

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Vladimír Šteiger

Inhibitory proteolytických enzymů motolic

Inhibitors of proteolytic enzymes of Trematodes

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 08. 2015

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Martinu Kašnému, Ph.D. za užitečné rady, podporu a obrovskou trpělivost. Dále bych rád poděkoval rodině a přátelům za podporu při psaní této práce.

Abstrakt

Motolice (Trematoda) jsou významnými parazity mnoha orgánových soustav bezobratlých i obratlovců včetně člověka, a proto jsou dlouhodobě předmětem celosvětového výzkumu. Za účelem přežití motolic v hostitelích se u nich vyvinuly nejrůznější adaptace a strategie, z nichž se některé odehrávají také na molekulární úrovni. Motolice produkují velké množství molekul, které jsou zapojeny do nejrůznějších esenciálních fyziologických procesů. Mezi takové molekuly řadíme i inhibitory proteolytických enzymů, které například regulují aktivitu těchto enzymů a modulují imunitní odpověď hostitele. Mnohé z inhibitorů jsou pro své vlastnosti také vhodnými kandidáty využitelnými v boji proti motolicím. Tato bakalářská práce shrnuje dosud známé informace, jak o přirozených inhibitech produkovaných motolicemi, tak o těch syntetických inhibitech, které byly uměle připraveny.

Klíčová slova: Inhibitor, motolice, peptidáza, serpin, cystatin

Abstract

Trematodes are important parasites possessing various localization in the bodies of invertebrate and vertebrate hosts, including human; therefore they are subject of long time intensive worldwide research. Trematodes developed various adaptations and strategies (some of them have also molecular background) enable them to survive in the host bodies. Trematodes produce large amount of different molecules, which are involved in various physiological processes. Inhibitors of proteolytic enzymes form a large group of biologically active compounds, e.g. they regulate the activity of peptidases or modulate host immune response. Many of these inhibitors are investigated as potential candidates in chemotherapeutic fight against trematodes. This thesis reviews the information concerning the natural inhibitors produced by trematodes and also synthetic inhibitors.

Key words: Inhibitor, trematode, peptidase, serpin, cystatin

Obsah

ABSTRAKT	I
OBSAH	II
1. ÚVOD	1
2. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA MOTOLIC	2
3. PROTEOLYTICKÉ ENZYMY	3
4. INHIBITORY PROTEOLYTICKÝCH ENZYMŮ	10
4.1. PŘIROZENÉ INHIBITORY	12
4.1.1. IREVERZIBILNÍ INHIBICE	13
4.1.2. REVERZIBILNÍ INHIBICE	17
4.2. SYNTETICKÉ INHIBITORY	23
5. ZÁVĚR	27
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	28

1. Úvod

Počet druhů motolic je odhadován přibližně na 8000 (Volf and Horák, 2007). Tyto organismy jsou významnými parazity bezobratlých i obratlovců, včetně člověka. Světová zdravotnická organizace (World health organisation, WHO) uvádí, že je na světě nakaženo přes 300 milionů lidí motolicemi z podtřídy Digenea (WHO, 2015). Právě z těchto důvodů jsou motolice studovány výzkumnými týmy po celém světě. Řada těchto studií je orientována na molekulární podstatu vztahu hostitel-parazit, přičemž bylo již mnohokrát prokázáno, že v rámci tohoto vztahu hrají významnou roli právě proteolytické enzymy a jejich inhibitory.

Peptidázy jsou esenciální pro parazitický způsob života, protože zajišťují přežití parazita v hostiteli. Jedná se především o migraci larev tkáněmi hostitele, vyhýbání se imunitnímu systému hostitele nebo jeho modulaci a získávání nutričních složek především degradací proteinů. Studie zaměřené na motolice proto často řeší otázky spojené právě s nepostradatelnou úlohou peptidáz v těchto procesech (McKerrow et al., 2006; Pearson et al., 2010).

U motolic byly v minulosti charakterizovány inhibitory zmíněných proteolytických enzymů, včetně inhibitorů cysteinových peptidáz, které např. regulují aktivitu a tak zprostředkovaně imunitní odpověď hostitele.

Poznatky související s pochopením funkcí peptidáz a inhibitorů včetně interakcí, které se mezi nimi odehrávají, mohou být tedy využitelné nejen v boji proti ostatním parazitům, ale i motolicím, a to zejména prostřednictvím vývoje nových chemoterapeutik a vakcín (McKerrow et al., 2006; Knox, 2007, Pearson et al., 2010).

Jednotlivé peptidázy a inhibitory prezentované v databázích jsou utříděny a označeny anotačními čísly. V této práci jsou použity informace z databází MEROPS 9.13 – databáze peptidáz a jejich inhibitorů (Rawlings et al., 2014); UniProtKB – databáze peptidů (Consortium, 2014); GenBank – databáze DNA sekvencí (Benson et al., 2015); GeneDB – databáze DNA sekvencí patogenních organismů (Logan-Klumpler et al., 2012) a PubChem – databáze malých molekul a jejich biologických aktivit (Wang et al., 2014).

Hlavní cíle práce

V navržené práci by měly být utříděny dosavadní poznatky související s přirozenými a syntetickými inhibitory motolic.

Dílčí cíle této práce

Zpracovat dostupnou literaturu zaměřenou na klasifikaci a členění proteinových/syntetických inhibitorů s účinkem proti aktivitě peptidáz motolic.

2. Základní charakteristika motolic

Motolice (Trematoda) se řadí do kmene ploštěnci (Platyhelminthes) a zahrnují výhradně parazitické zástupce, především pak endoparazitické. Povrch těla dospělých motolic je tvořen syncytiálním tegumentem (neodermis), který neobsahuje cilie, na jeho povrchu se však mohou vyskytovat různé další struktury např. výběžky a trny. Přítomnost tegumentu je hlavním znakem podkmene Neodermata, do kterého patří třídy Trematoda, Cestoda a Monogenea. Třída Trematoda zahrnuje podtřídu Aspidogastrea, která v souvislosti s problematikou této práce nemá větší význam, a podtřídu Digenea, kam spadá většina zástupců, u nichž naopak byla problematika inhibitorů proteolytických enzymů významně rozpracována, např. *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis* či *Paragonimus westermani*. Základní charakteristika těchto a dalších zástupců je proto uvedena níže.

Schistosoma mansoni (krevnička střevní) (Sambon, 1907) patří do čeledi Schistosomatidae. Rozměry samců jsou 6-12 x 1 mm a samic 10-16 x 0,2 mm. Životní cyklus je vázán na vodu a je dvouhostitelský, kde jsou mezihostiteli plži rodu *Biomphalaria*. Definitivním hostitelem je především člověk, u kterého krevnička způsobuje střevní schistosomózu. Dalšími definitivními hostiteli mohou být jiní primáti nebo hlodavci. Dospělci parazitují v portální žíle nebo cévách mezenteria (Gryseels et al., 2006).

Schistosoma japonicum (krevnička jaterní) (Katsurada, 1904) je motolice z čeledi Schistosomatidae. U dospělců je patrný pohlavní dimorfismus. Samci mají rozměry 6-12 x 0,8 mm a samice 12-20 x 0,3 mm. Životní cyklus je dvouhostitelský a je vázán na vodu. Mezihostiteli jsou předožábří plži rodu *Oncomelania*. Definitivních hostitelů je velké množství a zahrnuje i člověka, u kterého způsobuje jaterní schistosomózu. Dospělci jsou lokalizováni především v portální žíle (Gryseels et al., 2006).

Schistosoma haematobium (krevnička močová) (Bilharz, 1852) je motolicí z čeledi Schistosomatidae. Dospělý samci dorůstají rozměrů 10 x 1 mm a samice 12-20 x 0,2 mm. Životní cyklus těchto motolic je dvouhostitelský a je vázán na vodu. Mezihostiteli jsou plži rodu *Bulinus*. Definitivním hostitelem je pak člověk nebo někteří primáti. Způsobují močovou schistosomózu, protože jsou dospělci lokalizováni v urogenitálním traktu (Gryseels et al., 2006).

Fasciola hepatica (motolice jaterní) (Linnaeus, 1758) je zástupcem z čeledi Fasciolidae. Dospělci dosahují délky do 30 mm. Dvouhostitelský životní cyklus je vázán na vodu. Mezihostiteli jsou vodní plži čeledi Lymnaeidae. Definitivními hostiteli jsou převážně přežvýkavci, ale nakazit se mohou i jiní savci včetně člověka. Motolice jaterní parazituje v játrech a žlučovodech, kde způsobuje obstrukci žlučovodů a významné poškození tkáně (Pybus, 2001).

Fasciola gigantica (Cobbold, 1856) je motolice z čeledi *Fasciolidae*. Dospělci dorůstají délky až 75 mm. Životní cyklus je dvouhostitelský a je vázaný na vodu. Mezihostiteli jsou vodní plži z čeledi *Lymnaeidae*. Definitivními hostiteli jsou především buvoli a dobytek, ale i jiné druhy přežvýkavců. Dospělí červi parazitují ve žlučových cestách svého hostitele (Phalee et al., 2015).

Clonorchis sinensis (motolice žlučová) (Cobbold, 1875) patří do čeledi *Opisthorchiidae*. Dospělci mohou dosahovat rozměrů až 15 x 4 mm. Jedná se o motolici s tříhostitelským životním cyklem vázaným na vodu. Prvními mezihostiteli jsou nejčastěji plži rodu *Parafossarulus* a *Bithynia*. Druhým mezihostitelem je ryba, nejčastěji z čeledi *Cyprinidae*. Definitivní hostitel se nakazí pozřením infikované ryby. Mezi definitivní hostitele patří rybožraví savci včetně člověka, u kterých se dospělé motolice nacházejí ve žlučových cestách (Choi et al., 2004; Rim, 1986).

Paragonimus westermani (motolice plicní) (Kerbert, 1878) patří do čeledi *Paragonimidae*. Dospělci dosahují rozměrů okolo 12 x 8 mm. Jedná se o motolici s tříhostitelským životním cyklem vázaným na vodu. Prvními mezihostiteli jsou sladkovodní plži různých druhů. Druhými mezihostiteli jsou zástupci korýšů. Definitivními hostiteli jsou především různé kočkovité a psovitě šelmy, člověk nebo prase. Dospělé motolice parazitují v plicích, kde tvoří cysty, ale výjimečně mohou napadat i jiné orgány (Yokogawa, 1965).

3. Proteolytické enzymy

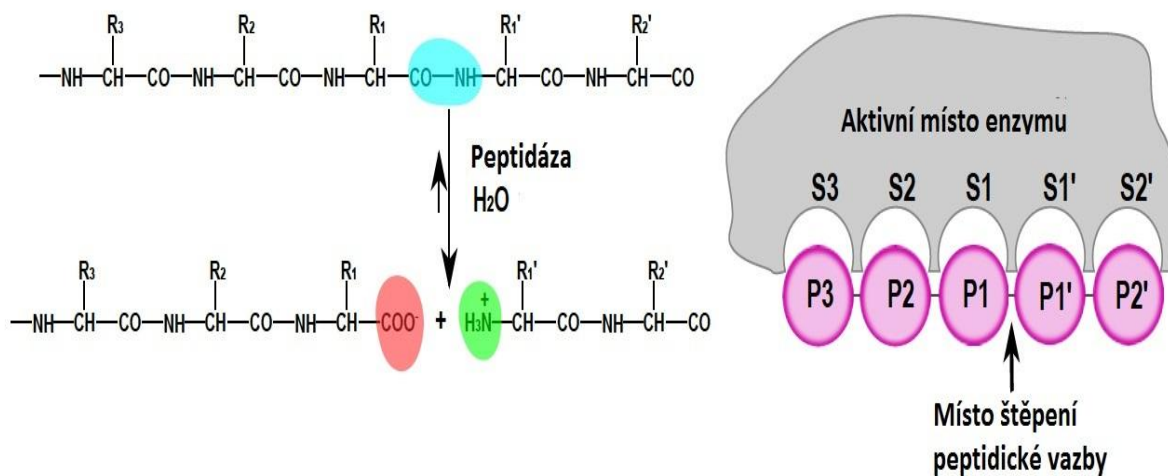
Dnes je doporučeno používat název peptidázy dle práce "*Enzyme Nomenclature*", kterou vydala Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) v roce 1992 (Academic Press NC-IUBMB). Název peptidázy má být používán pro všechny enzymy, které hydrolyticky štěpí peptidickou vazbu. Ukázalo se, že některé proteolytické enzymy patří mezi lyázy (katalyzují štěpení různých chemických vazeb jinak než prostřednictvím hydrolýzy a oxidace) a ne mezi hydrolázy, proto označení peptidázy pro veškeré proteolytické enzymy není úplně přesné (Foulk et al., 2002; Rawlings et al., 2011). V této práci však budu pro zjednodušení souhrnně používat termín peptidáza.

U motolic mají peptidázy esenciální úlohu a jsou tedy jedny z nedůležitějších enzymů u larev i u dospělců (Pearson et al., 2010). Zásadními jsou ve vztahu hostitel-parazit, kde sehrávají hlavní roli při migraci skrze tkáň hostitele, degradaci hemoglobinu a dalších krevních proteinů, vyhýbání se imunitnímu systému a aktivaci zánětu (McKerrow et al., 2006).

Peptidázy lze rozdělit několika způsoby. Nejzákladnějším způsobem třídění je podle místa působení. Peptidázy působící uvnitř polypeptidického řetězce (endopeptidázy) a působící na C- nebo N-konci (exo-peptidázy) (Sajid and McKerrow, 2002). Exo-peptidázy lze dále rozdělit na carboxypeptidázy (C-konec) a aminopeptidázy (N-konec) podle toho, na kterém konci polypeptidu působí. Existují ještě omega-peptidázy, které štěpí peptidickou vazbu bez preference k C- nebo N-konci (Barrett et al., 2012).

Druhým a více specifickým způsobem se proteolytické enzymy dají rozdělit podle jejich molekulární struktury, homologie a funkce na serinové (S), cysteinové (C), aspartátové (A), glutamátové (G), threoninové (T), asparaginylové (N) a metallopeptidázy (M). Existují ještě další dvě skupiny méně prozkoumaných peptidáz. Smíšené (P), kde je nukleofilem aminokyselina serinu, cysteinu nebo threoninu a proteolytické enzymy s neznámou katalytickou aktivitou (U) (Rawlings and Barrett, 1993; databáze MEROPS - Rawlings et al., 2014). Poznatky ohledně katalytických typů peptidáz v souvislosti s motolicemi jsou shrnuty níže (Tab. 1).

Obr. 1. Schéma štěpení peptidické vazby peptidázou (nomenklatura pozic dle Schechter and Berger 1967).



- Cysteinové peptidázy

V aktivním centru cysteinových peptidáz se nacházejí aminokyselinové zbytky cysteinu (Cys) a histidinu (His), které jsou nejčastěji doprovázeny asparaginem (Asn) a případně pak glutaminem (Gln) v různých kombinacích. Nukleofilem je zde sulfhydrylová skupina postranního řetězce cysteinu. Nejznámějšími cysteinovými peptidázami u motolic jsou cathepsin B a L (Sajid and McKerrow, 2002).

- Serinové peptidázy

Serinové peptidázy se vyznačují výskytem tří charakteristických aminokyselinových zbytků v aktivním centru, serinu (Ser), histidinu (His) a kyseliny asparagové (Asp). Jsou však objeveny i další serinové peptidázy s odlišnými katalytickými triádami a dyádami, ve všech se však vyskytuje serin, kde jeho hydroxylová skupina působí jako nukleofil. Mezi nejvýznamnější serinové peptidázy u motolic patří např. cercariální elastáza nebo kallikrein (Hedstrom, 2002).

- Aspartátové peptidázy

V aktivním centru se nachází molekula vody, která je vázána a aktivována ve většině případů dvěma postranními řetězci kyseliny asparagové (Asp), ale v některých případech může být druhý aspartátový zbytek nahrazen jinou aminokyselinou. Aktivovaná molekula vody poté zprostředkovává nukleofilní atak peptidické vazby. U motolic je nejvíce prostudovaný cathepsin D (James, 2004; Rawlings and Barrett, 2004a).

- Glutamátové peptidázy

U glutamátových peptidáz se v aktivním centru nachází molekula vody, která je vázána a aktivována přes postranní řetězec kyseliny glutamové (Glu) a stabilizována nejčastěji glutaminem (Gln). Stejně jako u aspartátových peptidáz zprostředkovává aktivovaná molekula vody nukleofilní atak peptidické vazby. Ačkoliv jsou mechanismy enzymatické aktivity aspartátových a glutamátových peptidáz v mnoha ohledech stejné, jako je například aktivování molekuly vody karboxylovými skupinami aminokyselin; jsou zde i zásadní rozdíly, které nyní rozdělují tyto enzymy do různých katalytických typů. Jedná se především o odlišné složení aminokyselin v aktivním centru enzymu (James, 2004; Rawlings and Barrett, 2004a).

Všechny dosud známe aspartátové a glutamátové peptidázy mají endopeptidázovou aktivitu, ačkoliv není zřejmý důvod, proč by nemohl existovat tento typ katalytického mechanismu i u exopeptidáz (Rawlings and Barrett, 2004a).

- Threoninové peptidázy

Dosud bylo objeveno a prozkoumáno pouze málo threoninových peptidáz, významný je však jejich výskyt a úloha v proteazomech, kde jsou dobře konzervované v jejich aktivních centrech. Hlavní funkcí proteazomu je degradace proteinů na aminokyseliny, ale účastní se i dalších důležitých biologických procesů, např. buněčného cyklu, kontroly kvality proteinů, apoptózy atd. Proteazomy s konzervovaným threoninem v jejich aktivním centru jsou významnou součástí proteolytických enzymů motolic (Murata et al., 2009; Tanaka, 2009).

- „Asparagine peptide lyases“

U těchto proteolytických enzymů je nukleofilem aminokyselina asparaginu (Asn). Postranní řetězec asparaginu vykazuje afinitu k vlastní karbonylové skupině a vytváří stabilní pětičlenný kruh succinimidu a díky jeho působení dochází ke štěpení peptidické vazby vlastního proteinu. Pro štěpení peptidické vazby jsou většinou nutné další aminokyseliny, například kyselina asparagová (Asp) nebo glutamová (Glu) ale i další aminokyseliny (Tajima et al., 2010; Rawlings et al., 2011).

„Asparagine peptide lyases“ byly objeveny poměrně nedávno a dosud bylo identifikováno pouze deset těchto enzymů, ale žádný z nich nebyl nalezen u motolic. (MEROPS - Rawlings et al., 2014).

- Metallopeptidázy

Metallopeptidázy mají exo- i endopeptidázovou aktivitu. Rozdělují se zejména podle toho, zda se v aktivním centru enzymu nachází jeden nebo dva kovové ionty. U metallopeptidáz se dvěma kovovými ionty, až na výjimky, převládá exopeptidázová aktivita, zatímco pokud mají pouze jeden iont kovu, fungují buď jako exo- nebo endopeptidázy (Rawlings and Barrett, 2004b).

Kovovým iontem je nejčastěji zinek, ale mohou to být i jiné prvky jako kobalt, mangan nikl nebo měď (Rawlings and Barrett, 2004b). Pro štěpení je dále nezbytná molekula vody, která zprostředkovává nukleofilní atak peptidické vazby (Seibert and Raushel, 2005).

V aktivním centru metallopeptidáz se nejčastěji vyskytují aminokyseliny histidin (His), kyselina glutamová (Glu), kyselina asparagová (Asp) a lysin (Lys) nebo cystein (Cys). U motolic jsou významné dvě skupiny peptidáz – leucin aminopeptidázy a dipeptidyl peptidázy III (Auld, 2004; Rawlings and Barrett, 2004b).

Tab. 1. Nejvýznamnější peptidázy jednotlivých skupin vyskytující se u motolic.

<i>Skupiny peptidáz</i>	<i>Aminokyseliny v aktivním centru</i>	<i>Biologická funkce u motolic</i>	<i>Druhy motolic s prokázaným nálezem (UniProtKB – anotační číslo)</i>	<i>Publikace o peptidázách u motolic</i>
Cysteinové				
Papain-like	Cys/His/Asn			
Cathepsin B		Migrace tkáněmi, trávení krve, vyhýbání se imunitní odpovědi (Smooker et al., 2010)	<i>Schistosoma mansoni</i> (P25792), <i>S. japonicum</i> (P43157), <i>Trichobilharzia szidati</i> (B5AXI3), <i>T. regenti</i> (Q4VRW9), <i>Fasciola hepatica</i> (Q24949), <i>F. gigantica</i> (Q86MW8), <i>Clonorchis sinensis</i> (Q9BKM4), <i>Metagonimus yokogawai</i> (Q9BPL4)	Klinkert et al., 1989; Rege et al., 1992; Heussler and Dobbelaere, 1994; Skelly and Shoemaker, 2001; Hu et al., 2003; Sajid et al., 2003; Caffrey et al., 2004; Meemon et al., 2004; Dvořák et al., 2005; Liu et al., 2006; Dolečková et al., 2007; Jolly et al., 2007
Cathepsin C		Trávení krve (Sajid and McKerrow, 2002)	<i>S. mansoni</i> (Q26563), <i>S. japonicum</i> (O18533),	Brindley et al., 1997; Hola-Jamriska et al., 2000
Cathepsin F		Trávení krve, vyhýbání se imunitní odpovědi (Pinlaor et al., 2009)	<i>S. mansoni</i> (Q26534), <i>C. sinensis</i> (Q0ZM47), <i>Paragonimus westermani</i> (Q9U0C8), <i>Opisthorchis viverrini</i> (W5RUH3)	Caffrey et al., 2004; Kang et al., 2004; Liu et al., 2006; Park et al., 2009
Cathepsin L		Penetrace a migrace tkáněmi, trávení krve, modulace imunitní odpovědi (Sajid and McKerrow, 2002)	<i>S. mansoni</i> (Q26564), <i>S. japonicum</i> (Q11003), <i>F. hepatica</i> (Q24940), <i>F. gigantica</i> (Q6T857), <i>Fascioloides magna</i> (B5AXI5), <i>C. sinensis</i> (G7YW57), <i>P. westermani</i> (O46177),	Smith et al., 1993; Heussler and Dobbelaere, 1994; Day et al., 1995; Yamasaki et al., 2002; Lee et al., 2006; Liu et al., 2006; Jolly et al., 2007; Park et al., 2009

Calpain-like	Gln/Cys/His/Asn			
Calpain		Ochrana před imunitou hostitele (Kumagai et al., 2005)	<i>S. mansoni</i> (P27730), <i>S. japonicum</i> (O96071)	Karcz et al., 1991; Liu et al., 2006; Jolly et al., 2007;
Asparaginyl-like	His/Cys			
Asparaginyl endopeptidáza		Pravděpodobně aktivuje další proteázy (Dalton et al., 2009)	<i>S. mansoni</i> (Q9NFY9), <i>S. japonicum</i> (P42665), <i>F. hepatica</i> (P80527), <i>F. gigantica</i> (A6Y9U8), <i>O. viverrini</i> (Q208S4)	Klinkert et al., 1989; El-Meanawy et al., 1990; Tkalcevic et al., 1995; Choi et al., 2006; Liu et al., 2006; Adisakwattana et al., 2007
Serinové				
Chymotrypsin-like	His/Asp/Ser			
Cerkariální elastáza		Penetrace a migrace kůži hostitele (Salter et al., 2002)	<i>S. mansoni</i> (Q26553), <i>S. haematobium</i> (Q8MUV6), <i>Schistosomatium douthitti</i> (Q8MUV4)	Newport et al., 1988; Pierrot et al., 1996; Salter et al., 2002; Dolečková et al., 2007
Kallikrein-like		Regulace vaskulární funkce hostitele (Da'dara and Skelly, 2011)	<i>S. mansoni</i> (O16007)	Carvalho et al., 1998
Enterokinase-like		Pravděpodobně aktivace trávicích enzymů ve střevě motolice (Liu et al., 2006)	<i>S. mansoni</i> (Q9XYW2), <i>S. japonicum</i> (Q5D9V2)	Liu et al., 2006
Prolyl-like	Ser /Asp/ His			
Dipeptidyl peptidáza IV		Pravděpodobně migrace tkáněmi (Curwen et al., 2006)	<i>S. japonicum</i> (Q5DB18)	Liu et al., 2006

Aspartátové				
Pepsin A-like	Asp/Asp			
Cathepsin D		Trávení krve (Brindley et al., 2001)	<i>S. mansoni</i> (P91802), <i>S. japonicum</i> (Q26515)	Wong et al., 1997; Verity et al., 1999
Threoninové				
Proteazom-like				
Proteazom		Degradace proteinů, apoptóza, buněčný cyklus (Tanaka, 2009; Murata et al., 2009)	<i>S. mansoni</i> (G4M183), <i>S. japonicum</i> (Q86F39)	Hu et al., 2003
Metallopeptidázy				
Leucin aminopeptidázy-like				
Leucin aminopeptidázy		Trávení krve, remodelace povrchových membrán (McCarthy et al., 2004)	<i>S. mansoni</i> (P91803), <i>S. japonicum</i> (Q9GQ37), <i>F. hepatica</i> (Q17TZ3), <i>P. westermani</i> (A1Z0K2)	Hu et al., 2003; Liu et al., 2006
Dipeptidyl peptidázy III-like	His/Glu/His/Glu			
Dipeptidyl peptidázy III		Neznámá funkce, možná konečný intracelulární katabolismus proteinů (Hola-Jamriska et al., 1999)	<i>S. mansoni</i> (G4VG40), <i>S. japonicum</i> (C1LH70)	Hola-Jamriska et al., 1999

4. Inhibitory proteolytických enzymů

Inhibitory proteolytických enzymů reprezentují v živém organismu důležité biologické nástroje vhodné pro regulaci proteolytické aktivity cílových peptidáz (Bode and Huber, 1993). Mohou být ovšem zapojeny i do dalších dějů jako např. buněčná signalizace. Jsou tedy nepostradatelné pro správné fungování buněk, tkáních a tím i celých organismů (Bode and Huber, 1993; Bode and Huber, 2000). Kromě inhibitorů proteolytických enzymů syntetizovaných daným organismem existují také inhibitory, které je možné připravit i uměle. Jedná se především o malé molekuly, menší než přirozené inhibitory, řazené dle databáze MEROPS do skupiny „small molecule inhibitors“ (SMIs) (MEROPS - Rawlings et al., 2014). Kromě přirozených inhibitorů jsou mnohé SMIs testovány v boji proti některým závažným chorobám působenými také parazitickými organismy (Turk, 2006).

Podobně jako proteolytické enzymy jsou proteinové inhibitory peptidáz tříděny do 67 rodin členěných dle primární struktury proteinových sekvencí. Tyto rodiny jsou seskupeny do 38 klanů dle terciárních struktur. Dále je známo více než 160 inhibitorů ze skupiny SMIs (Rawlings, 2010).

Tab. 2. Příklady identifikovaných inhibitorů a neinhibičních homologů (bez inhibiční aktivity) proteolytických enzymů u parazitických skupin. Šedou barvou je vyznačena třída Trematoda, kterou se tato práce podrobněji zabývá (dle MEROPS - Rawlings et al., 2014).

<i>Parazitické organismy (kmen/třída)</i>	<i>Počet známých inhibitorů a neinhibičních homologů</i>	<i>Počet klanů</i>	<i>Počet rodin</i>	<i>Příklady organismů</i>
<i>Protozoa</i>	53	8	8	
<i>Diplomonanida</i>	1	1	1	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Trichomonada</i>	3	2	2	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Tritrichomonas foetus</i>
<i>Kinetoplastea</i>	11	6	6	<i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania major</i>
<i>Oligohymenophora</i>	3	1	1	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>
<i>Perkinsea</i>	4	3	3	<i>Perkinsus marinus</i>
<i>Aconoidasida</i>	6	3	3	<i>Plasmodium vivax</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Coccidia</i>	19	8	8	<i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Lobosa</i>	2	2	2	<i>Acanthamoeba castellanii</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>

<i>Microsporidia</i>	4	2	2	<i>Nosema caranae</i> , <i>Encephalitozoon cuniculi</i>
<i>Nematoda</i>	114	12	13	
<i>Enoplea</i>	25	10	11	<i>Trichinella spiralis</i> , <i>Trichuris trichiura</i>
<i>Chromadorea</i>	89	12	13	<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Anisakis simplex</i> , <i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Trichostrongylus colubriformis</i> ,
<i>Hirudinea</i>	22	7	8	<i>Hirudo medicinalis</i> , <i>Limnatis nilotica</i>
<i>Platyhelminthes</i>	49	11	12	
<i>Cestoda</i>	15	10	10	<i>Echinococcus granulosus</i> , <i>Taenia solium</i>
<i>Trematoda</i>	34	11	12	<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Clonorchis sinensis</i>
<i>Arthropoda</i>	273	16	24	
<i>Chelicerata</i>	101	16	24	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Sarcoptes scabiei</i>
<i>Insecta</i>	172	13	16	<i>Pediculus humanus</i> , <i>Cimex lectularius</i> , <i>Culex pipiens</i> , <i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Glossina morsitans</i>
Celkem	511			

Tab. 3. Identifikované inhibitory u motolic, kterými se zabývá tato práce (dle MEROPS - Rawlings et al., 2014).

<i>Druh motolice</i>	<i>Počet známých peptidáz a nepeptidázových homologů</i>	<i>Počet známých inhibitorů a neinhibičních homologů*</i>	<i>Počet klanů</i>	<i>Počet rodin</i>
<i>C. sinensis</i>	256	32	8	8
<i>F. gigantica</i>	16	6	2	2
<i>F. hepatica</i>	26	8	3	3
<i>P. westermani</i>	13	3	2	2
<i>S. haematobium</i>	3	1	1	1
<i>S. japonicum</i>	211	21	8	9
<i>S. mansoni</i>	308	52	10	10
Celkem	833	123		

* Poznámka: Suma počtu inhibitorů zjištěných s využitím databáze MEROPS u jednotlivých druhů motolic se neshoduje s počtem inhibitorů pro celou třídu Trematoda. Pravděpodobně jsou v rámci databáze některé inhibitory shrnuty do jednoho celku, protože se jedná o homologické struktury.

Inhibitory lze rozdělit dle několika kritérií. V rámci této práce je použito základní členění na inhibitory přirozené a syntetické. Jako další se nabízí členění podle skupin peptidáz, které inhibují, toto rozdělení však není příliš praktické, protože některé inhibitory mohou inhibovat více skupin peptidáz. Vhodnější se proto zdá být rozdělení podle typu interakce s peptidázou na reverzibilní a ireverzibilní inhibitory; toto rozdělení je aplikováno i v této práci (Rawlings, 2004; Turk 2006).

4.1. Přirozené inhibitory

Dosud bylo objeveno mnohem méně přirozených inhibitorů peptidáz než peptidáz samotných, např. u motolic je podle databáze MEROPS identifikováno 833 peptidáz a 123 inhibitorů včetně jejich homologů (MEROPS - Rawlings et al., 2014). Lze spekulovat, že inhibitorům nebyla dosud věnována taková pozornost jako proteolytickým enzymům. Pravděpodobnější však je, že tento fakt je zapříčiněn nízkou specifitou inhibitorů k cílovým peptidázám, tzn. jeden inhibitor může inhibovat několik proteolytických enzymů (Turk, 2006). To je způsobeno také tím, že většina inhibitorů nemá konzervované úseky v aktivním centru, které by definovaly specifitu vůči jednotlivým katalytickým typům peptidáz (Rawlings, 2004).

Jedná se o molekuly různých hmotností a velikostí. Nejmenší inhibitory mohou dosahovat velikosti desítek aminokyselin a molekulové hmotnosti jen několika kDa, např. marinostatin, inhibitor izolovaný z *Alteromonas sp.* (1,5 kDa; 14 aminokyselin) (Takano et al., 1991), u motolic je to např. FgStefin-1, inhibitor izolovaný z motolice *Fasciola gigantica* (11,2 kDa) (Tarasuk et al., 2009); zatímco největší mohou dosahovat hmotnosti až několika desítek kDa a dokonce mohou být i větší než jejich cílové peptidázy, např. contrapsin u motolice *S. mansoni* (68 kDa), který inhibuje trypsin (23,3 kDa) (Modha and Doenhoff, 1994). Prozatím bylo prokázáno, že všechny přirozené inhibitory endogenních proteolytických enzymů, tzn. působící na peptidázy ze stejného organismu, jsou proteiny. Příklady nejznámějších přirozených inhibitorů jsou zobrazeny v Tab. 5. Pouze některé mikroorganismy produkují nepeptidické inhibitory peptidáz (Bode and Huber, 1993; Bode and Huber 2000), např. *Actinomyces sp.* exprimují nepeptidický inhibitor API-III („alkaline protease inhibitor“) (Pandhare et al., 2002).

4.1.1. Ireverzibilní inhibice

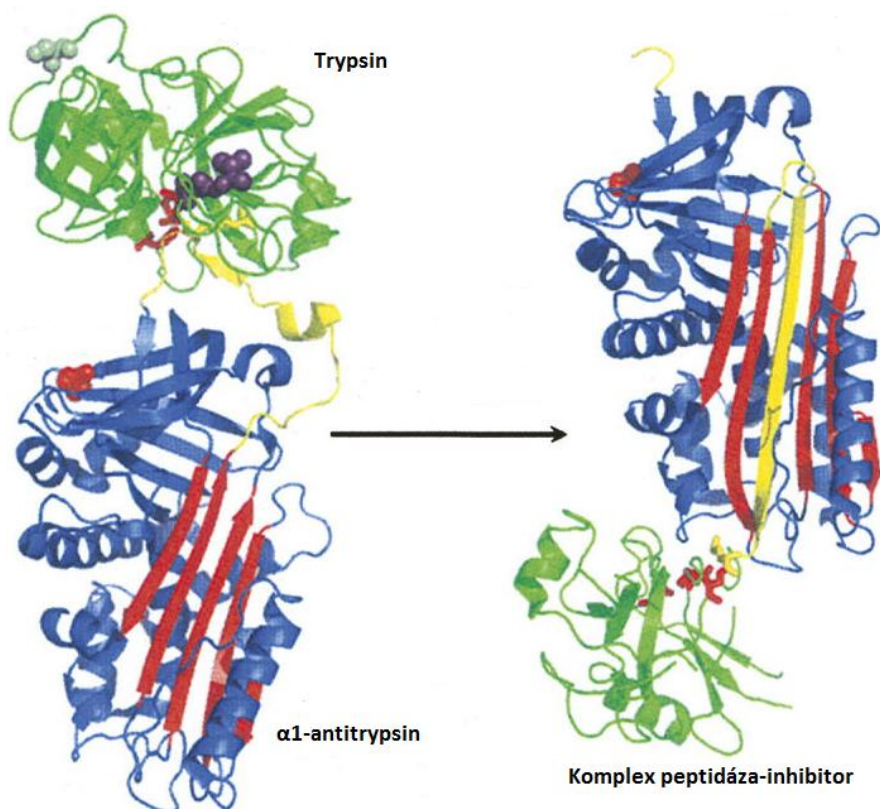
Tento typ nevratné reakce je typický pro systém inhibitor-endopeptidáza, kdy je nutné, aby došlo ke štěpení vnitřní peptidické vazby inhibitoru. Po štěpení vazby dojde k velké konformační změně inhibitoru, což vyvolá změnu konformace i samotné peptidázy, čímž je zablokováno její aktivní centrum (Knox, 2007). Inhibitory tohoto typu jsou schopné inhibovat široké spektrum peptidáz. Nejvíce prostudovaná inhibiční aktivita je pak u cysteinových, serinových a threoninových peptidáz, protože tvoří většinu všech peptidáz. (Powers et al., 2002). Ireverzibilní inhibiční reakce je typická např. pro inhibitory ze skupiny serpinů (serine protease inhibitors), jako α 1-antitrypsin z lidského krevního séra, který je dnes používán jako modelová molekula (Axelsson and Laurell, 1965; Molehin et al., 2012), ze skupiny makroglobulinů, jako α 2-makroglobulin, který byl identifikován např. v lidském krevním séru (Werb et al., 1974) nebo skupiny smapinů (small serine protease inhibitors) (Zang and Maizels, 2001).

V případě smapinů se jedná o skupinu inhibitorů příbuzným serpinům, s relativně malou velikostí - méně než 100 aminokyselin s konzervovanými 10 cysteinovými aminokyselinovými zbytky, které tvoří 5 disulfidických můstků. Tyto molekuly byly u parazitů, konkrétně parazitických hlístic, již identifikovány, avšak u motolic nebyly tyto molekuly prozatím prokázány (podobně jako makroglobuliny). Bylo zjištěno, že u hlístic, zastávají především antikoagulační funkci a ochranu před hostitelskými trávicími enzymy (Zang and Maizels, 2001). Z těchto rodin tedy byly u motolic objeveny pouze serpiny.

Serpiny tvoří skupinu strukturně konzervovaných proteinů, které inhibují především serinové peptidázy. Název „serpin“ vznikl ze spojení **serine protease inhibitors**. Serpiny dosahují průměrné velikosti 350-400 aminokyselin a molekulární hmotnosti 40-50 kDa (van Gent et al., 2003). Zpravidla se serpiny skládají ze 3 β -listů (A, B, C), 8-9 α -helixů a proteinového motivu zvaného „reactive central

loop“ (RCL), který se shoduje s aminokyselinami v aktivním centru cílových peptidáz a určuje tak selektivitu serpinů (Gatto et al., 2013; Irving et al., 2000). RCL motiv je obvykle tvořen přibližně 20 aminokyselinami blízko C-konce (van Gent et al., 2003). Po štěpení peptidické vazby v RCL dochází k vložení jeho konce do centra β -listu A a tím dochází k velké konformační změně. Tato konformace je vysoce stabilní. V konečné fázi dojde ke vzniku kovalentních vazeb mezi peptidázou a serpinem za vzniku acyl esterového intermediátu (Obr. 2). Tento proces je doprovázen zásadními distorzemi v aktivním centru peptidázy, které jsou příčinou ireversibilní reakce (Huntington et al., 2000, Law et al., 2006).

Obr. 2. Schéma reakce trypsinu (zelený; UniProtKB: P00760) s α 1-antitrypsinem (modrá; UniProtKB: P01009). Po štěpení peptidické vazby v RCL (žlutá) dojde k jeho vazbě do centra β -listu A (červená) (Liu et al., 2007).



Serpiny jsou intracelulární, membránové nebo sekretované proteiny, a proto hrají klíčovou fyziologickou roli v proteolytických drahách biologických systémů, jako je srážení krve, aktivace komplementu a zánětlivé reakce. U parazitických organismů mají pravděpodobně hlavní roli jako regulátory imunitní odpovědi hostitele, čímž napomáhají přežití parazita (Huntington et al., 2000; Molehin et al., 2012). Imunitní odpověď hostitele lze prostřednictvím inhibice modulovat několika způsoby. Jedním z možných způsobů je inhibice neutrofilní elastázy, peptidázy produkované

neutrofilů, např. Smpi56 u *S. mansoni* (Molehin et al., 2012). Další pravděpodobný způsob byl popsán u contrapsinu lokalizovaném na povrchu tegumentu *S. mansoni*, kde specificky váže hostitelský trávicí enzym trypsin a tím ho inhibuje. Vytvořením komplexu contrapsin-trypsin pak pravděpodobně dochází k blokování průniku protilátek k povrchu parazita (Modha and Doenhoff, 1994).

Serpiny **schistosom**: Prohledáváním databází peptidů bylo nalezeno 8 kompletních serpinových sekvencí u *S. mansoni* a jedna částečná a 3 kompletní serpinové sekvence u *S. japonicum* homologních se vzorovým serpinem α 1-antitrypsinem (Quezada and McKerrow, 2011). Podrobněji prozkoumáno je však zatím pouze několik serpinů.

- Smpi56 (GenBank: CCD60349; UniProtKB: G4LZN0) je serpin o molekulární hmotnosti 56 kDa a o délce 387 aminokyselin. Identifikovaný byl u dospělých červů *S. mansoni* a má pravděpodobně dvojí aktivitu. Zaprvé dokáže regulovat elastázovou aktivitu schistosom samotných, zadruhé je může chránit před neutrofilní elastázou uvolněnou aktivovanými neutrofilů hostitele (Ghendler et al., 1994).
- Contrapsin (GenBank: CCD60352; UniProtKB: G4LZN4) je inhibitor serinových proteáz o molekulární hmotnosti 68 kDa a délce 412 aminokyselin. Jedná se o intracelulární i povrchový protein tegumentu u dospělých samců *S. mansoni*. Pravděpodobná funkce tohoto serpinu je vyhýbání se imunitnímu systému pomocí vytváření komplexů contrapsin-trypsin, které blokují pronikání protilátek k povrchu parazita (Modha and Doenhoff, 1994).
- Sj serpin (GenBank: AAK57435; UniProtKB: Q967L9) o molekulární hmotnosti 45,2 kDa a délce 400 aminokyselin je protein asociovaný s membránou. Sj serpin je produkován na povrchu střevního epitelu a dále na dorsální i ventrální straně povrchu dospělců i cercárií *S. japonicum*. U dospělců byl detekován v mnohem větším množství. Bylo také zjištěno, že stimuluje Th2 typ imunitní odpovědi (Yan et al., 2005).
- SJB6 (GenBank: CAX69453; Q967L9) je serpin o molekulární hmotnosti 60 kDa a délce 387 aminokyselin. Jedná se o protein sekretovaný všemi stádii *S. japonicum* v definitivním hostiteli, především je pak produkován vajíčky. Pravděpodobně může mít roli právě v ochraně vajíček před peptidázami hostitele uvnitř hostitelských tkání. (Molehin et al., 2014).
- Sh serpin (GenBank: AAA19730; UniProtKB: Q26502) má molekulovou hmotnost 46,2 kDa a délku 406 aminokyselin. Sh serpin je v membráně zakotvený protein produkováný na povrch tegumentu dospělců *S. haematobium*. Jeho funkce je zatím neznámá, ale protože se jedná se o inhibitor trypsinu, který je produkován na povrch parazita, mohl by mít ochrannou funkci před peptidázami hostitele (Huang et al., 1999).

Serpiny **fasciolidních motolic**: Dosud nebyly identifikovány inhibitory ze skupiny serpinů u fasciolidních motolic.

Serpiny ***Clonorchis sinensis***: U motolice *C. sinensis* byly dosud objeveny dva inhibitory ze skupiny serpinů.

- Cspro serpin (GenBank: AHZ96593; UniProtKB: H2KUA9) o molekulární hmotnosti 42,2 kDa a velikosti 382 aminokyselin je intracelulární protein lokalizovaný v cytoplasmě kvůli absenci charakteristických signálních peptidů. Cspro serpin není prekurzorem Cs serpinu, jak by se mohlo podle názvu zdát; jedná se o první serpin izolovaný z motolice *Clonorchis sinensis* (Yang et al., 2009). Tento inhibitor je produkován všemi stádii parazita a u dospělců je exprimován ve žlutkových žlázách a varlatech. Cspro serpin specificky inhibuje chymotrypsin, trypsin a thrombin. Předpokládá se, že chrání metacerkárie před hostitelskými peptidázami po excystaci. Další pravděpodobnou funkcí je zachování správného vývoje a maturace miracií ve vajíčku pomocí regulace vnitřních serinových peptidáz. Bylo také prokázáno, že stimuluje Th1 typ imunitní odpovědi (Yang et al., 2009; Lei et al., 2013).

- Cs serpin (GenBank: ABR68547; UniProtKB: A6YID8) s molekulární hmotností 44 kDa o délce 385 aminokyselin je intracelulární serpin u všech životních stádií *C. sinensis*, převážně pak u metacerkárií. U dospělců je syntetizován ve žlutkových žlázách a varlatech. Analýzou sekvence proteinu bylo zjištěno, že se jedná o cytosolický protein. Cs serpin specificky inhibuje chymotrypsin, ale v malé míře i jiné peptidázy jako trypsin, thrombin, elastázy nebo cathepsin G. Kvůli tomu, že je exprimován v mnohem větší míře u metacerkárií než u dospělců lze předpokládat, že hraje zásadní roli v ochraně před hostitelskými proteolytickými enzymy po excystaci metacerkárií ve střevě hostitele stejně jako Cspro serpin. Jeho další funkcí je nejspíš zachování správného vývoje a maturace miracií ve vajíčku, ale pravděpodobně i samotná produkce vajíček udržováním homeostáze ve žlutkových buňkách regulací vnitřních serinových peptidáz. Bylo také zjištěno, že stimuluje Th1 typ imunitní odpovědi hostitele (Kang et al., 2010; Lei et al., 2013).

Serpiny ***Paragonimus westermani***: Zatím byl nalezen pouze jeden serpin u motolice *P. westermani*.

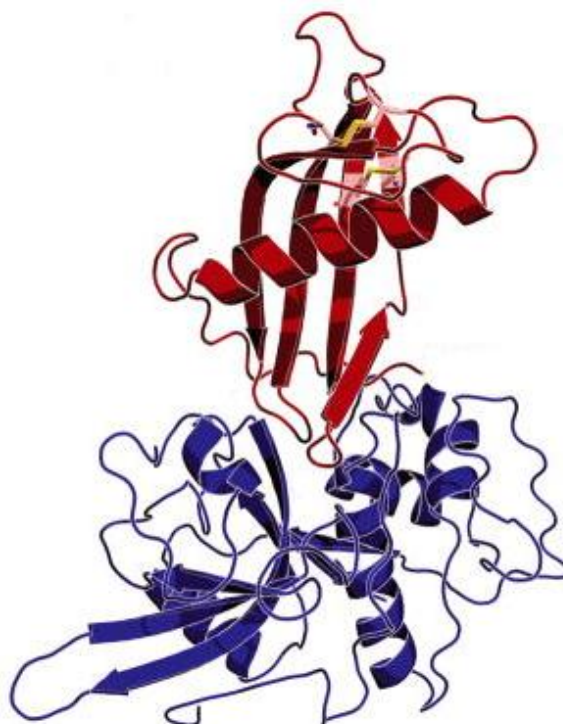
- Pw serpin (GenBank: ABV57466; UniProtKB: A9XX87) je serpin o molekulární hmotnosti 43 kDa a délce 387 aminokyselin. Jedná se o intracelulární cytosolický protein. Prokázán byl u všech vývojových stádií *P. westermani*, přičemž jeho exprese roste společně s vývojem parazita. Tento serpin specificky inhibuje aktivitu trypsinu, thrombinu a chymotrypsinu a v menší míře i elastáz a cathepsinu G. Předpokládá se, že hraje zásadní roli v regulaci aktivity intracelulárních serinových peptidáz parazita, které jsou pro jeho život esenciální (Hwang et al., 2009).

4.1.2. Reverzibilní inhibice

Reverzibilní inhibitory mají vysokou afinitu k aktivnímu centru cílové peptidázy. Inhibice je založena na vytvoření dočasné těsné vazby mezi inhibitorem a aktivním centrem peptidázy, které blokuje před navázáním substrátu. Jedná se o nekovalentní chemickou vazbu založenou na slabých interakcích, jako je vodíková vazba nebo hydrofobní interakce. Tato reakce je vratná, kdykoliv může dojít k rozpadu nekovalentních interakcí, proto reverzibilní inhibitory blokují pouze část cílových peptidáz na rozdíl od ireverzibilních inhibitorů, které dříve nebo později zablokují veškeré peptidázy. Reverzibilní inhibiční reakce je typická pro inhibitory cysteinových peptidáz - cystatiny, aspartátové peptidázy a metallopeptidázy (Turk, 2006; Knox, 2007). U motolic byly dosud identifikovány reverzibilní inhibitory pouze ze skupiny cystatinů.

Cystatiny jsou skupinou inhibitorů papain-like cysteinových peptidáz. Inhibitory se přímo těsně vážou do aktivního místa cílové peptidázy, které takto blokují. Cystatiny mají tvar klínu složeného z β -listu s pěti antiparalelními řetězci zabalenými okolo centrálního dlouhého α -helixu. Vrchol klínu je formován N-terminální doménou a dvěma vlásenkami, které tvoří tři vysoce konzervované reaktivní domény (Obr. 3) (Bode et al., 1988; Knox, 2007). Některé cystatiny mohou mít druhé nezávislé inhibiční centrum se specifitou pro asparaginylní endopeptidázy (Knox, 2007), např. lidský cystatin C (Alvarez-Fernandez et al., 1999).

Obr. 3. Komplex cathepsinu L (modrá; UniProtKB: P07711) a cystatinu (červená; UniProtKB: B7PKZ1) s vyznačenými disulfidickými můstky (žlutá) (Schwarz et al., 2012).



Skupina cystatinů se dále dělí na tři odlišné proteinové podrodiny založené na podobnostech v sekvencích aminokyselin a 3D struktuře. Rozdělují se na podrodiny kininogenů, cystatinů a stefinů (Rawlings et al., 2004c; MEROPS - Rawlings et al., 2014). Kininogeny byly dosud nalezeny pouze u savců (Bobek and Levine, 1992), proto se jimi v rámci této práce nebudu dále zabývat.

Stefiny, neboli **cystatiny typu I**, jsou neglykosylované proteiny o průměrné délce 100 aminokyselin a molekulární hmotnosti okolo 11 kDa. Vyznačují se tím, že nemají žádnou signální sekvenci ani disulfidické můstky. Jedná se o převážně intracelulární inhibitory, jejichž funkce je regulace endogenních proteinů v mnoha typech buněk (Abrahamson et al., 2003).

Podrodina cystatinů, nebo také **cystatiny typu II** jsou proteiny o průměrné délce 120 aminokyselin a o molekulární hmotnosti okolo 13 – 14 kDa. Cystatiny mají signální sekvenci a dva disulfidické můstky na C-konci proteinu. Pevně jsou tyto inhibitory exportovány z buňky a účastní se regulace exogenních peptidáz (Abrahamson et al., 2003).

Cystatiny schistosom: U schistosom bylo celkem nalezeno 10 proteinů odpovídajících rodině cystatinů, na základě jejich konzervovaných úseků a motivů (Tab. 4). U *S. japonicum* i u *S. haematobium* byly nalezeny 3 a u *S. mansoni* 4 tyto proteiny z podrodin stefinů i cystatinů. U *S. mansoni* bylo zjištěno, že tyto motolice exprimují cystatiny a stefiny během celého životního cyklu jedince. Cystatiny byly exprimovány v různých částech schistosom, např. v buňkách střevního epitelu a tegumentu na povrchu dospělého červa nebo v pohlavních orgánech. Předpokládanou funkcí celé skupiny cystatinů tak je regulace proteolytické aktivity endogenních peptidáz parazita a ochrana před degradací hostitelskými peptidázami (Cuesta-Astroz et al., 2014; Guo, 2015). U schistosom bylo dosud blíže charakterizováno pouze několik cystatinů, které jsou popsány níže.

- Sm cystatin (GenBank: AAQ16180, UniProtKB: Q7YW72) je cystatin typu I (stefiny) o molekulární hmotnosti 11,4 kDa a délce 101 aminokyselin. Tento inhibitor je intracelulární cystatin exprimovaný motolicí *S. mansoni*. Sm cystatin patří mezi cystatiny typu I na základě absence signálního peptidu a přítomnosti konzervovaných motivů, např. běžného stefinového motivu QVVAG. Pravděpodobně se jedná o cytosolický enzym právě kvůli absenci signálního peptidu. Sm cystatin je exprimován u dospělců i schistosomul. Tento inhibitor vykazuje inhibiční aktivitu proti papainu, pravděpodobně tak reguluje aktivitu intracelulárních cysteinových peptidáz parazita a patrně se i účastní regulace peptidáz při trávení krve, protože dokáže u schistosomul kompletně inhibovat formování haemozoinu, černého pigmentu, který je produktem trávení krve (Morales et al., 2004).
- Sj cystatin (GenBank: ACU68954, UniProtKB: F0UXG3) je cystatin typu I (stefiny) s molekulární hmotností 11,3 kDa a délkou 101 aminokyselin. Jedná se o cystatin typu I, kam byl zařazen na základě charakteristických znaků, jako jsou konzervované motivy typické pro stefiny nebo absence disulfidických můstků a signálních peptidů. Sj cystatin je exprimován ve všech životních stádiích

S. japonicum, především pak u dospělců a to v buňkách střevního epitelu, kde reguluje aktivitu endogenních peptidáz; a tegumentu na povrchu dospělých červů, kde je pravděpodobně jeho funkcí ochrana před imunitním systémem svého hostitele (He et al., 2011).

Tab. 4. Inhibitory z rodiny cystatinů identifikované u schistosom (Cuesta-Astroz et al., 2014).

<i>Anotační číslo (GeneDB)</i>	<i>Délka proteinu (počet aminokyselin)</i>	<i>Signální peptid</i>	<i>Disulfidické můstky</i>
<i>S. mansoni</i>			
Smp_006390.1	101	NE	NE
Smp_034420.1	117	ANO	ANO
Smp_034420.2	148	ANO	ANO
Smp_034420.3	145	ANO	ANO
<i>S. japonicum</i>			
Sjc_0005780	145	ANO	ANO
Sjc_0066340	101	NE	NE
Sjc_0094540	123	NE	ANO
<i>S. haematobium</i>			
Sha_109477	160	ANO	ANO
Sha_109478	145	ANO	ANO
Sha_300402	101	NE	NE

Cystatiny **fasciolidních motolic**: Dosud byly nalezeny 2 cystatiny typu I (stefiny) u *F. gigantica* a jeden multidoméno­vý cystatin u *F. hepatica*.

- FgStefin-1(GenBank: FJ827152, UniProtKB: C6GC97) je cystatin typu I (stefin) o molekulární hmotnosti 11 kDa a délce 99 aminokyselin. Je hlavním exprimovaným antigenem *F. gigantica*. Tento inhibitor má jak intracelulární, tak extracelulární regulační funkci. V buňkách se nachází v cytosolické formě. FgStefin-1 je u juvenilních i dospělých stádiích *F. gigantica* exprimován v tegumentu, ústní i břišní přísavce, hltanu, genitálním póru, cirru, děloze, vaječnících, ve střevním epitelu a dále je součástí exkrečních/sekrečních produktů. Tento stefin dokáže inhibovat savčí cathepsiny B, L a S, proto má pravděpodobně ochrannou funkci před hostitelskými ale i vlastními cysteinovými peptidázami (Tarasuk et al., 2009). Cathepsin L je totiž dominantní ve střevě exprimovanou peptidázou (Yamasaki et al., 2002) a u cathepsinu B byla prokázána exprese ve výše zmíněných pohlavních systémech *F. gigantica* (Meemon et al., 2004).

- FgStefin-2 (GenBank: AFV53480, UniProtKB: K4P3W9) je cystatin typu I (stefiny) o molekulární hmotnosti 12,5 kDa a délce 116 aminokyselin exprimovaný motolicí *F. gigantica*. Ačkoliv patří mezi cystatiny typu I (stefiny), sekvence tohoto genu zahrnuje i kód pro signální peptid, což není pro stefiny běžné. Jedná se stejně jako v případě FgStefin-1 protein, který byl identifikován v exkrementně-sekrecčních produktech motolice. FgStefin-2 je exprimován metacerkářiemi a dospělci ve střevním epitelu a u dospělých motolic dále v prostatických buňkách. FgStefin-2 má vysokou inhibiční aktivitu vůči cathepsinu B, dá se tedy předpokládat, že slouží jako regulátor chránící metacerkárie před autoproteolýzou při migraci tkáněmi hostitele. Metacerkárie jsou kvůli malým rozměrům více náchylné k poškození vlastním cathepsinem B. U dospělců nejspíš reguluje aktivitu cysteinových peptidáz, např. cathepsinu B v reprodukčních systémech, u kterého bylo prokázáno, že je zde exprimován (Meemon et al., 2004; Siricoon et al., 2012).

- Multidoménový cystatin *F. hepatica* (GenBank: CAC86126; UniProtKB: Q711N7) o molekulární hmotnosti 79 kDa a délce 690 aminokyselin je prvním nalezeným multidoménovým cystatinem u bezobratlých organismů. Skládá se ze šesti domén, kde jsou dvě domény dobře konzervované a zbylé čtyři jsou degenerované, tzn. nevykazují inhibiční aktivitu. Tento cystatin je sice svou strukturou podobný kininogenům – konzervované a degenerované domény, ale fylogenetické analýzy ukazují větší příbuznost všech domén s cystatiny typu II. Tento multidoménový cystatin je produkován juvenilně a dospělci, ale k největší expresi dochází právě u nově excystovaných juvenilních stádií (Dalton et al., 2003). Doména 4 je považována za hlavní inhibiční centrum, které dokáže inhibovat papain a cathepsin L1, který je hlavní cysteinovou peptidázou *F. hepatica*. Hlavní funkcí tohoto multidoménového cystatinu je pravděpodobně ochrana nedospělých stádií před vlastními cysteinovými peptidázami, při migraci tkáněmi hostitele, především pak cathepsinu L, který je produkován téměř okamžitě po excystaci. Předpokládá se, že se může účastnit i modulace hostitelské imunitní odpovědi, tak že stimuluje Th2 typ imunitní odpověď (Khaznadji et al., 2005).

Cystatiny *Clonorchis sinensis*: U motolice *C. sinensis* byly dosud popsány dva inhibitory z podrodiny cystatinů typu I (stefiny).

- CsStefin-1 (GenBank: ABR68548; UniProtKB: A6YID9) o molekulární hmotnosti 15,2 kDa a délce 136 aminokyselin je intracelulární stefin, který má dobře konzervované všechny znaky podrodiny cystatinů typu I (stefiny), nemají žádnou signální sekvenci, ani disulfidické můstky ve své struktuře. CsStefin-1 je exprimován v buňkách střevního epitelu juvenilů i dospělých červů, nebyl však nalezen ve vajíčkách. Byla prokázána jeho inhibice mnoha cysteinových peptidáz včetně papainu, cathepsinu B a L a především cathepsinu F, který je nejvíce exprimovanou cysteinovou peptidázou u *C. sinensis*. Předpokládá se tedy, že má regulační funkce a moduluje právě aktivitu cathepsinu F a tím chrání střevní buňky parazita před poškozením vlastními endogenními cysteinovými peptidázami (Kang et al., 2011).

- CsStefin-2 (GenBank: ABR68549, UniProtKB: A6YIE0) o molekulární hmotnosti 14 kDa a délce 124 aminokyselin patří do podrodiny cystatinů typu I (stefiny). Mezi stefiny byl zařazen na základě strukturních a fylogenetických znaků, nemá signální peptid a není N-glykosylován. Ačkoliv má CsStefin-2 méně konzervované úseky, na rozdíl od běžného stefinového motivu QVVAG má motiv QIVSG; nemají na inhibiční aktivitu vliv. CsStefin-2 je intracelulární stefin, pravděpodobně cytosolický, který je exprimován ve střevním epitelu všech životních stádií *C. sinensis* včetně vajíček. Na základě výsledků experimentů bylo prokázáno, že dokáže inhibovat papain, cathepsin B a L a především cathepsin F. Pravděpodobně slouží jako regulátor cysteinových peptidáz parazita a chrání tak střevní buňky před poškozením. Bylo však zjištěno, že CsStefin-2 již dokáže inhibicí regulovat autokatalytickou maturaci cathepsinu F (Kang et al., 2014).

Cystatiny ***Paragonimus westermani***: U motolice *P. westermani* dosud nebyl nalezen žádný inhibitor ze skupiny cystatinů.

Tab. 5. Příklady dalších významných přirozených inhibitorů peptidáz motolic (dle Powers et al., 2002; MEROPS - Rawlings et al., 2014).

<i>Název inhibitoru</i>	<i>Anotační číslo (PubChem)</i>	<i>Třída inhibitoru</i>	<i>Inhibiční aktivita</i>	<i>Prokázané cílové peptidázy u motolic</i>	<i>Prvotní izolace inhibitoru</i>	<i>Publikace týkající se motolic</i>
Aprotinin	16130295	Reverzibilní polypeptid	Trypsin, kallikrein, plasmin, chymotrypsin (Carvalho et al., 1998)	Kallikrein	<i>Bos taurus</i> - slinivka (Kunitz and Northrop, 1936)	Carvalho et al., 1998
Bestatin	72172	Reverzibilní dipeptid	Leucin aminopeptidáza (Xu and Dresden, 1986)	Leucin aminopeptidáza	<i>Streptomyces Olivoreticuli</i> (Umezawa et al., 1976)	McCarthy et al., 2004; Xu and Dresden, 1986
E-64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane)	123985	Ireverzibilní epoxysuccinylový peptid	Širokospektrý inhibitor cysteinových peptidáz (Suzuki et al., 1981; Powers et al., 2002)	Cathepsin B, C, L, F; asparaginylní endopeptidáza	<i>Aspergillus japonicus</i> (Hanada et al., 1978)	Caffrey et al., 1997; Dalton et al., 1996; Holar-Jamriska et al., 2000; Kang et al., 2004; Sajid and McKerrow, 2002
Elastatinal	3211	Reverzibilní aldehydový peptid	Neutrofilní elastáza (Dolečková et al., 2009)	Cathepsin B	<i>Streptomyces griseoruber</i> (Umezawa et al., 1973)	Dolečková et al., 2009
Epoxomicin	9915668	Ireverzibilní α,β -epoxoketon	Proteazom (Meng et al., 1999; Powers et al., 2002)	Proteazom	<i>Actinomyces sp.</i> Q996-17 (Hanada et al., 1992)	Guerra-Sá et al., 2005
Lactacystin	6610292	Ireverzibilní β -lakton	Proteazom, cathepsin A (Ostrowska et al., 1997)	Proteazom	<i>Streptomyces sp.</i> OM-6519 (Omura et al., 1991)	Guerra-Sá et al., 2005
Leupeptin	72429	Reverzibilní amid	Trypsin, kallikrein, cathepsin B, H, L, S; plasmin, papain, calpain (Aoyagi et al., 1969)	Cathepsin B, L; kallikrein, calpain	<i>Actinomyces sp.</i> (Aoyagi et al., 1969)	Moczoń, 2011
Pepstatin	5478883	Reverzibilní hexapeptid	Cathepsin D, pepsin, renin (Fujinaga et al., 1995)	Cathepsin D	<i>Actinomyces sp.</i> (Umezawa et al., 1970)	Caffrey et al., 2005
Soybean trypsin inhibitor	49777573	Reverzibilní polypeptid	Trypsin, kallikrein, plasmin, neutrofilní elastáza (Kunitz, 1947)	Kallikrein	<i>Glycine max</i> (Kunitz, 1945)	Carvalho et al., 1998

4.2. Syntetické inhibitory

Většina synteticky připravovaných inhibitorů patří mezi malé inhibitory (velikost) ze skupiny „small molecule inhibitors“ (SMIs) v databázi MEROPS (Rawlings et al., 2014). Skupina SMIs čítá přes 160 zástupců, u kterých je charakterizováno přes 1100 interakcí s peptidázami. SMIs se dají rozdělit do čtyř skupin podle jejich aktivity na: a) Inhibující více než jeden katalytický typ peptidáz; b) Inhibující peptidázy jednoho katalytického typu, ale více než jedné peptidázové rodiny; c) Inhibující více než jednu peptidázu ze stejné rodiny; a d) Inhibující pouze jednu peptidázu. Problémem tohoto rozdělení je, že inhibitory byly většinou testovány proti blízkým homologům peptidáz, proto je pravděpodobné, že mohou inhibovat i další nepříbuzné peptidázy (Rawlings, 2010). Příklady nejznámějších syntetických inhibitorů jsou zobrazeny v Tab. 6. Pro syntézu inhibitoru s aktivitou vůči cílové peptidáze je zapotřebí tento inhibitor správně navrhnout.

Existují dva způsoby, jak navrhnout syntetický inhibitor vůči cílové peptidáze. Prvním způsobem je rychlé vyhledávání vhodných malých molekul v databázích. Tato metoda není příliš účinná, dochází při ní k mnohočetným nálezům inhibitorů s malou selektivitou. Druhou metodou s výrazně lepšími výsledky je metoda založená na X-ray krystalografii, při které se provádí screening 3D struktury inhibitorů, substrátů a peptidáz a následně se provede *in silico* modelování interakce peptidáza-inhibitor (Powers et al., 2002; Turk, 2006). Syntetické inhibitory lze navrhnout jak v reverzibilní, tak v ireverzibilní formě. Reverzibilní inhibitory mají vysokou selektivitu, ale mohou částečně blokovat aktivitu dalších peptidáz. Oproti tomu ireverzibilní inhibitory blokují větší spektrum peptidáz, často však dochází k problémům se selektivitou. Jako ideální se jeví inhibitor nekovalentní reverzibilní, který bude mít vysokou selektivitu, ale malé vedlejší účinky. Navrhování nekovalentních inhibitorů je však velice obtížné, protože se musí vytvořit inhibitor podobný substrátu, ale ne analogický, který se váže kovalentně (Turk, 2006).

Tab. 6. Příklady syntetických inhibitorů peptidáz motolic (dle Powers et al., 2002; Kašný et al., 2009; MEROPS - Rawlings et al., 2014).

<i>Název inhibitoru</i>	<i>Anotační číslo (PubChem)</i>	<i>Třída inhibitoru</i>	<i>Inhibiční aktivita</i>	<i>Prokázané cílové peptidázy u motolic</i>	<i>Publikace týkající se motolic</i>
ALLM (N-acetyl-Leu-Leu-methioninal)	4331	Reverzibilní aldehydový peptid	Cathepsin B, L; calpain (Sasaki et al., 1990)	Cathepsin L, calpain	Yamakami et al., 1995
ALLN (N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal)	4332	Reverzibilní aldehydový peptid	Cathepsin B, L; calpain, proteazom (Sasaki et al., 1990)	Cathepsin L, calpain	Yamakami et al., 1995
CA-074 (N-(3-propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl)-isoleucyl-proline)	122165	Ireverzibilní epoxysuccinylový peptid	Cathepsin B (Powers et al., 2002)	Cathepsin B	Towatari et al., 1991; Caffrey and Ruppel, 1997a,b; Sajid and McKerrow 2002; Mikeš et al., 2005; Kašný et al., 2007; Dvořák et al., 2008; Dolečková et al., 2009
CLIK-148 (Z-Phe-Phe-Fluoromethylketone)	16760359	Ireverzibilní epoxysuccinylový peptid	Cathepsin L (Katunuma et al., 1999; Powers et al., 2002)	Cathepsin L	
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	6049	Ireverzibilní karboxylová kyselina	Metallopeptidázy (Auld, 1995)	Dipeptidyl peptidáza III, leucin aminopeptidáza	Couch et al., 1990; Dalton et al., 1997
Jodacetamid	3727	Ireverzibilní amid	Cysteinové peptidázy (Csoma and Polgár, 1984)	Dipeptidyl peptidáza III; cathepsin B, C, F; calpain; asparaginylní endopeptidáza,	Kang et al., 2004
Jodoacetát	5240	Ireverzibilní ester	Cysteinové peptidázy (Csoma and Polgár, 1984)	Calpain, asparaginylní endopeptidáza, Cathepsin B, L	

K11777 (N-methyl-piperazine-Phe-homoPhe-vinylsulfone-phenyl)	-	Ireverzibilní vinyl sulfon	Cathepsin B, L; Cruzipain (Abdulla et al., 2007)	Cathepsin B, L	Abdulla et al., 2007
MB-074 (N-(tyramine-carbamoyloxirane-2-carbonyl)-isoleucyl-proline)	-	Ireverzibilní epoxysuccinylový peptid	Cathepsin B (Bogyo et al., 2000; Powers et al., 2002)	Cathepsin B	Bogyo et al., 2000
MG-115 (carbobenzyloxy-leucyl-leucyl-norvalinal)	9868928	Reverzibilní aldehydový peptid	Proteazom (Guerra-Sá et al., 2005)	Proteazom	Guerra-Sá et al., 2005
MG-132 (N-[(Phenylmethoxy)carbonyl]-L-leucyl-N-[(1S)-1-formyl-3-methylbutyl]-L-leucinamide)	6914692	Reverzibilní aldehydový peptid	Proteazom (Guerra-Sá et al., 2005)	Proteazom	Guerra-Sá et al., 2005
Naftol blue-black (disodium (6Z)-4-amino-3-(4-nitrophenyl)azo-5-oxo-6-(phenylhydrazono)naphthalene-2,7-disulfonate)	9566044	Reverzibilní nepeptidický aromát	Chymotrypsin, cerkariální elastáza (Ring et al., 1993)	Cerkariální elastáza	Ring et al., 1993; Lim et al., 1999
Naftolová kyselina ([2-(4-methoxybenzoyl)-1-naphthoic acid])	-	Reverzibilní nepeptidická aromatická kyselina	Chymotrypsin, cerkariální elastáza (Ring et al., 1993)	Cerkariální elastáza	Ring et al., 1993; Lim et al., 1999
NEM (N-ethylmaleimide)	4362	Ireverzibilní imid	Cysteinové peptidázy (Anderson and Vasini, 1970)	Asparaginylní endopeptidáza	Moczoń, 2011
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	4784	Ireverzibilní sulfonyl fluorid	Serinové peptidázy, papain (Powers et al., 2002)	Kallikrein	Carvalho et al., 1998

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-chloromethylketone)	44135186	Ireverzibilní chlormethyl keton	Chymotrypsin (Hedstrom et al., 1994)	Cerkariální elastáza	Salter et al., 2000
Z-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK (Benzyloxycarbonyl-Ala-Ala-Phe-chloromethylketone)	135799	Ireverzibilní chlormethyl keton	Chymotrypsin (Cohen et al., 1991)	Cerkariální elastáza	Dvořák et al., 2008
Z-Phe-Ala-CHN₂ (Benzyloxycarbonyl-Phe-Ala-diazomethane)	5488522	Ireverzibilní diazomethyl keton	Cathepsin B, L (Dalton et al., 1997)	Cathepsin B, L, F; asparaginylní endopeptidáza	Mason et al., 1985; Day et al., 1995; Dalton et al., 1996; Dalton et al., 1997; Caffrey et al., 1997; 2000; Sajid and McKerrow, 2002; Kang et al., 2004; Dolečková et al., 2009
Z-Phe-Phe-CHN₂ (Benzyloxycarbonyl-Phe-Phe-diazomethane)	5486921	Ireverzibilní diazomethyl keton	Cathepsin L (Day et al., 1995)	Cathepsin B, L	Day et al., 1995; Dalton et al., 1996; Caffrey et al., 1997; Mason et al., 1985; Sajid and McKerrow, 2002; Dolečková et al., 2009
Z-Phe-Tyr-(t-But)-CHN₂ (Benzyloxycarbonyl-Phe-Tyr(<i>t</i> -butyl)-diazomethane)	5311153	Ireverzibilní diazomethyl keton	Cathepsin L (Shaw et al., 1993)	Cathepsin L	Stack et al., 2008; Dolečková et al., 2009

5. Závěr

V této práci byly shrnuty a utříděny dosavadní poznatky o přirozených a syntetických inhibitech, které blokují aktivitu proteolytických enzymů (peptidáz) motolic. Práce dokumentuje základní vlastnosti inhibitorů peptidáz a inhibitorů extrimovaných motolicemi. Dále se text práce zaměřuje na jejich pravděpodobnou biologickou funkci, protože ta dosud nebyla u mnohých inhibitorů prozatím zcela objasněna.

Inhibitorům peptidáz motolic se dlouhodobě věnuje celosvětový výzkum, protože mají vysoký předpoklad využití jako chemoterapeutika a jako součásti vakcín. Léky založené na principu inhibice peptidáz by tedy mohly významně napomoci v léčbě závažných parazitárních onemocnění, např. schistosomózy, kde je dosud jediným používaným lékem praziquantel, na jehož účinek jsou však u schistosom popsány vznikající rezistence (Doenhoff et al., 2008). Vhodným kandidátem by tak mohl být např. inhibitor K11777 (inhibitor cathepsinu B a L), u kterého bylo experimentálně zjištěno, že přímo eliminuje až 90% dospělých samců a samic *S. mansoni* a významně snižuje produkci vajíček, v důsledku čehož dochází i ke zmírnění poškození tkání hostitele (Abdulla et al., 2007).

Identifikace inhibitorů peptidáz u nejrůznějších organismů je v současnosti založena především na bioinformatických metodách, s jejichž využitím a dle predefinovaných parametrů, lze za tímto účelem cíleně prohledávat odpovídající genomická data. Dá se tedy předpokládat, že v budoucnu bude v souvislosti se získáváním stále větších souborů genomických dat týkajících se motolic přibývat také identifikací nových inhibitorů, které budou následně testovány.

Seznam použité literatury

- **Abdulla, M. H., Lim, K. C., Sajid, M., McKerrow, J. H., & Caffrey, C. R. (2007).** *Schistosomiasis mansoni*: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Medicine*, 4, 130-138.
- **Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., & Nathanson, C. M. (2003).** Cystatins. *Biochemical Society Symposium*, (70), 179–199.
- **Adisakwattana, P., Viyanant, V., Chaicumpa, W., Vichasri-Grams, S., Hofmann, A., Korge, G., Sobhon P., & Grams, R. (2007).** Comparative molecular analysis of two asparaginyl endopeptidases and encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 102–116.
- **Alvarez-Fernandez, M., Barrett, A. J., Gerhartz, B., Dando, P. M., Ni, J., & Abrahamson, M. (1999).** Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19195–19203.
- **Anderson, B., & Vasini, E. (1970).** Nonpolar Effects in Reactions of Sulfhydryl Group of Papain. *Biochemistry*, 9(17), 3348–3352.
- **Auld, D. (1995).** Removal and Replacement of Metal-Ions in Metallopeptidases. *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*, 248, 228–242.
- **Auld, D. S. (2004).** Catalytic mechanisms of metallopeptidases. In: Barrett, Rawlings, Woessner, (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands*, 268–289.
- **Axelsson, U., & Laurell, C. B. (1965).** Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin. *American Journal of Human Genetics*, 17(6), 466–472.
- **Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Woessner, J. F. (2012).** *Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press.*
- **Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2015).** GenBank. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), 30–35.
- **Bobek, L. A., & Levine, M. J. (1992).** Cystatins--inhibitors of cysteine proteinases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 3(4), 307–332.
- **Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos J., & Turk, V. (1988).** The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO Journal*, 7(8), 2593–2599.
- **Bode, W., & Huber, R. (1993).** Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 204, 433-451.
- **Bode, W., & Huber, R. (2000).** Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1477(1-2), 241–252.
- **Bogyo, M., Verhelst, S., Bellingard-Dubouchaud, V., Toba, S., & Greenbaum, D. (2000).** Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chemistry & Biology*, 7(1), 27–38.
- **Brindley, P. J., Kalinna, B. H., Dalton, J. P., Day, S. R., Wong, J. Y. M., Smythe, M. L., & McManus, D. P. (1997).** Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89(1), 1–9.

- Brindley, P. J., Kalinna, B. H., Wong, J. Y. M., Bogitsh, B. J., King, L. T., Smyth, D. J., Verity C. J., Abbenante G., Brinkworth R. I., Fairlie D. P., Smythe M. L., Milburn P. J., Bielefeldt-Ohmann H., Zheng Y., & McManus, D. P. (2001). Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 112(1), 103–112.
- Caffrey, C. R., Rheinberg, C. E., Moné, H., Jourdane, J., Li, Y. L., & Ruppel, A. (1997). *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, and *S. rodhaini*: cysteine-class cathepsin activities in the vomitus of adult worms. *Parasitology Research*, 83(1), 37–41.
- Caffrey, C. R., & Ruppel, A. (1997a). Affinity isolation and characterization of the cathepsin B-like proteinase Sj31 from *Schistosoma japonicum*. *The Journal of parasitology*, 1112-1118.
- Caffrey, C. R., & Ruppel, A. (1997b). Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Parasitology research*, 83(6), 632-635.
- Caffrey, C. R., Mathieu, M. A., Gaffney, A. M., Salter, J. P., Sajid, M., Lucas, K. D., Lucas K. D., Franklin C., Bogyo M., & McKerrow, J. H. (2000). Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. *Febs Letters*, 466(2-3), 244–248.
- Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P., & Sajid, M. (2004). Blood ‘n’ guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends in Parasitology*, 20(5), 241–248.
- Caffrey, C. R., Placha, L., Barinka, C., Hradilek, M., Dostál, J., Sajid, M., McKerrow J. H., Majer P., Konvalinka J., & Vondrásek, J. (2005). Homology modeling and SAR analysis of *Schistosoma japonicum* cathepsin D (SjCD) with statin inhibitors identify a unique active site steric barrier with potential for the design of specific inhibitors. *Biological Chemistry*, 386(4), 339–349.
- Carvalho, W. S., Lopes, C. T., Juliano, L., Coelho, P. M. Z., Cunha-Melo, J. R., Beraldo, W. T., & Pesquero, J. L. (1998). Purification and partial characterization of kininogenase activity from *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology*, 117, 311–319.
- Choi, B. I., Han, J. K., Hong, S. T., & Lee, K. H. (2004). Clonorchiasis and cholangiocarcinoma: etiologic relationship and imaging diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 540–552.
- Choi, J. H., Lee, J. H., Yu, H. S., Jeong, H. J., Kim, J., Hong, Y. C., Kong H. H., & Chung, D. I. (2006). Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine proteinase, in *Paragonimus westermani*. *The Korean Journal of Parasitology*, 44(3), 187–196.
- Cohen, F. E., Gregoret, L. M., Amiri, P., Aldape, K., Railey, J., & McKerrow, J. H. (1991). Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. *Biochemistry*, 30(47), 11221–11229.
- Consortium, T. U. (2014). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 1.
- Csoma, C., & Polgár, L. (1984). Proteinase from germinating bean cotyledons. Evidence for involvement of a thiol group in catalysis. *Biochemical Journal*, 222(3), 769–776.
- Cuesta-Astroz, Y., Scholte, L. L. S., Pais, F. S. M., Oliveira, G., & Nahum, L. A. (2014). Evolutionary analysis of the cystatin family in three *Schistosoma* species. *Frontiers in Genetics*, 5, 206.
- Curwen, R. S., Ashton, P. D., Sundaralingam, S., & Wilson, R. A. (2006). Identification of Novel Proteases and Immunomodulators in the Secretions of Schistosome Cercariae That Facilitate Host Entry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(5), 835–844.
- Da’dara, A., & Skelly, P. J. (2011). Manipulation of vascular function by blood flukes? *Blood Reviews*, 25(4), 175–179.
- Dalton, J. P., Clough, K. A., Jones, M. K., & Brindley, P. J. (1996). Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, 64(4), 1328–1334.

- Dalton, J. P., Clough, K. A., Jones, M. K., & Brindley, P. J. (1997). The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*, 114, 105–112.
- Dalton, J. P., Neill, S. O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moiré N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A. G., & Donnelly S. M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, 33(11), 1173–1181.
- Dalton, J. P., Brindley, P. J., Donnelly, S., & Robinson, M. W. (2009). The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites. *Trends in Parasitology*, 25(2), 59–61.
- Day, S. R., Dalton, J. P., Clough, K. A., Leonardo, L., Tiu, W. U., & Brindley, P. L. (1995). Characterization and Cloning of the Cathepsin L Proteinases of *Schistosoma japonicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(1), 1–9.
- Doenhoff, M. J., Cioli, D., & Utzinger, J. (2008). Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6), 659–667.
- Dolečková, K., Kasný, M., Mikes, L., Mutapi, F., Stack, C., Mountford, A. P., & Horák, P. (2007). Peptidases of *Trichobilharzia regenti* (*Schistosomatidae*) and its molluscan host *Radix peregra* S. Lat. (*Lymnaeidae*): construction and screening of cDNA library from intramolluscan stages of the parasite. *Folia Parasitologica*, 54(2), 94–98.
- Dolečková, K., Kasný, M., Mikes, L., Cartwright, J., Jedelský, P., Schneider, E. L., Dvořák J., Mountford A. P., Craik C. S., & Horák, P. (2009). The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *International Journal for Parasitology*, 39(2), 201–211.
- Dvořák, J., Delcroix, M., Rossi, A., Vopálenký, V., Pospíšek, M., Šedinová, M., Mikeš L., Sajid M., Sali A., McKerrow J. H., Horák P., & Caffrey, C. R. (2005). Multiple cathepsin B isoforms in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *International Journal for Parasitology*, 35(8), 895–910.
- Dvořák, J., Mashiyama, S. T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G. M., Hansell, E., Lim K. C., Hsieh I., Bahgat M., Mackenzie B., Medzihradzsky K. F., Babbitt P. C., Caffrey C. R., & McKerrow, J. H. (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie*, 90(2), 345–358.
- Foulk, B. W., Pappas, G., Hirai, Y., Hirai, H., & Williams, D. L. (2002). Adenylosuccinate lyase of *Schistosoma mansoni*: gene structure, mRNA expression, and analysis of the predicted peptide structure of a potential chemotherapeutic target. *International Journal for Parasitology*, 32(12), 1487–1495.
- Fujinaga, M., Chernaiia, M. M., Tarasova, N. I., Mosimann, S. C., & James, M. N. (1995). Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 4(5), 960–972.
- Gatto, M., Iaccarino, L., Ghirardello, A., Bassi, N., Pontisso, P., Punzi, L., Shoenfeld Y., & Doria, A. (2013). Serpins, immunity and autoimmunity: old molecules, new functions. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 45(2), 267–280.
- Ghendler, Y., Arnon, R., & Fishelson, Z. (1994). *Schistosoma mansoni*: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor. *Experimental Parasitology*, 78(2), 121–131.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., & Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368(9541), 1106–1118.

- Guerra-Sá, R., Castro-Borges, W., Evangelista, E. A., Kettelhut, I. C., & Rodrigues, V. (2005). *Schistosoma mansoni*: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. *Experimental Parasitology*, 109(4), 228–236.
- Guo, A. (2015). Comparative analysis of cystatin superfamily in platyhelminths. *PLoS One*, 10(4), e0124683.
- Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., & Tanaka, I. (1978). Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(3), 523-528.
- Hanada, M., Sugawara, K., Kaneta, K., Toda, S., Nishiyama, Y., Tomita, K., Yamamoto H., Konishi M., & Oki, T. (1992). Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *The Journal of Antibiotics*, 45(11), 1746–1752.
- He, B., Cai, G., Ni, Y., Li, Y., Zong, H., & He, L. (2011). Characterization and expression of a novel cystatin gene from *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Cellular Probes*, 25(4), 186–193.
- Hedstrom, L., Perona, J. J., & Rutter, W. J. (1994). Converting Trypsin to Chymotrypsin: Residue 172 Is a Substrate Specificity Determinant. *Biochemistry*, 33(29), 8757–8763.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–4524.
- Heussler, V. T., & Dobbela, D. A. E. (1994). Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64(1), 11–23.
- Hola-Jamriska, L., Dalton, J. P., Aaskov, J., & Brindley, P. J. (1999). Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes. *Parasitology*, 118, 275–282.
- Hola-Jamriska, L., King, L. T., Dalton, J. P., Mann, V. H., Aaskov, J. G., & Brindley, P. J. (2000). Functional expression of dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) of the oriental blood fluke *Schistosoma japonicum* in *Trichoplusia* in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 19(3), 384–392.
- Hu, W., Yan, Q., Shen, D. K., Liu, F., Zhu, Z. D., Song, H. D., Xu X. R., Wang Z. J., Rong Y. P., Zeng L. C., Wu J., Zhang X., Wang J. J., Xu X. N., Wang S. Y., Fu G., Zhang X. L., Wang Z. Q., Brindley P. J., McManus D. P., Xue C. L., Feng Z., Chen Z., & Han, Z. G. (2003). Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nature Genetics*, 35(2), 139–147
- Huang, W., Haas, T. A., Biesterfeldt, J., Mankawsky, L., Blanton, R. E., & Lee, X. (1999). Purification and crystallization of a novel membrane-anchored protein: the *Schistosoma haematobium* serpin. *Acta Crystallographica Section D*, 55(1), 350–352.
- Huntington, J. A., Read, R. J., & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806), 923–926.
- Hwang, J. H., Lee, W. G., Na, B. K., Lee, H. W., Cho, S. H., & Kim, T. S. (2009). Identification and characterization of a serine protease inhibitor of *Paragonimus westermani*. *Parasitology Research*, 104(3), 495–501.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., & Whisstock, J. C. (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research*, 10(12), 1845–1864.
- James, M. N. G. (2004). Catalytic pathway of aspartic peptidases. In: Barrett, Rawlings, Woessner, (Eds.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 12–19.
- Jolly, E. R., Chin, C. S., Miller, S., Bahgat, M. M., Lim, K. C., DeRisi, J., & McKerrow, J. H. (2007). Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biology*, 8(4), R65.

- **Kang, T. H., Yun, D. H., Lee, E. H. B., Chung, Y. B., Bae, Y. A., Chung, J. Y., Kang I., Kim J., Cho S. Y. & Kong, Y., (2004).** A cathepsin F of adult *Clonorchis sinensis* and its phylogenetic conservation in trematodes. *Parasitology*, 128, 195–207.
- **Kang, J. M., Sohn, W. M., Ju, J. W., Kim, T. S., & Na, B. K. (2010).** Identification and characterization of a serine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis*. *Acta Tropica*, 116(2), 134–140.
- **Kang, J. M., Lee, K. H., Sohn, W. M., & Na, B. K. (2011).** Identification and functional characterization of CsStefin-1, a cysteine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 177(2), 126–134.
- **Kang, J. M., Ju, H. L., Lee, K. H., Kim, T. S., Pak, J. H., Sohn, W. M., & Na, B. K. (2014).** Identification and characterization of the second cysteine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis* (CsStefin-2). *Parasitology Research*, 113(1), 47–58.
- **Karcz, S. R., Podesta, R. B., Siddiqui, A. A., Dekaban, G. A., Strejan, G. H., & Clarke, M. W. (1991).** Molecular cloning and sequence analysis of a calcium-activated neutral protease (calpain) from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49(2), 333–336.
- **Kašný, M., Mikeš, L., Dalton, J. P., Mountford, A. P., & Horák, P. (2007).** Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*, 134(11), 1599–1609.
- **Kašný, M., Mikes, L., Hampl, V., Dvorák, J., Caffrey, C. R., Dalton, J. P., & Horák, P. (2009).** Chapter 4. Peptidases of trematodes. *Advances in Parasitology*, 69, 205–297.
- **Katunuma, N., Matsui, A., Kakegawa, T., Murata, E., Asao, T., & Ohba, Y. (1999).** Study of the functional share of lysosomal cathepsins by the development of specific inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 39(1), 247–260.
- **Khaznadji, E., Collins, P., Dalton, J. P., Bigot, Y., & Moiré, N. (2005).** A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 35(10), 1115–1125.
- **Klinkert, M.-Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A., & Beck, E. (1989).** Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33(2), 113–122.
- **Knox, D. P. (2007).** Proteinase inhibitors and helminth parasite infection. *Parasite Immunology*, 29(2), 57–71.
- **Kumagai, T., Maruyama, H., Hato, M., Ohmae, H., Osada, Y., Kanazawa, T., & Ohta, N. (2005).** *Schistosoma japonicum*: localization of calpain in the penetration glands and secretions of cercariae. *Experimental Parasitology*, 109(1), 53–57.
- **Kunitz, M., & Northrop, J. H. (1936).** Isolation from Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitor, and an Inhibitor-Trypsin Compound. *The Journal of General Physiology*, 19(6), 991–1007.
- **Kunitz, M. (1945).** Crystallization of trypsin inhibitor from soybean. *Science* (New York, N.Y.), 101(2635), 668–669.
- **Kunitz, M. (1947).** Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor II. General Properties. *The Journal of General Physiology*, 30(4), 291–310.
- **Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado C. J., Langendorf C. G., Pike R. N., Bird P. I., & Whisstock, J. C. (2006).** An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, 7(5), 216.
- **Lee, E.-G., Na, B.-K., Bae, Y.-A., Kim, S.-H., Je, E.-Y., Ju, J.-W., Cho S. H., Kim T. S., Kang S. Y., Cho S. Y., & Kong, Y. (2006).** Identification of immunodominant excretory-secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics*, 6(4), 1290–1300.

- **Lei, H., Tian, Y., Chen, W., Wang, X., Li, X., Mao, Q., Sun J., Li R., Xu Y., Liang C., Huang Y., & Yu, X. (2013).** The biochemical and immunological characterization of two serpins from *Clonorchis sinensis*. *Molecular Biology Reports*, 40(6), 3977–3985.
- **Lim, K. C., Sun, E., Bahgat, M., Bucks, D., Guy, R., Hinz, R. S., Cullander C., & McKerrow, J. H. (1999).** Blockage of skin invasion by schistosome cercariae by serine protease inhibitors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(3), 487–492.
- **Liu, F., Lu, J., Hu, W., Wang, S.-Y., Cui, S.-J., Chi, M., Yan Q., Wang X. R., Song H. D., Xu X. N., Wang J. J., Zhang X. L., Zhang X., Wang Z. Q., Xue C. L., Brindley P. J., McManus D. P., Yang P. Y., Feng Z., Chen Z., & Han, Z.-G. (2006).** New Perspectives on Host-Parasite Interplay by Comparative Transcriptomic and Proteomic Analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathog*, 2(4), 29.
- **Liu, L., Mushero, N., Hedstrom, L., & Gershenson, A. (2007).** Short-lived protease–serpin complexes: Partial disruption of the rat trypsin active site. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 16(11), 2403–2411.
- **Logan-Klumpler, F. J., Silva, N. D., Boehme, U., Rogers, M. B., Velarde, G., McQuillan, J. A., Carver T., Aslett M., Olsen C., Subramanian S., Phan I., Farris C., Mitra S., Ramasamy G., Wang H., Tivey A., Jackson A., Houston R., Parkhill J., Holden M., Harb O. S., Brunk B. P., Myler P. J., Roos D., Carrington M., Smith D. F., Hertz-Fowler C., & Berriman, M. (2012).** GeneDB—an annotation database for pathogens. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 98–108.
- **Mason, R. W., Green, G. D., & Barrett, A. J. (1985).** Human liver cathepsin L. *The Biochemical Journal*, 226(1), 233–241.
- **McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S. M., Doyle, S., Mann, V. H., Brindley, P. J., Stewart M., Day T. A., Maule A. G., & Dalton, J. P. (2004).** Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology*, 34(6), 703–714.
- **McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., & Sajid, M. (2006).** Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology*, 1, 497–536.
- **Meanawy, M. A. el, Aji, T., Phillips, N. F., Davis, R. E., Salata, R. A., Malhotra, I., McClain D., Aikawa M., & Davis, A. H. (1990).** Definition of the complete *Schistosoma mansoni* hemoglobinase mRNA sequence and gene expression in developing parasites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43(1), 67–78.
- **Meemon, K., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Hofmann, A., Korge, G., Viyanant, V., Upatham E. S., Habe S., & Sobhon, P. (2004).** Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136(1), 1–10.
- **Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., & Crews, C. M. (1999).** Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), 10403–10408.
- **Mikeš, L., Židková, L., Kašný, M., Dvořák, J., & Horák, P. (2005).** In vitro stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (*Schistosomatidae*) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. *Parasitology research*, 96(4), 230–241.
- **Moczón, T. (2011).** A cysteine proteinase in the penetration glands of the cercariae of *Cotylurus cornutus* (Trematoda, *Strigeidae*). *Parasitology Research*, 108(3), 639–643.
- **Modha, J., & Doenhoff, M. J. (1994).** *Schistosoma mansoni* host–parasite relationship: interaction of contrapsin with adult worms. *Parasitology*, 109(04), 487–495.

- **Molehin, A. J., Gobert, G. N., & McManus, D. P. (2012).** Serine protease inhibitors of parasitic helminths. *Parasitology*, 139(6), 681–695.
- **Molehin, A. J., Gobert, G. N., Driguez, P., & McManus, D. P. (2014).** Characterisation of a secretory serine protease inhibitor (SjB6) from *Schistosoma japonicum*. *Parasites & Vectors*, 7, 330
- **Morales, F. C., Furtado, D. R., & Rumjanek, F. D. (2004).** The N-terminus moiety of the cystatin SmCys from *Schistosoma mansoni* regulates its inhibitory activity in vitro and in vivo. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(1), 65–73.
- **Murata, S., Yashiroda, H., & Tanaka, K. (2009).** Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2), 104–115.
- **Newport, G. R., McKerrow, J. H., Hedstrom, R., Pettitt, M., McGarrigle, L., Barr, P. J., & Agabian, N. (1988).** Cloning of the proteinase that facilitates infection by schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 263(26), 13179–13184.
- **Omura, S., Fujimoto, T., Otaguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H., & Sasaki, Y. (1991).** Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *The Journal of Antibiotics*, 44(1), 113–116.
- **Pandhare, J., Zog, K., & Deshpande, V. V. (2002).** Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. *Bioresource Technology*, 84(2), 165–169.
- **Park, S. Y., Lee, K. H., Hwang, Y. B., Kim, K. Y., Park, S. K., Hwang, H. A., Sakanari J. A., Hong K. M., Kim S. I., & Park, H. (2001).** Characterization and large-scale expression of the recombinant cysteine proteinase from adult *Clonorchis sinensis*. *The Journal of Parasitology*, 87(6), 1454–1458.
- **Pearson, M. S., Ranjit, N., & Loukas, A. (2010).** Blunting the knife: development of vaccines targeting digestive proteases of blood-feeding helminth parasites. *Biological Chemistry*, 391(8), 901–911.
- **Phalee, A., Wongsawad, C., Rojanapaibul, A., & Chai, J. Y. (2015).** Experimental life history and biological characteristics of *Fasciola gigantica* (Digenea: Fasciolidae). *The Korean Journal of Parasitology*, 53(1), 59–64.
- **Pierrot, C., Godin, C., Liu, J. L., Capron, A., & Khalife, J. (1996).** *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle. *Parasitology*, 113(06), 519–526.
- **Pinlaor, P., Kaewpitoon, N., Laha, T., Sripa, B., Kaewkes, S., Morales, M. E., Mann V. H., Parriott S. K., Suttiprapa S., Robinson M. W., To J., Dalton J. P., Loukas A., & Brindley, P. J. (2009).** Cathepsin F Cysteine Protease of the Human Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(3), 398.
- **Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., & James, K. E. (2002).** Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical Reviews*, 102(12), 4639–4750.
- **Pybus, M. J. (2001).** Liver flukes. Parasitic diseases of wild mammals, WM Samuel, MJ Pybus, and AA Kocan (eds.). *Iowa State Press, Ames, Iowa*, 121-149.
- **Quezada, L. A. L., & McKerrow, J. H. (2011).** Schistosome serine protease inhibitors: parasite defense or homeostasis? *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 83(2), 663–672.
- **Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1993).** Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical Journal*, 290 (1), 205–218.
- **Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (2004a).** Introduction: Aspartic and glutamic peptidases and their clans. In: Barrett, Rawlings, Woessner, (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands*, 3-12.

- **Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (2004b).** Introduction: metallopeptidases and their clans. In: Barrett, Rawlings, Woessner, (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn.* Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 231-268.
- **Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004c).** Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical Journal*, 378(3), 705–716.
- **Rawlings, N. D. (2010).** Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92(11), 1463–1483.
- **Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2011).** Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38321–38328.
- **Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014).** MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), 503–509.
- **Rege, A. A., Wang, W., & Dresden, M. H. (1992).** Cysteine Proteinases from *Schistosoma haematobium* Adult Worms. *The Journal of Parasitology*, 78(1), 16–23.
- **Rim, H.J. (1986).** The current pathobiology and chemotherapy of clonorchiasis. *Kisaengchunghak Chapchi*, 24, 1–141.
- **Sajid, M., & McKerrow, J. H. (2002).** Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1), 1–21.
- **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., & Caffrey, C. R. (2003).** Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131(1), 65–75.
- **Salter, J. P., Lim, K. C., Hansell, E., Hsieh, I., & McKerrow, J. H. (2000).** Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38667–38673.
- **Salter, J. P., Choe, Y., Albrecht, H., Franklin, C., Lim, K.-C., Craik, C. S., & McKerrow, J. H. (2002).** Cercarial Elastase Is Encoded by a Functionally Conserved Gene Family across Multiple Species of Schistosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24618–24624.
- **Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Tanaka, T., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma N., & Murachi, T. (1990).** Inhibitory Effect of di- and Tripeptidyl Aldehydes on Calpains and Cathepsins. *Journal of Enzyme Inhibition*, 3(3), 195–201.
- **Schwarz, A., Valdés, J. J., & Kotsyfakis, M. (2012).** The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(3), 117–127.
- **Seibert, C. M., & Raushel, F. M. (2005).** Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, 44(17), 6383–6391.
- **Shaw, E., Mohanty, S., Colic, A., Stoka, V., & Turk, V. (1993).** The affinity-labelling of cathepsin s with peptidyl diazomethyl ketones: Comparison with the inhibition of cathepsin L and calpain. *FEBS Letters*, 334(3), 340–342.
- **Siricoon, S., Grams, S. V., & Grams, R. (2012).** Efficient inhibition of cathepsin B by a secreted type 1 cystatin of *Fasciola gigantica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 186(2), 126–133.
- **Skelly, P. J., Da'dara, A., & Harn, D. A. (2003).** Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *International Journal for Parasitology*, 33(4), 363–369.
- **Smith, A. M., Dowd, A. J., McGonigle, S., Keegan, P. S., Brennan, G., Trudgett, A., & Dalton, J. P. (1993).** Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 1–8.
- **Smooker, P. M., Jayaraj, R., Pike, R. N., & Spithill, T. W. (2010).** Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control? *Trends in Parasitology*, 26(10), 506–514.

- Stack, C. M., Caffrey, C. R., Donnelly, S. M., Seshadri, A., Lowther, J., Tort, J. F., Collins P. R., Robinson M. W., Xu W., McKerrow J. H., Craik C. S., Geiger S. R., Marion R., Brinen L. S., & Dalton, J. P. (2008). Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9896–9908.
- Suzuki, K., Tsuji, S., & Ishiura, S. (1981). Effect of Ca²⁺ on the inhibition of calcium-activated neutral protease by leupeptin, antipain and epoxysuccinate derivatives. *FEBS Letters*, 136(1), 119–122.
- Tajima, N., Kawai, F., Park, S. Y., & Tame, J. R. H. (2010). A Novel Intein-Like Autoproteolytic Mechanism in Autotransporter Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 402(4), 645–656.
- Takano, R., Imada, C., Kamei, K., & Hara, S. (1991). The reactive site of marinostatin, a proteinase inhibitor from marine *Alteromonas sp.* B-10-31. *Journal of Biochemistry*, 110(6), 856–858.
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(1), 12–36.
- Tarasuk, M., Vichasri Grams, S., Viyanant, V., & Grams, R. (2009). Type I cystatin (stefin) is a major component of *Fasciola gigantica* excretion/secretion product. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 60–71.
- Tkalcevic, J., Ashman, K., & Meeusen, E. (1995). *Fasciola hepatica* - Rapid Identification of Newly Excysted Juvenile Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213(1), 169–174.
- Towatari, T., Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., & Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Letters*, 280(2), 311–315.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 785–799.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Okura, A., Morishima, H., & Takeuchi, T. (1973). Letter: Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 26(12), 787–789.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M., & Takeuchi, T. (1976). Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 29(1), 97–99.
- Van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K., & Kalsheker, N. (2003). Serpins: structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(11), 1536–1547.
- Verity, C. K., Loukas, A., McMANUS, D. P., & Brindley, P. J. (2001). *Schistosoma japonicum* cathepsin D aspartic protease cleaves human IgG and other serum components. *Parasitology*, 122(04), 415–421.
- Volf, P., & Horák, P. (2007). Paraziti a jejich biologie. *Triton*.
- Wang, Y., Suzek, T., Zhang, J., Wang, J., He, S., Cheng, T., Shoemaker B. A., Gindulyte A., & Bryant, S. H. (2014). PubChem BioAssay: 2014 update. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 1075–1082.
- Werb, Z., Burleigh, M. C., Barrett, A. J., & Starkey, P. M. (1974). The interaction of alpha₂-macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *The Biochemical Journal*, 139(2), 359–368.
- WHO (2015). Schistosomiasis *Fact Sheet #115*; Foodborne trematodiasis *Fact sheet #368*.
- Wong, J. Y. M., Harrop, S. A., Day, S. R., & Brindley, P. J. (1997). Schistosomes express two forms of cathepsin D1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1338(2), 156–160.

- **Xu, Y., & Dresden, M. (1986).** Leucine Aminopeptidase and Hatching of *Schistosoma mansoni* Eggs. *Journal of Parasitology*, 72(4), 507–511.
- **Yamakami, K., Hamajima, F., Akao, S., & Tadakuma, T. (1995).** Purification and Characterization of Acid Cysteine Protease from Metacercariae of the Mammalian Trematode Parasite *Paragonimus westermani*. *European Journal of Biochemistry*, 233(2), 490–497.
- **Yamasaki, H., Mineki, R., Murayama, K., Ito, A., & Aoki, T. (2002).** Characterisation and expression of the *Fasciola gigantica* cathepsin L gene. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1031–1042.
- **Yan, Y., Liu, S., Song, G., Xu, Y., & Dissous, C. (2005).** Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from *Schistosoma japonicum* (Sj serpin). *Veterinary Parasitology*, 131(1-2), 53–60.
- **Yang, Y., Hu, D., Wang, L., Liang, C., Hu, X., Wang, X., Chen J., Xu J., & Yu, X. (2009).** Molecular cloning and characterization of a novel serpin gene of *Clonorchis sinensis*, highly expressed in the stage of metacercaria. *Parasitology Research*, 106(1), 221–225.
- **Yokogawa, M. (1965).** *Paragonimus* and paragonimiasis. *Advances in Parasitology*, 3, 99–158.