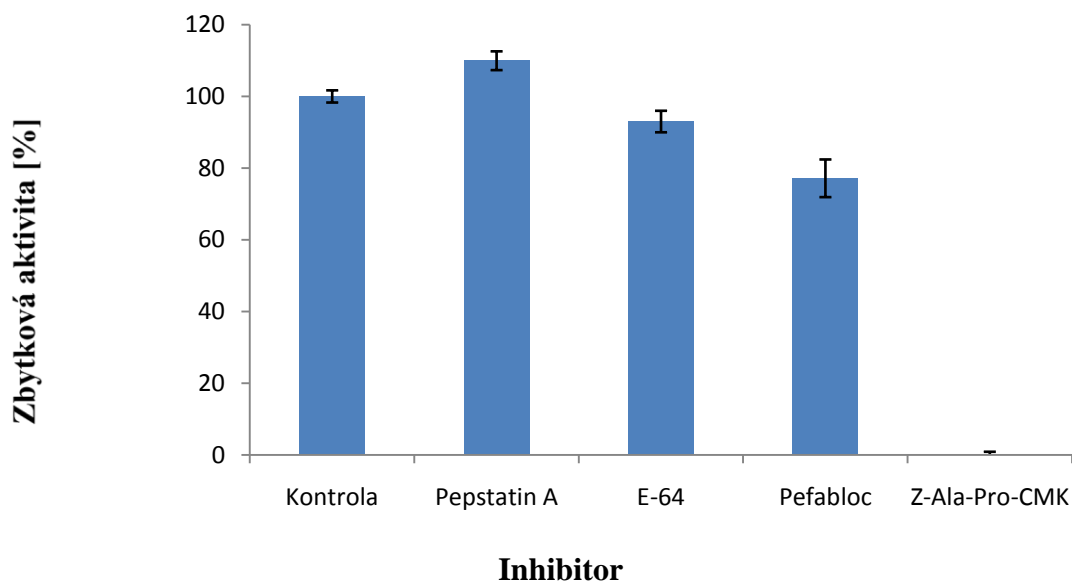
Inhibitor/aktivátor	Cílová proteasa	Koncentrace v testu
Pepstatin A	Inhibitor aspartátových proteas rodiny pepsinu	10 μ M
E-64	Inhibitor cysteinových proteas rodiny papainu	5 μ M
Pefabloc	Inhibitor serinových proteas rodiny S01	1 mM
Z-Ala-Pro-CMK	Inhibitor prolylendopeptidas	1 μ M
EDTA	Inhibitor metaloproteas	1 mM
DTT	Aktivátor cysteinových proteas	5 mM

Výsledky ukázaly, že aktivita PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného byla mnohonásobně (až 50×) zvýšena v přítomnosti DTT a EDTA (obr. 12). DTT je redukční činidlo, které je obvykle používáno jako aktivátor cysteinových proteas. Jeho mechanismus účinku spočívá v redukci oxidované (nebo obecně modifikované) thiolové skupiny katalytického cysteinu. EDTA je inhibitor metaloproteas, ale zároveň chelatační činidlo, které váže těžké kovy, které mohou interagovat s thiolovými skupinami cysteinových zbytků. Popsaná aktivace je výrazná, proto většina dalších kinetických testů byla prováděna v přítomnosti DTT a EDTA.

Na obr. 13 (str. 33) je vidět efekt jednotlivých inhibitorů na aktivitu PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného. Tato aktivita byla kompletně inhibována specifickým inhibitorem prolylendopeptidas Z-Ala-Pro-CMK. Pefabloc, inhibitor serinových proteas rodiny S01, vykazoval slabý inhibiční efekt. V případě inhibitorů pepstatin A (inhibitor aspartatových proteas) a E-64 (inhibitor cysteinových proteas) nebyl pozorován žádný výrazný inhibiční nebo aktivační efekt na aktivitu nativní PEP.



Obr. 12: Aktivace PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného. Enzymatická aktivita byla stanovena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Tris-HCl pH 8,0 v přítomnosti aktivátorů (osa x), jejichž výsledná koncentrace v testu je uvedena v Tabulce 1 (str. 31). Hodnoty aktivit jsou vyjádřeny v procentech jednotek RFU/s vztážených ke kontrolní hodnotě aktivity naměřené bez aktivátoru (100 %).



Obr. 13: Inhibiční analýza aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného s vybranými skupinově selektivními inhibitory proteas. Enzymatická aktivita byla stanovena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Tris-HCl pH 8,0 obsahujícím 1 mM EDTA a 2 mM DTT v přítomnosti inhibitorů (osa x), jejichž výsledná koncentrace v testu je uvedena v Tabulce 1 (str. 31). Hodnoty zbytkové aktivity jsou vyjádřeny v procentech jednotek RFU/s vztažených ke kontrolní hodnotě aktivity naměřené bez inhibitoru (100 %).

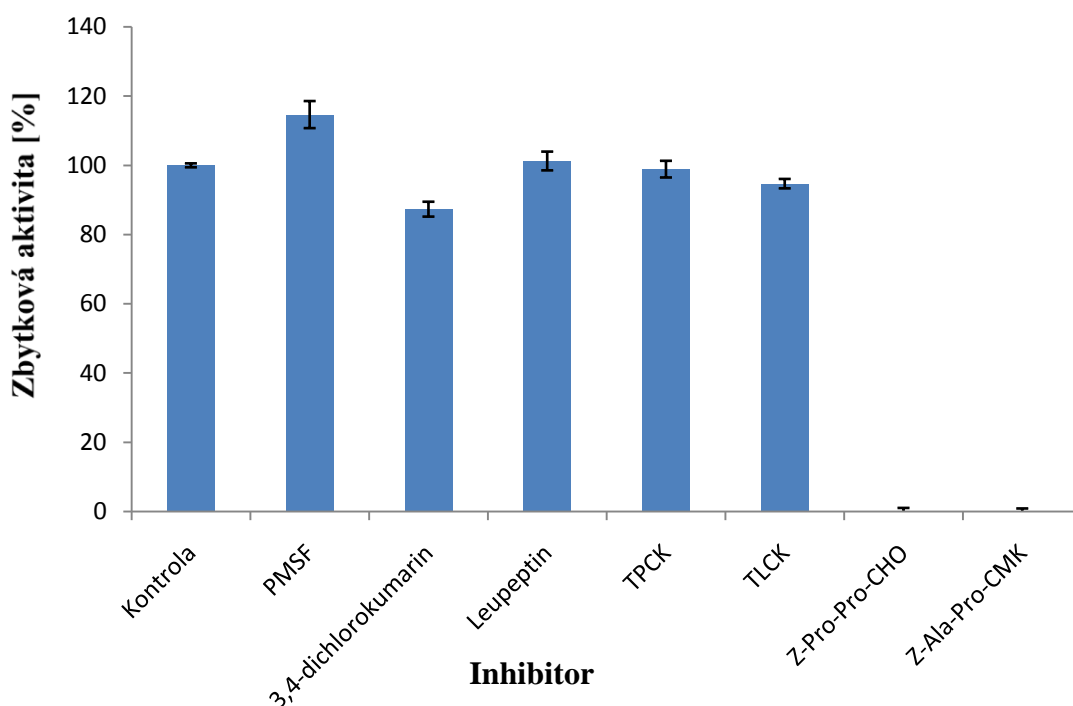
4.2. Vliv inhibitorů serinových proteas na aktivitu PEP

Testován byl vliv vybraných inhibitorů serinových proteas na PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného (Tabulka 2, str. 34). V testu byly přítomny aktivátory DTT a EDTA. Extrakt ze střevní tkáně byl inkubován s příslušným inhibitorem a poté byla stanovena zbytková aktivita PEP pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC. Zbytková aktivita byla vztažena k aktivitě neinhibovaného extraktu.

Tabulka 2: Inhibitory serinových proteas testované v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného.

Inhibitor	Cílová proteasa	Koncentrace v testu
PMSF	Serinové proteasy rodiny S01	1 mM
3,4-dichlorokumarin	Serinové proteasy rodiny S01	0,1 mM
Leupeptin	Serinové proteasy trypsinového typu a cysteinové proteasy	20 μ M
TPCK	Serinové proteasy chymotrypsinového typu	0,2 mM
TLCK	Serinové proteasy trypsinového typu	0,1 mM
Z-Pro-Pro-CHO	Serinové proteasy typu PEP	50 μ M
Z-Ala-Pro-CMK	Serinové proteasy typu PEP	10 μ M

Výsledky ukázaly, že aktivitu PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného kompletně inhibují pouze specifické inhibitory prolyndopeptidas Z-Ala-Pro-CMK a Z-Pro-Pro-CHO (obr. 14, str. 35). U dalších testovaných inhibitorů serinových proteas nebyl pozorován žádný výrazný inhibiční efekt. Zjištěná inhibiční specifita odpovídá inhibiční specifitě savčích PEP [35, 36].

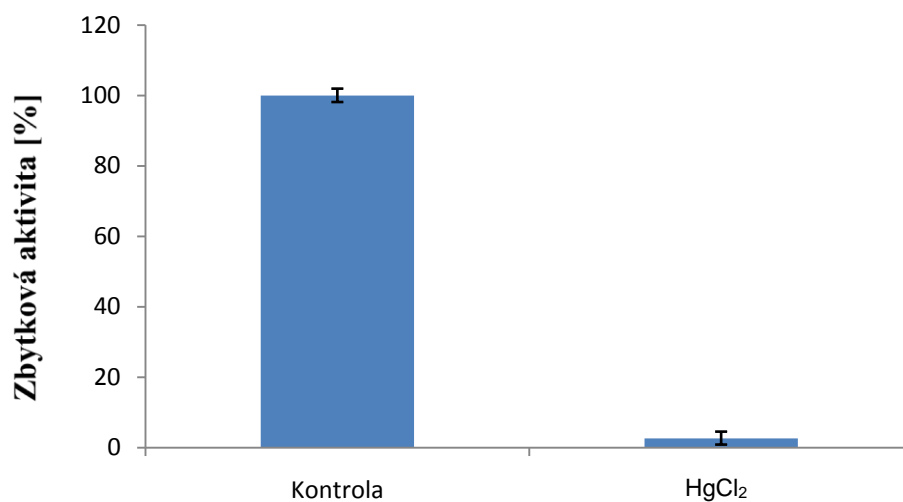


Obr. 14: Inhibiční analýza aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného s vybranými inhibitory serinových proteas. Enzymatická aktivita byla stanovena v kinetickém testu s flourogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Tris-HCl pH 8,0 obsahujícím 1 mM EDTA a 2 mM DTT v přítomnosti inhibitorů (osa x), jejichž výsledná koncentrace v testu je uvedena v Tabulce 2 (str. 34). Hodnoty zbytkové aktivity jsou vyjádřeny v procentech jednotek RFU/s vztažených ke kontrolní hodnotě aktivity naměřené bez inhibitoru (100 %).

4.2.3. Vliv rtuťnatých kationtů na aktivitu PEP

Byl testován efekt chloridu rtuťnatého na aktivitu PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného. Extrakt byl inkubován s chloridem rtuťnatým (10 mM) a poté byla stanovena zbytková aktivita PEP pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC. Zbytková aktivita byla vztažena k aktivitě neinhibovaného extraktu.

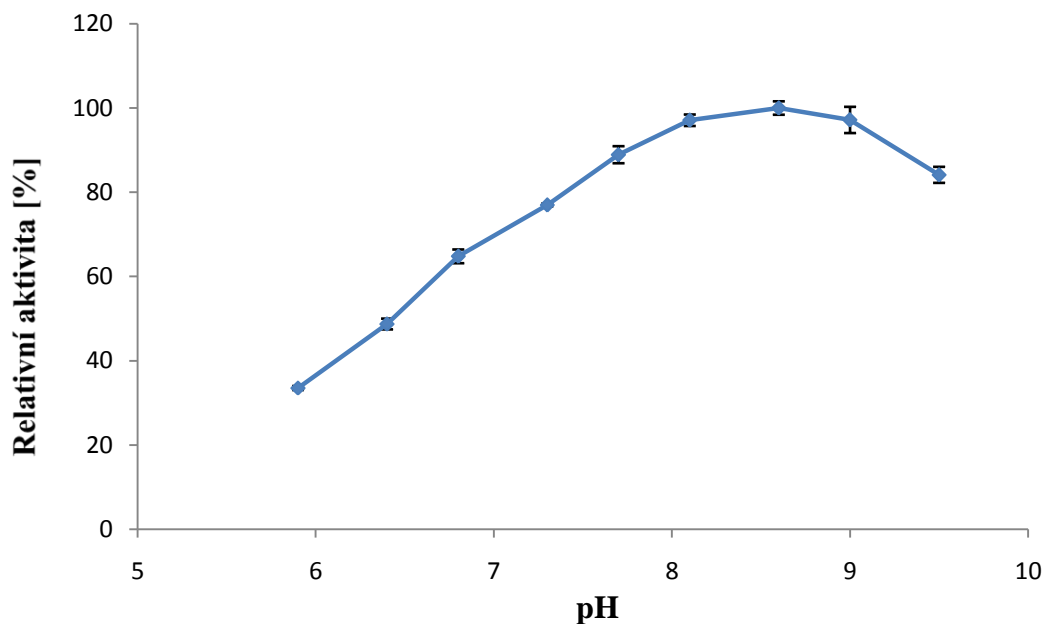
Rtuťnaté kationty, o kterých je známo, že mají schopnost interagovat s volnými thiolovými skupinami cysteinových zbytků proteinů, kompletně inhibovaly aktivitu nativní PEP (obr. 15, str. 36). To naznačuje, že ionty rtuti interagují s volnými thiolovými skupinami cysteinových zbytků PEP a pravděpodobně indukují změnu struktury PEP v oblasti aktivního místa spojenou se ztrátou aktivity.



Obr. 15: Vliv rtuťnatých kationtů na aktivitu PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného. Enzymatická aktivita byla stanovena v kinetickém testu s flourogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Tris-HCl pH 8,0 obsahujícím 1 mM EDTA a 2 mM DTT v přítomnosti 10 mM chloridu rtuťnatého. Hodnota zbytkové aktivity je vyjádřena v procentech jednotek RFU/s vztažených ke kontrolní hodnotě aktivity naměřené bez chloridu rtuťnatého (100 %).

4.3. Závislost aktivity PEP na pH

K určení pH optima aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného byl použit fluorogenní substrát Z-Gly-Pro-AMC. Z obr. 16 je vidět, že nativní PEP je aktivní v celé testované oblasti pH od 6,0 do 9,5 a pH optimum s maximální hodnotou aktivity je okolo pH 8,5.

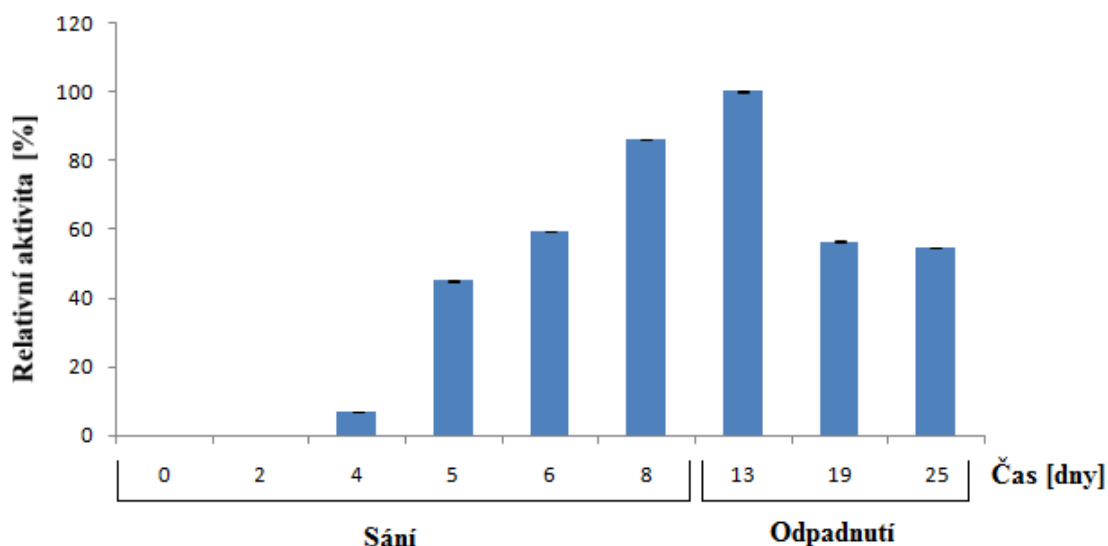


Obr. 16: Závislost enzymové aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně klišťete obecného na pH. Aktivita PEP byla stanovena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Bis-tris propan obsahujícím 1 mM EDTA a 2 mM DTT v daném pH (osa x). Aktivita je vyjádřena v procentech jednotek RFU/s vztažených k nejvyšší naměřené hodnotě (100 %).

4.4. Dynamika PEP ve střevu klíštěte obecného v průběhu sání

K porovnání enzymové aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného v různých fázích sání byly použity extrakty připravené ze střevních tkání klíšťat odebraných v různých časových intervalech od přisátí klíštěte na hostiteli. Aktivity PEP byly měřeny v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v přítomnosti DTT a EDTA. Aby byly výsledky porovnatelné, všechny aktivity byly měřeny paralelně a extrakty použité ve všech měřených vzorcích byly připraveny ze střevní tkáně stejného počtu klíšťat.

Na obr. 17 je ukázán výsledek měření. Aktivita PEP v prvních dnech od přisátí je minimální. Od pátého dne začíná rapidně růst a v třináctý den od přisátí (ve který se klíště nachází už mimo hostitele) dosahuje maxima.

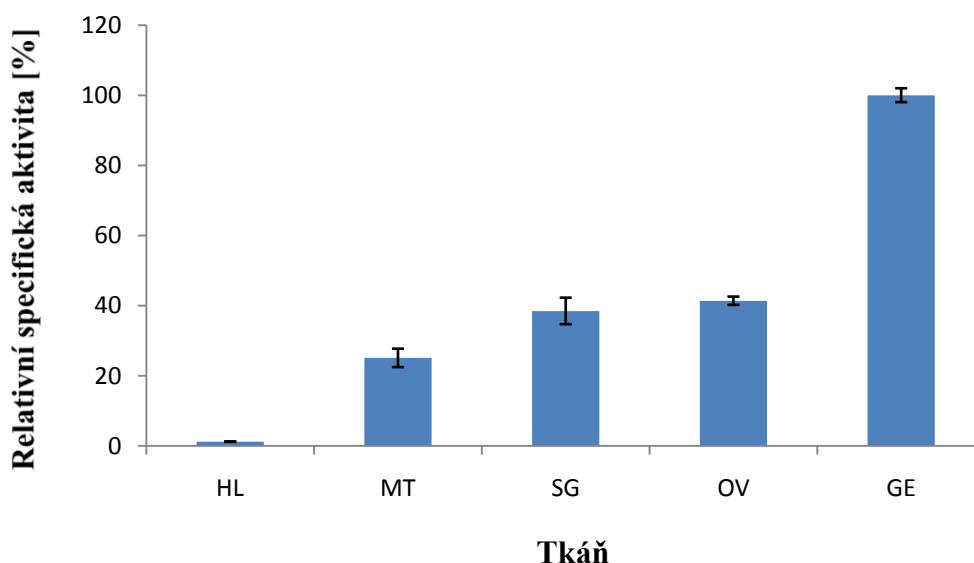


Obr. 17: Enzymová aktivita PEP v extraktech ze střevních tkání klíštěte obecného během sání a po odpadnutí z hostitele. Aktivita PEP v extraktech ze střevních tkání odebraných v danou dobu od počátku sání (osa x) byla stanovena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 obsahujícím 1 mM EDTA a 2 mM DTT. Extrakty použité ve všech měřených vzorcích byly připraveny ze střevní tkáně stejného počtu klíšťat. Aktivita je vyjádřena v procentech jednotek RFU/s vztažených k nejvyšší naměřené hodnotě (100 %).

4.5. Specifická aktivita PEP ve tkáních klíštěte obecného

4.5.1. Porovnání aktivity PEP ve vybraných tkáních

Aktivita PEP byla měřena v extraktech z vybraných tělních tkání klíštěte obecného, a to konkrétně v extraktech z hemolymfy, malpigických tubic, slinných žláz a z vaječníků. Aktivity byly měřeny pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v přítomnosti DTT a EDTA. Hodnoty takto získaných aktivit byly normalizovány na množství proteinů v extraktech. Na obr. 18 je vidět porovnání těchto specifických aktivit PEP přítomných v jednotlivých tkáních. Výrazně nejvyšší aktivita PEP byla detekována v extraktu ze střevní tkáně, značná aktivita v extraktech z malpigických tubic, slinných žláz a z vaječníků, naproti tomu žádná aktivita nebyla detekována v hemolymfě klíštěte. Uvedená data naznačují, že i když je PEP značně rozšířeným enzymem, lze předpokládat významnou roli při proteolytickém trávení proteinů z krve hostitele.



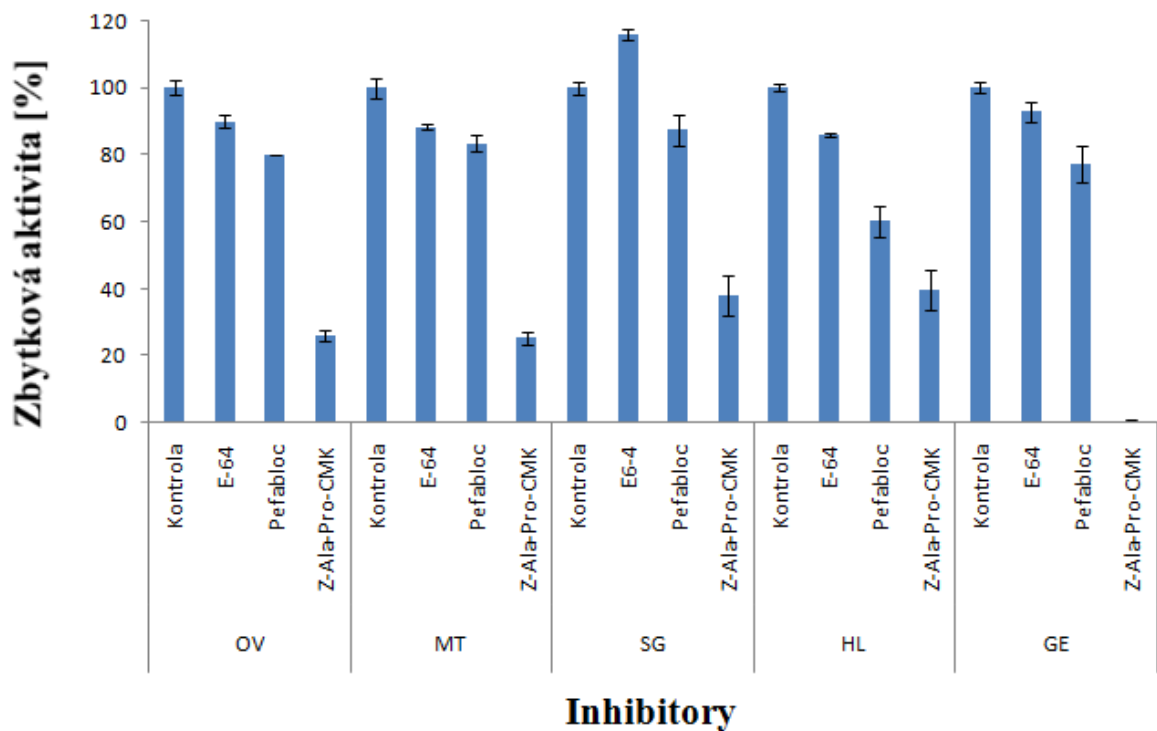
Obr. 18: Enzymová aktivita PEP v extraktech z tkání klíštěte obecného (HL – hemolymfa, MT – malpigické trubice, SG – slinné žlázy, OV – vaječníky, GE - střevní tkáň). Aktivita PEP byla stanovena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Tris-HCl pH 8,0 obsahujícím 1 mM EDTA a 2 mM DTT. Naměřené aktivity jsou normalizovány na množství proteinů v extraktech a představují specifické aktivity. Hodnoty specifických aktivit uvedené v grafu jsou vyjádřeny v procentech vztahených k nejvyšší naměřené hodnotě (100 %).

4.5.2. Inhibice aktivity PEP ve vybraných tkáních

Inhibiční specifita PEP v extraktech z vybraných tělních tkání klišťete obecného byla testována s inhibitory E-64, Pefabloc a Z-Ala-Pro-CMK, jejichž selektivita a koncentrace v testu je uvedena v Tabulce 1 (str. 31). Jednotlivé extrakty byly inkubovány s příslušnými inhibitory a poté byla stanovena zbytková aktivita PEP pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC. Do testu byly přidány aktivátory DTT a EDTA. Zbytková aktivita byla vztažena k aktivitě neinhibovaného extraktu dané tkáně.

Výsledek (obr. 19, str. 41) ukázal, že testované inhibitory mají podobný efekt na aktivitu PEP v extraktech z připravených tkání. Z-Ala-Pro-CMK vykazuje výraznou inhibici, mírná inhibice je viditelná v přítomnosti Pefabloc a E-64 nemá žádný výrazný inhibiční efekt.

Na rozdíl od aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně inhibitor Z-Ala-Pro-CMK neinhibuje aktivitu PEP v dalších testovaných tkáních kompletně. Možné vysvětlení pro tento jev je takové, že v jiných tkáních se může vyskytovat jiná proteasa štěpící prolylovou vazbu substrátu Z-Gly-Pro-AMC, která je jiného typu než PEP a nemá plnou inhibiční citlivost k tomuto inhibitoru.

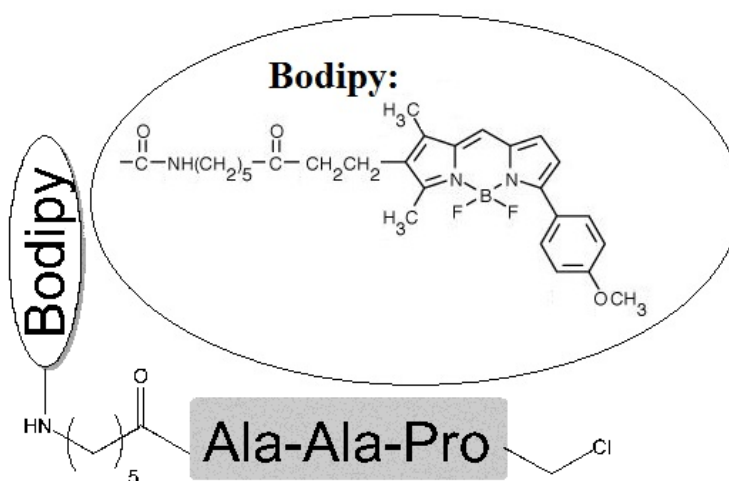


Obr. 19: Inhibiční analýza aktivity PEP v extraktech z vybraných tělních tkání klišťete obecného (HL – hemolymfa, MT – malpighické trubice, SG – slinné žlázy, OV – vaječníky, GE - střevo). Enzymatická aktivita byla stanovena v kinetickém testu s flourogenním substrátem Z-Gly-Pro-AMC v prostředí 0,1 M pufru Tris-HCl pH 8,0 obsahujícím 1mM EDTA a 2 mM DTT v přítomnosti inhibitorů (osa x), jejichž výsledná koncentrace v testu je uvedena v Tabulce 1 (str. 31). Hodnoty zbytkové aktivity jsou vyjádřeny v procentech jednotek RFU/s vztahených ke kontrolní hodnotě aktivity naměřené bez inhibitoru v dané tkáni (100 %).

4.6. Vizualizace PEP pomocí fluorescenční afinitní značky

Jako další metoda pro identifikaci PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného bylo použito afinitního fluorescenčního značení. Afinitní značky jsou specifickými ireverzibilními inhibitory proteas, na které jsou navázány fluorescenční skupiny. Proteasy, které reagují s afinitní značkou, je možné detekovat po separaci na elektroforéze SDS-PAGE pomocí fluorescenčního skeneru.

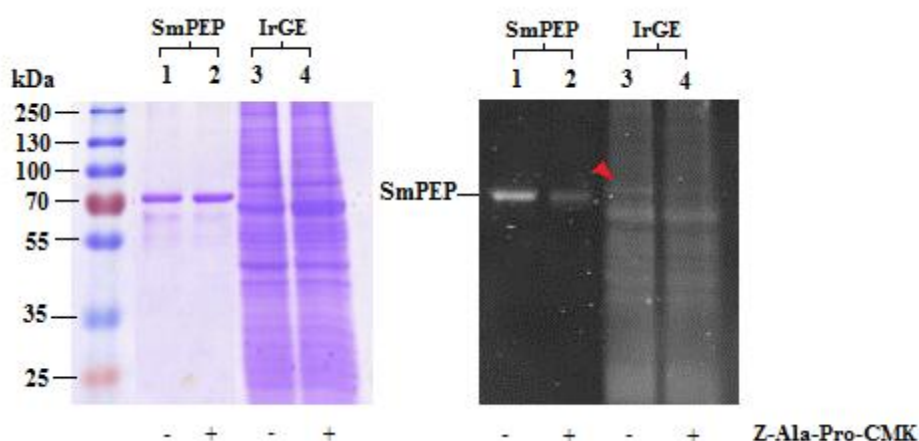
K identifikaci PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného byla použita fluorescenční afinitní značka BoPC (obr. 20). Tato značka se skládá z reaktivní chloromethylketonové skupiny (kovalentně váže značku na katalytický zbytek serinu), z peptidového řetězce Ala-Ala-Pro (váže se do aktivního místa proteasy a je zodpovědný za specifitu značky) a z připojené komerční fluorescenční skupiny označované jako Bodipy-TMR.



Obr. 20: Schematická struktura fluorescenční afinitní značky BoPC pro vizualizaci PEP. Na chloromethylketonovou skupinu je připojen peptidový řetězec Ala-Ala-Pro, na který je navázána fluorescenční skupina (Bodipy) s uvedenou strukturou. Tato značka byla navržena a syntetizována na ÚOCHB, AV ČR.

Po inkubaci BoPC s extraktem byla směs separována na elektroforéze SDS-PAGE a poté vizualizovaná na fluorescenčním skeneru. Pro ověření specifity bylo provedeno kompetiční značení: extrakt byl nejprve inkubován s inhibítorem Z-Ala-Pro-CMK a až poté byla k této směsi přidána značka BoPC. Inhibitor se naváže ireverzibilně do aktivního místa, čímž blokuje místo pro vazbu BoPC, což se projevuje při fluorescenční detekci na gelu jako „zhášený“ signál.

Jako pozitivní kontrola byla použita rekombinantní PEP z krevničky *Schistosoma mansoni* (SmPEP). Tento enzym byl na gelu pomocí BoPC identifikován jako pás o molekulové hmotě přibližně 75 kDa (obr. 21). Signál byl blokován po preinkubaci s inhibítorem Z-Ala-Pro-CMK. V extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného byl afinitním značením identifikován pás o molekulové hmotnosti cca 80 kDa, jehož fluorescenční signál byl „zhášen“ při kompetičním značení s inhibítorem Z-Ala-Pro-CMK.

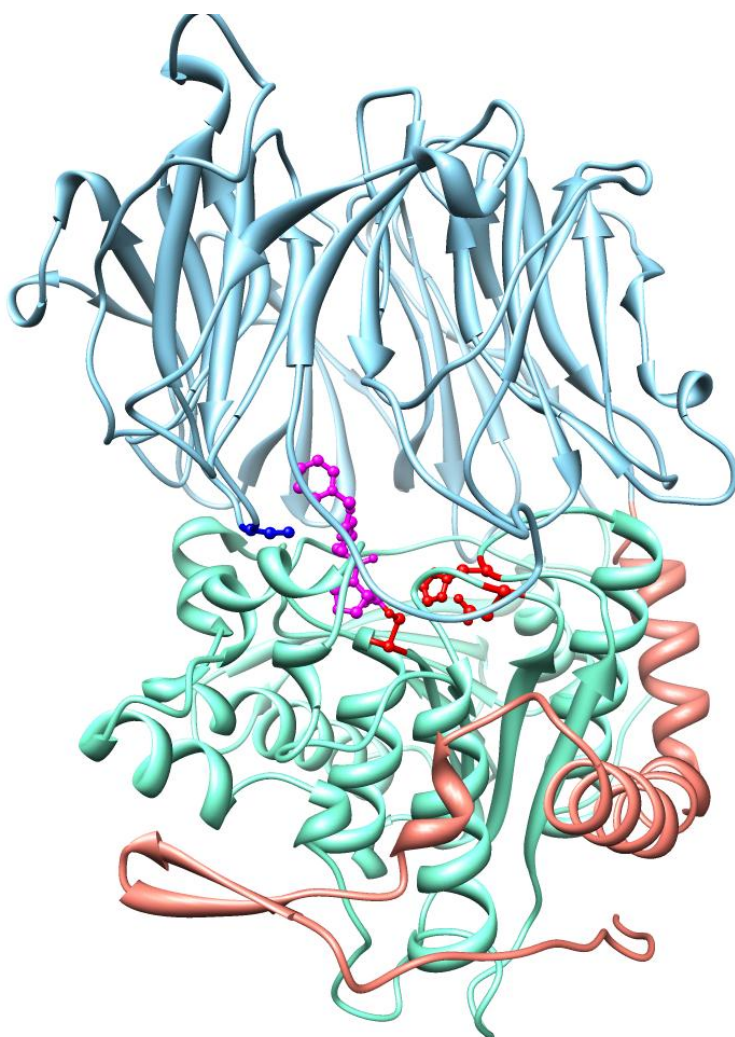


Obr. 21: Detekce PEP pomocí fluorescenční afinitní značky BoPC. Extrakt ze střevní tkáně klíštěte obecného (IrGE - dráhy 3 a 4) byl inkubován s BoPC, separován na elektroforéze SDS-PAGE a signál značené PEP byl detekován na fluorescenčním skeneru (vpravo). Signál byl inhibován při kompetičním značení v přítomnosti inhibitoru Z-Ala-Pro-CMK. Jako pozitivní kontrola byla značena rekombinantní PEP z krevničky *S. mansoni* (SmPEP - dráhy 1 a 2). Označena je pozice SmPEP a červenou šipkou je vyznačen předpokládaný pás PEP z klíštěte obecného. Po detekci byly proteiny v gelu obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 (vlevo), uvedeny jsou standardy molekulových hmotností.

4.7. Identifikace sekvence PEP v genomu klíštěte *Ixodes scapularis*

V genomu klíštěte *I. scapularis* [37] byla programem BlastP [38] za použití aminokyselinové sekvence lidské PEP (P48147) vyhledána homologická sekvence PEP s kódovým označením ISCW002432-RA. Tato aminokyselinová sekvence PEP z klíštěte *I. scapularis* (IsPEP) byla porovnána se sekvencí lidské a prasečí prolylendopeptidasy (obr. 22). Sekvence IsPEP obsahuje 707 aminokyselinových zbytků a je tvořena specifickou doménou označovanou jako tzv. „ β -propeller“ a peptidasovou doménu s katalytickou triádou Ser552, Asp638, His677, které jsou charakteristickými znaky savčích PEP.

IsPEP	-MKFQYPTPRRDESVDKYHGVEVRDPYRWMEPDSEETKEFVDAQNAVTTPFLEKCKDR	59
SsPEP	MLSFQYPDVYRDETAIQDYHGHKVCDPYAWLEDPDSEQTKAFVEAQNKITVPFLEQCPIR	60
HsPEP	MLSLQYPDVYRDETAVQDYHGHKICDPYAWLEDPDSEQTKAFVEAQNKITVPFLEQCPIR	60
	:.:*** ***:.:.:*** :. : ** * :*****:* ** :*** :*.*****:* *	
IsPEP	PKIKERLRELYDYPRFGCPNKHGSRFFYMNTGLQNQSVLYVQDSLADPRVFFDPNELS	119
SsPEP	GLYKERMTELYDYPKYSCHFKKGKRYFYFYNTGLQNQRVLYVQDSLEGEARVFLDPNLS	120
HsPEP	GLYKERMTELYDYPKYSCHFKKGKRYFYFYNTGLQNQRVLYVQDSLEGEARVFLDPNLS	120
	: **:.* *:.*.***: : ***** *****:.: ***:*** **	
IsPEP	EDGTVSMSTTSFSEDGELFAYGLSYSGSDWIKIYVKNVATGEIFPEVLEKIKFTSMSWTH	179
SsPEP	DDGTVALRGYAFSEDEGEYFAYGLSASGSDWVTIKFMKVDGAKELPDVLERVKFSCMAWTH	180
HsPEP	DDGTVALRGYAFSEDEGEYFAYGLSASGSDWVTIKFMKVDGAKELPDVLERVKFSCMAWTH	180
	:*****: : ***** ***** *****:.* . : * :. : :*****:*****:.***	
IsPEP	DNKGFYFGYKYPDSIAKADGTETDSAKDQKLYYHRVGTQSDVLCVEFPKEPKWRIGGTV	239
SsPEP	DGKGMFYNAYPQQDGKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTDQSEDILCAEFPDEPKWMGGAEL	240
HsPEP	DGKGMFYNSYPQQDGKSDGTETSTNLHQKLYYHVLGTDQSEDILCAEFPDEPKWMGGAEL	240
	* **:* ** ***: . * :*****: . ***** :** ***:***.*****.***** * . :	
IsPEP	SDCGKYLVTQAEGCKD-NM VYVANLEKLPNGIEVLLHLDLCIVGKFEAEYVVYVTNEGTVF	298
SsPEP	SDDGRYVLLSIREGCDPVNRLWYCDLQQESNGITGILKWKVLIDNFEGEYDYVTNEGTVF	300
HsPEP	SDDGRYVLLSIREGCDPVNRLWYCDLQQESSGIAGILKWKVLIDNFEGEYDYVTNEGTVF	300
	** * :* : : : : :***. * :. : : : . ** :* : : : : :***.*** *****	
IsPEP	TFRTNKGHPRYALVNIDLANSAEAFWQDLIPEDSKDVLWDATCVDKDKLVVCYLKRDVKNV	358
SsPEP	TFKTNRHSPNYRLINIDFTDPEESKWKVLVPEHEKDVLEWVACVRSNFLVLCYLHDKVNT	360
HsPEP	TFKTNRQSPNYRVINIDFRDPEESKWKVLVPEHEKDVLEWVACVRSNFLVLCYLHDKVNI	360
	:* ** : * . * : :*: : * : * : * :* . *****:* ** . : **:* ** :***	
IsPEP	LQLHSLATGAKIADFPLEVGTVSGYSGKKKDEIFYLFTSFLTPGTIYHCDLKEEPLSPK	418
SsPEP	LQLHDLATGALLKIFPLEVGSVVGYSGQKKDTEIFYQFTSFLSPGIYHCDLTKEELEPR	420
HsPEP	LQLHDLTTGALLKTFPLDVGSIVGYSGQKKDTEIFYQFTSFLSPGIYHCDLTKEELEPR	420
	. * : : ***:***: *****:***** *****:*** *****.*** * . * :	
IsPEP	VGPVPFLRESSRTATKFEVKQVFFESKDGCKVPMFIVRKKGLP--DNSPCLLYGYGGFNV	476
SsPEP	VFREVTV--KGIDASDYQTVQIFYPSKDGTKIPMFIVHKKGIKLDGSHPAFLYGYGGFNI	478
HsPEP	VFREVTV--KGIDASDYQTVQIFYPSKDGTKIPMFIVHKKGIKLDGSHPAFLYGYGGFNI	478
	* : . . * : : : . * : * : * :* . *****:***: . * . :*****:	



Obr. 23: Třírozměrná struktura prasečí PEP v komplexu s inhibitorem Z-Pro-Pro-CHO (PDB kód 1QFS). Světle modře je vyznačena doména označována jako „ β -propeller“, která stericky blokuje přístup do aktivního místa peptidasové domény (zeleně). Katalytické zbytky Ser554, Asp641, His680 jsou označeny červeně, N-konec proteinu lososově. Inhibitor Z-Pro-Pro-CHO vázící se do aktivního místa je vyznačen tmavě purpurovou barvou, Cys255 je označen tmavě modře. Upraveno v programu UCSF Chimera.

5. Diskuse

Inhibiční specifita PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného (*I. ricinus*) umožňuje zařadit tento enzym mezi serinové proteasy typu prolylendopeptidas. Důkazem toho je citlivost k inhibitorům Z-Pro-Pro-CHO a Z-Ala-Pro-CMK, které byly popsány jako účinné inhibitory savčích prolylendopeptidas [30, 36]. Naproti tomu studovaná aktivita nebyla inhibována jinými inhibitory serinových proteas trypsinového nebo chymotrypsinového typu ani skupinovými inhibitory jiných tříd proteas (aspartátových, cysteinových proteas a metaloproteas).

Dále bylo zjištěno, že aktivita PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného byla indukována pomocí DTT a EDTA. Tento výsledek naznačuje, že aktivační proces by mohl mít souvislost s volnou thiolovou skupinou, která ovlivňuje funkci aktivního místa PEP z klíštěte obecného. DTT je v nízkých koncentracích často používán jako thiolové činidlo pro „odmaskování“ thiolových skupin cysteinových zbytků proteinů, které byly modifikovány oxidací nebo tvorbou komplexů. EDTA je obecně používána v proteinové biochemii k vyvázání iontů kovů z proteinových komplexů. Typickým příkladem tohoto použití DTT a EDTA je aktivace cysteinových proteas, které obsahují v aktivním místě volný zbytek cysteinu, který je obvykle částečně blokován oxidací nebo interakcí s různými nízkomolekulárními ligandy, které je potřeba odstranit pro plnou aktivaci těchto enzymů.

Přítomnost cysteinového zbytku důležitého pro aktivitu PEP z klíštěte obecného je dále podporována testem aktivity PEP v extraktu ze střevní tkáně v přítomnosti chloridu rtuťnatého, který kompletně inhiboval její aktivitu. Schopnost iontů rtuti interagovat s cysteinovými zbytky je opět známá z literatury, např. u cysteinových proteas, které jsou těmito ionty inhibovány [40].

Výše uvedená modulace aktivity PEP z klíštěte obecného by mohla být porovnána se savčími prolylendopeptidasami, které obsahují volný cysteinový zbytek. Tento zbytek u savčích PEP byl popsán jako citlivý na modifikaci pomocí reagensů, které interagují s thiolovými skupinami jako jsou např. p-chloromerkuribenzoát a jodacetamid [41]. Uvedená činidla byla schopna inhibovat peptidolytickou aktivitu lidské a prasečí PEP a bylo prokázáno, že za tuto inhibici je zodpovědná modifikace zbytku Cys255, který se nachází v blízkosti aktivního místa [39]. Proto byla v bakalářské práci analyzována sekvence PEP z klíštěte *I. scapularis*, který je evolučně příbuzný s *I. ricinus* a jsou pro něj

dostupná sekvenční data z genomu. Sekvence PEP z klíštěte *I. scapularis* byla porovnána se sekvencemi lidské a prasečí PEP a bylo zjištěno, že PEP z klíštěte *I. scapularis* obsahuje, stejně jako oba savčí enzymy, cysteinový zbytek v homologické pozici k Cys255. Z toho vyplývá, že příčinou aktivace PEP z klíštěte obecného je pravděpodobně působení DTT a EDTA právě na zbytek Cys homologický s Cys255. Nicméně u PEP z klíštěte obecného byl poprvé popsán kromě inhibičního efektu působením na Cys255 také aktivační efekt, který literatura o savčích PEP neuvádí. Toto může být způsobeno tím, že Cys255 je u PEP z klíštěte obecného silně modifikován molekulami přítomnými v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného, který byl používán pro měření enzymové aktivity. Těmito molekulami by mohly být např. ionty železa, které mohou pocházet z hemu uvolněného při degradaci hemoglobinu přijatého z krve hostitele.

Bakalářská práce určila hodnotu pH optima PEP z klíštěte obecného v oblasti pH 8-9, což je v souladu s hodnotou uvedenou pro savčí homologa [41]. Dále byla určena relativní molekulová hmotnost PEP z klíštěte obecného pomocí vizualizace fluorescenční afinitní značkou, která se váže do aktivního místa PEP. Toto značení v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného umožnilo detekovat na elektroforéze SDS-PAGE pás o molekulové hmotnosti cca 80 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti uváděné pro savčí PEP [30].

Pro lokalizaci PEP z klíštěte obecného byla měřena aktivita v extraktech z několika tkání klíštěte a nejvyšší specifická aktivita byla nalezena v extraktu ze střevní tkáně. Tato aktivita byla kompletně inhibována Z-Ala-Pro-CMK, známým jako selektivní inhibitor prolylendopeptidas [35]. Extrakty ze střevní tkáně byly dále připraveny pro sérii klíšťat v průběhu celého procesu sání na hostiteli a trávení po odpadnutí klíštěte z hostitele. Tato analýza ukázala, že v průběhu 2. fáze sání (4.-8. den) dochází k nárůstu aktivity PEP a po odpadnutí dosahuje maxima (13. den) a poté opět klesá. Tyto výsledky naznačují, že PEP z klíštěte obecného by se mohla účastnit procesu trávení proteinů přijatých z krve hostitele. Předchozí práce ukazují, že trávicí proteolýza klíšťat je řízena cysteinovými a aspartátovými proteasami [14, 42]. Žádná z těchto proteas, nicméně, není schopna štěpit peptidovou vazbu s prolinem v pozici P_1 nebo P_1' , proto lze předpokládat, že PEP štěpící peptidové fragmenty s prolinem v pozici P_1 by mohla účinně doplňovat degradaci proteinových substrátů v závěrečných fázích trávicí proteolýzy.

6. Závěr

Bakalářská práce se zabývala prolylendopeptidasou (PEP) z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), která u tohoto parazita doposud nebyla biochemicky charakterizována. Tato serinová proteasa je potenciální cílová molekula pro vývoj nových vakcín proti klíšťatům a přenášeným patogenům.

- Nejvyšší specifická proteolytická aktivita PEP testovaná v různých tkáních klíštěte obecného byla nalezena ve střevní tkáni.
- Aktivita PEP v extraktu střevní ze tkáně klíštěte obecného byla indukována pomocí DTT a EDTA a inhibována pomocí HgCl_2 . Vysvětlení tohoto efektu bylo navrženo na základě funkční role cysteinového zbytku v blízkosti aktivního místa PEP.
- Byla určena inhibiční specifita PEP z klíštěte obecného, jež byla selektivní pro peptidové inhibitory Z-Ala-Pro-CMK a Z-Pro-Pro-CHO. Bylo určeno pH optimum aktivity PEP z klíštěte obecného v oblasti pH 8-9.
- Proteolytická aktivita PEP z klíštěte obecného je ve střevní tkáni v prvních dnech od přisátí klíštěte na hostiteli minimální. Od pátého dne sání začíná výrazně narůstat a dosahuje maxima v třináctý den od přisátí. V pozdních fázích trávení po uvolnění klíštěte z hostitele aktivita klesá.
- PEP v extraktu ze střevní tkáně klíštěte obecného byla vizualizována na elektroforéze SDS-PAGE pomocí metody fluorescenčního afinitního značení a její molekulová hmotnost byla stanovena přibližně na 80 kDa.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Matthews, B.E.: An introduction to parasitology, Cambridge University Press (2007)
2. Volf, P., Horák, P., a kolektiv: Paraziti a jejich biologie, Triton (2007)
3. <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id76144>, 8.3.2012
4. <http://admin.mpooffice.hu/uploads/kullancsvedelem/kozonseges-kullancs-ixodes-ricinus.jpg>, 19.12.2011
5. <http://www.sciencephoto.com/media/373869/view>, 8.3.2012
6. <http://www.flickr.com/photos/texasparkswildlife/4333433208/sizes/o/in/photostream>, 8.3.2012
7. <http://www.ct.gov/caes/lib/caes/documents/publications/bulletins/b1010.pdf>, 8.3.2012
8. http://www.borelioza.cz/old_page/img/ir12.jpg, 19.12.2011
9. <http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=873>, 8.3.2012
10. http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:Life_cycle_of_ticks_family_ixodidae.PNG, 8.3.2012
11. Hovius, J. W., van Dam, A. P., Fikrig, E. (2007) *Trends Parasitol.* 23, 434-438
12. Franta, Z., Frantova, H., Konvickova, J., Horn, M., Sojka, D., Mares, M., Kopacek, P. (2010) *Parasit. Vectors.* 3, 119
13. Lara, F. A., Lins, U., Bechara, G. H., Oliveira, P. L. (2005) *J. Exp. Biol.* 208, 3093-3101
14. Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C. R., Mares, M., Kopacek, P. (2008) *Parasit. Vectors.* 1, 7
15. Lara, F. A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I. C., Braga, C. M., Miguens, F. C., Oliveira, P. L., Dansa-Petretski, M. (2003) *J. Exp. Biol.* 206, 1707-1715

16. Bowman, A., Nuttal P.: Ticks - Biology, disease and control, Cambridge University Press (2012)
17. http://www.borelioza.cz/old_page/ixodes.htm, 19.12.2011
18. Valenzuela, J. G. (2004) *Parasitology* 129, S83-S94
19. Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M., Chinzei, Y. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 1926-1934
20. Nuttall, P. A., Labuda, M. (2004) *Parasitology* 129, S177-S189
21. Sedlák, K., Tomšíčková, M.: Nebezpečné infekce zvířat a člověka, Scientia (2006)
22. <http://www.demussen.net/photomicrograph-depicting/info-vaw.html>, 8.3.2012
23. Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J. (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28, 882-890
24. <http://merops.sanger.ac.uk/>, 8.3.2012
25. Neurath, H., Walsh, K. A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 3825-3832
26. Page, M. J., Di Cera, E. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1220-1236
27. Hedstrom, L. (2002) *Chem. Rev.* 102, 4501-4524
28. http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Serine&lang=1, 14.3.2012
29. Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M., Hanada, K. (1982) *Biochem. J.* 201, 189-198
30. Rea, D., Fulop, V. (2006) *Cell Biochem. Biophys.* 44, 349-365
31. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1993) *Biochem. J.* 290, 205-218
32. Lupi, A., Tenni, R., Rossi, A., Cetta, G., Forlino, A. (2008) *Amino Acids* 35, 739-752
33. Fulop, V., Bocskei, Z., Polgar, L. (1998) *Cell* 94, 161-170
34. Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M., Kellenberger, E. (1970) *J. Mol. Biol.* 49, 99-113

35. Fajtová, P.: Prolyl endopeptidasa z krevničky *Schistosoma mansoni*, diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra biochemie (2011)
36. Yoshimoto, T., Simmons, W. H., Kita, T., Tsuru, D. (1981) *J. Biochem.* 90, 325-334
37. www.vectorbase.org, 23.5.2012
38. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 25.5.2012
39. Szeltner, Z., Renner, V., Polgar, L. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 15000-15005
40. Bondareva, L. A., Nemova, N. N., Kiaivariainen, E. I., Krupnova, M. I., Ostashkova, V. V. (2003) *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol.* 37-40
41. Polgar, L. (1991) *Eur. J. Biochem.* 197, 441-447
42. Horn, M., Nussbaumerova, M., Sanda, M., Kovarova, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C. R., Kopacek, P., Mares, M. (2009) *Chem. Biol.* 16, 1053-1063

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka