

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



**Strukturní a funkční analýza katepsinu B1
z krevničky *Schistosoma mansoni***

Mgr. Adéla Jílková

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Praha, 2014

Obsah

Seznam zkratk	1
Abstrakt	2
1. Úvod	3
2. Cíle práce	4
3. Materiál a metodika	5
3.1. Materiál a laboratorní vybavení	5
3.2. Metodika	5
4. Výsledky a diskuze	6
4.1. Publikace č. 1: Mapping the Pro-Peptide of the <i>Schistosoma mansoni</i> Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors	6
4.2. Publikace č. 2: Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, <i>Schistosoma mansoni</i>	7
4.3. Publikace č. 3: Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic <i>Schistosoma mansoni</i> Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors	7
4.4. Rukopis č. 4: Activation Route of the <i>Schistosoma mansoni</i> Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch	8
4.5. Publikace č. 5: Katepsinové proteasy v patologii	8
5. Závěry	9
6. Použitá literatura	10
Curriculum vitae	12
Seznam publikací	14

Seznam zkratk

CCP4	“Collaborative Computational Project No. 4”, software
FRET	“Fluorescence Resonance Energy Transfer”
$\Delta G'_{cov}$	rozdíl volné energie mezi kovalentním a nekovalentním komplexem
HB	“heparin-binding”, vázající heparin
IC₅₀	koncentrace inhibitoru potřebná k dosažení 50% inhibice enzymu
k_{2nd}	rychlostní konstanta 2. řádu
k_{cat}	číslo přeměny
k_{cat}/K_m	katalytická účinnost enzymu
K_i	inhibiční konstanta
K_m	Michaelisova konstanta
K11777	N-methyl-piperazin-Phe-homoPhe-vinylsulfon-fenyl
PDB	“Protein Data Bank”, databáze proteinových struktur
PISA	“Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies”
RP-HPLC	“Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography”
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SmCB1	katepsin B1 ze <i>Schistosoma mansoni</i>
SP	sulfatovaný polysacharid
UCSF	“University of California San Francisco”
VS	vinylsulfon

Abstrakt

Schistosomóza je závažné infekční onemocnění postihující více než 200 milionů lidí v oblasti tropů a subtropů. Původcem je parazit krevnička, který žije v cévách člověka a živiny získává degradací hemoglobinu z krve hostitele působením trávicích proteas. V současnosti je k dispozici pouze jediný lék proti schistosomóze a hrozba vzniku rezistence vyvolává potřebu vývoje nových terapeutik. Katepsin B1 (SmCB1) je klíčovou trávicí proteasou krevničky střevní (*Schistosoma mansoni*) a představuje cílovou molekulu pro terapeutický zásah. Tato práce podává komplexní charakterizaci SmCB1 zaměřenou na vztah struktury a aktivity a na inhibiční regulaci s využitím šesti vyřešených krystalografických struktur molekulárních forem a komplexů SmCB1.

SmCB1 je syntetizován ve formě neaktivního zymogenu, ve kterém N-koncový propeptid působí jako přirozený intramolekulární inhibitor blokující aktivní místo. Detailní biochemickou a strukturní analýzou byl identifikován nový unikátní mechanismus procesu aktivace zymogenu, při kterém je propeptid odštěpen, a byla popsána regulace tohoto procesu pomocí glykosaminoglykanů. Studium proteolytické aktivity SmCB1 prokázalo, že se jedná o enzym působící jako endopeptidasa i exopeptidasa a představuje tak účinný nástroj pro trávení hemoglobinu hostitele. Významná část práce se zabývala vyhledáním účinných molekul pro inhibici SmCB1 a to s využitím dvou přístupů. Zaprvé byly navrženy a syntetizovány reverzibilní peptidové inhibitory odvozené ze struktury propeptidu, které jsou funkční *in vitro* v mikromolárních koncentracích. Zadruhé byly identifikovány peptidomimetické inhibitory s vinylsulfonovou reaktivní skupinou, které jsou funkční *in vitro* v nanomolárních koncentracích. Mechanismus jejich interakce byl detailně studován pomocí krystalových struktur komplexů s SmCB1 a s využitím metod výpočetní chemie. Účinnost vinylsulfonových inhibitorů byla prokázána *ex vivo* při supresi živých parazitů.

Závěrem, tato práce pomohla definovat SmCB1 jako cílovou molekulu pro supresi *S. mansoni* a přinesla nové typy inhibitorů pro potenciální vývoj léčiv proti schistosomóze.

1. Úvod

Schistosomóza je chronické onemocnění vyvolané parazity rodu krevnička (*Schistosoma*). Touto nemocí je infikováno více než 200 milionů lidí v tropických a subtropických oblastech světa a představuje závažný zdravotní i sociálně ekonomický problém [1-4]. Tři nejvýznamnější druhy krevničky ohrožující člověka jsou *Schistosoma mansoni* (krevnička střevní), *S. japonicum* (krevnička jaterní) a *S. haematobium* (krevnička močová). K infekci člověka dochází při kontaktu s kontaminovanou vodou, ve které se nacházejí infekční larvy krevničky schopné penetrace nepoškozenou kůží člověka. Přes tkáň se dostávají do krevního oběhu, kde rostou a vyvíjejí se v dospělé krevničky, které pak žijí v cévách obklopujících střevo nebo urogenitální trakt. Samička zde klade denně až tisíce vajíček, která jsou hlavním patogenním agens schistosomózy [5]. Imunitní odpověď na vajíčka způsobuje záněty, vznik granulomů, vede k poškození orgánů a při infekci bývá zvýšeno riziko vzniku rakoviny [6].

Proti schistosomóze v současnosti neexistuje žádná očkovací látka a pro léčbu se používá téměř výhradně lék praziquantel [7]. S ohledem na to, že praziquantel je jediný účinný lék a nepřetržitě se používá již více než 20 let, stále narůstá pravděpodobnost vzniku rezistence a potřeba vývoje nových alternativních léčiv [8-12]. Tento výzkum se v současnosti zaměřuje hlavně na porozumění biochemie parazita a jeho molekulárních drah a na hledání cílových molekul, zásadních a unikátních pro parazita, jejichž blokování by bylo pro parazita letální.

Proteasy hrají velmi důležitou úlohu ve všech vývojových stádiích krevničky, zejména při interakci s hostitelem. Účastní se procesů invaze do hostitele, migrace tkáněmi, degradace krevních proteinů v procesu trávení, překonání imunitního systému hostitele a aktivace a modulace zánětu [13]. Dospělé krevničky žijící v cévách člověka získávají živiny pro růst a vývoj odbouráváním krevních proteinů. Proteolytické trávení je pro přežití parazita zásadní a je předmětem intenzivního vědeckého výzkumu. Na degradaci hemoglobinu se podílí kaskáda trávicích enzymů z tříd cysteinových, serinových, aspartátových proteas a metaloproteas. Ve střevě krevničky *S. mansoni* byly identifikovány proteasy katepsin B1, katepsin C, katepsiny L1, L2 a L3, katepsin D, asparaginylendopeptidasa a leucylaminopeptidasa [14-21].

Katepsin B1 ze *S. mansoni* (SmCB1), kterým se zabývá tato práce, je nejvíce zastoupená proteasa ve střevě krevničky a hraje v degradaci hemoglobinu klíčovou roli [14;22]. Tento enzym působí komplexně jako endopeptidasa i exopeptidasa [14]. SmCB1 je cílová molekula pro léčbu schistosomózy, jak bylo prokázáno *in vivo* na myším modelu pomocí inhibitoru K11777 blokujícího aktivitu SmCB1 [23]. Účinné inhibitory SmCB1 tak představují perspektivní molekuly pro vývoj chemoterapeutik proti schistosomóze. Důkladná strukturně

funkční charakterizace SmCB1 předkládaná v této práci je nezbytná pro racionální design těchto nových inhibičních molekul a pro pochopení biochemických mechanismů aktivity a regulace SmCB1.

2. Cíle práce

Disertační práce se zabývá trávicí proteasou katepsinem B1 (SmCB1) z krevničky střešní (*Schistosoma mansoni*), způsobující závažné parazitární onemocnění schistosomózu. Tato proteasa má klíčovou roli při trávení krevních proteinů hostitele a představuje cílovou molekulu pro vývoj nových léčiv proti schistosomóze. Práce je zaměřena na strukturně funkční charakterizaci SmCB1, popis mechanismu aktivace zymogenu a nalezení účinných inhibitorů SmCB1 jako potenciálních chemoterapeutik.

Dílčí cíle této práce jsou:

1. Příprava SmCB1 rekombinantní expresí a jeho purifikace.
2. Určení krystalové struktury SmCB1.
3. Analýza substrátové specifity SmCB1 pomocí syntetických i přirozených substrátů.
4. Studium inhibice SmCB1 pomocí vinylsulfonových (VS) inhibitorů:
 - a) Určení inhibiční specifity SmCB1 pomocí sady syntetických VS inhibitorů.
 - b) Strukturní popis kritických interakcí mezi SmCB1 a VS inhibitory.
 - c) Zjištění biologické účinnosti VS inhibitorů na larvách *S. mansoni*.
 - d) Enzymologická analýza inhibičního mechanismu VS inhibitorů pro vývoj výpočetní metody skórování účinnosti inhibice.
5. Příprava syntetických peptidových inhibitorů SmCB1 odvozených ze struktury propeptidu.
6. Biochemická a strukturní analýza mechanismu aktivace zymogenu SmCB1.

3. Materiál a metodika

3.1. Materiál a laboratorní vybavení

Většina dat byla získána s využitím vybavení a přístrojů v laboratořích Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB AV ČR). Práce vznikla ve spolupráci s pracovištěm University of California, San Francisco (UCSF, Dr. C. Caffrey), které poskytlo sadu vinylsulfonových inhibitorů a kde byly provedeny biologické experimenty s larvami krevničky. Analýzy metodami výpočetní chemie byly prováděny ve spolupracujících laboratořích Dr. Lepšíka a Dr. Vondráška ÚOCHB AV ČR. Difrakční data pro řešení krystalografických struktur byla získána na synchrotronu na pracovištích (1) Helmholtz-Zentrum Berlin, Bessy II electron storage ring, Berlin-Adlershof, Německo a (2) Structural Biology Center, Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, U.S.A. Řešení krystalových struktur probíhalo ve spolupráci s laboratoří Dr. Řezáčové na ÚOCHB AV ČR.

Celkově bylo připraveno 5 konstruktů zymogenu SmCB1 v plasmidu pPICZ α pro expresi v kvasinkách *Pichia pastoris*: (1) přirozený SmCB1^{WT}, (2) deglykosylovaný SmCB1^{DG} se dvěma mutacemi v sekvenčních motivech pro N-glykosylaci (Thr168→Ala, Thr283→Ala), (3) SmCB1 obsahující mutace v motivu vázajícím heparin: SmCB1^{HepA} (Arg57→Ala, Arg59→Ala) a SmCB1^{HepN} (Arg57→Asn, Arg59→Asn) a (4) SmCB1 s mutací katalytického cysteinu v aktivním místě (Cys100→Ser100). Syntetické peptidy a FRET substráty byly připraveny na ÚOCHB AV ČR.

3.2. Metodika

Základní metody použité v přiložených publikacích jsou následující:

Metody molekulární biologie:

Klonování do plasmidu pPICZ α , cílená mutageneze SmCB1 konstruktů, transformace buněk *P. pastoris* (kmen X-33), rekombinantní exprese v *P. pastoris*.

Biochemické metody:

Elektroforetická separace proteinů pomocí SDS-PAGE a detekce proteinů na membráně metodou Western blot, vizualizace proteas pomocí proteomických aktivních prób, chromatografická purifikace proteinů pomocí FPLC, separace peptidů pomocí RP-HPLC, analýza proteinů a peptidů metodami termofluor, cirkulární dichroismus, hmotová spektrometrie a N-koncové sekvenování.

Enzymologické metody:

Měření aktivity enzymů pomocí syntetických fluorogenních a FRET substrátů, stanovení kinetických parametrů SmCB1 pro substráty (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) a inhibitory (K_i , IC_{50} , k_{2nd}).

Krystalografické metody:

Krystalizace proteinů metodou visící kapky, řešení struktur proteinů metodou molekulárního nahrazení, analýza krystalografických struktur pomocí programů CCP4, Pymol, PISA.

Biologické metody:

Test *ex vivo* účinnosti inhibitorů na larvách *S. mansoni* (schistosomula) v kultivačním médiu a vyhodnocování indukovaných změn fenotypů.

4. Výsledky a diskuze

Výsledky disertační práce jsou shrnuty v celkem čtyřech publikacích a jednom rukopise připraveném k podání do impaktovaného časopisu. Následuje stručný rozbor těchto prací zabývajících se katepsinem B1 (SmCB1) z krevničky střevní (*Schistosoma mansoni*).

4.1. Publikace č. 1: Mapping the Pro-Peptide of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors

SmCB1 je syntetizován jako neaktivní zymogen, jehož aktivita je blokována N-terminálním propeptidem fungujícím jako přirozený intramolekulární inhibitor aktivního místa. Plně aktivní enzym vzniká ze zymogenu proteolytickým odštěpením propeptidu v průběhu aktivace. Tato publikace se zabývá (1) identifikací inhibičních oblastí v propeptidu pomocí jeho syntetických fragmentů navržených s využitím homologního modelu zymogenu SmCB1 a (2) racionálním vývojem nových inhibitorů odvozených od nalezeného přirozeného inhibičního motivu. V propeptidu SmCB1 byly identifikovány dvě inhibiční oblasti, jedna interagující s aktivním místem SmCB1 a druhá, která obsahuje sekvenční motiv vázající heparin (“heparin-binding motif”, dále “HB motiv”) a je účinná v přítomnosti heparinu. Analýzou sekvencí propeptidu katepsinů B z jiných organismů bylo zjištěno, že “HB motiv” je přítomný pouze u katepsinů B z parazitických motolic, které se podílejí na trávení krve hostitele. Inhibiční oblast interagující s aktivním místem byla dále použita jako pentapeptidový templát, z něhož byly pomocí 3D modelu SmCB1 a metody dokování navrženy deriváty s vyšší inhibiční účinností proti SmCB1 (nejúčinnější dosahovaly mikromolárních hodnot K_i). Závěrem, byl identifikován nový mechanismus inhibice propeptidem zprostředkovaný glykosaminoglykany, který se může podílet i na regulaci

procesu aktivace zymogenu, a byla popsána nová strategie pro vývoj inhibitorů SmCB1 jako potenciálních léčiv proti schistosomóze.

4.2. Publikace č. 2: Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*

Tato publikace se zabývá komplexní strukturně funkční charakterizací SmCB1. Je zde prezentována krystalová struktura SmCB1, která podává vůbec první strukturní popis proteolytického enzymu z parazitických krevniček. Struktura SmCB1 vykazuje obecné znaky proteas rodiny papainu a obsahuje specifickou flexibilní smyčku “occluding loop”. Tato smyčka moduluje přístupnost aktivního místa a je zodpovědná za duální exopeptidasovou a endopeptidasovou aktivitu SmCB1. Oba aktivní módy a substrátová specifita byly analyzovány pomocí syntetických fluorogenních peptidových substrátů a fyziologického proteinového substrátu hemoglobinu. Krystalová struktura SmCB1 byla vyřešena ve formě komplexů se třemi kovalentními peptidomimetickými inhibitory (obsahujícími vinylsulfonovou nebo epoxidovou skupinu). To umožnilo detailní strukturní popis vazby inhibitorů v aktivním místě a kvantifikaci interakce substituentů v jednotlivých vazebných podmístech enzymu pomocí kvantově chemických výpočtů. Inhibiční specifita SmCB1 byla dále zkoumána pomocí sady vinylsulfonových inhibitorů, které byly testovány *in vitro* s rekombinantním SmCB1 a *ex vivo* na živých larvách *S. mansoni*. Bylo prokázáno, že *in vitro* i *ex vivo* výsledky korelují a účinnost inhibice odpovídá míře suprese parazita. Práce tak podává důkaz o SmCB1 jako vhodné cílové molekule pro vývoj antiparazitik a informace pro racionální design nových inhibitorů SmCB1 jako potenciálních léčiv.

4.3. Publikace č. 3: Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic *Schistosoma mansoni* Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors

Bylo prokázáno, že vinylsulfonová peptidomimetika jsou účinné inhibitory SmCB1 (publikace č. 2). Cílem této studie bylo vyvinout výpočetní metodu, tzv. skórovací funkci, která by umožnila efektivně predikovat účinnost kovalentních vinylsulfonových inhibitorů *in silico*. Byla k tomu využita sada 20 vinylsulfonových inhibitorů z publikace č. 2, kde pro ně byla experimentálně kvantifikována inhibice SmCB1. Nyní byla provedena enzymologická analýza kinetických parametrů a ireverzibility interakce. Skórovací funkce pro kovalentní vinylsulfonové inhibitory byla získána modifikací již známé kvantově mechanické skórovací funkce pro nekovalentní komplexy. Nově je zahrnut popis kovalentní vazby a přidán nový $\Delta G'_{cov}$ term do skórovací funkce, který odpovídá rozdílu energií mezi kovalentním a

nekovalentním komplexem. Kovalentní skóre bylo vypočítáno pro studovanou sadu vinylsulfonových komplexů s SmCB1, které byly modelovány s využitím krystalové struktury (z publikace č. 2) jako templátu. Ze získaných dat vyplývá korelace mezi kovalentním skóre pro jednotlivé inhibitory a jejich inhibičními parametry. Tento nový výpočetní přístup tak představuje cenný nástroj pro *in silico* design kovalentních inhibitorů SmCB1.

4.4. Rukopis č. 4: Activation Route of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch

SmCB1 je syntetizován jako neaktivní zymogen, ve kterém N-terminální propeptid působí jako přirozený inhibitor blokující aktivní místo. Během aktivace je propeptid proteolyticky odštěpen za vzniku aktivního enzymu. Tato práce přináší komplexní analýzu procesu aktivace SmCB1. Byl identifikován nový unikátní mechanismus autoaktivace SmCB1 specificky indukované sulfatovanými polysacharidy (SP). Bez SP dochází pouze k tvorbě neaktivního intermediátu, ve kterém je odštěpena jen část propeptidu. Mechanismus aktivace byl detailně popsán pomocí krystalových struktur tří molekulárních forem SmCB1 vznikajících v průběhu aktivačního procesu: zymogenu, neaktivního intermediátu a zralého enzymu. Pro autoaktivaci je zásadní interakce SP s motivem vázajícím heparin (“heparin-binding motif”, “HB motiv”) přítomným v sekvenci SmCB1 propeptidu, jak bylo potvrzeno cílenými mutacemi “HB motivu”. Efektivní interakce SP závisí jak na strukturním typu SP, tak na jeho velikosti. Několika experimentálními přístupy byla dále analyzována molekularita autoaktivační reakce, která kombinuje monomolekulární a bimolekulární děje. Alternativní způsob aktivace SmCB1 je katalyzován proteolytickým enzymem asparaginylendopeptidasou ze *S. mansoni*, přičemž tato reakce je negativně modulována působením SP. Lze tak předpokládat, že ve fyziologickém prostředí fungují SP jako přepínač mezi oběma dráhami aktivace SmCB1.

4.5. Publikace č. 5: Katepsinové proteasy v patologii

Cílem této publikace je podat přehled současných trendů týkajících se problematiky katepsinových proteas, které se účastní patologických procesů se zaměřením na témata řešená na ÚOCHB AV ČR. V práci jsou přehledně zpracovány trávicí katepsiny hematofágních parazitů s krevničkou jako modelovým druhem a jsou zde prezentovány původní výsledky z publikací č. 1 až 4.

5. Závěry

Dizertační práce se zabývá katepsinem B1 (SmCB1) z krevničky střešní (*Schistosoma mansoni*), která způsobuje závažné parazitární onemocnění schistosomózu. Výsledky jsou shrnuty ve čtyřech publikacích a v jednom rukopise připraveném k podání do impaktovaného časopisu. Práce přináší nové informace o struktuře, aktivitě a inhibiční regulaci SmCB1, které umožňují lépe pochopit funkci tohoto medicíně významného enzymu a navrhovat jeho inhibitory jako potenciální léčiva proti schistosomóze.

V rámci disertační práce byly splněny zadané cíle s následujícími závěry:

1. Bylo připraveno pět přirozených a mutantních forem SmCB1 rekombinantní expresí v kvasinkách *Pichia pastoris* a byl vypracován postup pro jejich chromatografickou purifikaci.
2. Bylo vyřešeno šest krystalových struktur SmCB1, konkrétně (i) molekulární formy aktivační dráhy: neaktivní zymogen, intermediární aktivační forma, aktivní enzym a (ii) tři komplexy enzymu s peptidomimetickými inhibitory. Koordináty struktur byly uloženy v databázi PDB (kódová označení 4I04, 4I05, 4I07, 3S3R, 3S3Q, 3QSD).
3. Analýza proteolytické aktivity SmCB1 pomocí fyziologického substrátu hemoglobinu a knihoven syntetických fluorogenních peptidových substrátů umožnila (i) určit substrátovou specifitu a preference pro štěpené vazby a (ii) identifikovat duální aktivitu SmCB1 jako proteasy působící v exopeptidasovém (peptidyldipeptidasovém) a endopeptidasovém módu. Tyto aktivity dělají z SmCB1 účinný nástroj pro komplexní degradaci hemoglobinu ve střevě krevničky.
4. Analýza inhibice SmCB1 pomocí vinylsulfonových (VS) inhibitorů:
 - a) Inhibiční specifita SmCB1 byla analyzována pomocí sady VS inhibitorů s odlišnými substituenty v pozicích P3-P1'. Nejúčinnější inhibitory dosahovaly subnanomolárních hodnot IC_{50} .
 - b) Kritické interakce mezi SmCB1 a VS inhibitory byly kvantifikovány *in silico* pomocí metod výpočetní chemie s využitím krystalových struktur inhibičních komplexů.
 - c) Na základě enzymologické analýzy inhibice SmCB1 pomocí VS inhibitorů byla přístup výpočetní chemie získána skórovací funkce pro predikci inhibiční účinnosti VS inhibitorů, která umožní efektivní navrhování nových inhibitorů SmCB1 *in silico*.

- d) Biologická aktivita VS inhibitorů byla určena *ex vivo* v experimentech na larvách *S. mansoni* v kultivačním mediu. Nalezená účinnost při supresi parazita koreluje s *in vitro* inhibicí SmCB1, což podává důkaz o SmCB1 jako vhodné cílové molekule a VS jako antischistosomálních molekulách.
5. Funkční analýza propeptidu SmCB1 byla provedena pomocí syntetických fragmentů odvozených z propeptidu a umožnila identifikaci dvou strukturních oblastí v propeptidu, které působí jako inhibitory aktivity SmCB1. Oblast interagující s aktivním místem byla využita pro navrhování pentapeptidových inhibitorů s účinností *in vitro* v mikromolární oblasti hodnot K_i .
6. Pomocí biochemické a strukturní analýzy byl popsán unikátní mechanismus aktivace SmCB1 z neaktivního zymogenu na aktivní enzym, který probíhá dvěma alternativními dráhami: (i) autoaktivací indukovanou působením sulfatovaných polysacharidů (např. glykosaminoglykanů) nebo (ii) trans-aktivací katalyzovanou působením asparaginylendopeptidasy. Sulfatované polysacharidy fungují jako přepínač mezi oběma dráhami. Strukturní aspekty aktivace SmCB1 a interakce se sulfatovanými polysacharidy byly vysvětleny pomocí krystalových struktur tří forem SmCB1 v aktivační dráze.

6. Použitá literatura

1. WHO (2012): Weekly epidemiological record No.4, 87, World Health Organisation, Geneva, 37-44.
2. WHO (2013): Weekly epidemiological record No.8, 88, World Health Organisation, Geneva, 81-88.
3. Chitsulo,L., Engels,D., Montresor,A., and Savioli,L. (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.*, **77**, 41-51.
4. Steinmann,P., Keiser,J., Bos,R., Tanner,M., and Utzinger,J. (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect.Dis.*, **6**, 411-425.
5. Gryseels,B., Polman,K., Clerinx,J., and Kestens,L. (2006) Human schistosomiasis. *Lancet*, **368**, 1106-1118.
6. Mostafa,M.H., Sheweita,S.A., and O'Connor,P.J. (1999) Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin.Microbiol.Rev.*, **12**, 97-111.
7. Thetiot-Laurent,S.A., Boissier,J., Robert,A., and Meunier,B. (2013) Schistosomiasis chemotherapy. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, **52**, 7936-7956.
8. Caffrey,C.R. (2007) Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **11**, 433-439.
9. Ismail,M., Botros,S., Metwally,A., William,S., Farghally,A., Tao,L.F., Day,T.A., and Bennett,J.L. (1999) Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **60**, 932-935.

10. Melman,S.D., Steinauer,M.L., Cunningham,C., Kubatko,L.S., Mwangi,I.N., Wynn,N.B., Mutuku,M.W., Karanja,D.M., Colley,D.G., Black,C.L., Secor,W.E., Mkoji,G.M., and Loker,E.S. (2009) Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, **3**, e504.
11. Cioli,D., Botros,S.S., Wheatcroft-Francklow,K., Mbaye,A., Southgate,V., Tchuente,L.A., Pica-Mattoccia,L., Troiani,A.R., El-Din,S.H., Sabra,A.N., Albin,J., Engels,D., and Doenhoff,M.J. (2004) Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int.J.Parasitol.*, **34**, 979-987.
12. Fallon,P.G. and Doenhoff,M.J. (1994) Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **51**, 83-88.
13. Sajid,M. and McKerrow,J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **120**, 1-21.
14. Sajid,M., McKerrow,J.H., Hansell,E., Mathieu,M.A., Lucas,K.D., Hsieh,I., Greenbaum,D., Bogyo,M., Salter,J.P., Lim,K.C., Franklin,C., Kim,J.H., and Caffrey,C.R. (2003) Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **131**, 65-75.
15. Hola-Jamriska,L., Dalton,J.P., Aaskov,J., and Brindley,P.J. (1999) Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes. *Parasitology*, **118**, 275-282.
16. Dvorak,J., Mashiyama,S.T., Sajid,M., Braschi,S., Delcroix,M., Schneider,E.L., McKerrow,W.H., Bahgat,M., Hansell,E., Babbitt,P.C., Craik,C.S., McKerrow,J.H., and Caffrey,C.R. (2009) SmCL3, a gastrodermal cysteine protease of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, **3**, e449.
17. Brindley,P.J., Kalinna,B.H., Wong,J.Y., Bogitsh,B.J., King,L.T., Smyth,D.J., Verity,C.K., Abbenante,G., Brinkworth,R.I., Fairlie,D.P., Smythe,M.L., Milburn,P.J., Bielefeldt-Ohmann,H., Zheng,Y., and McManus,D.P. (2001) Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol.Biochem.Parasitol.*, **112**, 103-112.
18. Caffrey,C.R., Mathieu,M.A., Gaffney,A.M., Salter,J.P., Sajid,M., Lucas,K.D., Franklin,C., Bogyo,M., and McKerrow,J.H. (2000) Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.*, **466**, 244-248.
19. McCarthy,E., Stack,C., Donnelly,S.M., Doyle,S., Mann,V.H., Brindley,P.J., Stewart,M., Day,T.A., Maule,A.G., and Dalton,J.P. (2004) Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int.J.Parasitol.*, **34**, 703-714.
20. Caffrey,C.R., McKerrow,J.H., Salter,J.P., and Sajid,M. (2004) Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.*, **20**, 241-248.
21. Delcroix,M., Sajid,M., Caffrey,C.R., Lim,K.C., Dvorak,J., Hsieh,I., Bahgat,M., Dissous,C., and McKerrow,J.H. (2006) A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J.Biol.Chem.*, **281**, 39316-39329.
22. Caffrey,C.R. and Ruppel,A. (1997) Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Parasitol.Res.*, **83**, 632-635.
23. Abdulla,M.H., Lim,K.C., Sajid,M., McKerrow,J.H., and Caffrey,C.R. (2007) Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS.Med.*, **4**, e14.

Curriculum vitae

Osobní údaje:

Jméno a příjmení, titul: Adéla Jílková, Mgr.
Datum a místo narození: 15.4.1982, Praha
Národnost: česká
Kontaktní telefon: +420 776 277 107
E-mail: jilkova@uochb.cas.cz

Vzdělání:

Od 2006 **Postgraduální studium:** Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.
Dizertační práce: Strukturální a funkční analýza katepsinu B1 z krevničky *Schistosoma mansoni*
Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

2001 - 2006 **Magisterské studium:** Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie
Diplomová práce: Trávicí proteasy parazita krevničky *Schistosoma mansoni*
Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.
Oponent: Doc. RNDr. Věra Jonáková, CSc.

Zaměstnání:

Od 09/2006 **Ph.D. Student**
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.
Flemingovo nám. 2, Praha 6, Dejvice, 16610

Jazyky:

Anglický jazyk: plynule, FCE (8/2009)
Německý jazyk: základy

Absolvované kurzy:

Výpočetní postupy v makromolekulární krystalografii, Nové Hrady, (2013)

Kurz bioinformatiky: “The Bioinformatics Workshop”, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha, (2013)

Školení uživatelů mikroskopů: “ZEISS on Your Campus Workshop Series”, Fyziologický ústav AV ČR, Praha, (2013)

Praktický kurz microarray technik, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, (2012)

Kurz mikroskopie: “Imaging workshop”, Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, USA, (2011)

Kurz řešení krystalových struktur: “Expertise in Macromolecular Structure Refinement”, Ústav makromolekulární chemie, Praha (2009)

FEBS Advanced Course in Protein Crystallization, Nové Hrady (2008)

Kurz proteinové krystalografie: “Course of Protein Crystallography”, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha (2008)

Enzymologický kurz: “Enzyme Mechanisms and Kinetics” (Satellite Postgraduate Course), University of Patras, Patras, Řecko (2007)

Zahraniční stáže:

Zahraniční vědecká stáž na University of California San Francisco (Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases, California Institute for Quantitative Biosciences) v rámci společného výzkumného projektu s ÚOCHB AV ČR:

2009 (1 měsíc)

2010 (1.5 měsíce)

2011 (1 měsíc)

Příspěvky na konferencích:

Jílková, A., Horn, M., Řezáčová, P., Marešová, L., Fajtová, P., Brynda, J., Vondrášek, J., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Mareš, M.: *Activation Route of the Schistosoma mansoni Cathepsin B1 Drug Target*. Konference: Proteolytic enzymes and their inhibitors, Lucca, Itálie (2014). Plakátové sdělení

Jílková, A.: *Activation pathway of SmCBI drug target*. Konference ÚOCHB AV ČR, Harrachov (2014). Přednáška (přednáška se umístila mezi 10 nejlepšími)

Jílková, A.: *Digestive proteases of Schistosoma Blood Flukes as a Drug Target*. Seminář katedry Molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta JU, České Budějovice (2013). Přednáška

Jílková, A., Řezáčová, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfrlík, J., Brynda, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., a Mareš, M.: *Structural Basis for Inhibition of the Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, Schistosoma mansoni*. Konference: Molecular and cellular biology of helminth parasites VII, Hydra, Řecko (2012). Plakátové sdělení

Jílková, A., Řezáčová, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfrlík, J., Brynda, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., a Mareš, M.: *Structural Basis for Inhibition of the Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, Schistosoma mansoni*. Konference: 7th General Meeting of the International Proteolysis Society, San Diego, USA (2011). Plakátové sdělení

Jílková, A.: *Struktura a inhibice parazitárního katepsinu B, cílového enzymu pro léčbu schistosomózy*. Konference mladých biologů a biochemiků, Žďár nad Sázavou (2011). Přednáška (přednáška se umístila mezi 5 nejlepšími)

Jílková, A.: *Digestive Peptidases of Blood Fluke as a Drug Target*. Konference ÚOCHB AV ČR, Frymburk (2010). Přednáška

Jílková, A., Horn, M., Řezáčová, P., Kopáček, P., Caffrey, C. R. a Mareš, M.: *Cathepsin B as a target for control of blood-feeding parasite*. Konference: Molecules of life: from discovery to biotechnology, Melbourne, Austrálie (2010). Plakátové sdělení

Horn, M., Jílková, A., Vondrášek, J., Caffrey, C. R., a Mareš, M.: *Propeptide of Cathepsin B1 from Human Blood Fluke: Structure-Function Mapping and Small Mimetics Design*. Konference: XIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovinsko (2010). Plakátové sdělení

Jílková, A., Řezáčová, P., Horn, M., Caffrey, C. R., a Mareš, M.: *Preparation and Crystallization of Schistosomal Cathepsin B*. Conference: FEBS Advanced Course in Protein Crystallization, Nové Hradky (2008). Plakátové sdělení

Horn, M., Sojka, D., Jílková, A., Franta, Z., Zikmundová, M., Bogyo, M., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Kopáček, P., a Mareš, M.: *Similarity of hemoglobin proteolysis in ticks and blood flukes*. Conference: 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Řecko (2007). Plakátové sdělení

Seznam publikací

Horn, M., Jílková, A., Vondrášek, J., Marešová, L., Caffrey, C. R., Mareš, M.: Mapping the Pro-Peptide of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors, *ACS Chem Biol*, 6 (6), 609-617 (2011). IF=5,442

Jílková, A., Řezáčová, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfrlík, J., Brynda, J., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Mareš, M.: Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*, *J Biol Chem*, 286 (41), 35770-35781 (2011). IF = 4,651

Fanfrlík, J., Brahmshatriya, P. S., Řezáč, J., Jílková, A., Horn, M., Mareš, M., Hobza, P., Lepšík, M.: Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic *Schistosoma mansoni* Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors, *J Phys Chem B* 117(48), 14973-14982 (2013). IF = 3,607

Jílková, A., Horn, M., Řezáčová, P., Marešová, L., Fajtová, P., Brynda, J., Vondrášek, J., Caffrey, C. R., Mareš, M.: Activation Route of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch, Rukopis připraven k podání do časopisu *Structure*. IF = 5,994

Horn, M., Jílková, A., Mareš, M.: Kathepsinové proteasy v patologii, *Chem listy*, 4, 358-363 (2014). IF = 0,453

Jilková, A., Rezáčová, P., Horn, M., Caffrey, C. R., Mares, M.: *Preparation and Crystallization of Schistosoma mansoni Cathepsin B*. Conference: FEBS Advanced Course in Protein Crystallization, Nové Hradky (2008). Poster

Horn, M., Sojka, D., Jilková, A., Franta, Z., Zikmundová, M., Bogyo, M., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Kopáček, P., Mares, M.: *Similarity of hemoglobin proteolysis in ticks and blood flukes*. Conference: 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Greece (2007). Poster

Selected publications

Horn, M., Jilková, A., Vondrášek, J., Marešová, L., Caffrey, C. R., Mares, M.: Mapping the Pro-Peptide of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors, *ACS Chem Biol*, 6 (6), 609-617 (2011). IF=5.442

Jilková, A., Rezáčová, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfřik, J., Brynda, J., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Mares, M.: Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*, *J Biol Chem*, 286 (41), 35770-35781 (2011). IF = 4.651

Fanfřik, J., Brahmkshatrya, P. S., Rezáč, J., Jilková, A., Horn, M., Mares, M., Hobza, P., Lepšík, M.: Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic *Schistosoma mansoni* Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors, *J Phys Chem B* 117(48), 14973-14982 (2013). IF = 3.607

Jilková, A., Horn, M., Rezáčová, P., Marešová, L., Fajtová, P., Brynda, J., Vondrášek, J., Caffrey, C. R., Mares, M.: Activation Route of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch, To be submitted to *Structure*. IF = 5.994

Horn, M., Jilková, A., Mares, M.: Cathepsin Proteases in Pathology, *Chemistry*, 4, 358-363 (2014). IF = 0.453

Course of Protein Crystallography, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague (2008)

Enzyme Mechanisms and Kinetics (Satellite Postgraduate Course), University of Patras, Greece (2007)

Scientific stays:

Short scientific stays at the University of California San Francisco (Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases, California Institute for Quantitative Biosciences) - collaborative project with IOCB AS CR:

2009 (1 month)

2010 (1.5 month)

2011 (1 month)

Meetings and conferences - presentations:

Jilková, A., Horn, M., Rezáčková, P., Marešová, L., Fajtová, P., Brynda, J., Vondrášek, J., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., Mareš, M.: *Activation Route of the Schistosoma mansoni Cathepsin B1 Drug Target*. Conference: Proteolytic enzymes and their inhibitors. Lucca, Italy (2014). Poster

Jilková, A.: *Activation pathway of SmCBI drug target*. Conference of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Harrachov (2014). Presentation (within 10 best awarded)

Jilková A.: *Digestive proteases of Schistosoma Blood Flukes as a Drug Target*. Department of Molecular Biology, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice (2013). Presentation

Jilková, A., Rezáčková, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchova, J., Fantičik, J., Brynda, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., and Mareš, M.: *Structural Basis for Inhibition of the Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, Schistosoma mansoni*. Conference: Molecular and cellular biology of helminth parasites VII, Hydra, Greece, (2012). Poster

Jilková, A., Rezáčková, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchova, J., Fantičik, J., Brynda, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., and Mareš, M.: *Structural Basis for Inhibition of the Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, Schistosoma mansoni*. Conference: 7th General Meeting of the International Proteolysis Society, San Diego, USA, (2011). Poster

Jilková, A.: *Struktura a inhibice parazitárního katepsinu B, cillového enzymu pro léčbu schistosomozy*. Conference of young biologists and biochemists, Zďar nad Sázavou (2011). Presentation (within 5 best awarded)

Jilková, A.: *Digestive Peptidases of Blood Fluke as a Drug Target*. Conference of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Frymburk (2010). Presentation

Jilková, A., Horn, M., Rezáčková, P., Kopáček, P., Caffrey, C. R. and Mareš, M.: *Cathepsin B as a target for control of blood-feeding parasites*. Conference: Molecules of life: from discovery to biotechnology, Melbourne, Australia (2010). Poster

Horn, M., Jilková, A., Vondrášek, J., Caffrey, C. R., Mareš, M.: *Propeptide of Cathepsin B1 from Human Blood Fluke: Structure-Function Mapping and Small Molecules Design*. Conference: XIIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, (2010). Poster

Curriculum vitae

Personal details:

Name and surname, title: Adéla Jilková, M.Sc.

Birth date and place: 15.4.1982, Praha

Nationality: Czech

Phone: +420 776 277 107

E-mail: jilkova@uochb.cas.cz

Education:

Since 2006

Ph.D. study: Charles University in Prague, Faculty of Science, Ph.D. program Biochemistry

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i. Ph.D. thesis: Structural and functional analysis of cathepsin B1

from the blood fluke, *Schistosoma mansoni*

Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSc.

2001 - 2006

Masters study: Charles University in Prague, Faculty of Science, M.Sc. program Biochemistry

Master thesis: Digestive proteases of the blood fluke parasite

Schistosoma mansoni

Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Reviewer: Doc. RNDr. Věra Jonáková, CSc.

Employment:

Since 09/2006

Ph.D. Student

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i. Flemingovo nám. 2, Praha 6, Dejvice, 16610

Language skills:

English: fluent, FCE (8/2009)

German: basic

Courses:

Computational techniques in macromolecular crystallography, Nové Hradý, (2013)

The Bioinformatics Workshop, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Prague, (2013)

ZEISS on Your Campus Workshop Series (Workshop for microscope users), Institute of

Physiology AS CR, Prague (2013)

Practical course of microarray techniques, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague (2012)

Imaging workshop, Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, USA (2011)

Expertise in Macromolecular Structure Refinement (TeachSG Workshop), Institute of

Macromolecular Chemistry AS CR, Prague (2009)

FEBS Advanced Course in Protein Crystallization, Nové Hradý (2008)

8. Caffrey, C.R. (2007) Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 433-439.
9. Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A., and Bennett, J.L. (1999) Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 932-935.
10. Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., and Loker, E.S. (2009) Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *Plos.Negl.Trop.Dis.*, **3**, e504.
11. Cioli, D., Botros, S.S., Wheatcroft-Francklow, K., Mbaye, A., Southgate, V., Tchuente, L.A., Pica-Mattoccia, L., Troiani, A.R., El-Din, S.H., Sabra, A.N., Albin, J., Engels, D., and Doenhoff, M.J. (2004) Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 979-987.
12. Fallon, P.G. and Doenhoff, M.J. (1994) Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51**, 83-88.
13. Sajid, M. and McKerrrow, J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **120**, 1-21.
14. Sajid, M., McKerrrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., Franklin, C., Kim, J.H., and Caffrey, C.R. (2003) Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **131**, 65-75.
15. Hola-Jamriska, L., Dalton, J.P., Aaskov, J., and Brindley, P.J. (1999) Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes. *Parasitology*, **118**, 275-282.
16. Dvorak, J., Mashiyama, S.T., Sajid, M., Braschi, S., Delcroix, M., Schneider, E.L., McKerrrow, W.H., Bahgat, M., Hansell, E., Babbitt, P.C., Craik, C.S., McKerrrow, J.H., and Caffrey, C.R. (2009) SmCL3, a gastroduodenal cysteine protease of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Plos.Negl.Trop.Dis.*, **3**, e449.
17. Brindley, P.J., Kallina, B.H., Wong, J.Y., Bogitsch, B.J., King, L.T., Smyth, D.J., Verity, C.K., Abbenante, G., Brinkworth, R.L., Fairlie, D.P., Smythe, M.L., Milburn, P.J., Bielefeldt-Ohmann, H., Zheng, Y., and McManus, D.P. (2001) Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **112**, 103-112.
18. Caffrey, C.R., Mathieu, M.A., Gaffney, A.M., Salter, J.P., Sajid, M., Lucas, K.D., Franklin, C., Bogyo, M., and McKerrrow, J.H. (2000) Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.*, **466**, 244-248.
19. McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S.M., Doyle, S., Mann, V.H., Brindley, P.J., Stewart, M., Day, T.A., Maule, A.G., and Dalton, J.P. (2004) Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 703-714.
20. Caffrey, C.R., McKerrrow, J.H., Salter, J.P., and Sajid, M. (2004) Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.*, **20**, 241-248.
21. Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lim, K.C., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., and McKerrrow, J.H. (2006) A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J. Biol. Chem.*, **281**, 39316-39329.
22. Caffrey, C.R. and Ruppel, A. (1997) Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Parasitol. Res.*, **83**, 632-635.
23. Abdulla, M.H., Lim, K.C., Sajid, M., McKerrrow, J.H., and Caffrey, C.R. (2007) Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *Plos.Med.*, **4**, e14.

1. WHO (2012): Weekly epidemiological record No.4, 87, World Health Organisation, Geneva, 37-44.
2. WHO (2013): Weekly epidemiological record No.8, 88, World Health Organisation, Geneva, 81-88.
3. Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., and Savioh, L. (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.*, **77**, 41-51.
4. Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., and Utzinger, J. (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.*, **6**, 411-425.
5. Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., and Kestens, L. (2006) Human schistosomiasis. *Lancet*, **368**, 1106-1118.
6. Mostafa, M.H., Shewita, S.A., and O'Connor, P.J. (1999) Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 97-111.
7. Thetiot-Laurent, S.A., Boissier, J., Robert, A., and Meunier, B. (2013) Schistosomiasis chemotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 7936-7956.

6. References

6. A unique mechanism of SmCB1 zymogen activation was described using biochemical and structural analyses. There are two alternative routes for the generation of the mature SmCB1: (i) the autoactivation mediated by sulfated polysaccharides (e.g. glycosaminoglycans) and (ii) the trans-activation catalyzed by asparaginyl endopeptidase. Sulfated polysaccharides function as a switch between the two routes. The structural aspects of SmCB1 activation and interaction with sulfated polysaccharides were described using crystal structures of three SmCB1 forms along the activation pathway.
5. A functional analysis of the SmCB1 propeptide was performed using synthetic fragments derived from the propeptide. Two structural regions were identified in the propeptide that inhibited SmCB1 activity. The region interacting with the active site was used to design pentapeptide inhibitors with K_i values in the micromolar range.
6. A unique mechanism of SmCB1 zymogen activation was described using biochemical and structural analyses. There are two alternative routes for the generation of the mature SmCB1: (i) the autoactivation mediated by sulfated polysaccharides (e.g. glycosaminoglycans) and (ii) the trans-activation catalyzed by asparaginyl endopeptidase. Sulfated polysaccharides function as a switch between the two routes. The structural aspects of SmCB1 activation and interaction with sulfated polysaccharides were described using crystal structures of three SmCB1 forms along the activation pathway.
- (d) The biological activity of VS inhibitors was determined using an *ex vivo* assay with *S. mansoni* larvae cultivated in culture media. The suppression of parasites induced by the inhibitors correlates with their *in vitro* inhibition of SmCB1. This has demonstrated that SmCB1 is a target molecule and VS inhibitors are antischistosomal molecules.
- (c) Based on an enzymological analysis of the SmCB1 inhibition by VS inhibitors, a scoring function was developed for the prediction of inhibitory potency using quantum chemical approaches. This method provides an efficient tool for the *in silico* design of new SmCB1 inhibitors.

in silico by methods of computational chemistry with the help of the crystal structures of inhibitor complexes.

b) The key binding interactions between SmCB1 and VS inhibitors were quantified in yielded subnanomolar values of IC_{50} .

a) The inhibition specificity of SmCB1 was analyzed using a set of VS inhibitors containing different substituents in positions P3-P1'. The most effective inhibitors

4. An analysis of SmCB1 inhibition using vinyl sulfone (VS) inhibitors:

hemoglobin degradation in the schistosoma gut.

endopeptidase modes of action. SmCB1 thus functions as an efficient tool for host of a dual activity of SmCB1 comprising both exopeptidase (peptidyl dipeptidase) and determination of substrate specificity and cleavage preferences and (ii) the identification hemoglobin, and libraries of synthetic fluorogenic peptide substrates led to (i) the 3. An analysis of the proteolytic activity of SmCB1 using the physiological substrate, 3S3R, 3S3Q, 3QSD).

coordinates were deposited in the Protein Data Bank (PDB codes: 4I04, 4I05, 4I07, enzyme, and (ii) three enzyme complexes with peptidomimetic inhibitors. The structure activation pathway: the inactive zymogen, an activation intermediate, and the mature 2. Six crystal structures of SmCB1 were determined, namely (i) molecular forms along the developed.

1. Five native and mutant forms of SmCB1 were prepared by recombinant expression in the yeast *Fichia pastoris* and a protocol for their chromatographic purification was

The aims of the thesis have been met with the following conclusions:

medicinally important enzyme and to design its inhibitors as potential antischistosomal drugs. regulation of SmCB1, which makes it possible to better understand the function of this journal. This work provides new information on the structure, activity and inhibitory four publications and one completed manuscript prepared for submission in an impacted in *mansoni*, causing a serious parasitic disease – schistosomiasis. The results are presented in The Ph.D. thesis focuses on cathepsin B1 (SmCB1) from the human blood fluke *Schistosoma*

5. Conclusions

We provide an overview of digestive cathepsins of hematophagous parasites using schistosoma as a model species and summarize the results from the publications Nos. 1–4.

The aim of this work is to summarize current trends in the research on cathepsin proteases involved in pathological processes with the main focus on topics studied at the IOCB AS CR.

4.5. Publication No. 5: Cathepsin Proteases in Pathology

SmCBI is biosynthesized as an inactive zymogen in which the N-terminal propeptide operates as a natural inhibitor by blocking the active site. During activation, the propeptide is proteolytically removed, generating the active mature enzyme. This work provides a complex analysis of a SmCBI activation process. We propose a new mechanism of SmCBI autoactivation induced by sulfated polysaccharides (SPs). In the absence of SPs, only an inactive intermediate is formed with a partially cleaved propeptide. The mechanism of activation was described in detail using crystal structures of three molecular forms of SmCBI along the activation pathway: the zymogen, an inactive intermediate, and the mature enzyme. Autoactivation is accomplished by the interaction of SP with a heparin binding motif ("HB motif") in the sequence of SmCBI propeptide as was demonstrated by a site-directed mutagenesis of the "HB motif". This interaction is dependent on the structure and size of SP. The molecularly of the autoactivation reaction was further analyzed by several experimental approaches revealing that both monomolecular and bimolecular processes are involved. SmCBI is alternatively trans-activated by the proteolytic enzyme asparaginyl endopeptidase from *S. mansoni*, which is negatively modulated by SP. We have concluded that in physiological environment SPs function as a molecular switch between both activation pathways.

4.4. Manuscript No. 4: Activation Route of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch

developed quantum mechanics scoring function for noncovalent complexes. The enhancements are the description of the covalent-bond formation and the addition of the new ΔG^{cov} term to the scoring function, describing the "free" energy difference between the covalent and noncovalent complexes. The covalent score was calculated for the studied set of vinyl sulfone inhibitor complexes with SmCBI, which were modeled using a crystal structure (available in the publication No. 2) as a template. These data demonstrate the correlation of the covalent score for individual inhibitors with their inhibition parameters. The new computational approach is a valuable tool for the *in silico* design of covalent SmCBI inhibitors.

Vinyl sulfone peptidomimetics were demonstrated to be efficient inhibitors of SmCB1 (see the publication No. 2). The aim of this study was to develop a computational method (“scoring function”) to predict the potency of covalent vinyl sulfone inhibitors *in silico*. We used a set of 20 vinyl sulfone inhibitors from the publication No. 2, where SmCB1 inhibition was quantified experimentally. Now we performed an enzymological analysis of kinetic parameters and demonstrated the irreversibility of the interaction. The scoring function for covalent vinyl sulfone inhibitors was obtained through the modification of a previously

4.3. Publication No. 3: Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic *Schistosoma mansoni* Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors

This publication provides a comprehensive structure-function relationship analysis of SmCB1. We report the crystal structure of SmCB1, the first for a schistosomal proteolytic enzyme. The structure of SmCB1 adopts a classic papain-like fold and contains a specific flexible occluding loop. This loop modulates access to the active site of SmCB1 and is responsible for its complex proteolytic activity comprising both exopeptidase and endopeptidase modes of action. The two modes of action and the substrate specificity of SmCB1 were analyzed using synthetic fluorogenic peptide substrates and the physiological protein substrate, hemoglobin. We determined three crystal structures of SmCB1 complexed with covalent peptidomimetic inhibitors (containing vinyl sulfone or epoxide reactive groups). Based on these structures, we described the binding of the inhibitors to the active site and quantified their interactions with individual binding subsites by quantum chemical calculations. The inhibitory specificity of SmCB1 was further studied using a set of vinyl sulfone inhibitors, which were tested *in vitro* against recombinant SmCB1 as well as *ex vivo* on live *S. mansoni* larvae. This demonstrated that SmCB1 inhibition correlates with the severity of the phenotype induced in the parasites. The work provides evidence that SmCB1 is a valuable drug target for the development of antischistosomal and essential information for a rational design of new SmCB1 inhibitors as potential drugs.

4.2. Publication No. 2: Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*

inhibitors yielded micromolar inhibition constants). To conclude, we identified a novel glycosaminoglycan-mediated mechanism of SmCB1 inhibition by the propeptide, which can potentially regulate the zymogen activation and we described a new strategy for the development of SmCB1 inhibitors as potential antischistosomal drugs.

SmCB1 is biosynthesized in the form of inactive proenzyme (zymogen); its activity is blocked by the N-terminal propeptide operating as a natural intra-molecular inhibitor of the active site. The fully active mature enzyme is generated from the zymogen by the proteolytic removal of the propeptide during activation. This publication focuses on (1) the identification of the inhibitory regions in the propeptide using its synthetic fragments designed with the help of the 3D model of the SmCB1 zymogen and (2) the rational design of new inhibitors derived from the identified natural inhibitory region. Two inhibitory regions were identified in the SmCB1 propeptide. The first one interacts with the SmCB1 active site while the other contains a consensus sequence for heparin binding ("heparin-binding motif", "HB motif") and its function is heparin dependent. A sequence analysis of cathepsin B propeptides from other organisms revealed that the "HB motif" is only present in the propeptides of cathepsins B that are involved in host blood digestion of parasitic trematodes. The inhibitory region that interacts with the active site was used as a pentapeptide scaffold for the design of more potent inhibitors of SmCB1 using a 3D model of SmCB1 and molecular docking (the most effective

4.1. Publication No. 1: Mapping the Pro-Peptide of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors

The results of the Ph.D. thesis are presented in four publications and one completed manuscript prepared for submission in an impacted journal. These publications focus on cathepsin B1 from *Schistosoma mansoni* (SmCB1), and their summary is as follows.

4. Results and discussion

An *ex vivo* assay of inhibitor efficiency on *S. mansoni* larvae (schistosomula) cultivated in culture media and the evaluation of the phenotypes induced.

Biological methods:

Pymol and PISA.
Protein crystallization using vapor diffusion in hanging drop, protein structure determination by molecular replacement and an analysis of crystal structures using the programs CCP4,

Crystallographic methods:

K_m , k_{cat}/K_m and inhibitors (K_i , IC_{50} , k_{2nd}).

The measurement of enzyme activity using kinetic assays with synthetic fluorogenic and FRET substrates and the determination of kinetic parameters of SmCB1 for substrates (k_{cat} ,

Enzymological methods:

terminal sequencing.

An electrophoretic separation of proteins using SDS-PAGE and protein detection using Western blot, the imaging of proteases using activity-based probes, the purification of proteins using FPLC, the separation of peptides using RP-HPLC, an analysis of proteins and peptides using a thermofluor technique, circular dichroism, mass spectrometry and N-

Biochemical methods:

transformation of *P. pastoris* (strain X-33), and recombinant expression in *P. pastoris*. Cloning into the pPICZα plasmid, a site-directed mutagenesis of the SmCBI constructs,

The methods of molecular biology:

The general methods applied are as follows:

3.2. Methods

CR.

Five constructs of the SmCBI zymogen in the pPICZα plasmid were prepared for expression in the yeast *Pichia pastoris*: (1) SmCBI wild-type SmCBI^{WT}, (2) deglycosylated SmCBI^{DG} containing two mutations in the sequence motifs for N-glycosylation (Thr168→Ala, Thr283→Ala), (3) SmCBI containing mutations in the heparin-binding motif: SmCBI^{HepA} (Arg57→Ala, Arg59→Ala) and SmCBI^{HepN} (Arg57→Asn, Arg59→Asn) and (4) SmCBI containing a mutation of the catalytic cysteine residue in the active site (Cys100→Ser100). Synthetic peptides and FRET substrates were prepared at the IOCB AS CR.

Most of the data were obtained using the laboratory facilities at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry the Academy of Sciences of the Czech Republic (IOCB AS CR). The project was conducted in collaboration with Dr. Caffrey at the University of California, San Francisco (UCSF), who provided a set of vinyl sulfone inhibitors and the equipment for the biological experiments with schistosoma larvae. Computational work was performed in collaboration with the laboratories of Dr. Lepšik and Dr. Vondrasek at the IOCB AS CR. The diffraction data for crystal structure determination were collected on synchrotron (1) at the Helmholtz-Zentrum Berlin, Bessy II electron storage ring, Berlin-Adlershof, Germany and (2) at the Structural Biology Center, Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, U.S.A. Crystal structures were determined in collaboration with the team of Dr. Rezacova at the IOCB AS CR.

3.1. Material and laboratory equipment

3. Material and methods

demonstrated *in vivo* on a mouse model using the inhibitor K11777, which blocks SmCB1 activity [23]. Effective inhibitors of SmCB1 are perspective molecules for the development of new antischistosomal therapeutics. A detailed structural and functional characterization of SmCB1 presented in this Ph.D. thesis provides essential information for a rational design of these inhibitors and enables understanding of biochemical mechanisms of activity and regulation of SmCB1.

2. Aims of the study

The thesis is focused on the digestive protease cathepsin B1 (SmCB1) from the blood fluke *Schistosoma mansoni*, causing a serious parasitic disease schistosomiasis. This protease plays a crucial role in the digestion of host blood proteins and it is a target molecule for the development of new antischistosomal drugs. This thesis focuses on a structure-activity relationship analysis of SmCB1, the description of the mechanism of zymogen activation and the identification of efficient SmCB1 inhibitors as potential chemotherapeutics.

Specific aims of the thesis are:

1. The production of SmCB1 by recombinant expression and its purification.
2. The determination of the SmCB1 crystal structure.
3. An analysis of SmCB1 substrate specificity using synthetic and natural substrates.
4. A study of SmCB1 inhibition using vinyl sulfone (VS) inhibitors:
 - a) The determination of SmCB1 inhibitory specificity using a set of synthetic VS inhibitors.
 - b) A structural description of critical interactions between SmCB1 and VS inhibitors.
 - c) The determination of the biological activity of VS inhibitors against *S. mansoni* larvae.
 - d) An enzymological analysis of the inhibitory mechanism of VS inhibitors for the development of a new computational method for the scoring of inhibitor efficiency.
5. The preparation of synthetic peptide inhibitors of SmCB1 derived from the structure of the propeptide.
6. A biochemical and structural analysis of the activation mechanism of the SmCB1 zymogen.

1. Introduction

Schistosomiasis is a chronic disease caused by parasites of the genus *Schistosoma*. With over 200 million people infected in tropical and subtropical areas, it represents a serious health and socio-economic problem [1-4]. Three most important schistosoma species infecting humans are *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*. People become infected when their skin comes into contact with contaminated fresh water containing infectious larvae of schistosoma, which are able to penetrate intact skin. Larvae migrate through tissues into blood circulation, where they grow and develop into adults, living in the vessels surrounding the intestinal tract or the urogenital system. Schistosoma females produce thousands of eggs a day, which are the main pathogenic agents of schistosomiasis [5]. The immune response to eggs causes inflammation and granuloma formation, leading to damage to organs, and infection may contribute to an increased risk of cancer [6].

At present, no effective vaccine for schistosomiasis is available and the treatment now relies almost exclusively on a single drug, praziquantel [7]. Since praziquantel is the only effective drug and it has been in use for over 20 years, concerns over resistance are increasing and new alternative drugs are needed [8-12]. Current research focuses on the understanding of the parasite's biochemistry and its molecular pathways as well as on the identification of the target molecules which are essential and unique for the parasite and whose blocking would be lethal for the parasite.

Proteases play a crucial role in all life stages of schistosoma, especially in host-parasite interactions. They are involved in host invasion, tissue migration, host blood protein digestion, host immune evasion, as well as the activation and modulation of inflammation [13]. Adult schistosomes living in blood vessels of the human host obtain nutrients for their growth and development through the degradation of host blood proteins. Proteolytic digestion is essential for parasite survival and is one of the major subjects of schistosoma research. Hemoglobin is degraded by a cascade of digestive enzymes, including cysteine, serine, and aspartic proteases, and metalloproteases. The following proteases were identified in the gut of *S. mansoni*: cathepsin B1, cathepsin C, cathepsins L1, L2 and L3, cathepsin D, asparaginyl endopeptidase and leucyl aminopeptidase [14-21].

Cathepsin B1 of *S. mansoni* (SmCB1), the main subject of this thesis, is the most abundant protease in the schistosoma gut and plays a key role in hemoglobin degradation [14;22]. This enzyme has a complex proteolytic activity comprising both endopeptidase and exopeptidase modes of action [14]. SmCB1 is a target for the treatment of schistosomiasis as has been

Abstract

Schistosomiasis is a serious infectious disease that afflicts over 200 million people in tropical and subtropical regions. It is caused by *Schistosoma* blood flukes that live in human blood vessels and obtain nutrients from host hemoglobin, which is degraded by digestive proteases. Current therapy relies on a single drug and concern over resistance necessitates new drug development. In *Schistosoma mansoni*, cathepsin B1 (SmCB1) is a critical digestive protease that is a target molecule for therapeutic interventions. This thesis provides a comprehensive characterization of SmCB1 focused on structure-activity relationships and inhibitory regulation based on six crystal structures solved for SmCB1 molecular forms and complexes. SmCB1 is biosynthesized as an inactive zymogen in which the N-terminal propeptide operates as a natural intra-molecular inhibitor by blocking the active site. Detailed biochemical and structural analyses have identified a new and, so far, unique mechanism of SmCB1 zymogen activation through which the propeptide is proteolytically removed and the regulatory role of glycosaminoglycans in this process has been described. A study of SmCB1 proteolytic activity has revealed that the enzyme acts in two modes, as endopeptidase and exopeptidase, which makes it an efficient tool for host hemoglobin digestion. A major part of the thesis focused on the identification of new molecules for SmCB1 inhibition using two different approaches. First, reversible peptide inhibitors derived from the structure of the SmCB1 propeptide were designed and synthesized that are effective *in vitro* in the micromolar concentration range. Second, peptidomimetic inhibitors with a vinyl sulfone reactive group were identified that are effective *in vitro* in the nanomolar concentration range. The mechanism of the interaction between SmCB1 and the vinyl sulfone inhibitors was studied in detail using crystallographic structures of SmCB1 in complexes with the inhibitors and by computational chemistry methods. Finally, the *ex vivo* efficiency of the vinyl sulfone inhibitors was demonstrated by the suppression of live schistosoma parasites in culture. To conclude, this thesis has defined SmCB1 as a target molecule for the suppression of *S. mansoni* and has identified new types of inhibitors for the development of potential anti-schistosomal drugs.

List of abbreviations

CCP4	Collaborative Computational Project No. 4, software
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
ΔG^{cov}	“free” energy difference between the covalent and noncovalent complex
HB	heparin-binding
IC_{50}	inhibitor concentration necessary to effect 50% inhibition of the enzyme
k_{2nd}	second order rate constant
k_{cat}	turnover number
k_{cat}/K_m	catalytic efficacy of the enzyme
K_i	inhibition constant
K_m	Michaelis constant
K11777	N-methyl-piperazin-Phe-homoPhe-vinylsulfon-phenyl
PDB	Protein Data Bank
PISA	Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
SDS-PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis in presence of SDS
SmCB1	cathepsin B1 from <i>Schistosoma mansoni</i>
SP	sulfated polysaccharide
UCSF	University of California San Francisco
VS	vinyl sulfon

Content

List of abbreviations.....	1
Abstract.....	2
1. Introduction.....	3
2. Aims of the study.....	4
3. Material and methods.....	5
3.1. Material and laboratory equipment.....	5
3.2. Methods.....	5
4. Results and discussion.....	6
4.1. Publication No. 1: Mapping the Pro-Peptide of the <i>Schistosoma mansoni</i> Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors ...	6
4.2. Publication No. 2: Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, <i>Schistosoma mansoni</i>	7
4.3. Publication No. 3: Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic <i>Schistosoma mansoni</i> Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors.....	7
4.4. Manuscript No. 4: Activation Route of the <i>Schistosoma mansoni</i> Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch.....	8
4.5. Publication No. 5: Cathepsin Proteases in Pathology.....	8
5. Conclusions.....	9
6. References.....	10
Curriculum vitae.....	12
Selected publications.....	14

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



Structural and functional analysis of cathepsin B1
from the blood fluke, *Schistosoma mansoni*

M.Sc. Adéla Jilková

Supervisor: Michael Mareš, Ph.D.

Prague, 2014