

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Rekombinantní aspartátové proteasy krev sajících parazitů

Recombinant aspartic proteases of blood-feeding parasites

Diplomová práce

Autor: Bc. Jana Váchová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

PRAHA 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Rekombinantní aspartátové proteasy krev sajících parazitů“ vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

.....

Jana Váchová

Děkuji školiteli RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. za vedení, jeho vstřícnost, trpělivost a cenné rady a Mgr. Martinovi Hornovi, CSc. za pomoc po celou dobu řešení práce. Ráda bych také chtěla poděkovat všem členům laboratoře za vytvoření skvělé pracovní atmosféry a za cenné rady, které mi poskytli během studia. Dík bych chtěla dále vyjádřit i Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc za přečtení této práce a cenné připomínky. Zvláštní poděkování patří i mé rodině za finanční i psychickou podporu během studia.

Abstrakt

Krev sající parazité klíště obecné *Ixodes ricinus* a krevnička střevní *Schistosoma mansoni* produkují trávicí aspartátovou proteasu typu katepsinu D, která zahajuje degradaci hemoglobinu, jež je jejich hlavním potravním zrojem. Pro katepsin D z *I. ricinus* (IrKatD) byl sestaven a optimalizován protokol pro refolding rekombinantního enzymu a byl určen způsob aktivace IrKatD, při níž zymogen odštěpuje propeptid auto-aktivačním mechanismem v kyselém pH. Dále byly studovány funkční vlastnosti IrKatD s využitím kinetického měření v přítomnosti fluorogenního substrátu. Takto bylo určeno pH optimum, substrátová a inhibiční specifita IrKatD. V práci byla dále popsána příprava dvou izoenzymů rekombinantního katepsinu D ze *S. mansoni* (SmKatD). Pro jejich produkci byl použit expresní systém *E. coli*. Produkované proteiny byly izolovány z inkluzních tělísek pomocí afinitní chromatografie za denaturačních podmínek a byl sestaven a optimalizován protokol pro jejich refolding. Studované aspartátové proteasy jsou zajímavé z medicínálního pohledu: inhibitory SmKatD představují potenciální chemoterapeutika pro léčbu schistosomózy a IrKatD je perspektivní antigen pro vývoj nových protiklíštěcích vakcín.

Abstract

The blood fluke *Schistosoma mansoni* and the hard tick *Ixodes ricinus* produce an aspartic protease cathepsin D which initiates degradation of hemoglobin, their key nutrient. First, in the presented work, the protocol for refolding and activation of the zymogen of cathepsin D from *I. ricinus* (IrCatD) was developed and optimized. In acidic pH the propeptide of IrCatD zymogen was removed by an auto-activation mechanism. Further, a kinetic assay with fluorogenic substrates was employed to study functional properties of IrCatD including pH optimum, substrate and inhibition specificities. Second, two isoforms of cathepsin D from *S. mansoni* (SmCatD) were produced using recombinant expression in *E. coli*. These recombinant proteases were isolated from inclusion bodies using affinity chromatography under denaturing conditions, and protocol for their refolding was developed and optimized. The studied aspartic proteases are potential pharmacological targets: inhibitors of SmCatD represent potential chemotherapeutics for the treatment of schistosomiasis, and IrCatD is a candidate antigen for the development of novel anti-tick vaccines.

Seznam zkratek

Abz	aminobenzoyl
ATP	adenosintrifosfát
AIDS	„Acquired Immune Deficiency Syndrome“
BYC	Boophilus yokl pro-cathepsin
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimetylsulfoxid
E64	N-[N-(L-3-trans-karboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]-agmatin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“
HOAc	kyselina octová
HuKatD	catepsin D z lidského organismu
IrKatD	catepsin D z <i>Ixodes ricinus</i>
kDa	kilo Dalton
Man	mannosa
NAG	N-acetylglukosamin
Ni-NTA	Ni ²⁺ nitriltrioctová kyselina
Nph	p-nitrofenylalanin
PDI	potato cathepsin D inhibitor
PEG	polyethylenglykol
PI-3	pepsin inhibitor 3
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
pro-IrKatD	procatepsin D z <i>Ixodes ricinus</i>
pro-SmKatD	procatepsin D z <i>Schistosoma mansoni</i>
PVDF	polyvinyliden fluorid
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SmKatD-S	catepsin D z <i>Schistosoma mansoni</i> bez C-koncové domény

SmKatD-L	katepsin D ze <i>Schistosoma mansoni</i> s C-koncovou doménou
SQAP	squash aspartic proteinase inhibitor
ST	standardy molekulových hmot
Sta	statin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
THAP	tick heme-binding aspartic protease
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Zkratky aminokyselin

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

1. Parazitismus.....	11
1.1 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	11
1.1.1 Výskyt klíštěte obecného	13
1.1.2 Životní cyklus klíštěte obecného	14
1.1.3 Zaživací trakt samičky klíštěte obecného	15
1.1.4 Příjem potravy a trávení klíštěte	17
1.1.5 Onemocnění přenášená klíštětem obecným	18
1.1.5.1 Klíšťová encefalitida	18
1.1.5.2 Lymfská boreliosa	19
1.1.5.3 Erlichiosa	19
1.2 Krevnička střevní (<i>Schistosoma mansoni</i>)	19
1.2.1 Výskyt krevničky střevní.....	20
1.2.2 Životní cyklus krevničky střevní.....	21
1.2.3 Zaživací ústrojí krevničky střevní.....	22
1.2.4 Klinické příznaky a patogeneze	23
1.3 Hemoglobin jako hlavní zdroj živin klíšťat a krevniček	24
1.4 Klasifikace proteas	25
1.5 Třída aspartátových proteas.....	25
1.5.1 Aspartátové proteasy rodiny pepsinu.....	26
1.5.1.1 Struktura aspartátových proteas rodiny pepsinu.....	27
1.5.1.2 Katalytický mechanismus aspartátových proteas	27
1.5.1.3 Substrátová specifita aspartátových proteas	28
1.5.1.4 Inhibitory aspartátových proteas	28
1.5.2 Aspartátové proteasy typu katepsinu D.....	29
1.5.2.1 Substrátová specifita katepsinu D.....	30
1.5.2.2 Struktura katepsinu D.....	30
1.5.3 Aspartátové proteasy klíšťat	31
1.5.3.1 Katepsin D klíštěte obecného	31
1.5.3.2 Aspartátová proteasa z <i>Haemaphysalis longicornis</i>	32
1.5.3.3 Aspartátová proteasa typu BYC.....	32
1.5.3.4 Aspartátová proteasa typu THAP	33
1.5.4 Aspartátové proteasy krevničky střevní.....	34
2. Cíl.....	36
3. Materiál a metody	37
3.1 Materiál	37
3.1.1 Rekombinantní katepsin D z klíštěte obecného (IrKatD)	37
3.1.2 Rekombinantní katepsin D z krevničky střevní (SmKatD)	37
3.1.3 Chemikálie.....	37
3.2 Přístroje a vybavení.....	38
3.3 Experimentální metody	39
3.3.1 Rekombinantní exprese	39
3.3.1.1 Exprese v buňkách <i>E. coli</i> BL21(DE3)	39
3.3.1.2 Dezintegrace buněk a separace inkluzních tělísek	39
3.3.1.3 Purifikace katepsinu D z inkluzních tělísek	40
3.3.2 Refolding proteinu	41
3.3.3 Chromatografie na koloně Mono Q.....	41
3.3.4 Chromatografie na koloně Mono S.....	42
3.3.5 Analytické metody	43
3.3.5.1 Stanovení koncentrace proteinů	43
3.3.5.2 Příprava vzorků na SDS-PAGE acetonovou precipitací	43
3.3.5.3 SDS-PAGE.....	43
3.3.5.4 Přenos proteinů z gelu na membránu	43
3.3.5.5 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence	44
3.3.5.6 Tricin SDS-PAGE	44

3.3.5.7	Degradace hemoglobinu pro elektroforetickou analýzu.....	44
3.3.5.8	Degradace hemoglobinu s fluoreskaminovou detekcí	45
3.3.5.9	Analýza auto-aktivace prokatepsinu D	45
3.3.6	Měření enzymové aktivity.....	46
3.3.6.1	Kinetické měření s peptidovým substrátem.....	46
3.3.6.2	Určení pH optima IrKatD	46
3.3.6.3	Inhibice enzymové aktivity	46
4.	Výsledky.....	48
4.1	Katepsin D z <i>Ixodes ricinus</i> (IrKatD).....	48
4.1.1	Refolding IrKatD	48
4.1.1.1	Určení základní strategie pro refolding IrKatD	48
4.1.1.2	Optimalizace podmínek pro refolding pro-IrKatD	49
4.1.2	Chromatografická purifikace zymogenu IrKatD	52
4.1.3	Analýza aktivace zymogenu IrKatD	54
4.1.4	Chromatografická purifikace aktivního IrKatD.....	57
4.1.5	Biochemická analýza IrKatD	59
4.1.5.1	Určení pH optima IrKatD	59
4.1.5.2	Inhibiční specificita	59
4.1.5.3	Degradace hemoglobinu	61
4.1.5.4	Závislost degradace hemoglobinu na pH.....	61
4.2	Katepsin D ze <i>Schistosoma mansoni</i> (SmKatD).....	64
4.2.1	Příprava rekombinantního SmKatD	64
4.2.1.1	Exprese v <i>E. coli</i>	64
4.2.1.2	Purifikace SmKatD z inkluzních tělísek	65
4.2.2	Refolding SmKatD	65
4.2.2.1	Základní strategie pro refolding SmKatD.....	65
4.2.2.2	Optimalizace podmínek pro refolding SmKatD	67
5.	Diskuse.....	70
6.	Závěr.....	73
7.	Použitá literatura	75

1. Parazitismus

Parazitismus je definován jako typ soužití dvou organismů, kdy jeden organismus (parazit) získává živiny z druhého organismu (hostitele), kterému škodí, ale nemusí ho zabít. Vzhledem k závažnosti a rozšíření parazitárních onemocnění jsou parazité jedním z nejzávažnějších problémů dnešní doby a to jak v humánní, tak veterinární medicíně. Parazitologie je považována za jeden z nejsledovanějších vědních oborů Světovou zdravotnickou organizací [1]. Počet onemocnění způsobených parazity stoupá a zároveň dochází k rozšíření oblastí s výskytem těchto onemocnění a hrozí nebezpečí pandemie. Na žádné lidské parazitární onemocnění neexistuje účinná vakcína, což je důvodem nárůstu počtu onemocnění. Používané antiparazitické léky se navíc stále častěji stávají neúčinnými v důsledku rezistence.

Parazitismus je problémem převážně v tropických a subtropických zemích, ale můžeme se s ním setkat i v mírném podnebném pásmu.

Parazité žijící volně, kteří si někdy „přilepší“ na hostiteli, se nazývají fakultativní (příležitostní) parazité. Naopak ti parazité, kteří nejsou schopni přežít bez svého hostitele, se nazývají obligatorní (praví) parazité. Parazité se dále dělí na endoparazity a ektoparazity. Endoparazité žijí uvnitř hostitelského těla a na základě toho, zda žijí mezi buňkami hostitele či uvnitř jeho tělních dutin se dělí na intracelulární a extracelulární. Na povrchu hostitele parazitují ektoparazité [2].

1.1 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Taxonomie klíštěte obecného. Převzato z [3]:

Nadříše:	Eukaryota (<i>Eukaryotae</i>)
Říše:	Živočichové (<i>Animalia</i>)
Podříše:	Mnohobuněční (<i>Metazoa</i>)
Kmen:	Členovci (<i>Arthropoda</i>)
Podkmen:	Klepítkatci (<i>Chelicerata</i>)
Třída:	Pavoukovci (<i>Arachnida</i>)
Řád:	Klíšťatovci (<i>Ixodida</i>)
Čeleď:	Klíšťatovití (<i>Ixodidae</i>)
Rod:	Klíště (<i>Ixodes</i>)
Druh:	Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)

Klíšťata řádu *Ixodida* patří do kmene členovců (*Arthropoda*), podkmene klepítkatců (*Chelicerata*) a třídy pavoukovců (*Arachnida*). Řád klíšťatovci (*Ixodida*) se dělí do tří čeledí, z nichž první je klíšťákovití (*Argasidae*) a druhou klíšťatovití (*Ixodidae*), do které patří i klíště obecné. Třetí čeleď, která je zoologickou raritou, je *Nuttalliellidae* [4], která svými charakteristikami stojí mezi vlastnostmi *Argasidae* a *Ixodidae*. Obě čeledi *Argasidae* a *Ixodidae* mají společný způsob získávání potravy, liší se ale způsobem vývoje a zevnějškem (tab. 1).

Tab. 1: Rozdíly mezi tzv. tvrdými (*Ixodidae*) a měkkými klíšťaty (*Argasidae*).

Klíšťatovití (<i>Ixodidae</i>)	Klíšťákovití (<i>Argasidae</i>)
1. Pokožka je tvrdá	1. Pokožka je měkká
2. Hřbetní štítek (Scutum) je přítomen ve všech vývojových stádiích	2. Hřbetní štítek není přítomen
3. Na zadní části hřbetního štítu je přítomen jeden pár očí	3. Oči obvykle chybí
4. Larvy, nymfy, dospělí jedinci sají pouze jednou po dobu několika dnů	4. Nymfy a dospělí jedinci sají několikrát za den (30-60 minut), zatímco larvy sají několik dní
5. Samci umírají hned po kopulaci	5. Jsou schopní opakované kopulace
6. Samičky kladou přes 3 000 vajíček (podle druhu klíštěte) a poté umírají	6. Samičky kladou několik stovek vajíček

Klíště obecné (obr. 1, str. 13) je obligatorním ektoparazitem živícím se krví obratlovců. Co se týče potravy, dospělí samci potravu nepřijímají, pouze hledají na hostiteli samičku k páření. Naproti tomu, samička je schopná sát až dva týdny a zvětšit svůj objem až pětkrát. Důsledkem je uspořádání těla samiček, které mají na hřbetní straně těla tvrdý štítek (scutum), který u samiček zasahuje pouze do poloviny či třetiny jejich elastické idiosomy (tělo bez hlavové části). Tělo samců je téměř celé pokryto hřbetním štítkem. Důležitým orgánem pro uchycení klíšťat je jejich ústní ústrojí, tzv. hypostom, které obsahuje řadu zahnutých zoubků. Ukotvení v tkáni hostitele může být u některých klíšťat ještě umocněno vyloučením zvláštní bílkovinné hmoty zvané cement [2].



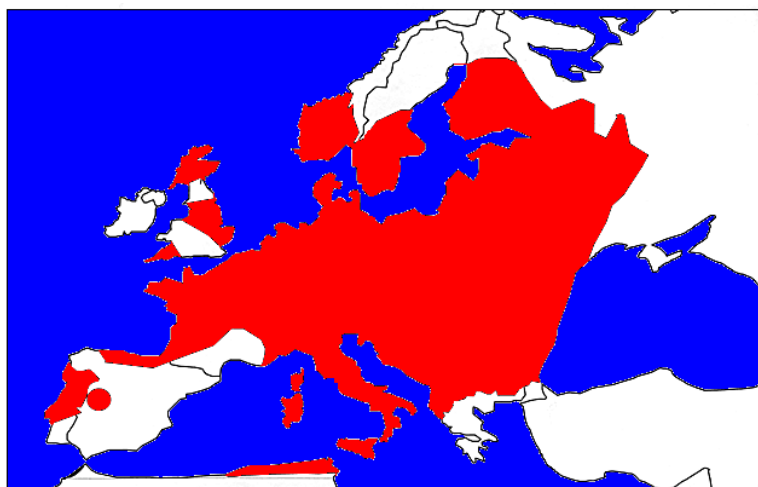
Obr. 1: Klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Převzato z [5].

1.1.1 Výskyt klíštěte obecného

Klíště obecné se vyskytuje v chladných, vlhkých, křovinatých nebo zalesněných oblastech. Preferuje listnaté a smíšené lesy. Hojně se také vyskytuje na loukách, polích, pastvinách s hustou vegetací a daří se mu v těchto oblastech až do 2000 m. n. m [6]. Důležité pro jejich přežití jsou hojné srážky.

Klíště obecné se vyskytuje téměř po celé Evropě, kromě oblastí kolem Středozemního moře, kde je suché a teplé klima (obr. 2). Dále se vyskytuje v severní Africe, Íránu a v oblastech okolo Kaspického moře [7].

Nejvyšší vrchol četnosti výskytu klíšťat nastává koncem jara, ovšem v přírodě se začínají objevovat už na začátku jara. V létě jejich četnost klesá, ukrývají se a jsou méně aktivní. Na začátku podzimu začíná jejich četnost výskytu opět růst a to až do zimních dnů.



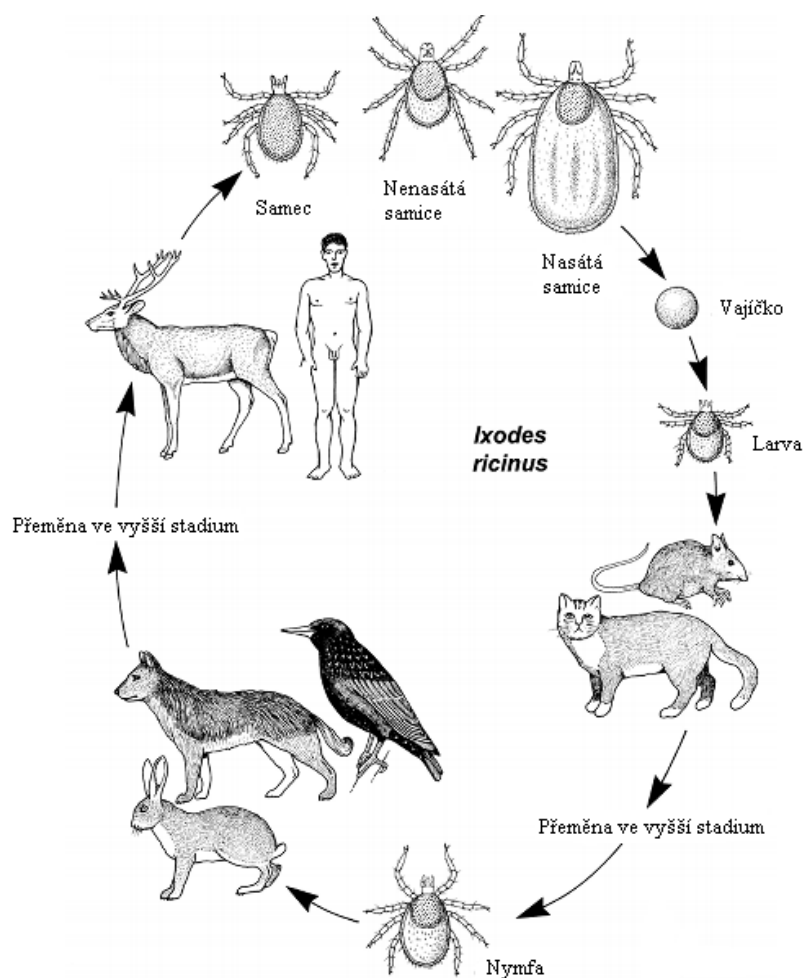
Obr. 2: Výskyt klíštěte obecného. Červeně vyznačené oblasti charakterizují výskyt klíštěte obecného. Upraveno podle [8].

1.1.2 Životní cyklus klíštěte obecného

Klíště potřebuje ke svému životu tři různé hostitele. Celý vývoj klíštěte trvá obvykle tři roky, přičemž jeden dílčí krok trvá okolo jednoho roku. Klíště je schopné přichytit se na hostitele v každém stádiu pouze jednou a po nasátí odpadne.

Nasátá samička dosahuje délky 1,5 cm. Spouští se do půdy, kde přečká 1 měsíc a klade okolo 2000 vajíček. Z vajíček se po 36-ti týdnech nejprve vylíhnou larvy s třemi páry nohou, které cizopasí na drobnějších hlodavcích, jako je králík a zajíc, dále pak na ještěrkách a ptácích. Po nasátí, obvykle v délce sání 3-10 dnů, se mění v další stadium nymfy se čtyřmi páry nohou. Doba přeměny trvá od 3 do 36 měsíců. Nymfy většinou cizopasí na větších obratlovcích a sají krev po dobu 4-7 dnů, poté odpadnou a nastává fáze přeměny. V rozmezí 2-8 měsíců nymfy pohlavně dozrávají a mění se v dospělé jedince, u nichž je rozdělené pohlaví. Po dalším nasátí se mění nymfy v dospělé jedince, které napadají lesní zvěř, psy, domácí kopytníky a člověka. Dospělé samice jsou schopny sát až 2 týdny, zatímco samci se pouze přichytí na hostitele, aby na něm vyhledali samici a spáрили se s ní. Dospělé samičky po nasátí nakladou vajíčka a zpravidla uhynou [9].

Sání je nezbytné pro vývoj klíštěte, neboť krev hostitele slouží jako zdroj energie a přísun živin. Životní cyklus klíštěte je graficky vyjádřen na obr. 3, str. 15.



Obr. 3: Životní cyklus klíštěte obecného. Upraveno podle [9].

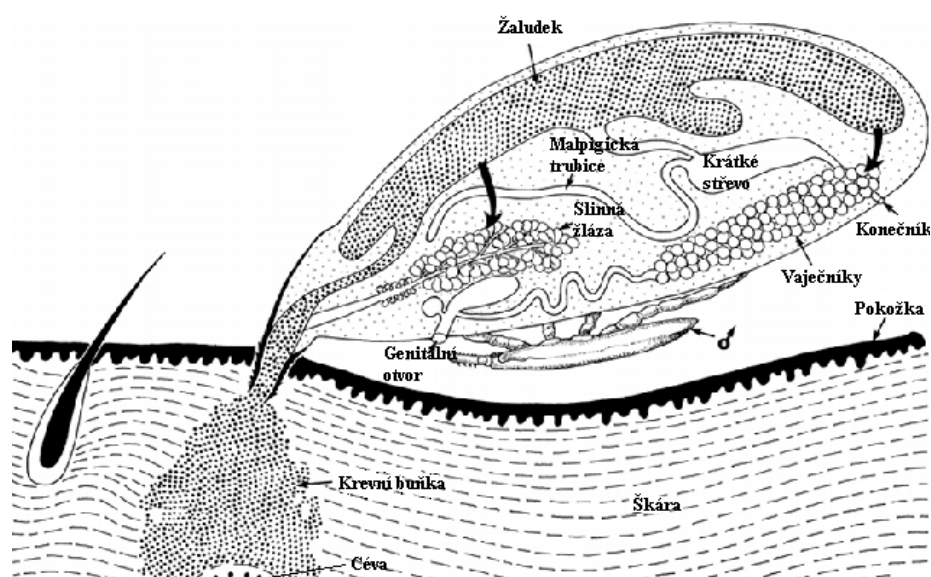
1.1.3 Zaživací trakt samičky klíštěte obecného

Ústní ústrojí klíštěte je tvořeno chelicery a hypostomem (obr. 5, str. 18). Tyto dvě části tvořící gnathosomu neboli hlavovou část klíštěte umožňují ukotvení klíštěte na hostitelské kůži během sání. Chelicery jsou prvním párem příústních končetin klepítkačů. Jsou to pokryté rigidní trubice se dvěma segmenty obklopující hypostom. Hypostom obsahuje zahnuté zoubky, kterými se klíště zanoří do hostitele a umožní jeho fixaci na těle hostitele. U rodu *Ixodidae* se navíc klíšťata upevňují vypuštěním speciální látky zvané cement. Tato látka je produktem slinné žlázy a působí téměř okamžitě. Po vyndání klíštěte z hostitele nezůstává cement v ráně hostitele, ale zůstává přilepený na ústním orgánu klíštěte [9].

Ústní kanálek slouží pro příjem z hostitelské tkáně a průtok slin. Prochází až do hltanu (farynxu), silného sacího orgánu s několika svěracími a rozšiřovacími svaly, které ve spojení s hltanovou záklopkou pohybují hostitelskou tkání až do jícnu. Jícen je

úzká trubice přilehlá k hltanu procházející přes synganglion (centrální nervový systém, mozek) a poté do středního střeva (žaludku). To se skládá z velké hlavní komory, z níž vychází několik slepých výběžků (caecum). Hlavní komora je dostatečně velká, aby mohlo dojít k zahájení trávicího procesu. Střední střevo vyplňuje většinu tělní dutiny klíštěte. Je obklopeno svalovými vlákny, která způsobují peristaltické pohyby. Střední střevo má zcela jednotnou strukturu, stěna se skládá z jedné vrstvy epitelálních buněk spočívající na tenké basální lamině se svalovými vlákny. V epitelu jsou přítomny tři druhy buněk: kmenové, sekreční a trávicí buňky. Povrch epitelálních buněk je pokryt mikroklyky, zatímco vnější plasmatická membrána je zvrásněná až do doby, než klíště začne trávit krev. Krátké střevo připojuje střední střevo k rektálnímu vaku, kde se hromadí výkaly a produkty Malpighických trubic, aby byly vyloučeny konečníkem [9].

Slinná žláza hraje hlavní roli během sání krve a je také důležitá pro rozvoj různých patogenů. Exkrece slin do těla hostitele brání nadměrnému zředování tělní tekutiny klíštěte, k čemuž dochází při sání krve vylučováním nadbytku kapaliny. Slinná žláza je párový orgán, který se skládá z granulárních jader a je rozšířen podél hlavové části a sbíhá do salivaria, který ústí do ústního kanálku. U klíštěte z čeledi *Ixodidae* byly objeveny granulární jaderka typu II-IV, které obsahují sekreční buňky, jejichž produkty vykonávají různé role jako antikoagulační funkci, znečlivující a lytickou funkci. Jaderka typu II jsou schopna zvýšit svojí velikost a sekreční aktivitu během sání a hrají roli v pozdější fázi trávení [6]. Vnitřní stavba těla samičky klíštěte obecného na obr. 4.



Obr. 4: Vnitřní stavba těla samičky klíštěte obecného. Upraveno podle [9].

1.1.4 Příjem potravy a trávení klíštěte

Všechna klíšťata jsou obligatorními ektoparazity savců, ptáků a plazů. Klíšťata s tříhostitelským cyklem preferují v každém vývojovém stadiu jiného hostitele. Larvy a nymfy preferují malé hlodavce, zatímco dospělí jedinci útočí na větší savce.

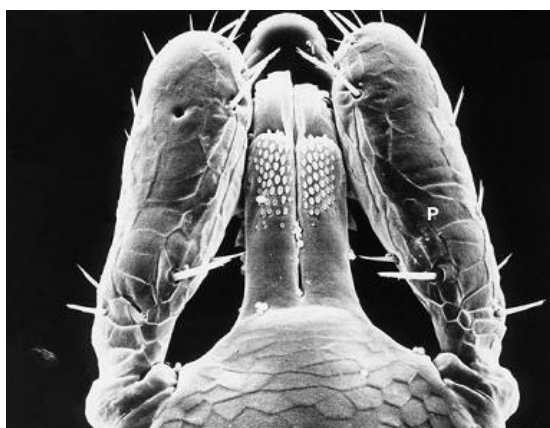
Interakce s hostitelem je zahájena zanořením chelicer (obr. 5, str. 18) do kůže hostitele, čemuž napomáhá lytická složka, která je vylučována slinami klíštěte. Poté vstoupí do rány hypostom (obr. 5, str. 18) a dojde k ukotvení pomocí zpětně zahnutých zoubků, které jsou na vnitřní straně hypostomu. U klíšťat z čeledi *Ixodidae* je ukotvení ještě podpořeno vypuštěním upevňující látky, tzv. cementu do rány, které upevní jak hypostom, tak chelicery. Vylitý cement se obvykle skládá z hlavní části, která je zaklíněná do rány hostitele a z oddělené části, která uzavírá hypostom a chelicery, čímž umožní dokonalé ukotvení. Základem cementu je protein a několik imunogenních proteinů, které byly objeveny i v extraktu slinné žlázy.

Sliny klíštěte mají různé farmakologické efekty. V roce 1898 Sabbatiny objevil antikoagulační vlastnost slin klíštěte. Tato schopnost byla objevena i u jiných klíšťat čeledi *Ixodidae*. Antikoagulant se podařilo izolovat a zjistilo se, že se jedná o protein o molekulové hmotnosti 65000, který inhibuje faktor Xa v proteolytické kaskádě krevního srážení, je produkován 4.-7. den sání a není imunogenní. Už malé množství slin má velký antikoagulační efekt na velký objem krve hostitele. Klíštěcí slinné žlázy mají také efekt na vasodilataci, vaskulární permeabilitu a cytolytickou aktivitu. Klíšťata se během sání snaží eliminovat nadměrné množství vody a iontů, které vylučují prostřednictvím slinných žláz do těla hostitele.

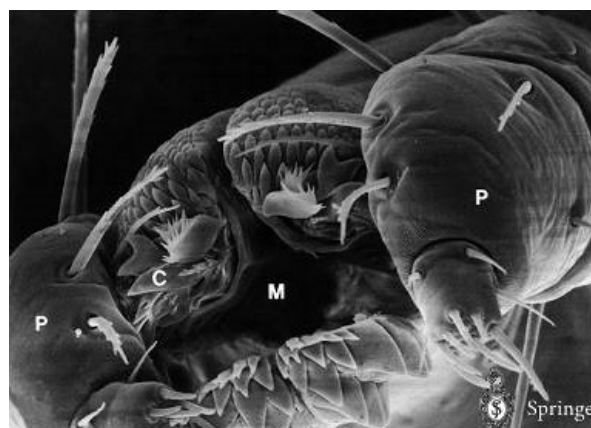
Hostitelská tkáň, hlavně tekutá část, je nasáta hltanovou pumpou a prochází přes jícen do středního střeva, kde probíhá trávení. Krev středním střevem prochází do velké centrální komory, odkud je dále distribuována do slepých výběžků peristaltickým pohybem. Během první fáze trávení klíšťata tráví velmi malé množství krve a mezitím se orgány vyvíjejí a rostou. To trvá zhruba okolo 4-6 dnů. Během této fáze je krev přijímána fagocytózou a pinocytózou do trávicích buněk I. typu, které v této fázi převládají. Získané živiny jsou použity pro stavbu pokožky, která se v následující fázi mnohonásobně zvětší a připravuje se tak na silný přísun krve během a po trávení. Během druhé tzv. expanzní fáze je klíštětem přijímána hlavní část krve po dobu 1-2 dnů. Jakmile tato velká část krve vstoupí do středního střeva, dochází k její hemolýze (tj. popraskání

membrán červených krvinek a uvolnění hemoglobinu) a ve střevě se trávení ujímají trávicí buňky II. typu. Tyto buňky tráví hemoglobin a jiné proteiny pinocytózou. Fagocytóza nebyla u toho typu buněk pozorována. Během expanzní fáze larvy, nymfy a samičky dospělých jedinců enormně zvětšují svůj objem. Samičky jsou schopny zvětšit při sání svůj objem až pětkrát.

A/



B/



Obr. 5: Ústní ústrojí klíštěte obecného. A) Pohled z přední strany larvy *Ixodes ricinus*. B) Pohled na ústa se zuby hypostomu a epistomu. Vysvětlivky: C – chelicera, M – ústa, P – pedipalpy (makadla). Převzato z [9].

1.1.5 Onemocnění přenášená klíštětem obecným

Klíště obecné slouží jako vektor různých onemocnění. Jeho sliny, které se dostávají do rány hostitele, mohou obsahovat různé patogeny způsobující bakteriální, virová a infekční onemocnění [10]. Mezi tato onemocnění patří klíšťová encefalitida, která je virového původu, lymská borelióza způsobená bakterií *Borellia burgdorferi*, tularémie, která je rovněž bakteriálního původu a několik dalších méně častých onemocnění [11].

1.1.5.1 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida byla poprvé popsána rakouským lékařem Schneiderem v roce 1931 [12]. Jedná se o onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) způsobené arbovirem, který patří do čeledi *Flaviviridae* a rodu *Flavivirus*. Tyto RNA viry obsahují jádro a obal tvořený lipidy a dvěma glykoproteiny. Inkubační doba je obvykle 7-14 dní, ale může kolísat až na 28 dní po vstupu viru do rány hostitele [13]. Poté virus putuje do Langerhansových ostrůvků, zde se replikuje virová DNA a putuje do lymfatických

uzlin, kde se pomnoží. Z lymfatických uzlin se virus dostává do krevního oběhu a je roznášen po organismu [14].

V prvním stadiu onemocnění se objevují horečnaté stavy, spojené se vstupem viru do hostitelského organismu. Ve druhém stadiu dochází k rozšíření viru do CNS, kde se virus replikuje a objevuje se zánět, lyze a dysfunkce buněk. Pokročilejší stadium vede k zánětu kloubů a až k meningitidě a meningoencefalitidě [15].

1.1.5.2 Lymská boreliosa

Lymské onemocnění je způsobeno bakterií *B. burgdorferi*. Jedná se o gramnegativní bakterii z kmene spirochét. Tato bakterie byla objevena Willym Burgdorferem v roce 1982. Onemocnění je přenášeno klíšťaty *Ixodes dammini*, *I. pacificus* a *I. ricinus*.

První příznaky onemocnění se projevují zarudnutím kůže v místě kousnutí klíštětem doprovázeným horečkou, bolestí svalů a kloubů, bolestí hlavy a celkovou únavou organismu. Zarudnutí po několika dnech odezní. U některých jedinců se bakterie může šířit skrytě a zarudnutí se vůbec neprojeví. V dalším stadiu se buď imunitní systém vypořádá s bakterií, nebo dojde k jejímu rozšíření. Komplikace, které nastávají v tomto stádiu, jsou lokální lymfadenopatie, v horším případě zánět jater či močového měchýře. Tyto symptomy přetrvávají dočasně a mění se během několika týdnů. U některých pacientů pronikne bakterie do CNS a způsobí zánět mozkových plen, strnutí šíje a obrnu. Po letech neléčení dochází k trvalému poškození kloubů, svalů, imunitního systému a nervů [16].

1.1.5.3 Erlichiosa

Erlichiosa je anemické onemocnění ovcí, dobytka, koček a psů, které se prostřednictvím klíštěte přenáší na člověka. Onemocnění je způsobené bakterií, která patří do čeledi *Anaplasmataceae* a rodů *Ehrlichia* a *Anaplasma*. Bakterie napadají bílé krvinky. Symptomy jsou bolest hlavy, bolest svalů a celková únava organismu. Může dojít k oslabení imunitního systému, což vede ke kvasinkovému onemocnění zvaného moučnivka. Jestliže je zanedbaná léčba, onemocnění se může stát fatálním [8].

1.2 Krevnička střevní (*Schistosoma mansoni*)

Taxonomie krevničky střevní. Převzato z [17]:

Nadříše: Eukaryota (*Eukaryotae*)

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Podříše:	Mnohobuněční (<i>Metazoa</i>)
Kmen:	Ploštěnci (<i>Platyhelminthes</i>)
Podkmen:	Neodermata (<i>Neodermata</i>)
Třída:	Motolice (<i>Trematoda</i>)
Řád:	Strigeidida (<i>Strigeidida</i>)
Čeleď:	Krevničkovití (<i>Schistosomatidae</i>)
Rod:	Krevnička (<i>Schistosoma</i>)
Druh:	Krevnička střevní (<i>Schistosoma mansoni</i>)

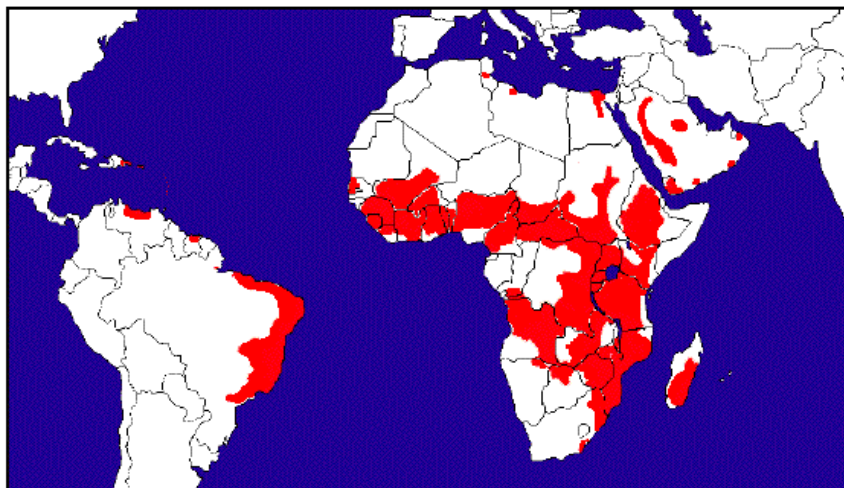
Krevnička střevní se řadí mezi cizopasně červy. Patří do třídy motolic (*Trematoda*), která obsahuje až na výjimky endoparazity obratlovců. Krevnička se liší od ostatních motolic pohlavním dimorfismem. Rozdíl mezi oběma pohlavími krevniček je v jejich velikosti, samička je dlouhá až 2 cm, tenká, plná hemozoinu a žije v rýze samečka v dokonalé kopulaci. Sameček je mnohem mohutnější (obr. 6). Rod krevnička lze rozdělit do dvou vývojových větví zahrnujících savčí a ptačí zástupce. Mezi zástupce rodu, které parazitují na lidech, můžeme zařadit *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* [2].



Obr. 6: Krevnička střevní (*Schistosoma mansoni*). Převzato z [18].

1.2.1 Výskyt krevničky střevní

Krevnička střevní (*S. mansoni*) se vyskytuje v oblastech s tropickým až subtropickým klimatickým pásmem (obr. 7, str. 21). A to především v mnoha zemích Afriky, Jižní Ameriky (Surinam, Venezuela a Brazílie), dále v oblastech Karibiku (Puerto Rico, Dominikánská republika, St. Lucia a další).

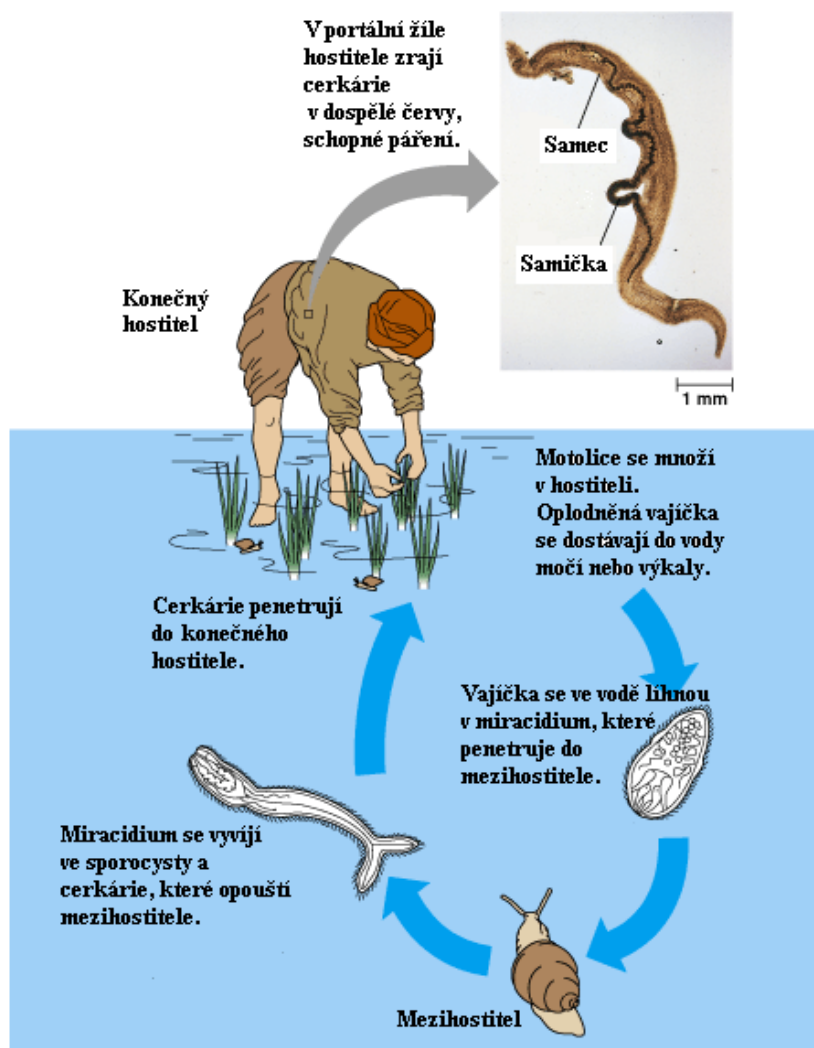


Obr. 7: Výskyt krevničky střevní. Červeně je vyznačen výskyt krevničky střevní. Převzato z [19].

1.2.2 Životní cyklus krevničky střevní

V životním cyklu (obr. 8, str. 22) krevniček se střídá pohlavní rozmnožování v lidském hostiteli a nepohlavní rozmnožování ve vodním plži. V cévách vnitřních orgánů člověka jsou kladena vajíčka, která s výkaly nebo močí opouštějí hostitele a dostávají se do vnějšího prostředí. Nízká hodnota osmotického tlaku vody dává signál, aby se z vajíčka začalo líhnout první larvální stadium miracidium. Miracidium produkuje enzym leucin aminopeptidasu, který napomáhá uvolnění z vajíčka [20]. Larva miracidium je schopna vyhledat na základě chemotaxe svého hostitele, kterým je vodní plž [21]. Po penetraci do vodního plže se miracidium dostává do jeho střeva, kde se vyvíjí ve sporocysty a poté v cercárie. Sporocysty často podléhají přeměně a mění svůj povrch, na němž se objevují mikroklyky [22]. Nemají ústní otvor ani zažívací systém, veškeré živiny absorbují z hostitelské tkáně, se kterou jsou v blízkém kontaktu. Živiny jsou potřebné sporocystám k vývoji embrya, které se může vyvíjet v další generaci sporocyst nebo v cercárie. Cercárie opouštějí mezihostitele a čekají na konečného hostitele, kterým je člověk. Důležitým stimulem pro penetraci do hostitele je lipidový povrch na kůži, zvláště esenciální mastné kyseliny jako je kyselina linoleová a kyselina linolová. Během penetrace cercárie odvrhují ocásek a stávají se netolerantními vůči vodě a mění se v další stadium zvané schistosomula [23]. V lidském organismu schistosomula putuje krevním řečištěm do portální žíly, která je bohatá na živiny, a zde se usídluje. Po třech týdnech se mladí červi vyvinou v dospělé jedince. Začne proces párování, kdy samička osídluje

rýhu samečka a společně putují do střeva, kde je zahájena produkce vajíček. Dospělí jedinci jsou schopni žít až 30 let [24].



Obr. 8: Životní cyklus krevničky střevní. Upraveno podle [25].

1.2.3 Zaživací ústrojí krevničky střevní

Zdrojem živin krevniček je hemoglobin. Krevnička střevní obývá žílu hepatoportálního systému a je zanořena v krevní tekutině. Zaživací systém krevniček nemá hltan a ani jícn [26].

Střevo krevniček nemá žádné žlázy, ale obsahuje gastrodermální buňky, které jsou schopny sekretovat trávicí enzymy, mezi něž patří: proteasy, dipeptidasy, aminopeptidasy, lipasy, kyselá fosfatasa a esterasa [27]. Krevničky mohou absorbovat malé molekuly,

aminokyseliny a sacharidy přes jejich pokožku [28,29]. Absorbce probíhá prostou difuzí a transportním systémem [30,31].

1.2.4 Klinické příznaky a patogeneze

Krevnička střešní je původcem onemocnění zvaného schistosomóza [30] nebo také bilharzióza [32]. Jedná se o druhé nejzávažnější tropické parazitární onemocnění po malárii.

Klinické příznaky a patogeneze jsou dány délkou trvání infekce, závisí na zdravotním stavu postiženého. Po průniku cercárií do hostitele se může po 24 hodinách objevit v místě vstupu zarudnutí, které zpravidla do dvou dnů mizí. Akutní fáze nastává 3-10 týdnů po infekci a projevuje se horečnatým onemocněním, kašlem, bolestí břicha a průjmem. Po nástupu chronické fáze dochází k maximální produkci vajíček, jež jsou hlavním patogením agens. Právě vajíčka jsou kladena do různých orgánů podle toho o jaký druh rodu *Schistosoma* se jedná.

U krevničky střešní jsou vajíčka kladena v oblasti tenkého střeva. Jakmile proniknou střešní stěnou a odumřou, dochází k jejich kalcifikaci, čímž způsobují fibrózu střev. To je spojeno s dalšími příznaky jako bolest břicha, krvácivý průjem, bolest hlavy. V pokročilém stádiu dochází k hromadění vody v těle (obr. 9), objevuje se rakovina tlustého střeva, cirhóza jater, portální hypertenze a poranění centrální nervové soustavy. Onemocnění je fatální.

V současné době jsou k dispozici tři léky: praziquantel, oxamniquin a metrifonát [1], ale objevuje se rezistence.

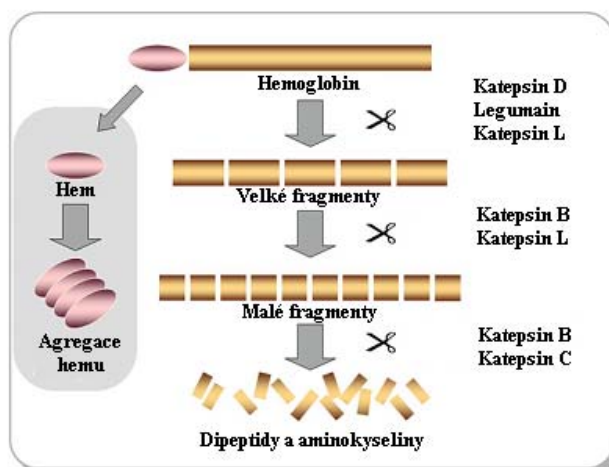


Obr. 9: 16-ti letý chlapec infikovaný *S. mansoni*. Převzato z [33].

1.3 Hemoglobin jako hlavní zdroj živin klíšťat a krevniček

Obživa klíštěte rodu *Ixodides* a krevničky rodu *Schistosoma* je zajištěna příjmem hemoglobinu z krve hostitele. Hemoglobin je uvolněn hemolýzou z červených krvinek a u klíšťat tráven po fagocytóze a pinocytóze. U krevniček probíhá trávení ve slepém střevě, jehož buňky jsou schopny sekretovat trávicí enzymy. Hemoglobin je u obou organismů tráven obdobnou kaskádou trávicích proteas (obr. 10), která zahrnuje endopeptidasy a exopeptidasy, které ho rozkládají až na jednotlivé aminokyseliny.

Štěpení hemoglobinu je zahájeno třemi endopeptidasami, katepsinem D, katepsinem L a legumainem, z nichž je nejvíce účinný katepsin D. Co se týče stupně fragmentace, tak nejméně účinný je legumain. Společným působením těchto tří proteas dojde ke kompletnímu rozštěpení hemoglobinu na velké fragmenty. Proteasy rodiny papainu, jako katepsin B a katepsin C hrají hlavní roli v další fázi degradace hemoglobinu, která zahrnuje štěpení velkých fragmentů až na dipeptidy. Katepsin B má dvě funkce, jednak působí jako endopeptidasa a jednak jako peptidyldipeptidasa (odštěpuje dipeptidy z C-konce peptidů/proteinů). Katepsin C je charakterizován jako dipeptidylaminopeptidasa, která odštěpuje dipeptidy od N-konce peptidů/proteinů. Mono-peptidasy, zahrnující serinové karboxypeptidasy a metalopeptidasy leucinaminopeptidasy, mohou participovat na uvolňování volných aminokyselin. Aby došlo ke kompletní degradaci hemoglobinu, je zapotřebí koordinované součinnosti všech vyjmenovaných proteas, takže proteasy zde fungují v proteolytické kaskádě [34].



Obr. 10: Degradace hemoglobinu. Hemoglobin je nejprve štěpen endopeptidasami katepsinem D, L a legumainem na velké fragmenty. Následuje štěpení na malé peptidy, dipeptidy až jednotlivé aminokyseliny pomocí exopeptidas katepsinu C a B. Převzato z [34].

1.4 Klasifikace proteas

Proteasy, někdy též označovány peptidasy, štěpí peptidové vazby proteinů/peptidů. Hrají důležitou roli ve všech fyziologických procesech, které zahrnují zrání a aktivaci proteinů nebo jejich degradaci (proteolýza). Proteasy jsou hierarchicky uspořádány do rodin a klanů. Rodiny se dělí na základě homologie jejich aminokyselinové sekvence a vyšším uspořádáním je klan, který tvoří rodiny na základě podobných strukturních segmentů. Proteasy jsou dále děleny podle jejich katalytického mechanismu na aspartátové, serinové, threoninové a cysteinové proteasy a metaloproteasy [35].

Podle místa štěpení se proteasy dělí na exopeptidasy a endopeptidasy, přičemž exopeptidasy štěpí substrát od N-konce (aminopeptidasy) nebo od C-konce (karboxypeptidasy), endopeptidasy štěpí substrát uprostřed řetězce.

1.5 Třída aspartátových proteas

Aspartátové proteasy (EC 3.4.23.X) jsou charakterizovány přítomností dvou katalytických aspartátových zbytků. Dalším znakem je typická terciární struktura, nízké pH optimum a jejich schopnost štěpit mezi hydrofobními aminokyselinami. Aspartátové proteasy jsou inhibovány mikrobiálním peptidem, pepstatinem, který byl poprvé izolován ze *Streptomyces* [36,37].

Aspartátové proteasy tvoří třídu A obsahující 7 klanů a 14 rodin a jsou přítomny v obratlovcích, houbách, rostlinách, prvocích a virech [38,39,40]. Savčí aspartátové proteasy jsou klasifikovány do dvou klanů, AA a AD, základním rozdílem, mezi těmito klany je terciární struktura. Klan AA je rozdělen do dvou hlavních rodin pepsinu (A1) a retropepsinu (A2). Rodina pepsinu zahrnuje např. intenzivně studované enzymy pepsin, gastrin, rennin, katepsin D a katepsin E, plasmepsin a histo-aspartátovou proteasu. Rodina retropepsinu zahrnuje např. HIV retropepsin [38]. Presenilin reprezentující klan AD tvoří katalytické jádro gama sekretasového komplexu a hraje roli v intramembránové proteolýze, při níž je štěpen transmembránový amyloidový prekurzorový protein [41].

Aspartátové proteasy katalyzují hydrolyzu peptidové vazby v mnoha biologických procesech. Aspartátové proteasy fungující v trávicím systému savců jako chymosin jsou využívány v potravinářském průmyslu např. při fermentaci, při výrobě sýrů [42,43,44,45,46,47]. Retrovirus HIV zodpovědný za rozvoj onemocnění AIDS obsahuje aspartátovou proteasu, která je cílovým enzymem pro chemoterapii pomocí proteasových

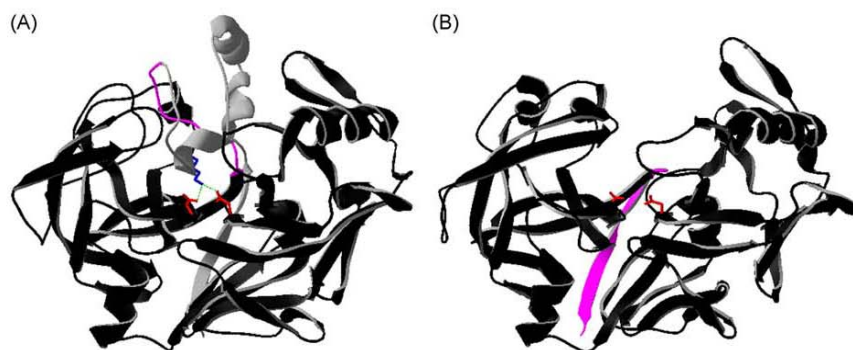
inhibitorů. Dále se endogenní lidské aspartátové proteasy stávají cílem terapie několika významných patologických stavů. Například pepsin hraje roli v peptickém vředu [48], který vzniká překyselením žaludku, při němž dochází k narušení žaludeční sliznice v důsledku nadměrné produkce kyseliny chlorovodíkové. Nadměrná produkce reninu vede k hypertenzi [49], plasmepsin, který je produkován parazitem *Plasmodium*, hraje roli v přenosu malárie [50], katepsin D v metastázích rakoviny [51], katepsin E v imunitním systému [52]. Dále jsou aspartátové proteasy důležité při tvorbě beta amyloidových plaků, které vznikají při Alzheimerově chorobě [53,54,55].

1.5.1 Aspartátové proteasy rodiny pepsinu

Proteasy, které patří do rodiny pepsinu, jsou eukaryotické endopeptidasy. Modelová proteasa pepsin, jež je hlavní proteasou gastrointestinárního traktu, je přírodně syntetizován v žaludeční sliznici obratlovců. Pepsin a všechny aspartátové proteasy obratlovců a hub této rodiny jsou syntetizovány jako zymogeny v neutrálním pH. Zymogen, neaktivní prekurzor aktivních enzymů, je přeměněn na aktivní enzym buď auto-katalytickou proteolýzou v kyselém pH nebo asistovanou proteolýzou jinou proteasou, během které dojde k odštěpení tzv. propeptidu (aktivačního peptidu) na N-konci peptidového řetězce zymogenu [56,57]. V případě pepsinu se z neaktivního prekurzoru pepsinogenu stává aktivní pepsin aktivací pod pH 4,0.

Důležitou roli ve stabilizaci molekuly proenzymu pepsinogenu hrají elektrostatické, vodíkové a hydrofobní interakce. Elektrostatické interakce jsou konzervované v krystalových strukturách prasečího pepsinogenu a týkají se interakcí mezi Arg13p a Asp11 a mezi Lys36p a Asp32/Asp215 [58]. Lys36p a Tyr37p jsou důležité pro stabilitu zymogenu v neutrálním pH [59,60]. Při nízkém pH dochází k protonaci těchto aminokyselin a k jejich odpuzování, což způsobí změnu konformace propeptidu a následně jeho odštěpení. Lys36p je ve vysoce konzervované oblasti zymogenu všech obratlovců [61]. Změna ve struktuře pepsinu po aktivaci je znázorněna na obr. 11, str. 27.

Zatímco aktivace probíhá v kyselém pH, tak při pH vyšším než 6,0 pepsin stejně jako většina proteas této rodiny podléhá ireversibilní denaturaci [42,62].



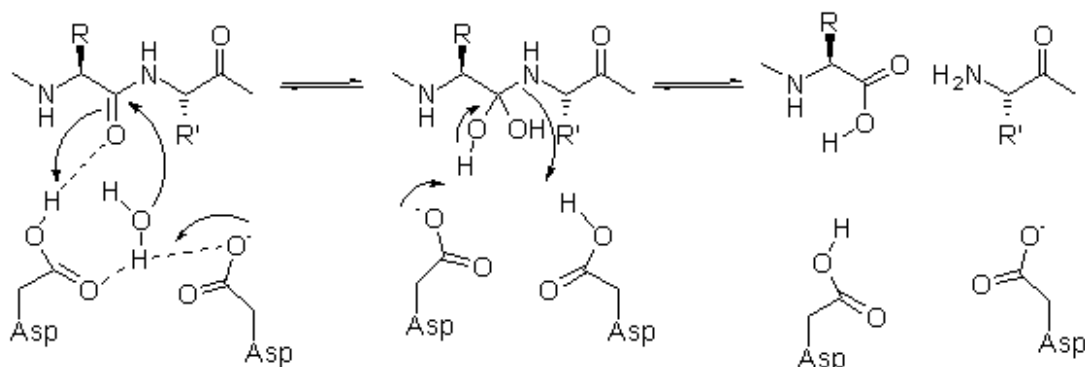
Obr. 11: **A)** Struktura prasečího pepsinogenu (PDB kód: 2PSG). **B)** Struktura prasečího pepsinu (PDB kód: 3PEP). Šedivě je znázorněn propeptid, který uzavírá aktivní místo v pepsinogenu s aminokyselinovým zbytkem Lys36p (modře). Lys36p vytváří vodíkové vazby (zeleně) s katalytickými zbytky Asp32 a Asp215 (červeně). Po odštěpení propeptidu podléhá pepsin konformačním změnám, N-konec (růžově) změní svojí polohu o 40 Å. Převzato z [55].

1.5.1.1 Struktura aspartátových proteas rodiny pepsinu

Aspartátové proteasy rodiny pepsinu jsou kovalentními heterodimery. Podjednotky se označují N-koncová a C-koncová a obě jsou si velmi podobné. Katalytické místo se nachází mezi těmito podjednotkami a každá z nich obsahuje jeden Asp zbytek. Sekvence propeptidu aspartátových proteas je dlouhá zhruba 50 aminokyselin, které jsou bohaté na bazické aminokyseliny [56,58], výjimkou jsou plasmepsiny, jejichž sekvence propeptidu jsou delší o 120 aminokyselinových zbytků [63]. Zralý protein obsahuje 300–400 aminokyselin. Typickým příkladem je prasečí pepsinogen, má hmotnost 40 kDa a skládá se z propeptidu o velikosti 44 aminokyselinových zbytků, které jsou bohaté na bazické zbytky, a z 326 zbytků, které tvoří aktivní enzym obsahující převážně kyselé zbytky. Katalytické aspartátové zbytky jsou v pozicích Asp32 a Asp215 [42,64,65].

1.5.1.2 Katalytický mechanismus aspartátových proteas

Mechanismus aspartátových proteas je založen na acidobazické katalýze (obr. 12, str. 28), které se účastní dva aspartátové zbytky v aktivním místě, přičemž jeden aspartátový zbytek se chová jako kyselina a druhý jako báze, to je dáno rozdílnou hodnotou pKa obou Asp zbytků. Důležitou roli hraje molekula vody, která se váže mezi tyto dva katalytické Asp zbytky. Molekula vody přítomná jako nukleofil atakuje karbonyl peptidové vazby a vazba je tak rozštěpena [66].



Obr. 12: Katalytický mechanismus aspartátových proteas. Katalytické Asp vážou molekulu vody [66], která nukleofilně atakuje uhlík karbonylové skupiny štěpené peptidové vazby a ponechává mu hydroxyl, vzniká tak nová karboxylová skupina. Zbylý vodík z molekuly vody je součástí nově vytvořené aminoskupiny. Převzato z [67].

1.5.1.3 Substrátová specifita aspartátových proteas

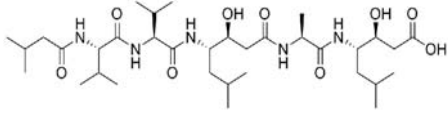
Aspartátové proteasy rodiny pepsinu štěpí vazby mezi hydrofobními aminokyselinami, zejména: Phe, Ala, Leu, Tyr [68]. Jedná se o endopeptidasy, které jsou schopné interagovat s aminokyselinovými zbytky substrátu po obou stranách štěpené vazby [69]. Na základě výsledků sekvenčních analýz štěpů pepsinovými proteasami, byl vytvořen heptapeptid, jež je využíván jako substrát aspartátových proteas a jehož sekvence je následující: Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Val-Leu [70]. Aby bylo možné sledovat štěpení tohoto substrátu spektrofotometricky, byl v substrátu fenylalanin vázající se do pozice P1' nahrazen p-nitrofenylalaninem (Nph). Fragmentace substrátu je pak spojena s poklesem absorbance při 305 nm. Substrát byl dále optimalizován záměnou některých aminokyselin za hydrofobnější. Výsledkem je oktapeptid o sekvenci Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu, který je používán jako substrát pro většinu aspartátových proteas [70].

1.5.1.4 Inhibitory aspartátových proteas

Specifickým inhibitorem všech aspartátových proteas rodiny pepsinu je pepstatin [71]. Jedná se o hexapeptid, který obsahuje aminokyselinu statin (Sta). Tento hexapeptid byl poprvé izolován z bakterií rodu *Actinomyces* a sekvence je následující: Ile-Val-Val-Sta-Ala-Sta. Byl prokázán inhibiční účinek v pikomolárních množstvích a využívá se rovněž jako ligand při afinitních chromatografiích [72] a pro titraci [73]. Součástí statinu, jehož struktura je ((3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanová kyselina 2, Sta), jsou hydroxylové skupiny, které právě interagují s hydroxyly karboxylových skupin

aspartátů, jež jsou v aktivním místě a vytěsňují molekulu vody, která je zapojena do katalytického mechanismu [74]. Další přirozené inhibitory jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2: Přehled přirozených inhibitorů aspartátových proteas.

Název	Zdroj	Struktura
Pepstatin [71]	bakterie (<i>Actinomyces</i>)	 Ile-Val-Val-Sta-Ala-Sta
IA-3 [75]	kvasinka (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	-helikální polypeptid s 68 AMK
PDI (potato cathepsin D inhibitor) [76]	brambor (<i>Solanum tuberosum</i>)	glykoprotein se 188 AMK
PI-3 (pepsin inhibitor 3) [77]	hlístice (<i>Ascaris suum</i>)	protein se 149 AMK
SQAPI (squash aspartic proteinase inhibitor) [78]	dýně (<i>Cucurbita maxima</i>)	polypeptid s 96 AMK
Equistatin [79]	mořská sasanka (<i>Actinia equina</i>)	protein 21,7 kDa

1.5.2 Aspartátové proteasy typu katepsinu D

Katepsin D je exprimován ve všech savčích buňkách a je majoritním proteolytickým enzymem v lysozomech, fagozomech a pozdních endozomech [80,81]. Patří do rodiny pepsinu, je syntetizován v neutrálním pH jako neaktivní zymogen. Syntéza probíhá na ribozomech drsného endoplasmatického retikula. Zymogen je aktivován dvěma mechanismy [82,83,84,85,86]: v kyselém pH propeptid ztrácí schopnost interakce s enzymem a autokatalytickým štěpením mezi zbytky Leu26p a Ile27p se uvolňuje počátečních 26 aminokyselin propeptidu a vzniká intermediát tzv. pseudokatepsin D. Pro kompletní odstranění propeptidu je nutné proteolytické působení jiného enzymu, kterým je pravděpodobně některá lysozomální cysteinová proteasa.

Katepsin D je známý jako lysozomální aspartátová proteasa, která se účastní přeměny buněčných proteinů, selektivního procesování MHC II antigenu, hormonů a růstových faktorů. Katepsin D je nezávislý marker prognózy léčby při rakovině prsu [89]. Silná exprese a sekrece katepsinu D ve formě zymogenu je spojena s progresivním

rozvojem rakoviny prsu a prostaty. Katepsin D je také důležitým mediátorem zahájení apoptosy v cytosolu rakovinných buněk [87].

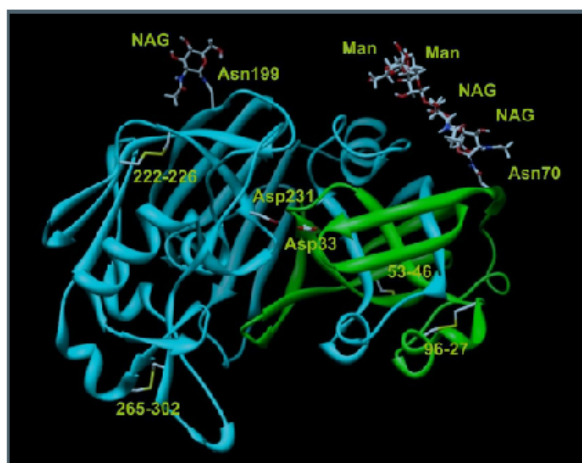
1.5.2.1 Substrátová specifita katepsinu D

pH optimum katepsinu D je mezi 3,5 a 5,0. Katepsin D preferuje štěpení vazeb substrátu mezi hydrofobními aminokyselinovými zbytky v pozicích P1 a P1' [88]. Substrát je vázán do aktivního místa katepsinu D o délce 8 aminokyselinových zbytků. Katepsin D se liší od řady aspartátových proteas tím, že preferuje substráty s Leu nebo Glu v pozici P2. Ostatní aspartátové proteasy mají v této pozici širokou specifitu [89].

1.5.2.2 Struktura katepsinu D

Aminokyselinové sekvence savčích katepsinů D jsou mezi jednotlivými druhy vysoce konzervované, přičemž nejvíce je podobný pepsinu, s nímž má 47% identitu.

Struktura katepsinu D (obr. 13) obsahuje dvě strukturální domény. N-koncový lehký řetězec s hmotností 14 kDa a C-koncový těžký řetězec s hmotností 38 kDa [90]. Ve struktuře katepsinu D jsou obsaženy dva fosforylované N-vázané oligosacharidy, které hrají roli v transportu zymogenu do lysosomu [91], tím se liší od sekretovaných aspartátových proteas rodiny pepsinu.



Obr. 13: Struktura lidského katepsinu D při pH 5,1 (PDB kód 1LYA). Struktura obsahuje dvě domény, tzv. těžký řetězec, který je na C-konci (modře) a tzv. lehký řetězec, který je na N-konci (zeleně). Cysteinové můstky jsou vyznačeny žlutě, čísla značí, o jaké spojené cysteiny se jedná. Struktura obsahuje dva N-vázané oligosacharidy, Man - mannosu, NAG - N-acetylglukosamin. Vyznačeny jsou i dva katalytické aspartátové zbytky.

1.5.3 Aspartátové proteasy klíšťat

U klíšťat rodu *Ixodes* hrají aspartátové proteasy klíčovou roli v proteolýze hemoglobinu [92,93] a v degradaci vitelinu [94]. Trávicí aspartátové proteasy jsou předmětem intenzivního studia jako možný vakcinační antigen pro regulaci sání klíšťat, příkladem je longepsin z tvrdého klíštěte *Haemaphysalis longicornis* a *Ixodes ricinus* [92,104]. U tvrdých klíšťat byla objevena aspartátová proteasa nazývaná BYC („Boophilus yolk pro-cathepsin“), která hraje hlavní roli v degradaci vitelinu, hlavního žloutkového proteinu klíštěcích vajíček, během embryogeneze [95]. Do stejné skupiny aspartátových proteas, které degradují vitelin, patří aspartátová proteasa THAP, („tick heme-binding aspartic protease“), která může vázat hem a tím regulovat degradaci vitelinu [92]. Funkční analýza těchto aspartátových proteas je nezbytná pro vývoj veterinárních vakcín umožňujících zastavení embryogeneze a redukci populace klíšťat [96].

Vitelin je hlavní složkou vajíček všech členovců [97]. Vývoj vajíček (oogeneze) klíšťat začíná v době sání. Tento proces, kterým dochází k růstu oocyty a akumulaci žloutku, jako energetické zásoby, se nazývá vitelogeneze. V této fázi je také produkován vitelogenin, který je transportován do mateřské hemolymfy a potom akumulován v oocytech jako vitelin [98]. Po vitelogenezi a oplodnění vajíček je právě BYC a THAP důležitý, neboť štěpením vitelinu vznikají aminokyseliny, které slouží jako zdroj pro rozvoj embrya [99]. Na degradaci vitelinu se podílí ještě další proteolytické enzymy, zejména cysteinové proteasy [100,101,102,103].

1.5.3.1 Katepsin D klíštěte obecného

V extraktu střevní tkáně klíštěte obecného byla identifikována aktivita katepsinu D IrKatD a byla z něho izolována cDNA. Signální sekvenci tvoří 21 aminokyselinových zbytků. Molekulární hmotnost proenzymu je 39,5 kDa a izoelektrický bod proteinu je 4,75. V proenzymu jsou přítomny 2 potenciální N-glykosylační místa. IrKatD o velikosti 322 aminokyselinových zbytků je kódován 1304 páry bazí dlouhé cDNA sekvence. V aktivním místě jsou přítomny dva aspartátové zbytky v poloze 79 a 270 [93].

IrKatD hraje klíčovou roli v počáteční fázi degradace hemoglobinu, při níž je hemoglobin štěpen na velké fragmenty [104]. Velké fragmenty jsou dále štěpeny ostatními endopeptidasami na menší fragmenty, dipeptidy a aminokyseliny.

1.5.3.2 Aspartátová proteasa z *Haemaphysalis longicornis*

cDNA izolovaná ze středního střeva *Haemaphysalis longicornis* kóduje aspartátovou proteasu zvanou longepsin. cDNA obsahuje 11769 párů bazí a kóduje 392 aminokyselinových zbytků o molekulové hmotnosti 39,3 kDa. cDNA má signální peptidovou sekvenci a v aktivním místě má dva aspartátové zbytky, které jsou typické pro aspartátové proteasy. cDNA longepsinu je z 44% podobná DNA katepsinu D ze *S. mansoni*. Tento protein má 5 N-vázaných glykosylačních míst [92]. Porovnání homologie sekvence IrKatD s longepsinem na obr. 14, str. 34.

Longepsin hraje důležitou roli ve fyziologii klíšťat [92,105]. Longepsin je exprimován v hladových klíšťatech a exprese je zvýšena během příjmu krve hostitele, kdy pravděpodobně hraje roli při trávení hemoglobinu. Dále byla objevena další funkce longepsinu a to, že je exprimován ve slinné žláze a během sání je sekretován do hostitele jako antigen. Longepsin se tedy může stát vhodným kandidátem pro vývoj vakcín.

1.5.3.3 Aspartátová proteasa typu BYC

BYC („Boophilus Yolk pro-Cathepsin“) byl izolován z vajíček klíšťat (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). Tento protein se účastní degradace vitelinu, hlavního žloutkového proteinu během embryogeneze. BYC je lokalizován ve vitelinových granulích v oocytech a je obklopen žloutkovým proteinem [103].

Veškeré živiny pro vývoj embrya jsou sbaleny ve vajíčkách ve formě žloutkových granulí [100,106]. Tyto velké lysosomální orgány jsou plné žloutkového proteinu vitelinu. Vitelin je fosfolipoglykoprotein odvozený od mateřského prekursoru nazývaného vitelogenin. Vitelogenin je sekretován do hemolymfy a odtud vstupuje do oocytu pomocí receptoru zprostředkujícího endocytózu [96,106]. K aktivaci BYC dochází v kyselém pH při embryogenezi [107]. Ve čtyřech dnech starém vajíčku bylo pozorováno nižší pH, což bylo spojeno se zvýšenou aktivitou ATP dependentní protonové pumpy. Aktivovaný BYC zahajuje následné štěpení vitelinu [108,109].

Sekvence BYC kóduje protein o 375 aminokyselinách a velikost se pohybuje okolo 54 kDa [120]. BYC má vysokou sekvenci identitu (okolo 35%) s ostatními aspartátovými proteasami členovců a aspartátovou proteasou ze *S. mansoni*. Ze savčích aspartátových proteas je patrná homologie s reninem.

Charakteristickým znakem této aspartátové proteasy je přítomnost pouze jednoho aspartátového zbytku v katalytickém místě. Je známo, že reakční mechanismus aspartátových proteas, jež mají konzervované dva Asp zbytky musí vázat molekulu vody, aby došlo k hydrolýze peptidové vazby substrátu. Detailní katalytické schéma u BYC je zatím neznámé a pravděpodobně je založeno na jednom aspartátovém zbytku a zbytku serinu, který je umístěn v pozici u druhého chybějícího aspartátu [110]. Porovnání homologie sekvence BYC s IrKatD na obr. 14, str. 34.

1.5.3.4 Aspartátová proteasa typu THAP

THAP (Tick Heme-binding Aspartic Proteases) je dalším z typů aspartátových endopeptidas těžkých klíšťat vyskytujících se ve vajíčkách klíštěte (*Boophilus microplus*). Jeho hlavní funkcí je degradace vitelinu. THAP je hlavně přítomen v tukovém tělese, středním střevu a vaječnících (ve vitelinových granulích) [111].

THAP se vyskytuje ve formě proenzymu a aktivního enzymu. Během časně fáze vitelogeneze je aktivována jenom malá část tohoto proteinu, zbývající je aktivována během pozdějšího embryonálního vývoje, cca po 3 dnech. Tato celková aktivace nastává v důsledku okyselení během embryogeneze [112]. Aktivním THAP je během embryogeneze degradováno až 40% vitelinu a jedná se o vysoce kontrolovaný proces.

Experimentálně bylo prokázáno, že degradace vitelinu prostřednictvím THAP je regulována hemem [113], neboť THAP má kromě aktivního místa ještě vazebné místo pro hem, které zvyšuje aktivitu THAP k hemoproteinům jako je vitelin. Hem uvolněný z vitelinu zároveň funguje jako inhibitor THAP. Touto zpětnou vazbou je regulována degradace vitelinu [114] tak, aby se zamezilo akumulaci volného hemu [95], který je cytotoxický. THAP proteasa by jakožto regulátor degradace vitelinu mohla sloužit jako vhodný kandidát pro vývoj vakcín [113]. Porovnání homologie sekvence THAP s IrKatD na obr. 14, str. 34.

IrKatD	MRCSTLTLTLVLLAAECAFGAFRIPLTRFKSVRKQLAEEGIYIHE-----GPY	49
longepsin	-MTSTLSAIIIVLLALVGVASSALLRVPLKRVQSARNQLREVGTVLNVTHGWSLGNALGGPF	59
THAP	-----EFALQLGWHDPNVTEIR--GRALGD-----PI	25
BYC	-----RKDRII MSNLFHS SSEEVG-----	19
	: . . ::	
IrKatD	PEPLVNLLDVEYYGPISIGTPPQDFQVIFDTGSANLWLPSSKC--TTKYCLHHHRYDSSK	107
longepsin	PEPLKNYLDAQYYGDVTLGTPPQVFRVFDTGSSNLWVPSKCPFTNIACMLHHKYNSKK	119
THAP	PIILTNYNMQFYGIITIGTPPQSFKLLMDTGSSNFWVPSINCD-QSMACRDHAKYDSSK	84
BYC	QTIPLNYTQLQYFGNITIGTPPQTFRVIFDTASNLTWVPSVGCSS--VEQCQDRPLYDNRH	77
	* : ::** ::***** *:::** * *::** * * : *:: :	
IrKatD	SSTYEADGRNFTIVYGGG-NVEGFISKDVCRI GSAKVSQGPLGEALVVGESLLEAPFDG	166
longepsin	SSTYAKNGTQFEIRYGGG-SVKGELSTDVFLGDIRLQQTFAEILRESGLAFIAAKFDG	178
THAP	SSTFTKSGRYIRIRYSGG-VVRGITSIDNVGVGPATVTQYKFAEMDHS DGKLF RNAKYDG	143
BYC	SSTYGAYGIWVTAPYIGGGAITGTAAYETIT IAGINVTNQLFVEATVIDPKIYNGVQFDG	137
	***: * . * * : * : : : : : * . . : **	
IrKatD	ILGLAYPSIAVDGVVVPVFDNMKQGLLGEQNVFSVYLNDRPSSKEGGEVLFVGGIDHDHYK	226
longepsin	ILGLGYPQISVLNVPVFDNMVAQGVAPKP-VFSVYLDNRNASDPNGGEVLFVGGIDEAHYT	237
THAP	IFGLAFPSISQNNQLPLFDAMVKQGVVQA-VFSLYLSKQFSEQNGGEIYFGGINAQRYT	202
BYC	SIGLSIESLYLSQHWSIFDNMFINHLLPEP-VFAFYFHP TVNGSDG-ELILGGIEKSHYE	195
	: ** . : . : ** * : : : *::** : : * * : ***: : *	
IrKatD	GSITYVPVTAAGYVQFHVGVKSVSASKSAPELLCKDGC EAIADTGTSLITGPPPEEVDSL	286
longepsin	GNITYVPVTRKGYVQFHMNGVKVGDNAT-----FCNGGCAA IADTGTSLIAGPTEEIHKL	292
THAP	GAIHYVPVQA AHVQVMDNIN-VQGT-----LCVGGCPTVVD SGTSFSLGFSADVETL	256
BYC	GELTYT-QSATDEWLIRLQGVKVMRWL-----QTEYIYAKPVSTLPYIYGEQSQIDSI	248
	* : * . : * . : : : : : . : ** : : :	
IrKatD	NQYLGGTKTEGGQYLLDCDKLES LPNVFTLISGKEFSLRSKDYVLKVNQQ-GOTLCVSGF	345
longepsin	NVAIGAAPFMAGEYIVSCKSIPTLPKINFNLNGNEFVLEKDYVLQVSA-GIPLCLSGF	351
THAP	NRVIGATKTAAGYFEVNCATISSLPPIITFNLNGKSFPLQGEAYTIRIPLTTGGEQCFTRI	316
BYC	NKALNASKTSGDEYTVDCSNITALPIISIKLSGKNFDLRPDYIVEVNSX-----CYSGF	303
	* : . : . . : : * : : ** : : : * . : : * : :	
IrKatD	MSLEMPQ----PLWIFGDVFLGPPYPIFDR----DQDRVGF AEVA----	382
longepsin	IGLDVPAPL-GPLWILGDVFIGRYTIFDR----GNDRVGF AFSR----	391
THAP	SESDASG---TNLWILGAVFTQTYTTFDR----AQRVGFATAV----	354
BYC	VVDEHQQP GASTWLLQNF LRRVYTI FKTGIFLWDKQLAFAYTRPIVY	352
	: *::** * *::** : : : **	

Obr. 14: Porovnání homologie sekvence katepsinu D z *I. ricinus* (IrKatD) s longepsinem z *Haemaphysalis longicorni*, THAP z *Boophilus microplus* a BYC z *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Signální sekvence u THAP a BYC není uvedena, protože není v databázi k dispozici. Šedou barvou jsou vyznačeny aminokyseliny, jejichž sekvence se shodují s IrKatD. Vysvětlivky: * poloha s identickými aminokyselinami, / . poloha s aminokyselinami s významnou/méně významnou podobností, - delece v sekvenci.

1.5.4 Aspartátové proteasy krevničky střevní

Krevnička střevní, *Schistosoma mansoni*, exprimuje v dospělém stádiu dvě formy katepsinu D. Jedna forma katepsinu se skládá z krátké signální sekvence, propeptidu o 37 aminokyselinových zbytcích a zralého peptidu o 377 aminokyselinových zbytcích, který je vysoce homologní se savčím katepsinem D. Druhá forma katepsinu D se liší tím, že je ve struktuře ještě přítomna C-koncová doména o délce 43 aminokyselinových zbytků

[115]. Obě dvě formy vykazují z 84% sekvenční homologii s katepsinem D ze *S. japonicum*, která rovněž exprimuje dvě formy této proteasy.

Aspartátové proteasy s C-koncovou doménou jsou známy i u jiných parazitů, jako například *Ancylostoma canium* [116] a *Eimeria acervulina* [117]. Tyto enzymy jsou identické se *S. mansoni* přes 46%, ale C-koncová doména není homologická. [118].

Katepsin D hraje klíčovou roli v proteolýze hemoglobinu, který je uvolněn z natrávených erytrocytů. Štěpení hemoglobinu probíhá při velmi kyselém pH, což je prostředí typické pro žaludek parazita. Zde katepsin D zahajuje degradaci hemoglobinu [119] na velké fragmenty, které jsou dále štěpeny cysteinovými endopeptidasami a exopeptidasami [115].

2. Cíl

Diplomová práce se soustředí na proteasy typu katepsinu D, které fungují jako trávicí proteasy krev sajících parazitů. Byly studovány katepsiny D z krevničky střevní (*Schistosoma mansoni*) a z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), které umožňují degradaci hemoglobinu, který je hlavním potravním zdrojem obou parazitů. Trávicí proteasy parazitů se v současné době stávají významným terapeutickým cílem pro zásah do trávicího systému parazitů a jejich supresi s potenciálním využitím pro přípravu „protiklíštěcích“ vakcín a pro vývoj nových anti-schistosomálních chemoterapeutik.

Katepsin D z *Ixodes ricinus*

Navrhnout a optimalizovat postup pro refolding rekombinantního proteinu. Určit proces aktivace enzymu a purifikovat aktivovaný enzym.

Charakterizovat pH optimum aktivního enzymu, analyzovat substrátovou a inhibiční specifitu.

Katepsin D z *Schistosoma mansoni*

Připravit rekombinantní protein (dva izoenzymy) expresí v systému *E. coli* a purifikovat denaturovaný protein afinitní chromatografií.

Navrhnout a optimalizovat postup pro refolding a testovat enzymovou aktivitu produktu.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Rekombinantní katepsin D z klíštěte obecného (IrKatD)

Prokatepsin D z klíštěte obecného *Ixodes ricinus* (pro-IrKatD) byl exprimován v bakterii *Escherichia coli* s histidinovou kotvou na N-konci proenzymu. Inkluzní tělíska izolovaná po expresi byla přečištěna afinitní chromatografií na koloně Ni-NTA Sepharosa. Eluční frakci poskytl Dr. D. Sojka z Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

3.1.2 Rekombinantní katepsin D z krevničky střevní (SmKatD)

Prokatepsin D z krevničky střevní *Schistosoma mansoni* (pro-SmKatD) byl klonován do plasmidu pET100 D-TOPO (Invitrogen) jako proenzym ve dvou variantách s C-koncovou doménou o délce 43 aminokyselinových zbytků, a bez C-koncové domény. Tyto konstrukty poskytl Dr. J. Dvořák z Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

3.1.3 Chemikálie

Substráty

Peptidové substráty Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu (Abz-KPAEFF*AL) a ABz-Ile-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu (Abz-Abz-IEF-F*RL) byly syntetizovány na ÚOCHB AV ČR.

Inhibitory

PDI byl izolován na ÚOCHB AV ČR.

Lopinavir byl poskytnut Dr. M. Kožíškem (ÚOCHB AV ČR).

Sigma, USA:

fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), pepstatin, E-64, leupeptin, pepabloc

Ostatní chemikálie

Sigma, USA:

dithiothreitol (DTT), k. ethylendiamintetraoctová (EDTA), glycin, močovina, dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris, akrylamid, lidský hemoglobin, dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, glukosa, lysozym, deoxycholát sodný (DOC), hovězí sérový albumin, Luria-Bertani medium (LB medium), Coomassie Brilliant Blue G250, močovina, N,N'methylenbisakrylamid, akrylamid, peroxidisíran amonný (APS), isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), arginin, polyethylenglykol (PEG) 1500, k. citronová, redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG), Triton X-100

Invitrogen, USA:

buňky *E. coli* BL21(DE3), karbenicilin, SOC medium

Lachema, ČR:

chlorid sodný, ethanol, hydroxid sodný, k. octová, k. chlorovodíková, methanol, fosforečnan sodný, aceton, glutaraldehyd, imidazol

Fermentas, Lotyšsko:

Hmotnostní standardy pro SDS-PAGE: „Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus“

3.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy AE 163	Mettler, Švýcarsko
Centrifugy:	
Centrifuga Eppendorf 5415D	Eppendorf, Německo
Centrifuga Heraeus Biofuge Fresco	DJB Labcare, Velká Británie
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	Thermosavant, USA
UltrafreeMC Microcentrifuge filter, 0,22 μ M	Millipore, USA
Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	Tecan, Rakousko
pH metr pH Pracitronic MW 870	Pracitronic, Německo
Termoblok	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Vertikální elektroforéza Mini Protean	BioRad, USA
Blotovací zařízení Mini Trans-Blot	BioRad, USA
ÅKTA Explorer	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Sonikátor Soniprep 150 MSE	Hielscher, Německo
Kolony a nosiče:	

NiNTA Superflow	Qiagen, USA
MonoS HR 5/5	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
MonoQ HR 5/5	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Ostatní vybavení:	
PVDF membrána	Millipore, USA

3.3 Experimentální metody

3.3.1 Rekombinantní exprese

3.3.1.1 Exprese v buňkách *E. coli* BL21(DE3)

50 μ l suspenze buněk *Escherichia coli* BL21(DE3) bylo rozmrazeno na ledu a bylo k nim přidáno 10 ng plasmidové DNA (vektor pET100/D-TOPO s SmKatD-S nebo SmKatD-L poskytnutý Dr. J. Dvořákem ze spolupracujícího Parazitologického ústavu v Českých Budějovicích). Poté byla směs inkubována 30 min na ledu. Transformace buněk byla provedena metodou teplotního šoku trvajícím 30 s při 42°C. Po 30 s byla směs okamžitě přemístěna na led, kde k ní bylo přidáno 250 μ l SOC média. Takto zpracovaná směs se dále kultivovala 1 h při 37°C za současného třepání (230 rpm). Poté byla celá směs přidána do 60 ml LB média, které obsahovalo karbenicilin (50 μ g/ml) a glukosu (1 %) a buňky byly kultivovány při 37°C přes noc za stálého třepání do hodnoty OD₆₀₀ 1,5.

Erlenmayerova baňka s 500 ml LB média, která obsahovala karbenicilin (50 μ g/ml) a glukosu (1%), se zaočkovala 10 ml kultury a kultivace probíhala při 37°C za současného třepání (230 rpm) až do hodnoty OD₆₀₀ 0,5. Exprese byla indukována přidavkem IPTG na finální koncentraci 1 mM a probíhala 5 h. Následně byly buňky centrifugovány (3000 g, 10 min, 4°C) a peleta byla poté zamrazena.

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0

3.3.1.2 Dezintegrace buněk a separace inkluzních tělísek

Bakteriální peleta (6 g z 1 l kultivačního media) byla rozsuspendována v 60 ml Pufri A, byl přidán lysozym (na špičku špachtle), PMSF (do finální koncentrace 1 mM) a merkaptoethanol (do finální koncentrace 0,1%). Směs byla inkubována při laboratorní

teplotě 30 min. Následovala sonikace na ledu tyčovým homogenizátorem. Po přidání DOC (do finální koncentrace 0,1%) byla směs inkubována na ledu 30 min. Lyzát byl centrifugován (10000 g, 10 min, 4°C), supernatant zamražen (označen jako Supernatant 1) a získaná peleta byla promyta 10 ml Pufru A obsahujícím 1 M NaCl a 0,5% Triton. Promytá peleta byla opět centrifugována (10000 g, 10 min, 4°C), supernatant zamražen jako Supernatant 2. Získaná peleta byla rozsuspendována v 10 ml Pufru A obsahujícím 1,5 M NaCl a 0,5 % Triton a 0,1% merkaptoethanol, sonikována a opět centrifugována (10000 g, 10 min, 4°C). Supernatant byl zamražen jako Supernatant 3, získaná peleta obsahovala inkluzní tělíška (1,2 g), která byla rozsuspendována v 9 mL pufru o složení: 100 mM Na-fosfát pH 8,0, 10 mM Tris, 8 M močovina a inkubována při laboratorní teplotě 24 h za stálého míchání. Nerozpuštěná část byla poté odstraněna centrifugací (10000 g, 15 min, 4°C).

Složení pufru A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

3.3.1.3 Purifikace katepsinu D z inkluzních tělíšek

Afinitní chromatografie byla využita k separaci rekombinantního katepsinu D ze *S. mansoni*. Využilo se interakce histidinové kotvy, připojené na N-konci proteinu, s nosičem Ni-NTA Superflow. Nikl imobilizovaný na nosiči interaguje s histidinovou kotvou proteinu. Eluce probíhala imidazolem, který kompetoval o nikelnaté ionty na nosiči s histidinovou kotvou.

Kolona s nosičem Ni-NTA Superflow (1x10 cm, 8 ml) byla promyta 15 ml ekvilibračního pufru o průtoku 1 ml/min. Poté bylo nanášeno na kolonu 10 ml vzorku, eluce byla provedena elučním puftrem obsahujícím 250 mM imidazol. Průběh chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při 280 nm, sbírány byly frakce o objemu 2 ml. Jednotlivé frakce byly analyzovány na SDS-PAGE.

Složení ekvilibračního pufru: 100 mM Na-fosfát, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M močovina

Složení promývacího pufru: 100 mM Na-fosfát, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M močovina, 20 mM imidazol

Složení elučního pufru: 100 mM Na-fosfát, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M močovina, 250 mM imidazol

3.3.2 Refolding proteinu

Testovány byly 3 varianty refoldingu:

Varianta refolding A

Tento protokol byl sestaven podle [120]. 1-5 l roztoku obsahujícího 10-60 g proenzymu purifikovaného afinitní chromatografií na nosiči Ni-NTA Superflow bylo přidáno do 100 l redukční směsi o složení: 50 mM GSH, 8 M močovina v 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Redukce probíhala 1 h při laboratorní teplotě. Zredukovaná směs byla dále za stálého třepání a při laboratorní teplotě přikapávána do 900 l refoldingové směsi, jejíž složení a pH se lišily v uvedeném rozmezí: 50 mM Tris-HCl pH 7,1-9,0, 0-30% glycerol, 0-0,5 M arginin, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. Finální směs byla třepána po dobu 30 min při laboratorní teplotě a poté 1-4 dny při 4°C.

Varianta refoldingu B

Tento protokol byl sestaven podle [121]. 50 l roztoku obsahujícího 150 g proteinu purifikovaného afinitní chromatografií na nosiči Ni-NTA Superflow bylo přidáno do 250 l 67% kyseliny octové. Preinkubační směs byla centrifugována při 10000 g, 10 min. Získaný supernatant byl dále přikapáván pipetou do 7,5 ml chladné vody za stálého míchání. K preinkubační směsi bylo přidáno 30 ml refoldovacího pufru o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol a poté se směs inkubovala 24-48 h při 4°C.

Varianta refolding C

Tento protokol byl sestaven podle [122]. Do 2 ml refoldingového pufru o složení 50 mM Na-acetát pH 3,6, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG byl přidán proenzym purifikovaný afinitní chromatografií na nosiči Ni-NTA Superflow do finální koncentrace proteinu 10 g/ml. Směs byla promíchána a poté se nechala třepat 1-5 dní při laboratorní teplotě.

3.3.3 Chromatografie na koloně Mono Q

Prokatepsin D byl z refoldingové směsi izolován pomocí ionexové chromatografie na koloně Mono Q HR 5/5 systému FPLC.

Kolona byla nejdříve ekvilibrována nanášecím pufrem při průtoku 1 ml/min. Prokatepsin D byl refoldován ve výsledném objemu 50 ml, poté bylo pH upraveno na hodnotu 6,5 a vzorek byl nanesen na kolonu. Kolona byla dále promyta 5 ml nanášecího pufru. Následovala eluce lineárním gradientem elučního pufru s 1 M NaCl. Byly sbírány 2 ml frakce při průtoku kolonou 1 ml/min. Průběh purifikace byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a stanovením aktivity katepsinu D pomocí fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL. Před stanovením aktivity byl vzorek inkubován 100 min při pH 4,0, aby došlo ke konverzi proenzymu na aktivní enzym.

Složení nanášecího pufru: 0,02 M Bis-Tris pH 6,5

Složení elučního pufru: 0,02 M Bis-Tris pH 6,5, 1 M NaCl

3.3.4 Chromatografie na koloně Mono S

Frakce po Mono Q (kapitola 3.3.3) obsahující prokatepsin D byly spojeny, pH bylo upraveno na hodnotu 3,8 a směs se inkubovala 2 h při 37°C, aby došlo k aktivaci katepsinu D. Po inkubaci byl roztok 10x zředěn, aby se snížila koncentrace NaCl, a byla provedena separace pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S HR 5/5 systému FPLC.

Kolona byla nejdříve ekvilibrována nanášecím pufrem při průtoku 1 ml/min. V dalším kroku bylo na kolonu nanášeno 50 ml aktivovaného katepsinu D. Kolona byla dále promyta 5 ml nanášecího pufru. Následovala eluce lineárním gradientem elučního pufru s 1 M NaCl. Byly sbírány 2 ml frakce při průtoku kolonou 1 ml/min. Průběh purifikace byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a detekcí aktivity katepsinu D v jednotlivých frakcích - pomocí fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL. Frakce obsahující aktivní katepsin D byly spojeny a uchovávány v -80°C.

Složení nanášecího pufru: 0,05 M Na-mravenčan pH 3,8

Složení elučního pufru: 0,05 M Na-mravenčan pH 3,8, 1 M NaCl

3.3.5 Analytické metody

3.3.5.1 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita metoda dle Bradfordové [123]. Kalibrační křivka byla sestavena z roztoků hovězího sérového albuminu o různých koncentracích v rozmezí 0-1000 g/ml. K 10 l vzorku respektive standardům bylo přidáno do jamek mikrodestičky 200 l činidla. Po inkubaci 10 min při 37°C byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Koncentrace proteinů ve vzorcích se určila ze sestavené kalibrační standardní křivky (A_{595} proti koncentraci standardu).

3.3.5.2 Příprava vzorků na SDS-PAGE acetonovou precipitací

Ke 200 l vzorku bylo přidáno 800 l 100% vychlazeného acetonu. Po inkubaci 30 min v -20°C byly vzorky centrifugovány (13000 g, 10 min, 4°C). Supernatant byl odsán a peleta byla vysušena na vakuové odparce SpeedVac při teplotě 70°C. K peletě byl přidán vzorkový pufr (15 l) a směs byla inkubována 10 min při 90°C a nanesena na SDS-PAGE.

Vzorkový pufr: 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 4% mekraptoethanol, 0,02% Comassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol

3.3.5.3 SDS-PAGE

Polyakrylamidová elektroforéza v 0,1% SDS byla provedena podle postupu dle Laemmliho [124]. Na vertikální elektroforéze BioRad byl použit 15% gel o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm. Fixace proteinů v gelech probíhala 15-30 min v roztoku obsahujícím 45% ethanol, 10% kyselinu octovou. K detekci proteinů se použil roztok Coomassie Brilliant Blue G250 [125].

3.3.5.4 Přenos proteinů z gelu na membránu

Po skončení SDS-PAGE byly PVDF membrána, podložka, gel a filtrační papír ekvilibrovány 15 min v transferovém pufru. Po ekvilibraci byly navrstveny do blotovacího přístroje v pořadí: anoda, podložka, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, podložka, katoda. Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 60 min při konstantním napětí 100 V. Poté byla membrána obarvena roztokem Coomassie Brilliant Blue G250 [125]. Membrána byla odbarvena 50 % methanolem a promyta 3x vodou.

Složení transferového pufru: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glycin, 20% methanol

3.3.5.5 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence

Pomocí SDS-PAGE byly separovány vzorky, které byly určeny k analýze. Následoval přenos proteinů na PVDF membránu (kap. 3.3.5.4). PVDF membrána byla obarvena pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 a následně odbarvena 25% methanolem s 10% kyselinou octovou. Příslušný pruh s proteinem byl z membrány vystřižen a poslán k určení N-koncové aminokyselinové sekvence. Určení N-koncové aminokyselinové sekvence prováděl Ing. Z. Voburka na ÚOCHB AV ČR automatickým Edmanovým odbouráváním N-koncových aminokyselin pomocí proteinového sekvenátoru ABI Procise 491.

3.3.5.6 Tricin SDS-PAGE

Tricinová polyakrylamidová elektroforéza byla používána k detekci fragmentů vzniklých při degradaci hovězího hemoglobinu. Tricin SDS-PAGE je založena na postupu podle Schäggera [126]. Na vertikální elektroforéze BioRad byl použit 16% gel s 6 M močovinou o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm. Fixace proteinů v gelech probíhala 1 h v 5% glutaraldehydu, 30 min v roztoku obsahujícím 45% ethanol a 10% kyselinu octovou. K detekci proteinů se použil roztok Coomassie Brilliant Blue G250.

3.3.5.7 Degradace hemoglobinu pro elektroforetickou analýzu

Reakční směs o celkovém objemu 50 l byla složena z 5 l aktivovaného katepsinu D přečištěného na koloně Mono S, 25 l pufru o pH 2,3-10,0 a 20 l roztoku hemoglobinu (5 mg/ml). Reakční směs byla inkubována při 37 °C a v čase 0-20 h byly odebírány alikvoty o objemu 10 l. Reakce byla ukončena přidávkem 10 l 2x koncentrovaného Tricin SDS-PAGE pufru a inkubací při 65°C, 2 min. Směs byla analyzována na Tricin SDS-PAGE. Jako kontrolní vzorek bylo použito 30 l H₂O a 20 l roztoku hemoglobinu.

Složení používaných pufrů:

50 mM Na-citrát pH 2,3, 2,7, 3,2

50 mM Na-acetát pH 3,6, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5

50 mM Na-fosfát pH 6,0, 7,0, 8,0

50 mM Na-borát pH 9,0, 10,0

Složení pufru pro Tricin SDS-PAGE: 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 4% merkaptoethanol, 0,02% Comassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol

3.3.5.8 Degradace hemoglobinu s fluoreskaminovou detekcí

Reakční směs o celkovém objemu 35 l byla složena ze 2 l aktivovaného katepsinu D, 23 l inkubačního pufru o různém pH a 10 l roztoku hemoglobinu. Směs byla inkubována 90 min při 37°C. Poté bylo ke každé směsi přidáno 118 l derivatizačního pufru a následně 46 l roztoku fluoreskaminu. Fluoreskaminová detekce spočívá v interakci s nově vzniklými N-konci fragmentů hemoglobinu za vzniku fluoreskujícího produktu. Množství fluorescenčně modifikovaných fragmentů hemoglobinu bylo stanoveno na fluorescenčním spektrofotometru GENios měřením fluorescence při excitační vlnové délce 390 nm a emisní vlnové délce 465 nm.

Složení inkubačního pufru: 0,05 M Na-acetát pH 3,2, 3,6, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5

Složení derivatizačního pufru: 0,5 M Na-borát pH 9,0

Roztok fluoreskaminu: 0,03% v acetonu

3.3.5.9 Analýza auto-aktivace prokatepsinu D

Časový průběh auto-aktivace prokatepsinu D byl měřen po inkubaci s 0,5 M Na-acetátem pH 4,0 při 37°C. V časových intervalech v rozmezí 0-225 min a dále přes noc byly odebírány alikvoty, které byly smíchány se substrátovou směsí a účinnost aktivace byla zjištěna kinetickým stanovením pomocí substrátu Abz-KPAEFF*AL (Kap. 3.3.6.1).

Analýza auto-aktivace byla dále provedena pomocí SDS-PAGE. Prokatepsin D byl inkubován s 0,5 M Na-acetátem pH 4,0 při 37°C a v časových intervalech byly odebírány 200 l alikvoty k nimž byl přidán 1 l pepstatinu, který zastavil aktivaci. Vzorky na SDS-PAGE byly připraveny pomocí acetonové precipitace popsané v kapitole 3.3.5.2.

Složení inkubační směsi: 2,5 l enzymu, 77,5 l 0,5 M Na-acetát pH 4,0

*Složení substrátové směsi: 15,5 l 0,5 M Na-acetát pH 4,0, 0,5 l 10 mM Abz-KPAEFF*AL v DMSO*

3.3.6 Měření enzymové aktivity

3.3.6.1 Kinetické měření s peptidovým substrátem

Enzymová aktivita katepsinu D byla stanovena při 37°C v mikrodestičce pomocí fluorescenčního spektrofotometru GENios. Používány byly fluorogenní peptidové substráty s vnitřním zhášením (princip FRET, „Förster resonance energy transfer“). Do jejich sekvence je integrována donorová skupina fluoroforu a skupina akceptoru s absorbním spektrem překrývajícím emisní spektrum donoru. Fluorescence intaktní molekuly je slabá, rozštěpením peptidové vazby mezi skupinou donoru a akceptoru fluorescence vzrůstá. V práci byly používány substráty Abz-IEF-F*RL a Abz-KPAEF-F*AL, které využívají fluorescenční skupinu aminobenzoylu (Abz), která se detekuje při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 410 nm, a p-nitrofenylalanin jako akceptor [61].

Do mikrodestičky bylo napipetováno 10 μ l roztoku enzymu a 70 μ l 0,2 M Na-acetát pH 4,0. Při stanovení aktivit prokatepsinu D byla směs inkubována 1-2 h při 37°C, přičemž došlo k přeměně neaktivního zymogenu na aktivní katepsin D. Do enzymové směsi bylo poté přidáno 20 μ l substrátové směsi, která se skládala z 0,4 μ l 10 mM substrátu v DMSO a 19,6 μ l 0,1 M Na-acetát pH 4,0. Enzymová aktivita byla měřena jako míra štěpení fluorogenního substrátu enzymem.

3.3.6.2 Určení pH optima IrKatD

Enzymy, jež byly použity pro měření aktivity v závislosti na pH, byly přečištěny pomocí iontoměničové chromatografie FPLC. K 10 μ l enzymu bylo přidáno do mikrodestičky 90 μ l substrátové směsi preinkubované 10 min při 37°C. Enzymová aktivita byla měřena jako míra štěpení fluorogenního substrátu enzymem.

*Složení substrátové směsi: 0,15 M citrát-fosfát pH 2,3-6,5, 40 μ l M Abz-KPAEFF*AL*

3.3.6.3 Inhibice enzymové aktivity

Enzymy použité pro měření inhibiční specifity byly přečištěny pomocí FPLC. Do mikrodestičky bylo napipetováno 10 μ l roztoku enzymu a 80 μ l inhibiční směsi. Směs

byla poté inkubována při 37°C po dobu 15 min. Následně byla přidána substrátová směs a byla měřena zbytková aktivita enzymu na fluorescenční čtečce GENios.

Inhibiční směs: 0,1 M Na-acetát pH 4,0, 10⁻⁶ M inhibitor (pepstatin, E-64, leupeptin), 1 mM inhibitor (pefabloc, EDTA, lopinavir).

*Substrátová směs: 0,1 M Na-acetát pH 4,0, 40⁻⁶ M Abz-KPAEFF*AL*

4. Výsledky

4.1 Katepsin D z *Ixodes ricinus* (IrKatD)

4.1.1 Refolding IrKatD

4.1.1.1 Určení základní strategie pro refolding IrKatD

Výchozím materiálem pro zjištění optimálních podmínek refoldingu byl rekombinantní katepsinu D (IrKatD) ve formě zymogenu označovaný jako prokatepsin D (pro-IrKatD), který byl získán přečištěním inkluzních tělísek po expresi v bakterii *E. coli* na koloně Ni-NTA Sepharosa. (Tento materiál byl získán z Parazitologického ústavu AV ČR (Kap. 3.1.1).

Správné sbalení pro-IrKatD bylo testováno pomocí třech variant refoldingu, které jsou podrobně popsány v kapitole 3.3.2.

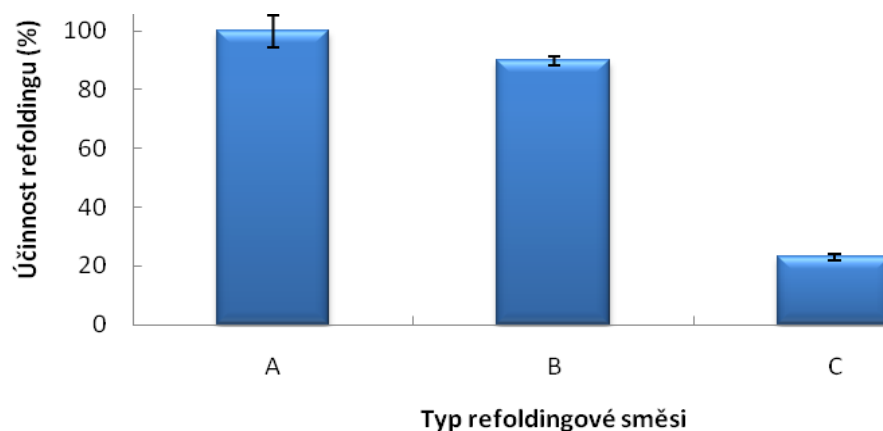
A) Pro-IrKatD byl přidán do preinkubačního roztoku o složení: 50 mM GSH, 8 M močovina (uvedeny jsou finální koncentrace). Tento roztok byl přidán za stálého míchání do desetinásobného objemu refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG.

B) Pro-IrKatD byl přidán do preinkubačního roztoku obsahujícího finálně 40% kyselinu octovou. Poté byl tento roztok zředěn 25x chladnou vodou a smíchán s refoldingovou směsí o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol.

C) Pro-IrKatD byl inkubován v refoldingové směsi o složení: 50 mM Na-acetát pH 3,6, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG.

Účinnost refoldingu pro-IrKatD byla stanovena pomocí aktivního testu s fluorogenním substrátem Abz-KPAEFF*AL. Měřena byla fluorescence, která vzniká při štěpení substrátu. Aktivitní test obsahoval úvodní inkubaci v kyselém pH, při které dochází ke konverzi neaktivního prokatepsinu D na aktivní enzym (kap. 3.3.5.8).

Porovnáním aktivit IrKatD (obr. 15, str. 49) bylo zjištěno, že nejvyšší aktivita je ve variantě refoldingu popsané v bodě 1) zahrnující preinkubaci s 50 mM GSH a refolding ve směsi, která obsahuje 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. Tato varianta refoldingu byla v práci dále optimalizována.



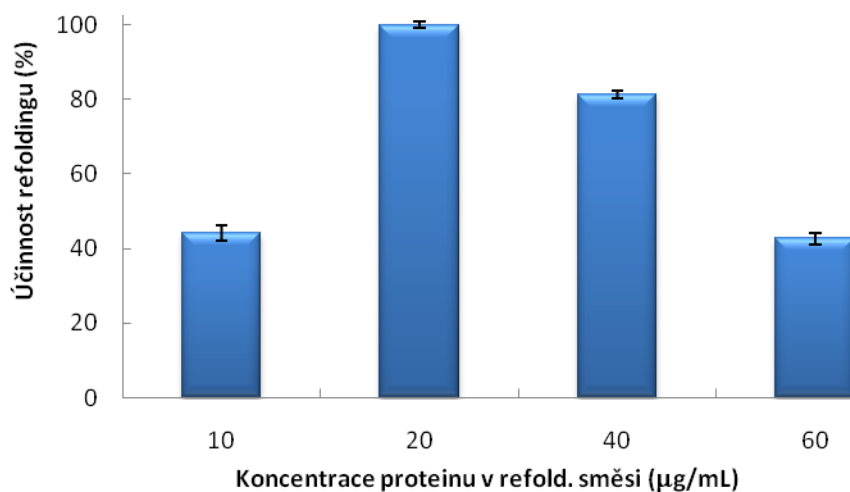
Obr. 15: Účinnost refoldingu IrKatD v závislosti na složení refoldingové směsi. Refolding probíhal 48 h ve třech variantách refoldingu (osa x): A/ Preinkubace v 50 mM GSH následovaná refoldingem v 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. B/ Preinkubace v přítomnosti 67% kyseliny octové následované refoldingem v 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol. C/ Refolding v 50 mM Na-acetát pH 3,6, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG. Aktivita IrKatD byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.1.2 Optimalizace podmínek pro refolding pro-IrKatD

1/ Závislost na koncentraci proteinů

Byla provedena optimalizace refoldingu pro-IrKatD v závislosti na koncentraci proteinu ve finální refoldingové směsi. Pro optimalizaci koncentrace proteinu v refoldingové směsi byly zvoleny následující koncentrace (finální koncentrace v refoldingové směsi): 10, 20, 40, 60 g/ml. Po preinkubaci v 50 mM GSH a 8 M močovíně, probíhal refolding po dobu 48 h v pufru o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. Účinnost refoldingu pro-IrKatD se stanovovala pomocí aktivního testu, jako míra štěpení fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL, po aktivaci pro-IrKatD (obr. 16, str. 50).

Z experimentu vyplývá, že nejvhodnější finální koncentrace IrKatD v refoldingové směsi je 20 g/ml, další zvyšování či snižování koncentrace proteinu vede ke snížení účinnosti refoldingu.

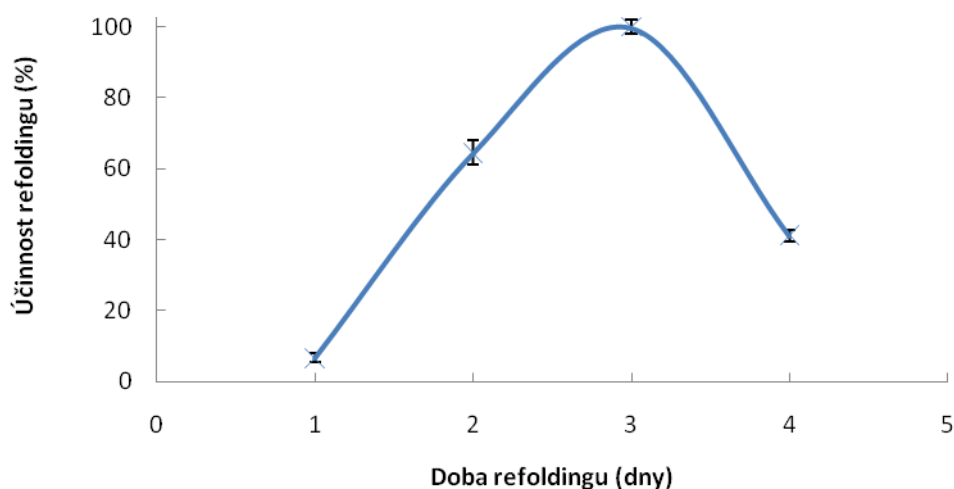


Obr. 16: Účinnost refoldingu IrKatD v závislosti na koncentraci proteinu v refoldingové směsi. Po preinkubaci v 50 mM GSH a 8 M močovíně probíhal refolding 72 h v refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. Aktivita IrKatD byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

2/ Závislost na době refoldingu

Optimalizace doby sbalování byla testována při koncentraci 20 g/ml proteinu v následujícím uspořádání: vzorek pro-IrKatD byl preinkubován v 50 mM GSH a 8 M močovíně a dále inkubován v refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. Doba refoldingu se pohybovala mezi 1-4 dny a účinnost refoldingu pro-IrKatD se stanovovala pomocí aktivního testu, jako míra štěpení fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL, po předchozí aktivaci pro-IrKatD (obr. 17, str. 51).

Z experimentu vyplývá, že optimální doba sbalování IrKatD činí 3 dny, v této době je aktivita enzymu nejvyšší.



Obr. 17: Účinnost refoldingu IrKatD v závislosti na době inkubace. Po preinkubaci v 50 mM GSH a 8 M močovíně probíhal refolding po dobu 1-4 dnů (osa x) ve variantě refoldingové směsi: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. Výsledná koncentrace proteinu v refoldingové směsi je 20 g/ml. Aktivita IrKatD byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

3/ Vliv pH, koncentrace glycerolu a argininu na účinnost refoldingu

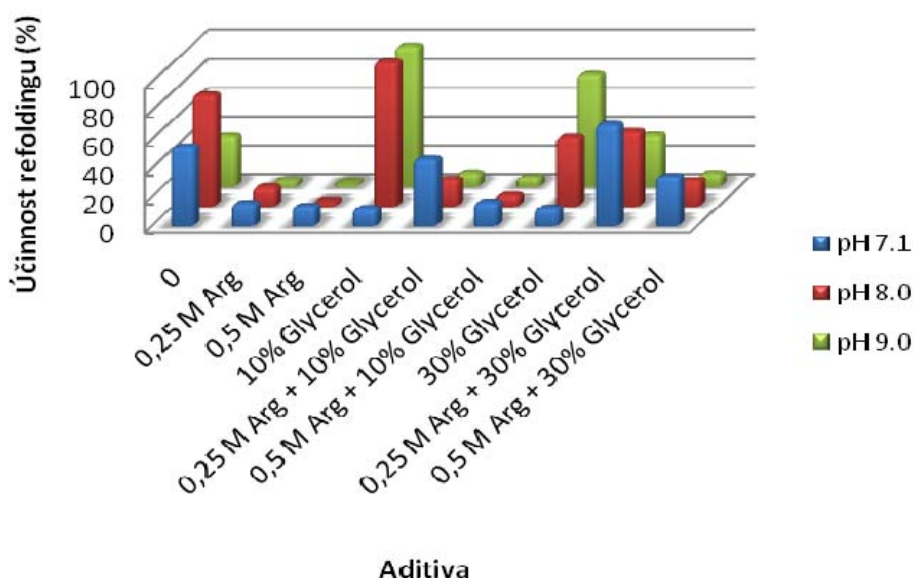
Testováno bylo 27 variant složení refoldingové směsi, které se lišily pH, koncentrací glycerolu a argininu, který usnadňuje sbalování řady proteinů. Preinkubační směs, jež obsahuje 50 mM GSH a 8 M močovinu, byla přidána do refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris-HCl pH 7,1-9,0, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG, 0-30% glycerol, 0-0,5 M arginin (tab. 3, obr. 18, str. 52).

Účinnost refoldingu pro-IrKatD se stanovovala pomocí aktivitního testu, jako míra štěpení fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL, po předchozí aktivaci pro-IrKatD. Dle tab. 3 a obr. 18, str. 52 jsou nejvhodnější podmínky pro správné sbalení IrKatD v prostředí o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,05% PEG 1500 a 10% glycerol. Nalezené optimální podmínky refoldingu byly používány pro další práci.

Tab. 3: Optimalizace podmínek pro refolding pro-IrKatD.

glycerol %	0	0	0	10	10	10	30	30	30
arginin M	0	0,25	0,5	0	0,25	0,5	0	0,25	0,5
pH	Relativní aktivita								
pH 7,1	54,6	15,08	13,2	11,6	46,1	15,9	11,8	70,0	33,7
pH 8,0	77,3	13,3	3,0	100,0	18,4	7,7	47,9	51,9	17,7
pH 9,0	35,2	3,8	1,7	97,4	9,2	6,2	78,2	35,9	8,8

Po preinkubaci v 50 mM GSH a 8 M močovíně probíhal refolding po dobu 72 h v refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris-HCl pH 7,1-9,0; 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG, 0-30% glycerol, 0-0,5 M arginin. Aktivita katepsinu D byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty. Optimální podmínky pro refolding pro-IrKatD jsou zvýrazněny červeně.

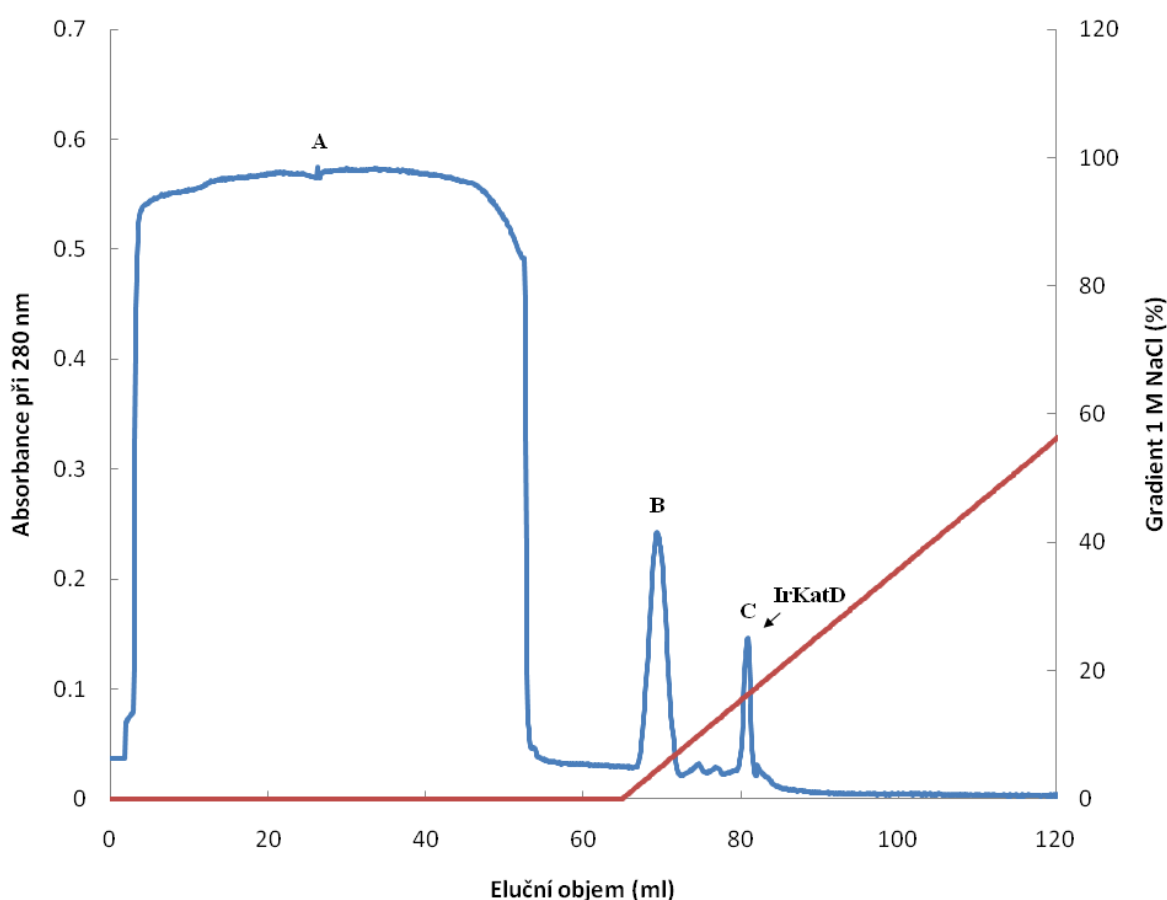


Obr. 18: Optimalizace podmínek pro refolding pro-IrKatD. Popis a číselné údaje tohoto experimentu jsou uvedeny v tab. 3.

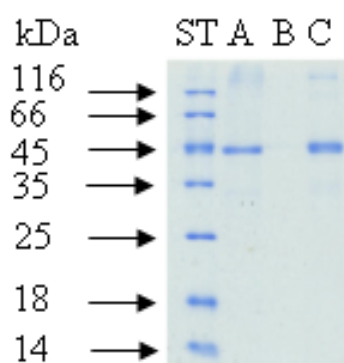
4.1.2 Chromatografická purifikace zymogenu IrKatD

Pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono Q HR 5/5 systému FPLC byl separován správně sbalený pro-IrKatD od nesprávně sbaleného proteinu. Na kolonu bylo naneseno 50 ml směsi po refoldingu pro-IrKatD, kde bylo upraveno pH na 6,5 (kap. 3.3.3). Eluce probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl v pufru o pH 6,5.

Aktivní IrKatD byl detekován pomocí aktivního testu s fluorogenním substrátem Abz-KPAEFF*AL po předchozí aktivaci pro-IrKatD. Aktivita IrKatD byla nalezena v absorbčním vrcholu C (obr. 19, str. 53). Absorbční vrcholy A, B a C byly dále analyzovány na SDS-PAGE (obr. 20, str. 54). Pás odpovídající molekulové hmotnosti pro-IrKatD, která činí cca 42 kDa, se podařilo detekovat v absorbčních vrcholech A a C. V absorbčním vrcholu A je přítomen materiál nenavázaný na kolonu a v absorbčním vrcholu C byla detekována aktivita IrKatD. Lze předpokládat, že absorbční vrchol A obsahuje chybně sbalený protein a absorbční vrchol C obsahuje správně sbalený pro-IrKatD, který vykazoval proteolytickou aktivitu.



Obr. 19: Izolace pro-IrKatD iontoměničovou chromatografií na koloně Mono Q HR 5/5 systému FPLC. Na kolonu ekvilibrovanou puforem 0,02 M Bis-Tris pH 6,5 byla nanesena směs po refoldingu pro-IrKatD, jejíž pH bylo upraveno na pH 6,5. Eluce probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl v pufru 0,02 M Bis-Tris pH 6,5. Objem sbíraných frakcí byl 2 ml (osa x). Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a stanovením enzymatické aktivity IrKatD v jednotlivých frakcích. Aktivita byla měřena s fluorogenním substrátem Abz-KPAEFF*AL po aktivaci IrKatD. Šipkou je zvýrazněn absorbční vrchol, který obsahuje aktivní IrKatD. Frakce tvořící absorbční vrcholy A, B a C byly spojeny a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

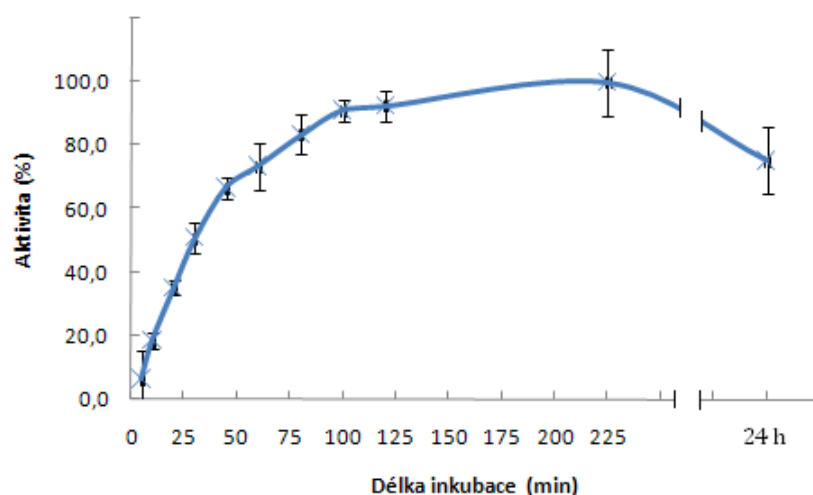


Obr. 20: SDS-PAGE analýza vzorků z chromatografie refoldovaného pro-IrKatD na koloně Mono Q HR 5/5 systému FPLC. Na 15% gelu SDS-PAGE byl separován vzorek elučních materiálů odpovídajících absorbním vrcholům A, B a C (obr. 19, str. 53) a standardy molekulových hmot (ST) v kDa. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue G250.

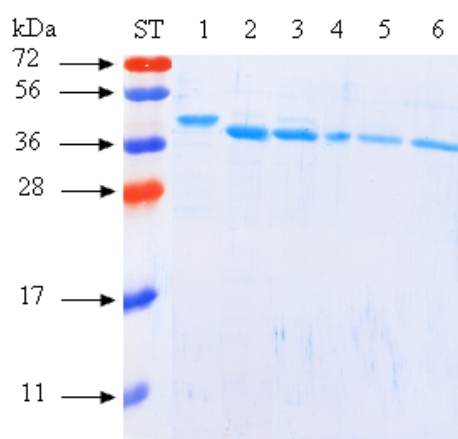
4.1.3 Analýza aktivace zymogenu IrKatD

V prvním kroku byla testována schopnost pro-IrKatD aktivovat se auto-katalytickým mechanismem. Bylo zjištěno, že purifikovaný rekombinantní pro-IrKatD se auto-aktivuje v kyselém prostředí (pH 4,0). Aktivita IrKatD se měřila v různých časových intervalech v aktivním testu s fluorogenním substrátem Abz-KPAEFF*AL (obr. 21, str. 55). IrKatD se kompletně aktivoval za 100 min, při delší inkubaci nedocházelo k další aktivaci. Aktivovaný IrKatD je poměrně stabilní – při prodloužené inkubaci (24 h) si zachovával 80% své maximální aktivity.

Kromě aktivního testu byl průběh aktivace analyzován na SDS-PAGE (obr. 22, str. 55). Sledována byla aktivace pro-IrKatD v časovém rozmezí 0-24 h. Pás pro-IrKatD o molekulové hmotnosti cca 42 kDa zmizel a konvertoval na pás aktivního IrKatD o molekulové hmotnosti cca 37 kDa. Takto generovaný enzym je relativně stabilní, i při dlouhodobé aktivaci dochází pouze k částečnému poklesu intenzity pásu a nejsou vidět významné degradační fragmenty.



Obr. 21: Průběh aktivace pro-IrKatD. Pro-IrKatD byl aktivován při pH 4,0 a teplotě 37°C. V časových intervalech 0-225 min a 24 h (osa x) byla měřena aktivita se substrátem Abz-KPAEFF*AL. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).



Obr. 22: Analýza aktivace pro-IrKatD na SDS-PAGE. Pro-IrKatD byl aktivován při pH 4,0 a teplotě 37°C. V časových intervalech 0-24 h byly odebrány alikvoty na SDS-PAGE. Na 15% gelu je zobrazeno 6 drah, které se liší dobou aktivace pro-IrKatD. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue G250.

Dráha:	ST	Standardy molekulových hmot v kDa
	1	Pro-IrKatD před aktivací
	2	Aktivace 30 min
	3	Aktivace 1 h
	4	Aktivace 3 h
	5	Aktivace 6 h
	6	Aktivace 24 h

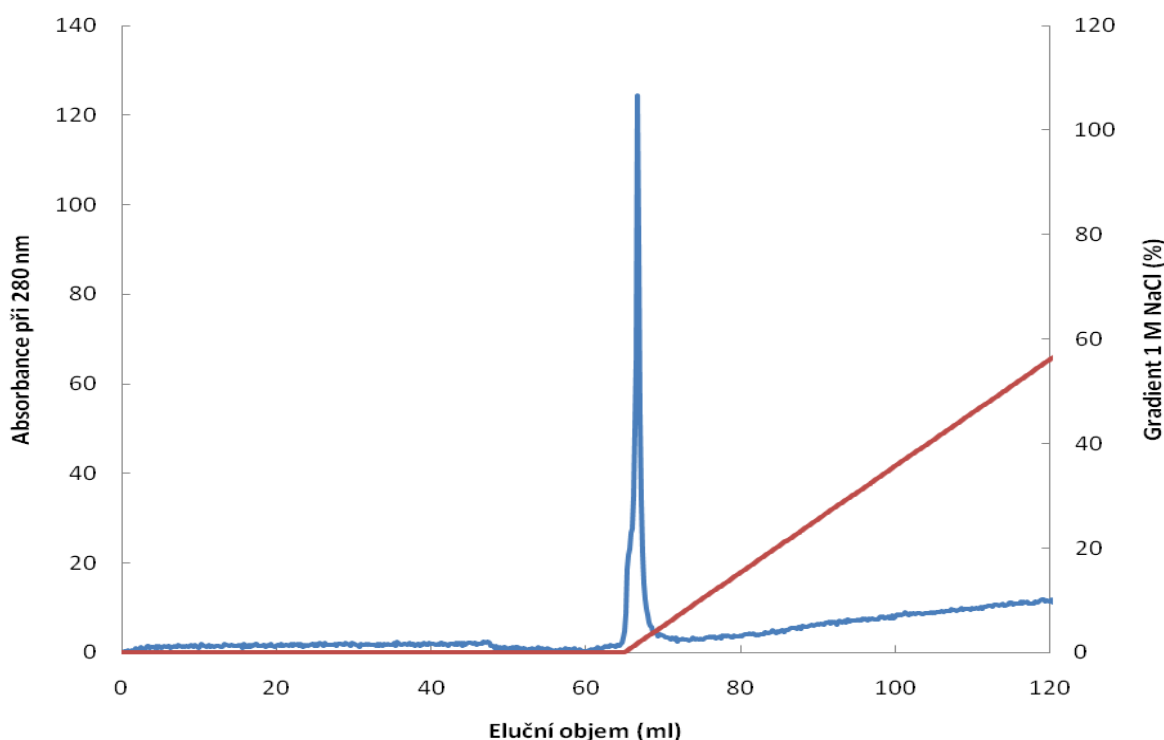
U aktivovaného IrKatD byla určena N-koncová sekvence (po přenosu na PVDF membránu): IHEGPYPE-. Aktivní IrKatD tedy vzniká odštěpením cca 21 aminokyselin z propeptidu pro-IrKatD, ovšem změna pozorovaná na SDS-PAGE je větší než odštěpení 21 aminokyselin (obr. 22, str. 55), protože pro-IrKatD byl klonován s N-koncovým Histagem o velikosti 3 kDa. Porovnání IrKatD s lidským katepsinem D (HuKatD) ukazuje, že nalezený N-konec IrKatD je zhruba v oblasti N-konce přirozeného lidského katepsinu D (obr. 23). Nelze vyloučit, že extenze -IHE- u IrKatD může být *in vivo* odbourána působením exopeptidas, takže N-konce obou enzymů by začínaly shodnou homologickou sekvencí GPXPE-.

IrKatD	MRCSTLTLTLVLLAAECAFGAFRIPLTRFKSVRKQLAEEG-----	41
HuKatD	MQPSSLLPLALCLLAAP-ASALVRIPLHKFTSIRRTMSEVGGSVEDLIAKGPVSKYSQAV	59
	*: ** : **** * . ***** :*.***: :.* *	
	↓	
IrKatD	IYIHEGPYPEPLVNLDDVEYYGPISIGTPPQDFQVIFDTGSANLWLPSSCKTK--YCLH	99
HuKatD	PAVTEGPIPEVLKNYMDAQYYGEIGIGTPPQCFTVVFDTGSSNLWVPSIHCKLLDIACWI	119
	: *** ** * * :*.*** *.***** * * :*****:*****:*. *	
	↑	
IrKatD	HHRYDSSKSSTYEADGRNFTIVYGSNVEGFISKD-----VCRIGSAKVSQGQPL	148
HuKatD	HKYNSDKSSTYVKNGTSTFDIHYGSGSLSGYLSQDTVSVPCQSASSASALGGVKVERQVF	179
	:*.** :* . * * ***** :.***:*** .. :*..** * :	
IrKatD	GEALVVGESLLEAPFDGILGLAYPSIAVDGVVVPVFDNMMKQGLLGEQNVFSVYLNDRDPS	208
HuKatD	GEATKQPGITFIAAKFDGILGMAYPRISVNNVLPVFDNLMQQKLV-DQNIQSFYLSRDPD	238
	*** * :.: * *****:*** * :*.*****:*. * * : :***:*.**..***.	
IrKatD	SKEGGEVLFGGIDHDHYKGSITYVPVTAKGYWQFHVDPVSVSASKSAPELLCKDGCEAI	268
HuKatD	AQPGGELMLGGTDSKYKGSLSYLNVTAKAYWQVHLDQVEVASG-----LTLCKEGCEAI	293
	:. :***:*** * . :*****:*** ** * .***.*** * * : . * . *****	
IrKatD	ADTGTSLITGPPEEVDLSLQYLGGTKTEGGQYLLDCDKLESPLNVTFTISGKEFSLRSKD	328
HuKatD	VDTGTSLMVGVPVDEVRELQKAIGAVPLIQGEYMIPEKVVSTLPAITLKLGGKGYKLSPED	353
	.*****:.** ** * :.: :*. . * :***:*** :***:*** :*. * . :.*	
IrKatD	YVLKVNQQGQTLQVSGFMSLEMPQP---LWIFGDVFLGPPYPIFDRDQDRVGFAEVA--	382
HuKatD	YTLKVSQAGKTLCLSGFMGMDIPPPSGPLWILGDVFIGRYYTVFDRDNNRVGFAEAAARL	412
	*.*** * * :*****:*** . :.* * *****:*** * * .*****:*****.*	

Obr. 23: Porovnání homologických sekvencí lidského katepsinu D (HuKatD) a katepsinu D z *I. ricinus* (IrKatD). Červeně je znázorněna signální sekvence, modře je znázorněn propeptid a černě zralý enzym. Šipky vyznačují místo aktivace enzymu. Vysvětlivky: * poloha s identickými aminokyselinami, : / . poloha s aminokyselinami s významnou/méně významnou podobností, - delece v sekvenci.

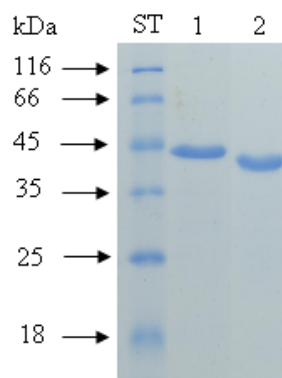
4.1.4 Chromatografická purifikace aktivního IrKatD

Aktivovaný IrKatD byl purifikován pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S HR 5/5 systému FPLC. Na kolonu bylo naneseno 50 ml IrKatD aktivovaného při pH 3,8 (kap. 3.3.4). Eluce byla provedena lineárním gradientem 0-1 M NaCl v pufru pH 3,8. Aktivní forma IrKatD byla detekována ve frakcích pomocí testu s fluorogenním substrátem Abz-KPAEFF*AL. Aktivita IrKatD byla nalezena pouze v oblasti 65-70 ml elučního objemu (obr. 24).



Obr. 24: Izolace IrKatD pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S HR 5/5 systému FPLC. Na kolonu ekvilibrovanou puforem: 50 mM Na-mravenčan pH 3,8, byl nanesen vzorek IrKatD aktivovaného v pH 3,8. Eluce probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl v pufru: 50 mM Na-mravenčan pH 3,8. Sbírány byly frakce po 2 ml (osa x). Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a stanovením enzymatické aktivity IrKatD v jednotlivých frakcích.

Po purifikaci aktivní formy IrKatD pomocí FPLC na koloně Mono S HR 5/5 byla spojená frakce, jež obsahuje IrKatD, analyzována pomocí SDS-PAGE (obr. 25, str. 58). Aktivovaný IrKatD migroval v jediném pásu o velikosti 37 kDa.



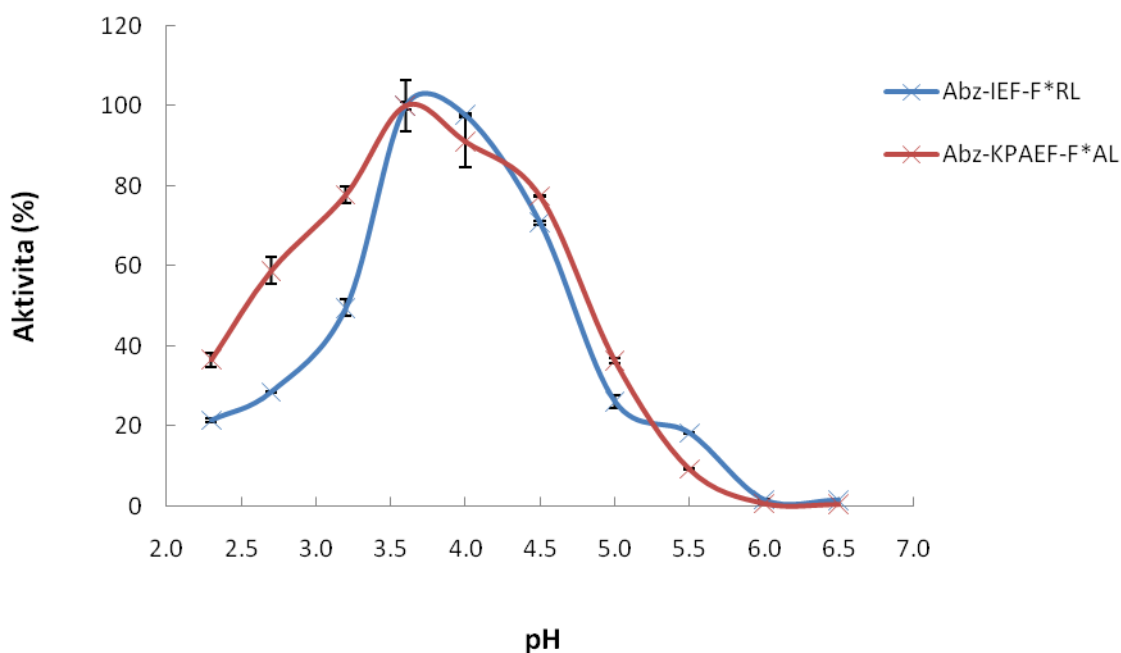
Obr. 25: Analýza vzorku aktivovaného IrKatD z chromatografie na Mono S HR 5/5 systému FPLC. Barvení 15% gelu SDS-PAGE bylo pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. Šipky značí molekulové hmotnosti standardů.

Dráha: ST Standardy relativních molekulových hmot v kDa
 1 Neaktivovaný materiál pro-IrKatD
 2 Frakce v elučím objemu 65-70 ml

4.1.5 Biochemická analýza IrKatD

4.1.5.1 Určení pH optima IrKatD

Pro určení pH optima IrKatD byly použity 2 peptidové fluorogenní substráty Abz-IEF-F*RL a Abz-KPAEF-F*AL (obr. 26). Oba substráty jsou štěpeny v oblasti pH od 2,3 do 5,5 s pH optimem mezi pH 3,5-4,0.



Obr. 26: Závislost aktivity IrKatD na pH. Pro stanovení aktivity IrKatD byly použity fluorogenní substráty Abz-IEF-F*RL a Abz-KPAEF-F*AL. Aktivita byla měřena v 0,15 M citrát-fosfátovém pufru pH 2,3-6,5 (osa x). Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

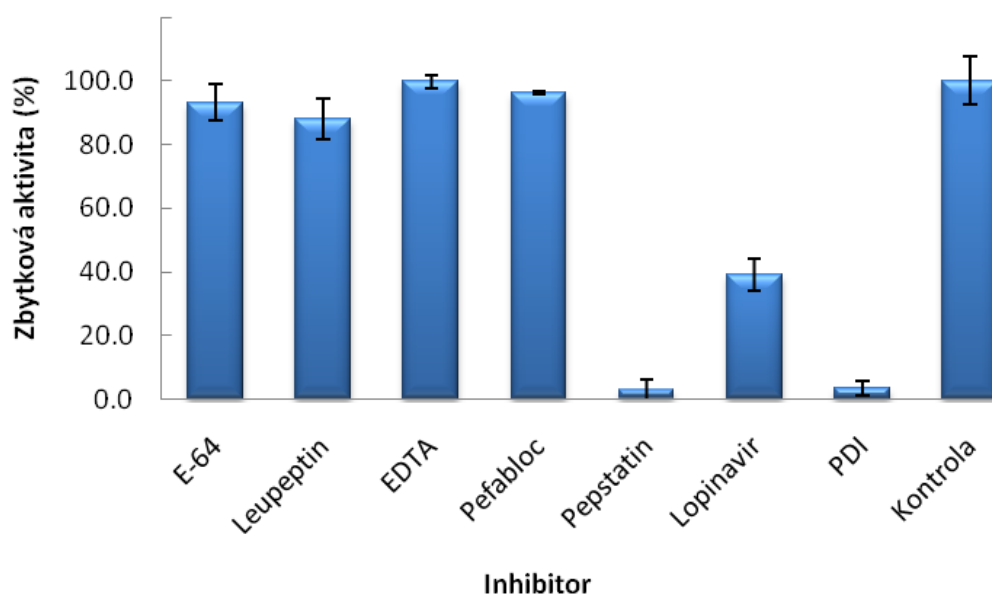
4.1.5.2 Inhibiční specificita

Byla určena inhibiční specificita IrKatD s vybranými skupinově selektivními proteasovými inhibitory. IrKatD byl inkubován s inhibitory a poté byla pomocí aktivního testu s fluorogenním substrátem stanovena zbytková aktivita IrKatD, která byla porovnána s neinhibovaným IrKatD (obr. 27, str. 60). Aktivita IrKatD byla testována pomocí sady inhibitorů uvedených v tab. 4, str. 60.

Tab. 4: Inhibitory použité pro určení inhibiční specifity IrKatD.

Inhibitor	Cílové proteasy	Koncentrace
E-64	cysteinové proteasy rodiny papainu	10 M
Pepstatin	aspartátové proteasy rodiny pepsinu	10 M
Pefabloc	serinové proteasy	1 mM
Leupeptin	serinové a cysteinové proteasy	10 M
EDTA	metaloproteasy	1 mM
Lopinavir	aspartátové proteasy rodiny retropepsinu	10 M
PDI	aspartátové proteasy typu katepsinu D	1,75 M

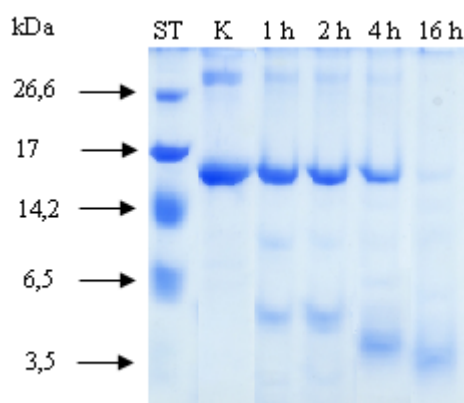
Tento experiment ukázal, že IrKatD je plně inhibován pepstatinem a PDI (potatoe cathepsin D inhibitor), což jsou inhibitory aspartátových proteas rodiny pepsinu, a částečně lopinavirem, což je inhibitor aspartátových proteas rodiny retropepsinu. Inhibitory jiných tříd proteas aktivitu IrKatD významně neovlivňovaly.



Obr. 27: Inhibiční specifita IrKatD s vybranými skupinově selektivními inhibitory proteas. Zobrazena je zbytková aktivita IrKatD měřena pomocí fluorogenního substrátu Abz-KPAEF-F*AL při pH 4,0 v přítomnosti inhibitorů aplikovaných v koncentracích uvedených v tab. 4 (osa x). Hodnoty zbytkové aktivity jsou vztaženy k neinhibované kontrole (100%) (osa y).

4.1.5.3 Degradace hemoglobinu

Hemoglobin je nejdůležitější složkou potravy klíštěte a IrKatD je jedním z hlavních enzymů, který se podílí na úvodní degradaci hemoglobinu v kyselém pH [104]. Nyní byla analyzována degradace hemoglobinu purifikovaným rekombinantním IrKatD. V prvním kroku byla testována degradace při pH 4,0 v různých časových intervalech. Degradovaný hemoglobin byl analyzován na Tricin SDS-PAGE (obr. 28). Během inkubace pás hemoglobinu o 16 kDa postupně mizel a současně vznikaly degradační fragmenty o molekulové hmotnosti cca 10 kDa a 5 kDa. Tyto fragmenty byly postupně kompletně konvertovány na fragmenty o molekulové hmotnosti 3,5 kDa, které už nejsou dále štěpeny ani po 16 h. Rekombinantní IrKatD je tedy schopen kompletně degradovat hemoglobin na malé fragmenty hemoglobinu až o molekulové hmotnosti 3,5 kDa, které jsou ve střevě klíštěte degradovány dalšími proteasami, zejména exopeptidasami. Stejný výsledek byl pozorován i u přirozeného IrKatD testovaného v extraktu střeva klíštěte [104].

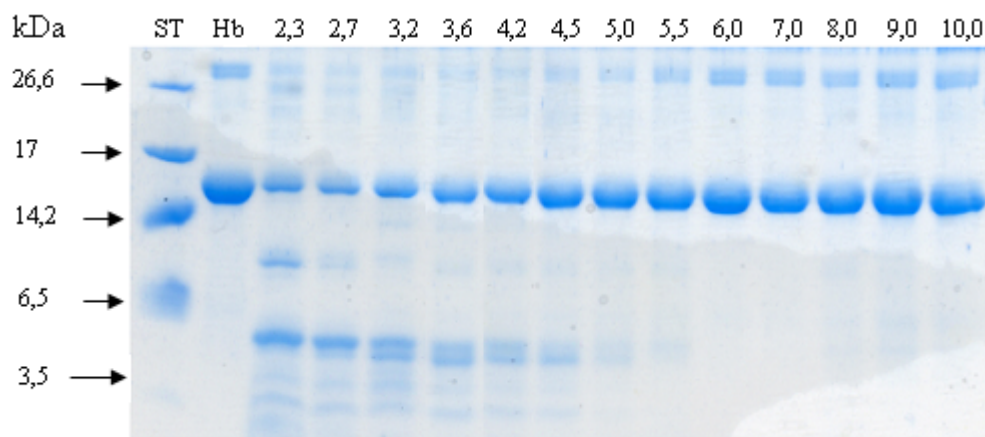


Obr. 28: Degradace hemoglobinu pomocí IrKatD při pH 4,0 v závislosti na délce inkubace. Vzorky byly analyzovány na Tricin SDS-PAGE a gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. V jednotlivých drahách je hemoglobin (16 kDa) degradován po dobu (1-16 h) uvedenou v popise. K – kontrola, nedegradovaný hemoglobin.

4.1.5.4 Závislost degradace hemoglobinu na pH

Hemoglobin byl inkubován 4 h s IrKatD v pufrech o pH 2,3-10,0. Poté byla degradace hemoglobinu analyzována pomocí Tricin SDS-PAGE (obr. 29, str. 62). K degradaci hemoglobinu pomocí IrKatD dochází v intervalu pH 2,3-5,5 s nejintenzivnějším štěpením kolem pH 3. V tomto intervalu pH se objevují pásy degradovaného hemoglobinu s molekulovou hmotností 3,5-5 kDa. Dále se v oblasti pH od

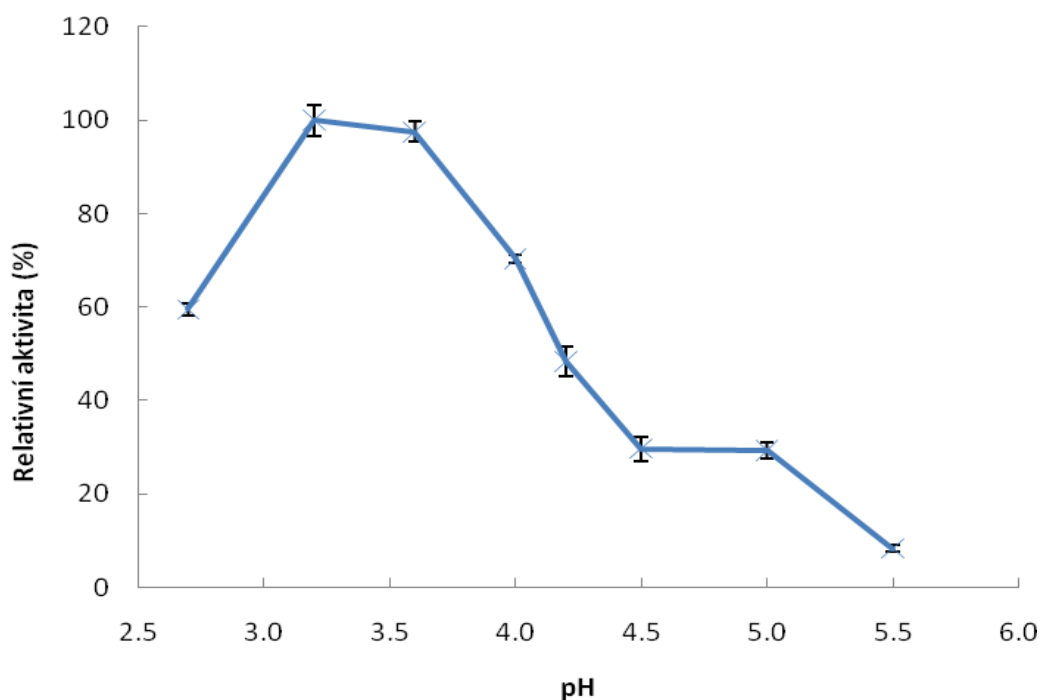
2,3-2,7 objevují také slabé pásy o molekulové hmotnosti $> 6,5$ kDa, v této extrémně kyselé oblasti nedochází tedy k tak intenzivní fragmentaci. Při pH 6,0 a výše nedocházelo k žádné významné degradaci hemoglobinu (obr. 29).



Obr. 29: pH optimum degradace hemoglobinu pomocí IrKatD. Degradace hemoglobinu probíhala 4 h ve škále pufrů (kap. 3.3.5.7) o různém pH (uvedeno v popisce). Vzorky byly analyzovány a gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue G250.

Dráha: ST Standardy molekulových hmot v kDa
Hb nedegradovaný hemoglobin

Degradace hemoglobinu pomocí IrKatD byla dále analyzována pomocí kvantitativního testu s fluoreskaminovou detekcí (obr. 30, str. 63). Fluoreskamin reaguje s nově vzniklými N-konci fragmentů hemoglobinu za vzniku fluorescenčního produktu. Množství fluorescenčně modifikovaných fragmentů hemoglobinu bylo stanoveno měřením fluorescence. Touto analýzou bylo ukázáno, že hemoglobin je degradován pomocí IrKatD v kyselém pH v rozmezí 2,3-5,5. Optimální podmínky pro degradaci hemoglobinu jsou při pH 3,2-3,7. Při přechodu k zásaditějším hodnotám pH dochází k prudkému poklesu degradace hemoglobinu.



Obr. 30: pH optimum degradace hemoglobinu pomocí IrKatD měřené pomocí kvantitativního testu s fluoreskaminovou detekcí. Degradace hemoglobinu probíhala v pufru 0,05 M Na-acetát pH 2,7-5,5 (osa x), a byla detekována derivatizací nově vzniklých N-konců fluoreskaminem za vzniku fluorescenčního produktu. Míra fluorescence je vyjádřena v relativních fluorescenčních jednotkách normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

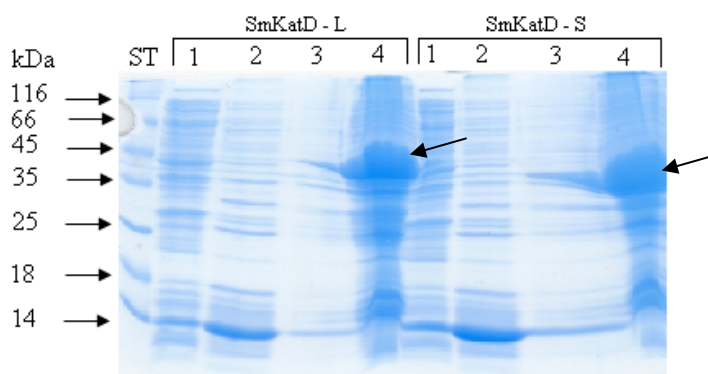
4.2 Katepsin D ze *Schistosoma mansoni* (SmKatD)

4.2.1 Příprava rekombinantního SmKatD

Katepsin D z krevničky *S. mansoni* (SmKatD) byl klonován do plasmidu pET100 D-TOPO (Invitrogen) jako proenzym ve dvou variantách: s C-koncovou doménou o délce 43 aminokyselinových zbytků a bez C-koncové domény. Tyto varianty byly dále označovány jako SmKatD-S (bez C-koncové domény) a SmKatD-L (s C-koncovou doménou). Plasmidy obou forem poskytl Dr. J. Dvořák z Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

4.2.1.1 Expres v *E. coli*

Kultura *E. coli* byla transformována vektorem nesoucím SmKatD-S resp. SmKatD-L a buňky byly kultivovány při 37°C. Indukce exprese byla provedena přidáním IPTG a kultivace byla zastavena po 5 h. Poté byly buňky sklizeny a následovala dezintegrace a promytí buněk podle postupu popsaného v kapitole 3.3.1.2. Supernatanty z dezintegrace a promývacích kroků a inkluzní tělíska (rozpuštěná v roztoku 8 M močoviny) byly analyzovány na SDS-PAGE (obr. 31). Z tohoto experimentu je zřejmé, že u obou forem rekombinantního SmKatD se většina exprimovaného proteinu (38 resp. 42 kDa) akumulovala v inkluzních tělískách (dráha 4).



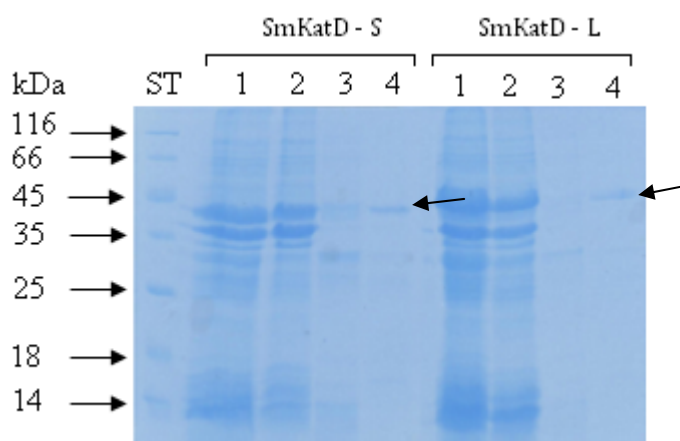
Obr. 31: Příprava inkluzních tělísek po expresi SmKatD-S a SmKatD-L v *E. coli*. Na 15% gelu SDS-PAGE byly analyzovány vzorky supernatantů získané během dezintegrace buněk a izolace inkluzí. Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. Šipky označují pozici exprimovaného rekombinantního proteinu.

Dráha:	ST	Standardy molekulových hmot v kDa
	1	Supernatant S1 po centrifugaci lyzovaných buněk
	2	Supernatant S2 po 1. promytí inkluzí (1 M NaCl)
	3	Supernatant S3 po 2. promytí inkluzí (1,5 M NaCl)
	4	Inkluzní tělíska rozpuštěná v roztoku 8 M močoviny

4.2.1.2 Purifikace SmKatD z inkluzních tělísek

Pro purifikaci zymogenu SmKatD-S a SmKatD-L (pro-SmKatD-S resp. pro-SmKatD-L) z inkluzních tělísek byla použita afinitní chromatografie na koloně s nosičem Ni-NTA Superflow. Chromatografický nosič interaguje s histidinovou kotvou, umístěnou na N-konci konstruktů rekombinantního proteinu. K vytěsnění proteinů z Ni-NTA nosiče se používá 250 mM imidazol, který kompetuje s histidinovou kotvou.

Inkluze (6 g) byly rozpuštěny a naneseny na kolonu Ni-NTA Superflow. Výsledné množství prokatepsinu D po purifikaci na koloně Ni-NTA činí: SmKatD-S = 650 mg; SmKatD-L = 630 mg. Frakce z jednotlivých promývacích a elučních kroků byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 32).



Obr. 32: SDS-PAGE analýza purifikace zymogenu SmKatD-S a SmKatD-L z inkluzních tělísek na koloně Ni-NTA Superflow. Na 15% gelu SDS-PAGE jsou vybrané frakce z jednotlivých chromatografických kroků. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. Šipka označuje pozici exprimovaného rekombinantního proteinu.

Dráha:	ST	Standardy molekulových hmot v kDa
	1	Nanášený vzorek
	2	Nenavázaný materiál
	3	Promytí ekvilibračním pufrem s obsahem 20 mM imidazolu
	4	Eluce pufrem s obsahem 250 mM imidazolu

4.2.2 Refolding SmKatD

4.2.2.1 Základní strategie pro refolding SmKatD

Výchozím materiálem byl rekombinantní pro-SmKatD-S a pro-SmKatD-L získaný přečištěním inkluzních tělísek (po expresi v bakterii *E. coli*) na koloně Ni-NTA Superflow.

Správné sbalení pro-SmKatD-S a pro-SmKatD-L bylo testováno pomocí tří variant refoldingu, které jsou podrobně popsány v kapitole 3.3.2.

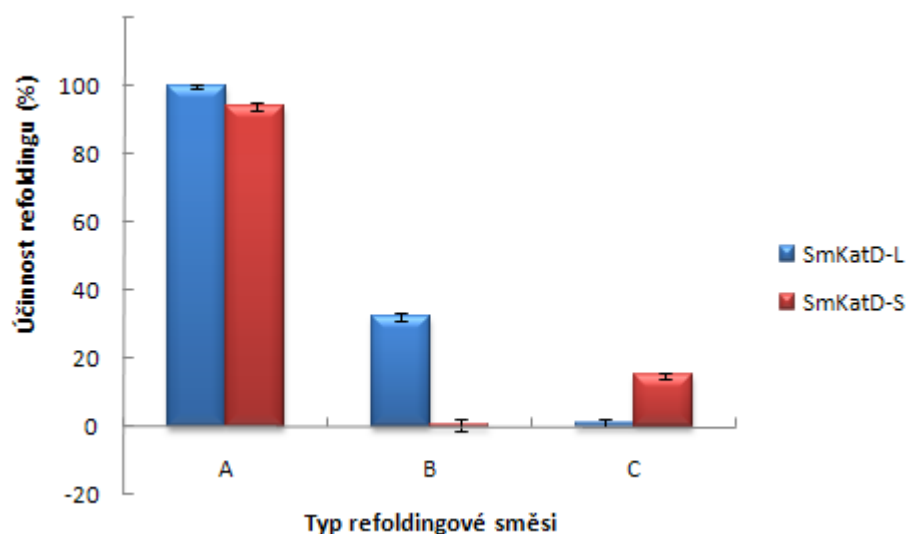
A) Pro-SmKatD-S resp. pro-SmKatD-L byl přidán do preinkubačního roztoku o složení: 50 mM GSH, 8 M močovina (uvedeny jsou finální koncentrace). Tento roztok byl přidán za stálého míchání do desetinásobného objemu refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG.

B) Pro-SmKatD-S resp. pro-SmKatD-L byl přidán do preinkubačního roztoku obsahujícího finálně 50% kyseliny octové. Poté byl tento roztok zředěn 25x chladnou vodou a smíchán s refoldingovou směsí o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol.

C) Pro-SmKatD-S resp. pro-SmKatD-L byl inkubován v refoldingové směsi o složení: 50 mM Na-acetát pH 3,6, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG.

Účinnost refoldingu pro-SmKatD-S a pro-SmKatD-L byla stanovena pomocí aktivitního testu s fluorogenním substrátem Abz-KPAEFF*AL. Měřena byla fluorescence, která vzniká při štěpení substrátu. Aktivitní test obsahoval úvodní inkubaci v kyselém pH, při které dochází ke konverzi neaktivního zymogenu na aktivní enzym (kap. 3.3.5.8).

Porovnáním aktivit SmKatD-S a SmKatD-L (obr. 33, str. 67) bylo zjištěno, že nejvyšší aktivita je ve variantě refoldingu popsané v bodě 2) zahrnující preinkubaci v přítomnosti 67% kyseliny octové následované refoldingem v 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol. Tato varianta refoldingové směsi byla dále optimalizována.

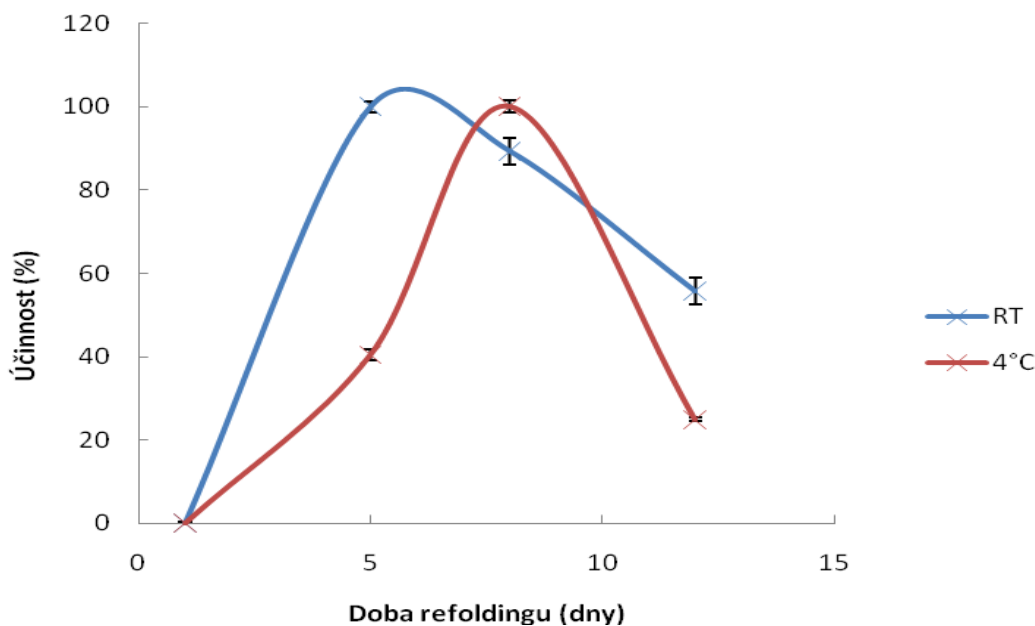


Obr. 33: Účinnost refoldingu pro-SmKatD-S a pro-SmKatD-L v závislosti na složení refoldingové směsi. Refolding probíhal 48 h ve třech variantách refoldingu (osa x): **A/** Preinkubace v přítomnosti 67% kyseliny octové následované refoldingem v 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol. **B/** Preinkubace v 50 mM GSH následovaná refoldingem v 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5 mM GSSG. **C/** Refolding v 50 mM Na-acetát pH 3,6, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG. Aktivita SmKatD-S a SmKatD-L byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.2.2 Optimalizace podmínek pro refolding SmKatD

1/ Závislost na době refoldingu

Optimalizace doby sbalování byla testována při koncentraci 20 g/ml proteinu v následujícím uspořádání: vzorek pro-SmKatD-L byl preinkubován v přítomnosti 67% kyseliny octové a dále inkubován v refoldingové směsi o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol. Doba refoldingu se pohybovala mezi 1-12 dnů a účinnost refoldingu pro-SmKatD-L se stanovovala pomocí aktivního testu, jako míra štěpení fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL, po předchozí aktivaci pro-SmKatD-L (obr. 34, str. 68). Dále byl testován vliv teploty prostředí, ve kterém refolding probíhá. Z experimentu vyplývá, že optimální doba sbalování proteinu při laboratorní teplotě činí 5 dnů a při 4°C byla naměřena optimální doba po 8 dnech.



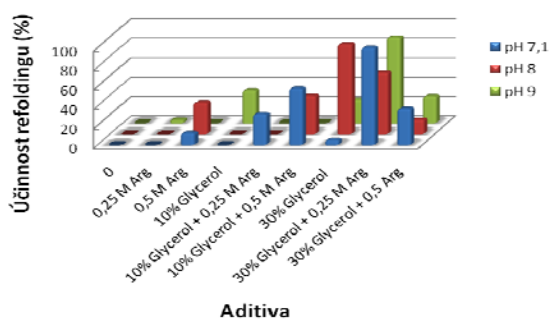
Obr. 34: Účinnost refoldingu pro-SmKatD-L v závislosti na době refoldování. Refolding 20 μ l SmKatD-L probíhal při laboratorní teplotě (RT) a 4°C po dobu 1-12 dní (osa x) v pufru o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol. Aktivita byla stanovena s fluorogenním substrátem Abz-IEF-F*RL. Aktivita enzymu byla měřena po aktivaci zymogenu a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

2/ Vliv pH a koncentrace glycerolu a argininu na účinnost refoldingu

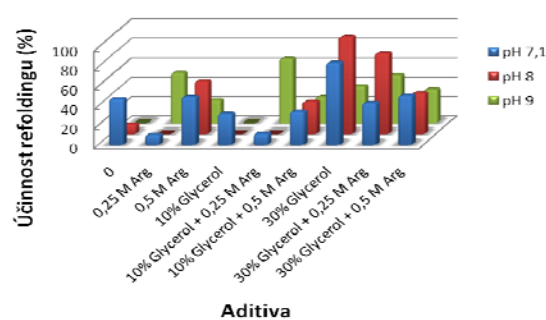
Testováno bylo 27 variant složení refoldingové směsi, které se lišily pH, koncentrací glycerolu a argininu, který usnadňuje sbalování řady proteinů. Preinkubační směs, jež obsahuje 67% kyselinu octovou, byla přidána do refoldingové směsi o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 7,1-9,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 0-30% glycerol, 0-0,5 M arginin (obr. 35 str. 69).

Účinnost refoldingu pro-SmKatD se stanovovala pomocí aktivního testu, jako míra štěpení fluorogenního substrátu Abz-KPAEFF*AL, po předchozí aktivaci pro-SmKatD. Dle obr. 35, str. 69 jsou nejvhodnější podmínky pro správné sbalení zymogenů v prostředí o složení: 0,5 M Tris-HCl pH 9,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol, 0,25 M arginin (pro SmKatD-S) a 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 30% glycerol (pro SmKatD-L). Nalezené optimální podmínky refoldingu byly používány pro další práci.

A/



B/



Obr. 35: Optimalizace podmínek pro refolding pro-SmKatD. **A/** SmKatD-S s koncentrací proteinu v refoldingové směsi: 20 g/ml. **B/** Obdobně zpracován pro SmKatD-L.

V grafech je uvedena účinnost sbalování v závislosti na pH a přidavku aditiv. Základní směs (v grafech označena jako 0) má složení: 0,5 M Tris-HCl pH 7,1/8,0/9,0, 0,05%, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG. Na ose x jsou uvedena aditiva modifikující základní směs.

Aktivita enzymů byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

5. Diskuse

Diplomová práce se zabývá aspartátovou proteasou katepsinem D ze dvou významných krev sajících parazitů: z klíštěte obecného *Ixodes ricinus* a z krevničky stěvní *Schistosoma mansoni*. Oba parazité se živí výhradně krví hostitele a hlavním zdrojem živin pro jejich růst a vývoj je především hemoglobin. Katepsin D je součástí komplexního proteolytického systému, který zahrnuje proteasy několika tříd a efektivně degraduje hemoglobin až na dipeptidy a aminokyseliny nezbytné pro metabolismus parazita. Katepsin D hraje roli především v první fázi degradace – fragmentaci intaktního hemoglobinu na velké fragmenty [104,128]. Klíště a krevnička jsou významnými z medicínálního hlediska. Klíště jako vektor závažných lidských patogenů (*Flavivirus*, *B. burgdorferi*) přenášených do těla hostitele ze slin klíšťat a krevnička jako endoparazit zodpovědný za závažné infekční onemocnění schistosomózu (bilharziózu). Katepsin D tedy představuje perspektivní molekulární cíl pro zásah do trávicího systému parazitů a jejich supresi s potenciálním využitím pro přípravu „protiklíštěcích“ vakcín a pro vývoj nových anti-schistosomálních chemoterapeutik.

Diplomová práce je zaměřena na získání aktivního rekombinantního IrKatD po expresi v *E. coli* a na následnou biochemickou charakterizaci. Zymogen IrKatD klíštěte byl získán jako denaturovaný protein z inkluzních tělísek. Dalším krokem bylo třeba najít optimální postup pro úspěšný refolding, tj. nalézt podmínky, při kterých by protein byl převeden do nativní konformace. Testovány byly tři základní varianty refoldingu, které se liší především ve složení refoldingové směsi [120,121,122]. Ukázalo se, že nejvhodnějším typem refoldingu je protokol označovaný jako „bazický“ refolding, stejně jako tomu bylo u příbuzných aspartátových proteas, např. u plasmepsinu z *Plasmodium falciparum* [127]. Prokatepsin D byl dále purifikován na iontoměničové FPLC chromatografii, přičemž byla separována správně sbalená forma zymogenu.

Dále byla studována aktivace IrKatD, tj. konverze zymogenu na aktivní formu enzymu, během které dojde k odštěpení N-koncového propeptidu zymogenu. Aktivace probíhala auto-aktivačním procesem v kyselém prostředí (pH 4,0). Aktivace byla sledována měřením enzymové aktivity a rovněž na proteinové úrovni pomocí SDS-PAGE a dále určením N-koncové aminokyselinové sekvence. IrKatD se auto-aktivuje odštěpením celého propeptidu o délce 43 aminokyselin, přechodné intermediáty dokazující postupnou fragmentaci nebyly nalezeny. Aktivace IrKatD se tak liší od aktivace lidského katepsinu D,

který se nemůže auto-katalyticky aktivovat na zralý katepsin D. Při auto-aktivaci proenzymu lidského katepsinu D se odštěpuje pouze 26 aminokyselin z propeptidu za vzniku intermediátu zvaného pseudokatepsin D. Celý propeptid nebo zbytek propeptidu u pseudokatepsinu D je odštěpen asistovanou proteolýzou pomocí jiné proteasy [52,53].

Biochemická charakterizace IrKatD byla provedena po purifikaci aktivovaného enzymu na iontoměničové FPLC chromatografii. Bylo určeno pH optimum, substrátová a inhibiční specifita. Byly použity peptidové substráty Abz-IEF-F*RL a Abz-KPAEFF*AL a hemoglobin. Oba peptidové substráty jsou štěpeny katepsinem D s pH optimem v rozmezí pH 3,5-4,0. Tyto data odpovídají výsledkům získaných při měření pH závislosti aktivity nativního IrKatD v extraktu střevní tkáně *I. ricinus* [93].

Přirozeným substrátem IrKatD je hemoglobin. Analýzou degradace hemoglobinu na Tricin SDS-PAGE se podařilo potvrdit skutečnost, že IrKatD má endopeptidasovou aktivitu a podílí se na počáteční fázi degradace hemoglobinu. Hemoglobin o molekulové hmotnosti 16 kDa byl štěpen pomocí IrKatD na vysokomolekulární fragmenty o molekulových hmotnostech 10 kDa a 5 kDa a pak na fragmenty o molekulové hmotnosti 3,5 kDa, které už dále nejsou degradovány IrKatD (*in vivo* v jejich degradaci pokračují pravděpodobně exopeptidasy [104]). Stejně tak byl určen pH profil degradace hemoglobinu pomocí IrKatD, využilo se analýzy na Tricin SDS-PAGE a kvantitativního testu s fluoreskaminovou kvantifikací N-konců nově vzniklých fragmentů. Obě metody dokazují, že je hemoglobin degradován v kyselé oblasti s pH optimem v rozmezí pH 3,0-3,5.

Pro studium inhibiční specifity byla použita sada skupinově selektivních inhibitorů. Aktivita IrKatD byla zcela inhibována pestatinem a PDI. Pepstatin je inhibitor aspartátových proteas izolovaný z *Actinomyces*. PDI je inhibitor katepsinu D izolovaný z brambor *Solanum tuberosum*, který je specifický pro aspartátové proteasy typu katepsinu D, což umožňuje funkčně zařadit IrKatD do této skupiny enzymů. Lopinavir, inhibitor retrovirových aspartátových proteas, inhiboval IrKatD pouze částečně, což lze vysvětlit nižší homologií retropepsinů a pepsinových proteas, kam IrKatD patří.

Stejně tak jako IrKatD je katepsin D z krevničky střevní (SmKatD) hlavním enzymem, jež zahajuje degradaci hemoglobinu v trávicím traktu tohoto parazita. Rozdílem SmKatD od ostatních aspartátových proteas rodiny pepsinu je přítomnost dvou izoenzymů SmKatD v genomu, které se liší strukturou C-konce molekuly. Kromě standardního izoenzymu je přítomna neobvyklá forma katepsinu D obsahující navíc C-koncovou

doménu ve struktuře, která prodlužuje enzym o 43 aminokyselin. Funkce této C-koncové domény není známa a její vliv na biochemické vlastnosti vyžaduje srovnávací analýzu obou forem enzymu. Cílem této práce bylo připravit expresní systém pro produkci těchto proteinů umožňujících v dalším období funkční a strukturní analýzu.

Zymogeny obou forem SmKatD-S a SmKatD-L byly exprimovány v *E. coli* a následně purifikovány z inkluzních tělísek afinitní chromatografií na koloně Ni-NTA. V dalším kroku byly testovány vhodné podmínky, které by umožnily sbalit denaturovaný enzym do nativní konformace. Ukázalo se, že nejvhodnější podmínky pro refolding SmKatD (na rozdíl od IrKatD) umožňuje protokol, který obsahuje ředící krok v kyselém prostředí a bazickou inkubaci. Takto získané preparáty SmKatD byly proteolyticky funkční po předchozí auto-aktivaci v kyselém pH.

6. Závěr

Diplomová práce se zabývala aspartátovou proteasou typu katepsinu D ze dvou krev sajících parazitů, krevničky střešní *Schistosoma mansoni* a klíštěte obecného *Ixodes ricinus*. Tyto proteiny byly připraveny rekombinantní expresí a byly biochemicky charakterizovány.

Katepsin D z *I. ricinus* (IrKatD):

Byl sestaven protokol pro optimální refolding zymogenu IrKatD připraveného z inkluzních tělísek expresního systému v *Escherichia coli*. Dále byly určeny podmínky (doba a pH prostředí) umožňující auto-aktivaci tohoto neaktivního zymogenu, při níž dochází k odštěpení aktivačního peptidu (propeptidu). Takto připravený enzymaticky aktivní IrKatD byl purifikován pomocí iontoměničové chromatografie.

Funkční vlastnosti IrKatD byly studovány pomocí aktivního testu s fluorogenním substrátem a bylo určeno pH optimum hydrolýzy, které je v intervalu pH 3,7-4,0. Substrátová analýza dále zahrnovala stanovení pH optima degradace hemoglobinu jako fyziologického proteinového substrátu, které bylo analyzováno na Tricin SDS-PAGE a kvantitativním testem s fluoreskaminovou detekcí. Tímto bylo prokázáno, že se IrKatD chová jako endopeptidasa, která je schopná zahájit degradaci hemoglobinu. Dále byla určena inhibiční specificita IrKatD a byla zjištěna interakce s pepstatinem (skupinový inhibitor aspartátových proteas), PDI (katepsin D inhibitor z brambor) a částečně Lopinavirem (inhibitor HIV proteasy).

Katepsin D ze *S. mansoni* (SmKatD):

SmKatD existuje ve dvou izoenzimech lišících se přítomností C-koncové domény. Sekvence kódující tyto formy SmKatD byly klonovány do plasmidu pET100/D-TOPO[®], který byl použit pro expresi v systému *E. coli*. Produkované proteiny byly izolovány z inkluzních tělísek pomocí afinitní chromatografie za denaturačních podmínek.

Byly nalezeny optimální podmínky pro refolding obou izoenzymů SmKatD. Tento protokol je založen na ředění v kyselém pH v přítomnosti oxidačně-redukčního

systemu obsahujícího glutathionu a na bazické inkubaci. Auto-aktivací byly připraveny enzymaticky aktivní formy SmKatD.

7. Použitá literatura

- [1] <http://www.who.int/inf-fs/en/fact115.html> (15.12.2009)
- [2] Volf P., Horák P. a kolektiv: Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha (2007)
- [3] Hubálek Z., Mikrobiální zoonózy a sapronózy, skriptum PřF MU Brno, str. 153 (2000)
- [4] <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com> (23.1.2010)
- [5] <http://www.naturfoto.cz/kliste-obecne-fotografie-5743.html> (12.4.2010)
- [6] Rosický B., Černý V., Daniel M., Dusbábek F., Palička P., Samšišák K.: Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka. Academia, Praha, str. 41-46 (1979)
- [7] http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ixodes_ricinus.pdf (8.4.2010)
- [8] <http://www.cdc.gov/Ncidod/eid/vol6no4/fournierG1.htm> (12.1.2010)
- [9] Encyclopedic reference of parasitology (<http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/frame.php>) (28.3.2010)
- [10] Hoogstraal H.: Adv Parasitol 24, 135-138 (1985)
- [11] Nutall P. A.: Zentralbl Bakteriol 289, 492-505 (1999)
- [12] Schneider H.: Wiener Klin Wschr 44, 350-352 (1931)
- [13] Haglund M., Gunther G.: Vaccine 21, S1/11-S1/18 (2003)
- [14] Zinoviev A. S., Konev V. P., Kvetkova E. A., Shamanin V. A., Polishuk T. I.: Ark Patol 6, 25-28 (1996)
- [15] Dumpis U., Crook D., Oksi J.: Clin Infect Dis 28, 882-890 (1999)
- [16] Steere A. C., Bartenhagen N. H., Craft J. E., Hutchinson G. J., Newman J. H., Rahn D. W., Sigal L. H., Spieler P. N., Stenn K. S., Malawista S. E.: Ann Intern Med 99, 76-82 (1983)
- [17] <https://www.msu.edu/course/zol/316/sspptax.htm> (28.3.2010)
- [18] <http://biology.unm.edu/biology/esloker/grants/schisto.html> (26.3.2010)
- [19] www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/schisto_distribution.html (18.4.2010)
- [20] Xu X., Dresden M. H.: J Parasitol 72, 507-511 (1986)
- [21] Christensen N. O.: Acta Tropica 37, 303-318 (1980)
- [22] Daniel B. E., Preston T. M., Southgate V. R.: Parasitol 104, 41-49 (1992)
- [23] Granzer M., Haas W.: Int J Parasitol 16, 575-579 (1986)
- [24] Schmidt G. D., Robert L. S.: Foundations of parasitology, McGraw-Hill, Singapore (2006)

- [25] http://dbs.umt.edu/courses/biol103/labs/Christian/4b_inverts_and_hydra.htm
(1.4.2010)
- [26] Foster L. A., Bogitsh B. J.: *J Parasitol* 72, 669-676 (1986)
- [27] Dalton J. P., Smith A. M., Cloug K. A., Brindley P. J.: *Parasitol Today* 11, 299-303
(1995)
- [28] Fujino T.: Structure and function of the alimentary tract in trematodes, v knize
Advances in trematode biology, (Fried B., Graczyk T. K. eds.) CRC Press, Boca
Raton str. 87-115 (1997)
- [29] Rogers S. H., Bueding E.: *Int J Parasitol* 5, 369-571 (1975)
- [30] Cornford E. M., Bocash W. D., Oldendorf W. H.: *J Parasitol* 67, 24-30 1982
- [31] Kassai T.: *Vet Parasitol* 29, 299-326 (1988)
- [32] Columbia encyclopedia (<http://Columbia.Thefreedictionary.com/bilharziosis>)
(3.3.2010)
- [33] <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=9101067>
(28.3.2010)
- [34] Soneshine D. E., Hynes W. L., Cerual S. M., Mitchell R., Benzine T.: *Exp Appl
Acarol* 36, 207-223 (2005)
- [35] Sajid M., McKerrow J. H.: *Mol Biochem Parasitol* 120, 1-21 (2002)
- [36] Blundell T. L., Johnson M. S.: *Protein Sci* 2, 877-883 (1993)
- [37] Davies D. R.: *Annu Rev Biophys Chem* 19, 189-215 (1990)
- [38] Rawlings N. D., Morton F. R., Barrett A. J.: *Nucleic Acid Res* 34, 270-272 (2006)
- [39] Mutlu A., Gal S.: *Physiol Plant* 105, 569-576 (1999)
- [40] Simoes I., Carlos F.: *Eur J Biochem* 271, 2067-2075 (2004)
- [41] Laudon H., Winblad B., Naslund J.: *Physiol Behav* 92, 115-120 (2007)
- [42] Barbano D. M., Rasmussen R. R.: *J Dairy Sci* 75, 1-12 (1992)
- [43] Chitpinyol S., Crabbe M. J. C.: *Food Chem* 61, 395-418 (1998)
- [44] Kitts D. D., Weiler K.: *Curr Pharm Des* 9, 1309-1323 (2003)
- [45] Laloï M., McCarthy J., Morandi O., Gysler Ch., Bucheli P.: *Planta* 215, 754-762
(2002)
- [46] Ohtani H.: *New Food Ind* 30, 65-79 (1998)
- [47] Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H.: *Biochem
Cell Biol* 80, 109-112 (2002)
- [48] Cooper J. B.: *Curr Drug Targets* 3, 155-173 (2002)

- [49] Scott B. B., McGeehan G. M., Harrison R. K.: *Curr Protein Pept Sci* 7, 241–254 (2006)
- [50] Coombs G. H., Goldberg D. E., Klemba M., Berry C., Kay J., Mottram J. C.: *Trends Parasitol* 17, 532–537 (2001)
- [51] Benes P., Vetvicka V., Fusek M.: *Crit Rev Oncol Hematol* 68, 12–28 (2008)
- [52] Zaidi N., Kalbacher H.: *Biochem Biophys Res Commun* 367, 517–522 (2008)
- [53] Dominguez D. I., Hartmann D., De Strooper B.: *Neurodegener Dis* 1, 168–174 (2004)
- [54] Vassar R.: *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1589–1602 (2002)
- [55] Horimoto Y., Dee D. R., Yada R. Y.: *Nat Biotechnol* 25, 318–324 (2009)
- [56] Koelsch G., Mares M., Metcalf P., Fusek M.: *FEBS Lett* 343, 6–10 (1994)
- [57] Foltmann B.: *Biol Chem* 369, 311–314 (1988)
- [58] Richter C., Tanaka T., Yada R. Y.: *Biochem J* 335, 481–490 (1998)
- [59] James M. N. G., Sielecki A. R.: *Nature* 319, 33–38 (1986)
- [60] Hartsuck J. A., Koelsch G., Remington S. J.: *Proteins* 13, 1–25 (1992)
- [61] Foltmann B., Pedersen V. B.: *Adv Exp Med Biol* 95, 3–22 (1977)
- [62] Ahmad F., McPhie P.: *Int J Pept Protein Res* 12, 155–163 (1978)
- [63] Bernstein N. K.: *Nat Struct Biol* 6, 32–37 (1999)
- [64] Dunn B. M.: *Chem Rev* 102, 4431–4458 (2002)
- [65] Sielecki A. R., Fedorov A. A., Boodhoo A., Andreeva N. S., James M. N.: *J Mol Biol* 214, 143–170 (1990)
- [66] James M. N. G., Sielecki A. R.: *Biochemistry* 24, 3701–3713 (1985)
- [67] <http://www.dschi.univ.trieste.it/~benedetti/mechanism.gif> (26. 4. 2010)
- [68] Inouye K., Voynick I. M., Delpierre G. R., Fruton J. S.: *Biochemistry* 5, 2473–2483 (1966)
- [69] Powers J. C., Harley A. D., Myers D. V.: *Adv Exp Med Biol* 95, 141–157 (1977)
- [70] Dunn B. M., Hung S.: *Biochem Biophys Acta* 1477, 231–240 (2000)
- [71] Aoyagi T., Kunitomo S., Morishima H., Takeuchi T., Umezawa H.: *J Antibiot (Tokyo)* 24, 687–694 (1971)
- [72] Conner G. E.: *Biochem J* 263, 601–604 (1989)
- [73] Majer P., Collins J. R., Gulnik S. V., Erickson J. W.: *Protein Sci* 6, 1458–1466 (1997)
- [74] Rich D. H., Sun E. T.: *Biochem Pharmacol* 29, 2205–2212 (1980)

- [75] Li M., Phylip L. H., Lees W. E., Winther J. R., Dunn B. M., Wlodawer A., Kay J., Gustchina A.: *Nat Struct Biol* 7, 113-117 (2000)
- [76] Mares M., Meloun B., Pavlik M., Kostka V., Baudys M.: *FEBS Lett* 251, 94-98 (1989)
- [77] Ng K. K., Petersen J. F., Cherney M. M., Garen C., Zalatoris J. J., Rao-Naik C., Dunn B. M., Martzen M. R., Peanasky R. J., James M. N.: *Nat Struct Biol* 7, 653-657 (2000)
- [78] Christeller J. T., Farley P. C., Ramsay R. J., Sullivan P. A., Laing W. A.: *Eur J Biochem* 254, 160-167 (1998)
- [79] Shoichet B. K., Baase W. A., Kuroki R., Matthews B. W.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 452-456 (1995)
- [80] Press E. M., Porter R. R., Cebra J.: *Biochem J* 74, 501-514 (1960)
- [81] Malik M., Sheikh A. M., Wen G., Spivack W., Brown W. T., Li X.: *Immunobiol*, in press (2010) doi:10.1016/j.imbio.2010.03.001
- [82] Conner G. E.: *J Biol Chem* 267, 21738-21745 (1992)
- [83] Hasilik A., von Figura K., Conzelmann E., Nehr Korn H., Sandhoff K.: *Eur J Biochem* 125, 317-321 (1982)
- [84] Briozzo P., Morisset M., Capony F., Rougeot C., Rochefort H.: *Cancer Res* 48, 3688-3692 (1988)
- [85] Larsen L. B., Boisen A., Petersen T. E.: *FEBS Lett* 319, 54-58 (1993)
- [86] Wittlin S., Rösel J., Hofmann F., Stover D. R.: *Eur J Biochem* 265, 384-393 (1999)
- [87] Vetvička V., Vetvičková J., Fusek M.: *Cancer Lett* 79, 131-135 (1994)
- [88] Máša M., Marešová L., Vondrášek J., Horn M., Ježek J., Mareš M.: *Biochemistry* 45, 15474-15482 (2006)
- [89] Woessner J. F. Jr., Shamberger R. J. Jr.: *J Biol Chem* 246, 1951-1960 (1971)
- [90] Baldwin E. T., Bhat T. N., Gulnik S., Hosur M. V., Sowder R. C., Cachau R. E., Collins J., Silva A. M., Erickson J. W.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6796-6800 (1993)
- [91] Hasilik A., von Figura K.: *Eur J Biochem* 121, 125-129 (1981)
- [92] Boldbaatar D., Sikasunge, S. C., Battsetseg B., Xuan X., Fujisaki K.: *Insect Biochem Mol Biol* 36, 25-36 (2006)
- [93] Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdusek O., Caffrey C. R., Mares M., Kopáček, P.: *Parasit Vectors* 18, 1-7 (2008)

- [94] Logullo C., Vaz Ida S., Sorgine M. H., Paiva-Silva G. O., Faria F. S., Zingali R. B., De Lima M. F., Abreu L., Oliveira E. F., Alves E. W., Masuda H., Gonzales J. C., Masuda A., Oliveira P. L.: *Parasitol* 116, 525–532 (1998)
- [95] Sorgine M. H., Logullo C., Zingali R. B., Paiva-Silva G. O., Juliano L., Oliveira P. L.: *J Biol Chem* 275, 28659–28665 (2000)
- [96] Sappington T. W., Raikhel A. S.: *Insect Biochem Mol Biol* 28, 277–300 (1998)
- [97] Diehl P. A., Aeschlimann A., Obenchain F. D.: *Physiology of ticks*. Pergamon Press, Oxford, str. 277–350 (1982)
- [98] Campos E., Moraes J., Facnha A. R., Moreira E., Valle D., Abreu L., Manso P. P. A., Nascimento A., Pelajo-Machado M., Lenzi H., Masuda A., Vaz Jr., I., Logullo C.: *Vet Parasitol* 138, 349–357 (2006)
- [99] Medina M., Leon P., Vallejo C. G.: *Arch Biochem Biophys* 263, 355–363 (1988)
- [100] Fagotto F.: *Arch. Insect Biochem Physiol* 14, 217–235 (1990)
- [101] Seixas A., Dos Santos P. C., Velloso F. F., Da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Horn F., Termignoni C.: *Parasitol* 126, 155–163 (2003)
- [102] Fialho E., Nakamura A., Juliano L., Masuda H., Silva-Neto M. A.: *Arch Biochem Biophys* 436, 246–253 (2005)
- [103] Abreu A. L., Valle D., Manso P. P. A., Fac A. R., Pelajo-Machado M., Masuda H., Masuda S., Vaz Jr. I., Lenzi H., Oliveira P. L., Logullo C.: *Insect Biochem Mol Biol* 34, 443–449 (2004)
- [104] Horn M., Nussbaumerová M., Šanda M., Kovářová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C. R., Kopáček P., Mareš M.: *Chem Biol* 16, 1053–1063 (2009)
- [105] Barrett A. J., Rawlings D., Woessner J. F.: *Handbook of Proteolytic Enzymes*., Academic Press, Oxford, str. 801–805 (1998)
- [106] Takahashi S. Y., Yamamoto Y., Shionoya Y., Kageyama T.: *J Biochem* 114, 267–272 (1993)
- [107] Fagotto F., Maxfield F. R.: *J Cell Sci* 107, 3325–3337 (1994)
- [108] Liu X. D., McCarron R. C., Nordin J. H.: *J Biol Chem* 271, 33344–33351 (1997)
- [109] Yamahama Y., Uto N., Tamotsu S., Miyata T., Yamamoto Y., Watabe S., Takahashi S. Y.: *J Insect Physiol* 49, 131–140 (2003)
- [110] Butler J. E., Hamilton W. C., Sasser R. G., Ruder C. A., Hass G. M., Williams R. J.: *Biol Reprod* 26, 925–933 (1982)

- [111] Nascimento-Silva M. C., Leal A. T., Daffre S., Juliano L., da Silva Vaz I. Jr., Paiva-Silva G. de O., Oliveira P. L., Sorgine M. H.: *Comp Biochem Physiol, Part B* 149, 599–607 (2008)
- [112] Giorgi F., Bradley J. T., Nordin J. H.: *Micron* 30, 579–596 (1999)
- [113] Fagotto F.: *J Cell Sci* 108, 3645–3647 (1995)
- [114] Renard G., Garcia J. F., Cardoso F. C., Richter M. F., Sakanari J. A., Ozaki L. S.: *Insect Biochem Mol Biol* 30, 1017–1026 (2000)
- [115] Wong J. Y. M., Harrop S. A., Day S. R., Brindley J. P.: *Biochem Biophys Acta* 1338, 156–160 (1997)
- [116] Harrop S. A., Prociv P., Brindley J. P.: *Biochem Biophys Res Comm* 227, 294–302 (1996)
- [117] Laurent F., Bourdieu C., Kaga M., Chilmonczyk S., Zgrzebski G., Yvone P., Pery P.: *Mol Biochem Parasitol* 62, 303–312 (1993)
- [118] Koehler J. W., Morales M. E., Shelby B. D., Brindley J. P.: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 83–85 (2007)
- [119] Becker M., Harrop S. A., Dalton J. P., Kalinna B. H., McManus D. P., Brindley J. P.: *J Biol Chem* 270, 24496–24501 (1995)
- [120] Sijwali P. S., Shenai B. R., Gut J., Singh A., Rosenthal P.: *J Biochem* 360, 481–489 (2001)
- [121] Sadhukhan R., Leone J. W., Lull J., Wang Z., Kletzien R. F., Henrikson R. L., Tomasselli A. G.: *Protein Expr Purif* 46, 299–308 (2006)
- [122] Paerson M. S., Bethony J. M., Pickering D. A., Oliveira L. M., Jariwala A., Santiago H., Miles A. P., Zhan B., Jiang D., Ranjit N., Mulvenna J., Tribolet L., Plieskatt J., Smith T., Bottazzi M. E., Jones K., Keegan B., Hotez P. J., Loukas A.: *FASEB J* 23, 3007–3019 (2009)
- [123] Bradford M. M.: *Anal Biochem* 82, 248–254 (1976)
- [124] Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680–685 (1970)
- [125] Blakesley R. W., Boezy J. A.: *Anal Biochem* 82, 580–582 (1977)
- [126] Schägger H.: *Nat Protocol* 1, 16–22 (2006)
- [127] Hill, J., Tyas, L., Phylip, L. H., Kay, J., Dunn, B. M., Berry, C.: *FEBS Lett* 352, 155–158 (1994)
- [128] Delcroix M., Sajid M., Caffrey C. R., Lim K. C., Dvorak J., Hsieh I., Bahgat M., Dissous C., McKerrow J. H.: *J Biol Chem* 281, 39316–39329 (2006)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka