

Katedra parazitologie
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Diplomová práce

**Střevní proteázy flebotomů, proteázové inhibitory
leishmanií a jejich vliv na vývoj v přenašeči**

Anna Svárovská

Školitel: prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha, 2006

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Svárovská'.

Anna Svárovská

Poděkování

Děkuji především rodičům, kteří mě podporovali nejen materiálně po celou dobu mého studia.

Ráda bych poděkovala také svému školiteli Petru Volfovi za vedení mé práce a velmi vstřícný a přátelský přístup.

Moje poděkování patří také celému osazenstvu naší laboratoře, se kterým se mi velmi dobře pracovalo, a celé katedře parazitologie za příjemné prostředí a podporu. Jmenovitě bych chtěla poděkovat Mileně Svobodové, Honzovi Dvořákovi a Robertu Šut'ákovi za pomoc při realizaci experimentů. Můj velký dík patří také Ivě Rohoušové, Jitce Peckové a Jovaně Sádlové.

Za podporu děkuji také sourozencům, babičce, Petrovi a přátelům.

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární přehled.....	7
2.1	Klasifikace proteolytických enzymů.....	7
2.2	Serinové proteázy rodiny S1	8
2.3	Cysteinové proteázy rodiny C1	8
2.4	Flebotomové: charakteristika skupiny; příjem potravy a stavba trávicího traktu ...	9
2.5	Leishmanie: charakteristika skupiny; <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i>	11
2.6	Vývoj leishmanií v trávicím traktu vektora	11
2.7	Střevní proteázy flebotomů.....	13
2.8	Leishmaniové inhibitory cysteinových proteáz	18
2.9	Leishmaniové inhibitory serinových proteáz.....	19
2.10	Vliv střevních proteáz flebotomů na vývoj leishmanií	21
3	Materiál a metodika.....	25
3.1	Složení použitých roztoků.....	25
3.2	Chov flebotomů, jejich pitvy a příprava vzorků střeva.....	26
3.3	Stanovení proteinové koncentrace	27
3.4	Leishmanie, jejich kultivace a infekční sání flebotomů přes membránu	27
3.5	Exprese a purifikace rekombinantních proteinů ISP2 a ICP.....	29
3.6	Fluorimetrické měření proteázové aktivity ve střevě flebotomů	30
3.6.1	Stanovení pH optima proteázové aktivity ve střevě flebotomů	31
3.6.2	Inhibice střevní proteázové aktivity	31
3.6.3	Individuální variabilita střevní proteázové aktivity	32
3.6.4	Dynamika střevní proteázové aktivity <i>P. papatasi</i> a <i>P. duboscqi</i>	32
3.6.5	Srovnání trypsinových aktivit v různých teplotách.....	33
3.6.6	Inhibiční účinky ISP2 na střevní proteázovou aktivitu	33
3.6.7	Inhibiční účinky ICP na střevní proteázovou aktivitu.....	33
3.7	Elektroforéza	34
3.8	Gelová filtrace.....	35

4	Výsledky	36
4.1	Stanovení pH optima proteázové aktivity ve střevě flebotomů	36
4.2	Inhibice střevní proteázové aktivity	37
4.3	Individuální variabilita střevní proteázové aktivity	37
4.4	Dynamika střevní proteázové aktivity <i>P. papatasi</i> a <i>P. duboscqi</i>	39
4.5	Srovnání trypsinových aktivit v různých teplotách.....	41
4.6	Charakterizace a částečná purifikace střevních proteáz <i>P. duboscqi</i>	42
4.7	Expres a purifikace ISP2 a ICP	46
4.8	Inhibiční účinky ISP2 na střevní proteázovou aktivitu	47
4.9	Inhibiční účinky ICP na střevní proteázovou aktivitu.....	49
4.10	Experimentální infekce <i>P. papatasi</i>	51
5	Diskuze	57
6	Shrnutí	64
7	Literatura	66

1 Úvod

Flebotomové jsou významnou skupinou krevsajícího dvoukřídleho hmyzu. Jsou rozšířeni v tropech, subtropích a v menší míře i v mírném pásu celého světa. Z hlediska humánní medicíny jsou důležití jako přenašeči virových, bakteriálních a především parazitárních infekcí. Komplex onemocnění působených přenášenými prvky rodu *Leishmania* je Světovou zdravotnickou organizací řazen mezi sedm nejvýznamnějších lidských parazitárních (http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm). Vzhledem k mimořádnému medicínskému významu leishmaniózy je výzkumu tohoto onemocnění věnována velká pozornost. Jedním z možných přístupů je studium interakcí mezi vektorem a přenášeným parazitem.

Leishmanie během svého vývoje ve vektorovi neopouští jeho trávicí trakt. Schopnost parazita přežít v měnících se podmínkách střeva při trávení krve je podmínkou dalšího šíření infekce. Poznání střevních proteáz flebotomů a mechanismů, kterými se leishmanie účinkům hydrolytických enzymů brání může tedy být důležitým krokem na cestě ke kontrole tohoto onemocnění. Leishmanie si zřejmě vytvořily několik prostředků, které jim slouží k ochraně před proteolýzou ve střevě přenašeče. Velká pozornost je věnována studiu povrchových glykokonjugátů leishmanií. V poslední době byly v genomu leishmanií objeveny geny pro inhibitory proteolytických enzymů. Jejich funkce nebyla zatím uspokojivě objasněna. V některých případech napovídá jejich profil exprese v průběhu životního cyklu prvoka jejich možné roli při vývoji v hmyzím přenašeči. Studium této možnosti se, pokud je mi známo, zatím nikdo nezabýval a proto jsem se o to pokusila ve své diplomové práci.

Cílem mé diplomové práce bylo:

- částečně charakterizovat proteázovou aktivitu ve střevě flebotomů po sání
- zjistit, zda jsou inhibitory proteáz *Leishmania major* a *Leishmania mexicana* schopny inhibovat proteolytickou aktivitu střeva flebotomů *in vitro*
- zkoumat možnou roli inhibitorů serinových proteáz *Leishmania major* při vývoji v přenašeči pomocí experimentálních infekcí

2 Literární přehled

2.1 Klasifikace proteolytických enzymů

Peptidázy (syn. proteolytické enzymy) jsou enzymy, které katalyzují štěpení peptidické vazby. Jedná se o hydrolázy rozšířené mezi všemi živými organismy. Jsou to globulární, ve vodě rozpustné proteiny. Lokalizovány mohou být uvnitř, vně nebo na povrchu buněk. Často se vyskytují ve formě zymogenů a substráty hydrolyzují až po aktivaci jiným proteolytickým enzymem. V organismu plní různé funkce, např. intracelulární degradace proteinů, proteolytická aktivace proenzymů na enzymy, regulace imunitní odpovědi; ve své práci se zabývám pouze proteázami s trávicí funkcí. Ty, společně s glykosidázami, lipázami, esterázami a fosfolipázami patří k nejdůležitějším trávicím enzymům. Současná nomenklatura doporučená Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3>) nezahrnuje pojem proteáza. V praxi je ovšem tento pojem užíván nejčastěji, obvykle jako synonymum doporučeného výrazu peptidáza. V tomto významu je také použit v této práci.

Peptidázy můžeme rozdělit na dvě základní skupiny, exopeptidázy a endopeptidázy. Exopeptidázy odštěpují jednu nebo několik málo aminokyselin z N- nebo C- konce peptidového řetězce. Sekundární a terciární struktura proteinu obvykle brání jeho štěpení exopeptidázami. Štěpení uvnitř polypeptidového řetězce je katalyzováno endopeptidázami. Tyto enzymy štěpí polypeptidový řetězec na charakteristických místech, jejichž specifita je dána aminokyselinami, které sousedí s místem štěpení. Peptidázy je možno klasifikovat na základě jejich aktivního místa a katalytického mechanismu do čtyř hlavních skupin: **serinové** peptidázy (katalytický mechanismus zahrnuje nukleofilní aktivitu hydroxylové skupiny serinu), **cysteinové** proteázy (nukleofilem je thiolová skupina cysteinu), **aspartátové** proteázy (dva zbytky kyseliny asparagové fungují jako ligandy pro aktivovanou molekulu vody) a **metaloproteázy** (dvojmocný kationt kovů aktivuje molekulu vody). Na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí jsou proteázy sdružovány do rodin a rodiny proteáz s podobnou sekundární a terciární strukturou a předpokládaným společným evolučním původem do klanů (Barett a kol., 2000).

2.2 Serinové proteázy rodiny S1

Serinové proteázy rodiny S1 hrají zřejmě v trávení flebotomů zásadní úlohu, a proto je tato kapitola věnována jejich bližšímu představení. Rodina S1 je největší rodinou známých peptidáz a její zástupce najdeme u organismů ze všech říší. Zahrnuje pouze serinové endopeptidázy, například trypsin, chymotrypsin, elastázu a plasmin. Proteázy rodiny S1 sdílí stejný katalytický mechanismus. Katalytická triáda (tj. trojice aminokyselin v aktivním místě enzymu, která se podílí na katalyzované reakci) se skládá z kyseliny asparagové (Asp), histidinu (His) a serinu (Ser). Kyselina asparagová polarizuje histidin. Histidin funguje jako báze – přijímá proton od serinu (v první fázi) a molekuly vody (v druhé fázi) a následně působí v každé fázi jako kyselina. Serin nukleofilně napadá uhlík karboxylové skupiny substrátu. Substrátová specifita je dána téměř výhradně povahou aminokyselinového zbytku na pozici P1 substrátu. V rámci rodiny S1 existují tři hlavní typy: **trypsinový** (v pozici P1 substrátu je bazická aminokyselina Arg nebo Lys), **chymotrypsinový** (v pozici P1 Tyr, Trp, Phe, nebo Leu) a **elastázový** (v pozici P1 Ala). Proteázy rodiny S1 jsou syntetizovány ve formě prekurzorů, které jsou aktivovány odštěpením N-terminální sekvence (Barret a kol., 2000; <http://merops.sanger.ac.uk/>).

2.3 Cysteinové proteázy rodiny C1

Tato rodina je v následujícím odstavci blíže představena, protože jeden z leishmaniových inhibitorů proteáz (*Leishmania mexicana* ICP) zkoumaných v této práci inhibuje specificky rodinu C1 cysteinových peptidáz.

Rodina C1 (papainová rodina) zahrnuje mnoho endopeptidáz a několik exopeptidáz, v některých případech (např. katepsin B) enzymy s obojím typem aktivity. Exopeptidázy jsou obvykle cytosolické, ostatní enzymy rodiny C1 jsou obvykle sekretovány nebo cíleny do lyzozomů. Lysosomální a sekretorické enzymy jsou syntetizovány ve formě prekurzorů s N-terminální cílovou sekvencí. Zástupci rodiny C1 jsou například rostlinný enzym papain a lyzozomální katepsiny B, H a L. Katalytickými zbytky jsou Cys (s funkcí analogickou serinu serinových proteáz) a His, obvykle je přítomen také Gln předcházející katalytickému cysteinu a Asn následující katalytický His. Pro substrátovou specifitu je rozhodující povaha vazebního místa S2 enzymu, která určuje afinitu k velkým hydrofobním aminokyselinám v pozici P2 substrátu. Výjimečný je v tomto směru katepsin B, který velmi dobře štěpí i substráty s argininem v pozici P2 (Barret a kol., 2000; <http://merops.sanger.ac.uk/>).

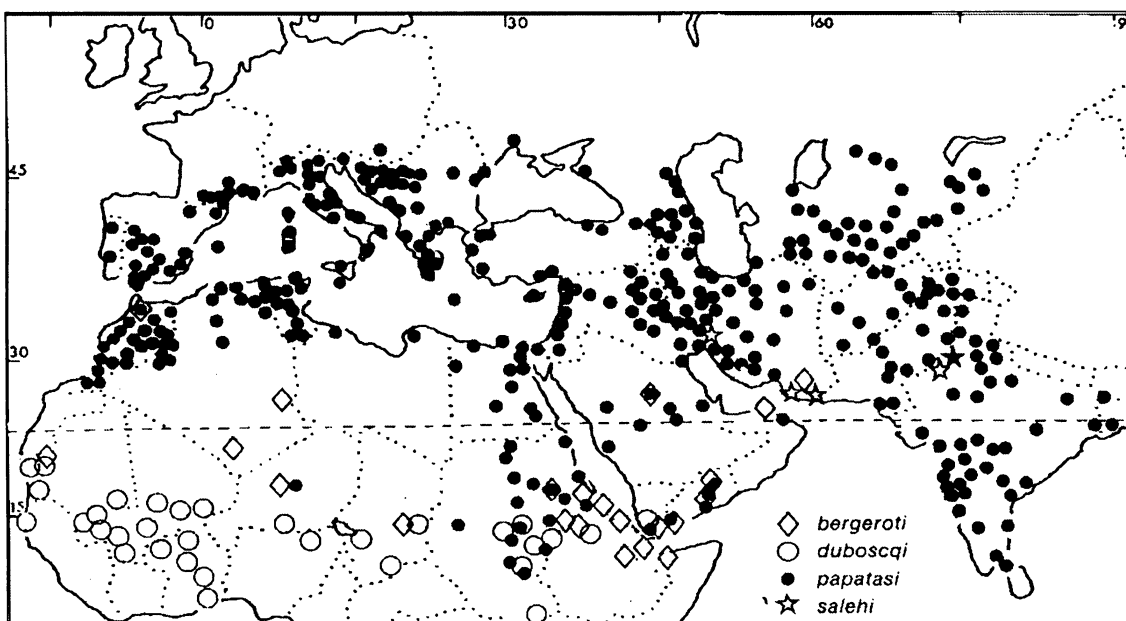
2.4 Flebotomové: charakteristika skupiny; příjem potravy a stavba trávicího traktu

Flebotomové (řád Diptera, čeleď Psychodidae, podčeleď Phlebotominae) jsou drobní (1.5-3 mm délky), jemně ochlupení komárci žijící především v tropech a subtropích celého světa; hranice jejich rozšíření dosahuje 50° severní a 40° jižní šířky. Osidlují velmi rozmanité biotopy vzhledem k nadmořské výšce (od míst položených níže než hladina moře po 3300m n.m.), vlhkosti (od aridních oblastí po deštné pralesy) i jiným faktorům (např. pralesní i antropofilní druhy). Z více než 700 poznáných druhů flebotomů je asi 70 prokázanými nebo předpokládanými vektory lidských onemocnění. Přenašeči leishmaniózy jsou dva rody: *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě.

Ve své práci jsem používala druhy *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus duboscqi* a *Lutzomyia longipalpis*. *P. papatasi* je vektorem kožní leishmaniózy působené druhem *Leishmania major* ve Starém světě. Má obrovský areál rozšíření (viz obrázek 2-1) a na mnoha místech je hlavním vektorem leishmaniózy. *P. duboscqi* je přenašečem *L. major* v některých oblastech Afriky. *L. longipalpis* je zřejmě komplexem několika druhů. Jeho rozšíření sahá od jižního Mexika po severní Argentinu. Je přenašečem viscerální leishmaniózy působené druhem *Leishmania infantum*. V experimentálních laboratorních nákazách bývá běžně používán také jako vektor *L. mexicana*. (Peters a Killick-Kendrick, 1987)

Obr. 2-1: Mapa rozšíření *P. papatasi* a *P. duboscqi* (podle Peters a Killick-Kendrick, 1987)

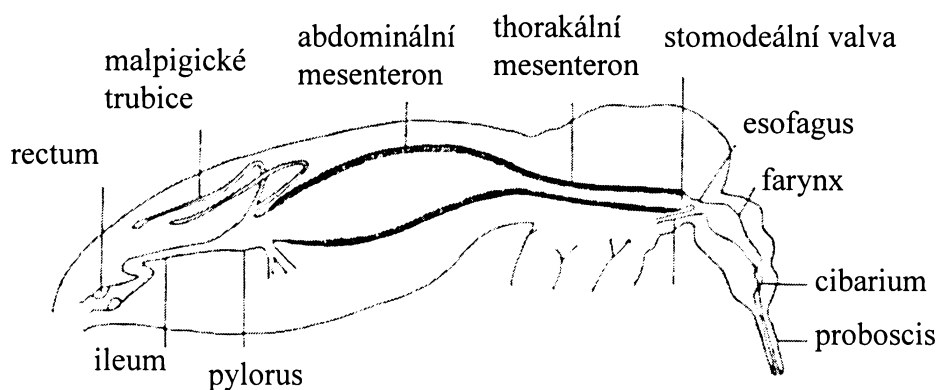
P. duboscqi (kroužky) a *P. papatasi* (tečky)



Flebotomové přenášejí na člověka také řadu virových a bakteriálních onemocnění, například horečku papatači (původcem je virus ze skupiny flebovirů) nebo bartonelózu (původcem je bakterie *Bartonella bacilliformis*).

Flebotomové mají čtyři eucephalní, apodní larvální instary; nejdříve po třech týdnech se kuklí. Pro dospělé je typická převážně noční aktivita. Samci i samičky se živí sáním cukerných šťáv. Krev sají pouze samičky, pro které je zdrojem proteinů pro tvorbu vajíček. Samičky kladou vajíčka do vlhkých míst s dostatkem organického materiálu pro výživu larev (např. opadané listí nebo odpad z domácnosti). Některé druhy jsou schopny klást první snůšku bez přijetí krve. Jednotlivé druhy se liší v počtu sání během jednoho gonotrofického cyklu; některé sají vícekrát během několika dnů, jiné vyžadují pouze jedno sání na jednu snůšku. Do místa sání samička uvolňuje sliny s lokálním vazodilatačním, analgetickým a imunomodulačním účinkem na hostitele. Některé druhy se páří před, jiné po a další během sání. Doba mezi sáním a kladením vajíček jednotlivých druhů závisí na druhu flebotoma a teplotě prostředí; u laboratorních kolonií se pohybuje mezi 4-8 dny (shrnutí viz Killick-Kendrick, 1999; Sádlová, 1999).

Obr. 2-2: Schéma trávicího traktu flebotoma (upraveno podle Killick-Kendrick, 1979)



2.5 Leishmanie: charakteristika skupiny; *L. major*, *L. mexicana*

Prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) jsou dvojhospitelská parazitická protozoa. Jejich obratlovčími hostiteli jsou především savci včetně člověka, jedinými známými přenašeči jsou flebotomové. Leishmanie jsou původci onemocnění s různými klinickými projevy souhrnně označovanými leishmaniózy, kterými je v současné době zasaženo asi 20 miliónů lidí. Leishmanióza je rozšířena v tropické a subtropické Americe, Africe, Číně, Indii, střední Asii, na Blízkém východě a v mediteránu.

Při své práci jsem použila dva druhy. Druh *Leishmania major* je původcem zoonotické kožní leishmaniózy. Vyskytuje se v Africe a na Blízkém a Středním východě v aridních oblastech. Rezervoárem jsou drobní noroví hlodavci. Zástupci komplexu druhů *Leishmania mexicana* jsou původci kožní leishmaniózy ve Střední Americe. Rezervoárem jsou lesní hlodavci (Peters a Killick- Kendrick, 1987; <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>).

2.6 Vývoj leishmanií v trávicím traktu vektora

Vývoj leishmanií ve vektorovi probíhá výhradně v jeho trávicím traktu. Medicínsky významné leishmanie s výjimkou komplexu *L. braziliensis* patří mezi tzv. suprapylorické druhy. To znamená, že jejich vývoj je omezen na střední střevo a anteriorní část trávicího traktu, parazit se nevyvíjí v zadním střevě (Lainson a kol., 1977).

Přijatá krev obsahuje stádia amastigotů. Ta se v krvi obklopené peritrofickou membránou dělí a diferencují v bičíkaté promastigoty, konkrétně tzv. procyklické formy, které později transformují v delší, štíhlejší formy, tzv. dlouhé nektomonády. Zhruba třetí den po sání rozrušují nektomonády peritrofickou matrix a unikají do ektoperitrofického prostoru střevního lumen. Zde se pomocí bičíku uchycují na mikroklky střevní stěny. Toto přichycení je reverzibilní a chrání promastigoty před vyloučením spolu s nestrávenými zbytky krve. Suprapylorické druhy leishmanií se v abdominální části mezenteronu opakovaně přichycují a uvolňují a rychle množí, později migrují anteriorně. Dlouhá nektomonádní stádia transformují v tzv. krátké nektomonády (podle Rogers a kol., 2002 nazývané také leptomonády), které 5-7 dní po sání představují nejhojnější formy v hrudní části střeva. Krátké nektomonády jsou prekurzory infekčních metacyklických stádií. Z nektomonádních stádií vznikají v blízkosti stomodeální vřívky také krátké nepohyblivé

haptomonády. Některé z nich kolonizují oesofagus a farynx a vytvářejí paramastigotní stádia. Haptomonády i paramastigoti jsou přichyceni k povrchu stomodeální valvy a předního střeva, někdy infekce zasahuje i cibarium a proboscis (shrnutí Sádlová, 1999).

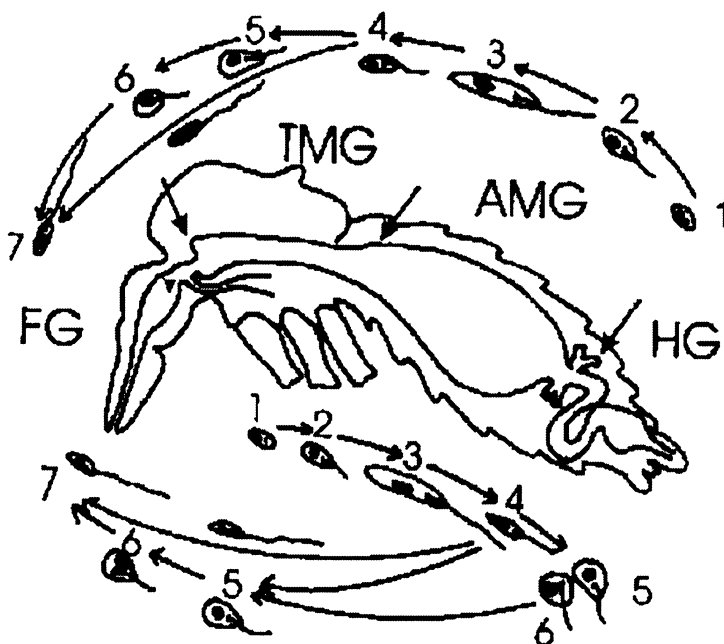
Leishmanie skupiny peripylaria vytvářejí po průniku peritrofické matrix haptomonády a paramastigoty uchycené v pyloru a ileu, kde se také množí. Později vytváří pohyblivá promastigotní stádia, která migrují do hrudní části střeva. Další vývoj je obdobný vývoji suprapylorických druhů (shrnutí Killick-Kendrick, 1979; Sádlová, 1999).

Paraziti působí těžké poškození stomodeální valvy, které brání vektorovi v přijetí krve a nutí jej k opakovaným pokusům o sání. K přenosu infekce na obratlovce dochází se zpětným tokem přijaté krve, působeným právě poškozením stomodeální valvy.

Metacykličtí promastigoti jsou po vstupu do těla obratlovce fagocytováni do makrofágů. Ve fagolysosomu těchto buněk transformují v amastigotní formy a dále se množí (shrnutí Sádlová, 1999).

Obr 2-3: Morfologický vývoj a lokalizace leishmanie v přenašeči (Sádlová, 1999)

suprapylorické druhy - v horní části obrázku, peripylorické druhy – ve spodní části obrázku; šipkami je střevo rozděleno do oblastí: FG – přední střevo; TMG – thorakální mezenteron; AMG – abdominální mezenteron; HG – zadní střevo; morfologické formy leishmanií: 1 – amastigoti 2 – procyklický promastigot, 3 – dlouhá nektomonáda, 4 – krátká nektomonáda; 5 – haptomonáda; 6 – paramastigot; 7 – metacyklický promastigot



2.7 Střevní proteázy flebotomů

Proteolytické enzymy hrají v trávení krve ve střevě hematofágního hmyzu zásadní úlohu, neboť většinu živin v přijaté krvi tvoří proteiny. Většina hematofágního hmyzu produkuje alkalické trávicí proteázy a hlavní úlohu v trávení u nich hrají serinové proteázy trypsinového a chymotrypsinového typu. Výjimkou jsou v tomto směru Hemiptera, u nichž jsou hlavními trávicími enzymy cysteinové proteázy aktivní při kyselém pH (hodnota pH přibližně 5). Například u hematofágních ploštic rodu *Triatoma* a *Rhodnius* jsou hlavní trávicí endopeptidázy katepsin L a katepsin B typu (Lehane, 1994; Kollien a kol., 2004).

U nematocerních dipter je přijatá krev shromážděna v abdominálním mesenteronu. Během několika minut jsou erythrocyty zkoncentrovány v masu, z níž je extrahována voda. Poté je krev obklopena peritrofickou matrix, sekretovanou buňkami střevního epitelia. Ta během 1 až 4 hodin vytváří obal, který zcela obklopuje přijatou potravu v zadním mesenteronu. Peritrofická matrix je tvořena chitinovou sítí, proteiny a proteoglykany (Pimenta a kol. 1997). Oblastí s nejvyšší aktivitou trávicích enzymů je tenká vrstva tekutiny mezi střevním epitelem a kompaktní masou krve, resp. peritrofickou matrix. Trávení postupuje od periferie směrem ke středu endoperitrofického prostoru, hem je přeměněn na hematin. Po skončení trávení je peritrofická matrix s hematinem a dalšími zbytky krve vyloučena. Délka doby trávení je závislá na teplotě, vlhkosti i množství přijaté potravy (přehled Clements, 1992).

Trávení krve a syntéza proteolytických enzymů jsou relativně dobře prostudovány u komárů (Diptera: Culicidae). V mnohém jsou poznatky u této skupiny podstatně komplexnější než u flebotomů, obzvláště v oblasti regulace exprese trávicích enzymů. Výzkum střevních proteáz flebotomů často vychází z poznatků získaných u komárů a proto je v této práci stručně shrnuji.

Aktivita střevních proteáz komárů významně stoupá po sání krve. Zjištěna byla endo- i exopeptidázová aktivita. Hlavními endopeptidázami u všech studovaných anautogenních druhů komárů (tj. druhů vyžadujících sání krve pro tvorbu vajec) jsou trypsiny a chymotrypsiny. Hlavní endopeptidázou indukovanou po sání u druhu *Aedes aegypti* je trypsin produkovaný ve dvou formách, tzv. časný a pozdní trypsin. Ani jeden z těchto proteinů není přítomen v nenasátém střevě. Časný trypsin se v malém množství vyskytuje v nasátém střevě mezi 1 a 8h po sání. Pozdní trypsin je produkován ve velkých množstvích nejdříve asi 8-10h po sání a je zodpovědný za většinu endoproteázové aktivity

ve střevě. Zatímco pozdní trypsin plní roli hlavního trávicího enzymu, časný trypsin je součástí signální dráhy, která aktivuje transkripci pozdního trypsinu. Gen pro časný trypsin je transkribován u nenasátých samic v závislosti na juvenilním hormonu. Sání krve vyvolává translaci přítomné mRNA pro časný trypsin a jeho sekreci do střevního lumen. Aminokyseliny a krátké peptidy uvolněné aktivitou časného trypsinu a exopeptidáz aktivují zahájení transkripce pozdní formy trypsinu. Tento dvoufázový systém trávení umožňuje *Ae. aegypti* díky časnému trypsinu zjistit kvalitu přijaté potravy před zahájením syntézy pozdního trypsinu (Felix a kol., 1991; Barillas-Mury a kol., 1995; Noriega a kol., 1997; Noriega a kol. 1999; Noriega a kol., 2001). Podle Borovsky a kol. (2003a) není ovšem přítomnost časného trypsinu *Ae. aegypti* nutná pro zahájení transkripce pozdního trypsinu a jeho syntéza je ovlivněna mnoha dalšími faktory, např. neuroendokrinními faktory a hormony střevních epiteliálních buněk.

U druhu *Anopheles gambiae* bylo zjištěno sedm trypsinových genů, z nichž některé jsou transkribovány konstitutivně a mají roli zřejmě analogickou časnému trypsinu *Ae. aegypti*, u jiných je transkripce indukována po sání podobně jako u pozdního trypsinu *Ae. aegypti* (Muller a kol., 1993, 1995). Trypsiny indukované sáním krve byly identifikovány jako hlavní trávicí enzymy i u mnoha dalších druhů komárů, např. *Anopheles darlingi* a *Culex quinquefasciatus* (Carroci a kol, 2003). Geny pro trypsiny komárů zřejmě sdílí regulační element rozeznávaný transkripčním faktorem GATA (Giannoni a kol., 2001). Dosud popsané trypsiny komárů vykazují nízkou sekvenční podobnost mezi druhy (40,5% pozdní trypsiny *An. gambiae* a *Ae. Aegypti*), ale jejich trojrozměrné struktury jsou si velmi podobné a to nejen navzájem mezi druhy, ale i s jinými skupinami hmyzu, např. *Drosophila melanogaster*. Mají strukturu dvou antiparalelních β -soudkových domén (shrnutí Borovsky, 2003a). Syntéza pozdních trypsinů komárů je ukončena působením TMOF (trypsin modulating oostatic factor) syntetizovaného ovariem. Tento hormon je uvolňován do hemolymfy a váže se na střevní epiteliální buňky. Podobné peptidové hormony ukončující syntézu trypsinu byly nalezeny také u dalších skupin hmyzu, např. motýlů (Borovsky, 2003b).

Chymotrypsiny hrají významnou roli v larválním vývoji i v trávení dospělců komárů. Jiang a kol. (1997) popsali chymotrypsin *Ae. aegypti* specifický pro dospělé samičky, který je stejně jako časný trypsin poprvé přepisován na začátku života dospělé a jeho mRNA je překládána až po nasátí potravy. Na rozdíl od časného trypsinu, mRNA pro chymotrypsin po sání neklesá a protein je produkován průběžně během trávení (Jiang a kol., 1997). U druhu *An. gambiae* byly identifikovány tři trávicí chymotrypsiny, dva se

svým profilem exprese podobají pozdním trypsinům, jeden časným trypsinům. Všechny tři chymotrypsiny jsou produkovány ve formě zymogenů a aktivovány tryptickým štěpením (Vizioli a kol., 2001). Chymotrypsiny indukované po sání krve byly objeveny také u amerických druhů anofelů, např. *An. darlingi* (de Almeida a kol., 2003).

Ve střevě komárů byla prokázána i exopeptidázová aktivita. Konstitutivní i sáním indukovaná aminopeptidázová aktivita byla identifikována u *Ae. aegypti* i několika druhů rodu *Anopheles*. Karboxypeptidáza A, karboxypeptidáza B a aminopeptidázová aktivita jsou indukovány u *Ae. aegypti* po sání s nejvyšší aktivitou mezi 20 a 24 h po sání, podobně jako pozdní trypsin. Všechny zjištěné exopeptidázy vykazují široké pH optimum mezi 6.5 a 9.0. Stejně jako v případě pozdního trypsinu je produkované množství exopeptidáz úměrné množství proteinů v přijaté potravě a jejich stimulace je závislá na trypsinové aktivitě. Na základě těchto poznatků autoři navrhují, že všechny tyto proteázy pozdní fáze jsou regulovány aktivitou časného trypsinu a možná sdílejí shodné regulační elementy (Noriega a kol., 2002). Naproti tomu u *An. gambiae* je karboxypeptidáza A indukována velmi rychle po sání. Množství přítomné mRNA se zvětší 10x do 3h po sání oproti hladině před sáním krve. Indukce této karboxypeptidázy je nezávislá na obsahu proteinů v přijaté potravě. Karboxypeptidáza B je u tohoto druhu exprimována podobně jako časné trypsin. Je pravděpodobné, že karboxypeptidáza A a karboxypeptidáza B u druhu *An. gambiae* společně s časnými trypsiny a časným chymotrypsinem hrají roli v regulaci syntézy proteáz pozdější fáze (Edwards a kol., 1997; Lavazec a kol., 2005).

O proteolytických enzymech u flebotomů je, v porovnání s komáry, známo poměrně málo. Sání krve vyvolává syntézu a sekreci trávicích enzymů, zahrnujících trypsin, chymotrypsin, aminopeptidázy, karboxypeptidázy a glukosidázy (Sacks a Kamhawi, 2001). Enzymy jsou uvolněny do ektoperitrofického prostoru a procházejí přes peritrofickou membránu do požívané krve (Pimenta a kol., 1997).

Ve střevě nenasátých samic flebotomů je velmi nízká proteázová aktivita. Podle Dillon a Lane (1993a) je, při použití azoalbuminu jako substrátu pro detekci celkové proteázové aktivity, u *P. papatasi* maximální hladiny je dosaženo mezi 24-34 hodinami a u *P. langeroni* asi 48h po sání krve. Zpět na původní hodnoty klesá hladina proteázové aktivity 58 resp. 72 hodin po sání. Aktivita byla kompletně inhibována syntetickým inhibitorem serinových proteáz PMSF (phenylmethylsulfonyl fluorid). Podobně jako u jiného hematofágního hmyzu je trypsinová aktivita téměř výhradně lokalizována ve střevním lumen, naopak aminopeptidázová aktivita se vyskytuje jak v lumen tak i asociovaná se střevní stěnou. Detekovaná chymotrypsinová aktivita odpovídá asi 1,5%

trypsinové aktivity. Optimální hodnoty pH pro trypsinovou aktivitu jsou u obou druhů flebotomů v alkalické oblasti mezi pH 7,5 a 9,5, pro aminopeptidázovou aktivitu pH 8 (Dillon a Lane, 1993a).

Srovnání syntézy serinových proteáz u dospělců a vývojových stádií provedli Mahmood a Borovsky (1992 a 1993) u druhu *Lutzomyia anthophora*. Larvy i kukly *L. anthophora* syntetizují trypsinové i chymotrypsinové proteázy. Aktivita serinových proteáz stoupá během larválního vývoje a klesá před zakuklením. V kuklách mohou tyto proteázy zřejmě sloužit k lyzi střeva, k níž dochází během metamorfózy. Larvální stádia syntetizují více chymotrypsinových proteáz, zatímco u dospělců převažují trypsinové.

Nejnovější a dosud nejpodrobnější studie střevních proteáz flebotomů (Ramalho-Ortigao a kol., 2003) popisuje sekvenci a částečnou charakterizaci šesti střevních serinových proteáz *P. papatasi*. Metodou sekvenace cDNA knihoven nasátého i nenasátého střeva *P. papatasi* byly identifikovány cDNA kódující čtyři trypsinové a dvě chymotrypsinové sekvence. Všechny vykazují strukturální podobnost známým trypsinům a chymotrypsinům různých druhů komárů. V cDNA knihovně z nenasátých střev byly nalezeny tři trypsinové sekvence (*Pptryp1* – *Pptryp3*), z nichž nejhojnější je *Pptryp1*. Sekvenace cDNA knihovny střeva 6 a 24h po sání krve ukázala další sekvenci pro trypsin (*Pptryp4*). Předpokládaná molekulová hmotnost těchto trypsinů se pohybuje mezi 27.7 a 29.2 kDa. V cDNA knihovně nasátého střeva byly identifikovány také dvě chymotrypsinové sekvence (*Ppchym1* a *Ppchym2*) kódující proteiny o předpokládané molekulové hmotnosti 28.8 a 28.2 kDa (Ramalho-Ortigao a kol., 2003).

Nalezené sekvence endopeptidáz zahrnují předpokládané signální peptidy o délce 16 nebo 19 aminokyselin i předpokládané místo štěpení pro aktivaci proteinu. Ve všech nalezených sekvencích je přítomna katalytická triáda, zahrnující histidin, kyselinu asparagovou a serin, i šest konzervovaných cysteinových zbytků. Nalezené trypsinové sekvence obsahují vysoce konzervovaná trypsinová vazebná místa. Přítomny jsou i aminokyselinové zbytky důležité pro specifitu trypsinů (lysin a aspartát na konzervovaných pozicích), stejně jako zbytky zodpovědné za specifitu chymotrypsinů u *Ppchym1* a *2* (Ramalho-Ortigao a kol., 2003).

Předpokládané aminokyselinové sekvence čtyř trypsinových molekul *P. papatasi* se navzájem shodují v 44-63%. Předpokládané chymotrypsinové sekvence jsou shodné z 59%. Shoda mezi trypsinovými a chymotrypsinovými sekvencemi se, podobně jako u *An. gambiae* (Vizioli a kol., 2001), pohybuje mezi 30 a 40%. Nalezené serinové proteázy *P. papatasi* vykazují vysoký stupeň podobnosti trypsinům a chymotrypsinům u komárů. Dva

popisované chymotrypsiny *P. papatasi* jsou z 34-45% shodné s chymotrypsiny *An. gambiae*, *Ae. aegypti* a *An. aquasalis*. Trypsiny *P. papatasi* se shodují s trypsiny těchto komárů ze 35-60% (Ramalho-Ortigao a kol., 2003).

Metodou RT-PCR bylo zjištěno, že v profilu exprese serinových proteáz *P. papatasi* jsou významné rozdíly. Všechny čtyři trypsinové mRNA jsou přítomny i v nenasátém střevě. Dvě z nich (*Pptryp1* a *Pptryp2*) jsou během 30h po sání redukovány. Hladina *Pptryp3* se zřejmě po sání nemění a zůstává stálá až do 30h, po 48h je již výrazně redukována. Exprese *Pptryp4* je sáním indukována, stoupá po 6 i 30h. Exprese dvou chymotrypsinových proteáz se též podstatně vzájemně liší. Pouze jedna z nich (*Ppchym1*) je přítomna i v nenasátém střevě. Hladina mRNA pro *Ppchym1*, která je v nenasátém střevě nízká, strmě stoupá už 6h po sání. Po 30h je ale přibližně z 50-70% redukována a po 48h se její množství vrací na původní hodnotu. Naproti tomu mRNA pro *Ppchym2* v nenasátém střevě chybí. Brzy po sání (6h) je její hladina detekovatelná, ale nízká. Po 30h velmi výrazně stoupá, následuje redukce po 48h. (Ramalho-Ortigao a kol., 2003)

Výsledky RT-PCR v zásadě odpovídají i naměřené enzymatické aktivitě.

Trypsinová aktivita je detekovatelná již 1h po sání, maximálních hodnot dosahuje mezi 27 a 48h po sání. Po 72h je opět redukována. Chymotrypsinová aktivita je detekovatelná nejdříve 6h po sání, rovněž s maximálními hodnotami mezi 27 a 48h a redukcí po 72h po sání (Ramalho-Ortigao a kol., 2003).

Skutečnost, že mRNA pro všechny trypsiny *P. papatasi* je přítomná v nenasátém střevě, ačkoliv v něm nebyla zjištěna žádná trypsinová aktivita, autoři vysvětlují posttranskripční regulací těchto trypsinů. Nevylučují ovšem ani možnost skladování inaktivních prekurzorů enzymů uvnitř střevních buněk (Ramalho-Ortigao a kol., 2003).

Chymotrypsiny *P. papatasi* *Ppchym1* a *Ppchym2* se podle zjištěného profilu exprese zdají být analogické časnému a pozdnímu trypsinu *Ae. aegypti* (Barillas-Mury a kol., 1995). Je možné, že mechanismy regulující expresi časného a pozdního trypsinu u *Ae. aegypti* se u flebotomů vyvinuly pro chymotrypsiny (Ramalho-Ortigao a kol., 2003).

Pro aktivitu trávicích enzymů mohou být důležitými faktory hodnota pH a teplota. Gontijo a kol. (1998) stanovili v mesenteronu flebotomů sátých na roztoku sacharózy kyselý pH přibližně hodnoty 6, podobně jako Tang a kol. (1998). Ti dále uvádějí neutrální pH (7,0 až 7,3) v thorakálním mezenteronu a zásadité prostředí (pH 7,1 až 8,4) v abdominálním mesenteronu nenasátých samic. U samic brzy po sání krve byla v thorakálním střevě hodnota pH 7,4, která v průběhu trávení klesala na zpět ke kyselým hodnotám (Tang a kol., 1998). Je známo, že zvýšení teploty prostředí urychluje průběh

trávení krve u hematofágního hmyzu. U komárů bylo popsáno, že vyšší teplota jednak urychluje syntézu trávicích enzymů, jednak zvyšuje jejich aktivitu (shrnutí Clements, 1992). Flebotomové jsou aktivní v poměrně širokém teplotním rozmezí v závislosti na druhu. Některé druhy rodu *Lutzomyia* vyskytující se v horském prostředí, např. *L. verrucarum*, sají na hostiteli v teplotách mezi přibližně 10 až 18 °C (Mullen a Durden, 2002). Většina druhů flebotomů saje ale obvykle při teplotách 25°C a vyšších. Např. Roberts (1994) zaznamenal největší aktivitu pozorovaného druhu *P. alexandri* v terénu při teplotách mezi 31 a 43°C, jako minimální teplotu pro aktivitu tohoto druhu uvádí 11°C.

2.8 Leishmaniové inhibitory cysteinových proteáz

Leishmanie ani jiná trypanosomatida nekódují ve svých genomech žádné inhibitory cysteinových peptidáz z rodiny cystatinů, které jsou jinak v přírodě takřka všudypřítomné. Byly však u nich objeveny inhibitory z rodiny ICP (rodina I42 v databázi MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>). Kromě trypanosomatidů byly inhibitory této rodiny objeveny i u některých dalších parazitických protozoí a u prokaryot. Jedná se o malé proteiny (přibližně 13 kDa), které nevykazují žádnou sekvenční podobnost s jinými známými skupinami inhibitorů cysteinových peptidáz. Vzájemná podobnost primárních aminokyselinových sekvencí inhibitorů ICP je nízká (31 % identita ICP *Trypanosoma cruzi* a *L. mexicana*) s výjimkou konzervovaných motivů, které se účastní interakce s inhibovanými enzymy. Inhibitory ICP mají stejnou specifitu k inhibovaným enzymům: jsou účinnými inhibitory klanu CA, rodiny C1 cysteinových peptidáz, obzvláště katepsinu L. Terciární struktura ICP je podobná N-terminálním doménám imunoglobulinů. Detailně byla určena struktura ICP *L. mexicana*: je tvořen dvěma β -listy jejichž vlákna jsou spojena smyčkami s výše zmíněnými konzervovanými motivy. Tyto smyčky se váží do štěrbin aktivního místa inhibovaných enzymů. Role inhibitorů ICP v biologii daných organismů není zcela jasná (Sanderson a kol., 2003, Smith a kol., 2006).

Bylo prokázáno, že ICP druhu *Trypanosoma cruzi* nazvaný chagasin se váže na endogenní cysteinové peptidázy *T. cruzi* a reguluje jejich aktivitu. Tím ovlivňuje děje závislé na endogenní proteolytické aktivitě *T. cruzi*, jako je diferenciace epimastigotů v metacyklické trypomastigoty ve střevě přenašeče a invaze savčích buněk (Santos a kol., 2005; Monteiro a kol., 2001).

Role ICP u leishmanií byla studována především u druhu *L. mexicana*. ICP *L. mexicana* je 12,7 kDa velký protein. In vitro inhibuje aktivitu peptidáz podobných savčímu katepsinu L včetně vlastních proteáz *L. mexicana* nazvaných CPA a CPB. ICP

váže a inhibuje také katepsin B, ale s přibližně 1000x menší afinitou. (Sanderson a kol., 2003) Cysteinové peptidázy *L. mexicana* CPA a CPB jsou syntetizovány ve formě zymogenů, transportovány přes endoplazmatické retikulum (ER) a Golgiho aparát (GA) a sekretovány do flagelární kapsy leishmanie. Tam jsou pravděpodobně aktivovány odštěpením pro-domény a poté transportovány endosomální cestou do lyzozomu. ICP nehraje roli při expresi, procesování a transportu vlastních peptidáz *L. mexicana* ani v regulaci aktivity těchto enzymů v endozomálních kompartmentech buňky. ICP je také v největší míře exprimován u procyklických promastigotů zatímco cysteinové peptidázy CPB u amastigotních stadií. Není vyloučeno, že ICP brání působení peptidáz předčasně aktivovaných v ER a GA, pravděpodobněji se ovšem jeví role ICP v modulaci aktivity proteáz z prostředí. V prostředí, ve kterém leishmanie žijí, tedy v lyzosomech makrofágů savčího hostitele a střevě přenašeče, je velká koncentrace hydrolytických enzymů. ICP by mohl ovlivňovat jejich aktivitu buď přímo v okolním prostředí nebo po jejich endocytóze do buňky parazita. Sekrece ICP nebyla u přirozené linie *L. mexicana* detekována, ale transgenní linie, která ICP exprimuje ve velkém množství, jej sekretuje do média. Endocytóza hostitelských proteinů je u leishmanií běžná. Promastigoty *L. mexicana* kultivované v médiu s papainem tento enzym endocytují. ICP v buňce s pohlceným papainem částečně kolokalizuje (Besteiro a kol., 2004).

Role ICP při vývoji leishmanií v savčím hostiteli není jasná a je v současné době předmětem výzkumu. Linie s knock-outovaným genem pro ICP tvoří léze v myši, ty jsou ale výrazně menší než léze způsobené přirozenou linií. Linie, která ICP nadprodukuje a sekretuje ovšem vytváří léze ještě hůře než knock-out. Je možné, že sekretovaný ICP moduluje imunitní odpověď myši a tím snižuje infektivitu této linie (Besteiro a kol., 2004).

Skutečnost, že ICP je v největší míře exprimován u procyklických promastigotů, napovídá, že by se mohl uplatňovat při vývoji leishmanií ve střevě přenašeče po sání. Jedním z cílů předkládané diplomové práce bylo proto ověřit, zda je ICP schopen inhibovat proteolytickou aktivitu ve střevě flebotomů.

2.9 Leishmaniové inhibitory serinových proteáz

U protozoí, konkrétně u parazitických prvoků rodu *Trypanosoma* a *Leishmania*, byly též nalezeny inhibitory proteáz homologní ecotinu bakterie *Escherichia coli*. Ecotin *E. coli* je protein, který účinně inhibuje aktivitu některých serinových proteáz s velmi různorodou substrátovou specifitou. Homology ecotinu se vyskytují u několika dalších

rodů Gram-negativních bakterií. Ecotin *E. coli* je účinným inhibitorem mnoha serinových proteáz rodiny S1, včetně pankreatického trypsinu a chymotrypsinu, neutrofilní elastázy, a trombinu (souhrn McGrath a kol., 1995). Ecotiny se vyskytují v periplasmě bakterií a do okolního prostředí jsou sekretovány jen v malém množství. Jednou z jejich funkcí je zřejmě ochrana proti neutrofilní elastáze. Neutrofilny jsou leukocyty, které zajišťují první obranu proti invadujícím mikroorganismům a sekrece elastázy je jedním z mechanismů, kterým patogeny zabíjejí. Ecotin inhibuje aktivitu neutrofilní elastázy, která pronikne do periplasmatického prostoru bakterií (Eggers a kol., 2004).

Ecotin je homodimer. Podjednotky o váze 16 kDa navzájem interagují především prostřednictvím svých C-koncových domén. S navázaným trypsinem vytváří ecotin heterotetramerní komplex, ve kterém je každá molekula trypsinu v kontaktu s oběma podjednotkami ecotinu. Podjednotky ecotinu mají strukturu beta-soudku, s trypsinem interagují hlavně smyčky spojující jednotlivá vlákna, která tvoří β -strukturu. Smyčka primárního vazebného místa ecotinu se váže do aktivního místa trypsinu, podobně jako substrát. Stejná molekula trypsinu se váže i na druhou ecotinovou podjednotku na smyčky tzv. sekundárního vazebného místa. Struktura heterodimeru sestávajícího ze dvou molekul ecotinu a dvou molekul trypsinu je zcela unikátní mezi známými strukturami komplexů serinových proteáz s inhibitory. Kooperativní působení dvou vazebných míst na různých podjednotkách ecotinu a flexibilní spojení těchto podjednotek C-koncovými doménami umožňují ecotinu inhibovat širokou škálu proteáz s různou substrátovou specifiitou (Yang a kol., 1998).

Homology ecotinu u kinetoplastid byly nazvány ISP (inhibitory serinových proteáz). *Leishmania major* kóduje ve svém genomu tři tyto inhibitory: ISP1 ([LmjF15.0300](#)), ISP2 ([LmjF15.0510](#)) a ISP3 ([LmjF15.0520](#)), všechny lokalizované v jednom polycistronicky transkribovaném místě na chromozomu 15 (Ivens a kol., 2005). ISP 1 a 2 kódují proteiny o velikosti podobné ecotinu, konkrétně 16,5 resp. 17,6 kDa. ISP3 má velikost 42 kDa. Pouze jeho N-terminální doména je homologní ecotinu, C-terminální úsek nemá známý homolog. Tyto tři geny jsou konzervovány i u dalších druhů leishmanií: potvrzeny byly u *L. infantum* ([LinJ15.0350](#), [LinJ15.0530](#), a [LinJ15.0540](#)) a *L. braziliensis*. Homology ISP1 a ISP2 se nacházejí také v genomu *Trypanosoma brucei*, zatímco ISP3 je zřejmě specifický pro rod *Leishmania*. Bylo prokázáno, že rekombinantní ISP2 *L. major* účinně inhibuje chymotrypsin, trypsin a elastázu. Vzhledem k tomu, genom *L. major* nekóduje žádné serinové peptidázy rodiny S1 (Ivens a kol., 2005), dá se předpokládat, že ISP *L. major* inhibují proteázy z vnějšího prostředí. Takovými

potenciálními cíli jsou serinové proteázy savčího hostitele, například neutrophilní elastáza nebo katepsin G, a nebo střevní peptidázy přenašeče. Zatímco ecotin *E. coli* je sekretován do periplasmy a obsahuje exportní signální peptid od délce 20 aminokyselin, u ISPů trypanosomatid nebyl žádný N-terminální signální peptid nalezen. Při kultivaci promastigotů *L. major* v kultuře nebyla detekována sekrece ISP a to ani v přítomnosti trypsinu nebo chymotrypsinu přidaného do média. Zdá se tedy, že ISP trypanosomatid nejsou sekretovány. Extracelulární enzymy by tedy mohly být inhibovány zřejmě až po endocytóze do buňky parazita. Zjištěný expresní profil se u tří ISP *L. major* liší. ISP1 byl detekován u promastigotů z logaritmické fáze růstu kultury a metacyklických promastigotů. ISP2 je exprimován v průběhu celého životního cyklu, i u amastigotů. ISP3 nebyl detekován u žádného stádia. Vzhledem k provedení pokusu (promastigoti a metacykly byli získáni z in vitro kultury) nejsou však tyto údaje zcela spolehlivé. Je ku příkladu možné, že ISP3 je exprimován v množství, které nebylo protilátkou detekováno, nebo je jeho exprese stimulována vnějším podnětem ve střevě přenašeče (<http://www.genedb.org>; Coombs, nepublikováno).

Jedním z cílů předkládané práce bylo zjistit, jak se linie *L. major* defektní v různých ISP genech vyvíjejí ve flebotomech a dále ověřit, zda jsou tyto inhibitory schopny in vitro inhibovat proteázovou aktivitu střeva flebotomů.

2.10 Vliv střevních proteáz flebotomů na vývoj leishmanií

Adler (1938) byl prvním, kdo se zabýval studiem trávení *P. papatasi* v souvislosti s jeho rezistencí k některým druhům leishmanií. Zjistil, že se snížením obsahu séra v přijímané krvi se výrazně zvýšil stupeň infekce *P. papatasi* druhem leishmanie, která v něm za normálních podmínek nepřežívá (zřejmě *L. tropica*). Navrhl možnost, že produkty trávení séra ničí promastigoty leishmanií a že snížení koncentrace séra v potravě snížilo množství indukovaných proteáz. Schlein a Romano (1986) a Borovsky a Schlein (1987) infikovali experimentálně *P. papatasi* promastigoty a prokázali, že infekce *L. major* v jejím přirozeném vektoru snižuje množství proteáz přítomných ve střevě po sání. Přidání trypsinového inhibitoru umožní přežití a rozvoj infekce *L. donovani*, která jinak v *P. papatasi* nepřežívá. Autoři formulovali hypotézu, že specifická složka trypsinové aktivity ve střevě *P. papatasi* brání rozvoji infekce *L. donovani*. Naopak, schopnost

modulovat tuto složku umožňuje ve střevě přežít druhu *L. major*, pro kterou je *P. papatasi* přirozeným vektorem.

Potlačení a zpoždění aktivity alkalických proteáz ve střevě *P. papatasi* potvrdili Dillon a Lane (1993b) i při infekci amastigoty *L. major*, tedy situaci lépe odpovídající přirozenému průběhu infekce. Při infekci *P. langeroni*, který není přirozeným vektorem *L. major*, byl nástup proteáz rovněž opožděn oproti kontrole, ale snížení aktivity bylo méně výrazné než u *P. papatasi*. Autoři navrhuji dvě možná vysvětlení, proč je snížení aktivity proteáz vektora pro rozvoj infekce důležité. První je možnost přímého škodlivého účinku proteolytických enzymů na leishmanie. Podle druhé hypotézy je suprese proteáz důležitá, protože zvyšuje množství dostupných živin pro rostoucí populaci parazita (Dillon a Lane, 1993b).

Vlivem složení přijímané krve na proteázovou aktivitu ve střevě *P. papatasi* a náchylnost tohoto druhu k infekci *L. donovani* se zabývali též Schlein a Jacobson (1998). Heparinizovaná krev stejně jako podání erytrocytů v izotonickém roztoku vedou ke snížení a zpoždění aktivity alkalických proteáz a umožní přežití *L. donovani* v jejím nepřirozeném vektoru. Autoři navrhuji, že mechanismem ovlivnění sekrece proteáz složením přijímané krve může být vysvětleno i jejich dřívější pozorování (Schlein a Jacobson, 1996), kdy zaznamenali ovlivnění vývoje *L. major* v jejím přirozeném vektoru *P. papatasi* typem přijaté savčí krve. Volf a kol. (2001) popsali příznivý vliv galaktosaminu a heparinu na rozvoj infekce *L. major* v *P. duboscqi*, který je také přirozeným přenašečem této leishmanie. Galaktosamin vykazuje nespecificky toxický účinek vůči flebotomům a působí téměř úplnou inhibici jejich proteázové aktivity. Heparin významně snížil trypsinovou aktivitu 12 a 72h po sání, nevykazuje však žádný účinek na defekaci, mortalitu ani ovipozici flebotomů.

Velmi zajímavé výsledky přineslo studium role peritrofické matrix v trávení krve a vývoji infekce (Pimenta a kol., 1997). Ukázalo se, že peritrofická matrix je sice částečnou bariérou v rozvoji infekce, ale zároveň zřejmě umožňuje přežití parazitů v časných fázích trávení. Je-li do krve s amastigoty *L. major* přidána chitináza, která zabrání tvorbě peritrofické matrix, dochází po 4h k 90% snížení infekce a do 12h je infekce zlikvidována téměř úplně. Při současném podání parazitů, chitinázy a inhibitoru trypsinu dochází ke značně menšímu časnému poklesu infekce. Přestože 4h po sání je trypsinová aktivita za normálních podmínek relativně nízká, postačuje zřejmě k potlačení infekce. K redukci infekce asi na 50% množství živých amastigotů během prvních 4h po sání dochází i při normálním průběhu infekce, dále však k poklesu nedochází a do 24h se parazité začínají

pomnožovat. Nepřítomnost peritrofické matrix tedy stupňuje účinek nepříznivých podmínek, které i za normálních okolností ve střevě existují. Podle této práce jsou amastigoti, stejně jako plně vyvinutí promastigoti po 18h vývoje, k těmto podmínkám relativně rezistentní. Citliví jsou parazité v časném stádiu (2-8h) transformace. Toto tvrzení je v souladu i s výsledky Dillon a Lane (1993b), kteří pozorovali růst plně diferenciovaných promastigotů v kultuře i za přítomnosti trypsinu.

Podle Pimenty a kol. (1997) peritrofická matrix omezuje vystavení parazitů hydrolytickým enzymům v časně fázi, než diferencují ve formy k proteázám rezistentní. Zdá se, že peritrofická matrix je jednak sama částečnou bariérou v pronikání enzymů a zároveň obaluje denzní hmotu přijatých erytrocytů, které zpomalují difuzi enzymů uvnitř prostoru vymezeného peritrofickou membránou. Je třeba podotknout, že v tomto případě, narozdíl od předchozích studií (Schlein a Romano, 1986; Borovsky a Schlein, 1987; Dillon a Lane, 1993b), nebyla prokázána signifikantní inhibice ani zpoždění proteázové aktivity během infekce *P. papatasi* amastigoty *L. major*.

U leishmanií bylo navrženo několik mechanismů, kterými se buňky parazita účinkům proteolytických enzymů vektora brání a jakým způsobem modifikují aktivitu či množství sekretovaných proteáz. Výzkum je zaměřen především na povrchové a sekretované glykokonjugáty leishmanií. Sacks a kol. (2000) studovali roli fosfoglykanů obsahujících opakující se fosfodisacharidovou jednotku -6Gal(β1,4)Man(α1)-PO₄, které jsou hlavními povrchovými a sekretovanými molekulami leishmanií. Použili mutantní linii deficitní v proteinu, který zajišťuje přidání galaktofuranózy do glykanového jádra lipofosfoglykanu (LPG) a je tudíž nutný pro syntézu LPG (linie *lpg1-*). Druhá použitá linie byla deficitní v genu kódujícím GDP-manosový transporter v Golgiho aparátu nutný pro syntézu všech fosfoglykanů (linie *lpg2-*). Zjistili, že přítomnost LPG, který je nejhojnější molekulou na povrchu promastigotů leishmanií, nemá zásadní význam pro přežití leishmanií ve střevě vektora v časně fázi infekce (před defekací). Naopak, fosfoglykany obecně jsou nutné pro obranu před proteolytickými enzymy ve střevě v této fázi vývoje: linie *lpg2-* nepřežívala trávení krve.

Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním Schleina a kol. (1990), že přidání glykokonjugátů sekretovaných promastigoty v kultuře podpoří přežívání parazitů ve střevě brzy po sání. Leishmanie sekretují fosfoglykany do střeva flebotomů ve velkém množství (Davies a kol., 1990) a tyto negativně nabitě molekuly by mohly být bariérou proti průniku trávicích enzymů k povrchu buňky parazita. Takovými molekulami jsou například proteophosphoglykany (PPG) strukturou podobné savčím mucinům. Dalším možným

účinkem proteofosfoglykanů s enzymatickou aktivitou, například sekretované kyselé fosfatázy (sAP) je inhibice trávicích enzymů flebotoma jejich defosforylací. Mezi strukturami fosfoglykanů jednotlivých druhů leishmanií jsou značné rozdíly. Tento polymorfismus může hrát roli ve schopnosti těchto molekul inhibovat trávicí enzymy nebo chránit povrch parazita před účinkem proteáz. (Sacks 2000 a 2001, Sacks a Kamhawi, 2001)

Na povrchu leishmanií jsou hojné také další molekuly s glykofosfatidyl- inositolovou kotvou se strukturou glykanového jádra odlišnou od LPG. Zejména se jedná o glykofosfatidylinositolové lipidy (GIPLs) a GPI-ukotvené proteiny (např. metalloproteináza gp63). Byla vyslovena domněnka, že funkcí gp63 ve vektorovi by mohla být degradace proteinů ve střevě (Schlein, 1993). Hajmová a kol. (2004) potvrzují špatné přežívání mutantů *Leishmania amazonensis* s down-regulovanou expresí gp63 ve střevě *L. longipalpis* 2 dny po sání a navrhuje, že jejím možným účinkem je degradace trávicích enzymů vektoru. Naopak, Joshi a kol. (1998, 2002) nepozorovali rozdíl ve vývoji *L. major* s deletovanými geny pro gp63 a přirozené linie ve střevě *P. papatasi*. Role gp63 při vývoji leishmanií v přenašeči tedy není doposud objasněna, je možné, že se liší mezi různými kombinacemi parazit-vektor.

Role leishmaniových inhibitorů proteáz (viz výše) při vývoji parazita ve střevě přenašeče dosud nebyla studována. Jedním z cílů předkládané práce je ověřit, zda tyto molekuly mohou být významné při vývoji infekce ve střevě flebotoma.

3 Materiál a metodika

3.1 Složení použitých roztoků

Trisový pufr

20mM Tris (Sigma)
150 mM NaCl
dotitrovat pomocí HCl na pH 7,8 (není-li uvedeno jinak)

Fyziologický roztok

150mM NaCl

Glycinový pufr – pH 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10 a 10,5

0,05 M Glycin
dotitrovat pomocí NaOH na požadované pH

Citrát-fosfátový pufr

zásobní roztoky:
0,1 M kyselina citronová (roztok A)
0,2 M Na₂HPO₄ (roztok B)
pro dosažení požadovaného pH se míchá:

	ml roztoku A	ml roztoku B
3	39,8	10,2
4	30,7	19,3
5	24,3	25,7
5,5	21,6	28,4
6	17,9	32,1
6,5	14,5	35,5
7	6,5	43,6

a doplní se destilovanou vodou do 100 ml.

Fosfátový pufr

145 mM NaCl
2,5 mM NaH₂PO₄ · 2 H₂O
7,5 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O
dotitrovat pomocí HCl na pH 7,3

Octanový pufr

100mM octan sodný
dotitrovat na pH 5,0

LB médium

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g kvasnicový extrakt
doplnit destilovanou vodou do 1 l
dotitrovat pomocí NaOH na pH 7

LB agar

LB médium + 20 g agaru na 1 l

pufr pro purifikaci na Ni-agarosové koloně:

Lyzační pufr

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM imidazol
dotitrovat pomocí NaOH na pH 8

Promývací pufr

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
20 mM imidazol
dotitrovat pomocí NaOH na pH 8

Eluční pufr

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM imidazol
dotitrovat pomocí NaOH na pH 8

Dialyzační pufr

100 mM Tris-HCl pH 8
100 mM NaCl
2 mM EDTA
0,05 % Triton X-100

3.2 Chov flebotomů, jejich pitvy a příprava vzorků střeva

K pokusům byli používáni flebotomové z laboratorních kolonií. Kolonie flebotomů jsou chovány při teplotě 25 °C (není-li u konkrétního pokusu uvedeno jinak), vzdušné vlhkosti téměř 100% a světelných podmínkách 14/10 LD. Dospělí flebotomové jsou vypouštěni do nylonových sítí (asi 40x40x40 cm) napnutých na kovových konstrukcích a umístěných v igelitových pytlích s navlhčenou vatou k udržení dostatečné vlhkosti. Obě pohlaví sají roztok 50% sacharózy (krátce převařený v mikrovlnné troubě) nebo 50% med (tepelně upravený 30 min při 56°C). Tímto roztokem je napuštěn kousek vaty, který je umístěn na Petriho misce v síti. Samice sají jednou až dvakrát týdně krev na anestezované myši. Použitým narkotikem je směs Narkamonu (5 % ketamin, Spofa), Rometaru (2 % xylazin, Spofa) a sterilního fyziologického roztoku (Hoechst-Biotika). Výsledná koncentrace je 15 mg xylazinu a 150 mg ketaminu na 1 kg váhy zvířete. Nasáté samice jsou den po sání krve odděleny do menších sítěk (asi 20×20×20 cm). Po defekaci, tj. 5.-7. den po sání, jsou umístěny do kelímků s navlhčenou sádrkou. Samice se vykladou během dalších 2-5 dnů. Kelímky s vajíčky, larvami a kuklami jsou umístěny v dózách, jejichž dno je pokryto sterilizovaným pískem navlhčeným destilovanou vodou. Larvy jsou krmeny jemně mletou směsí králíčího trusu a pelet (v poměru 1:1), fermentovanou 3-4 týdny za 100% vlhkosti a teploty 25 °C. Vylíhlí dospělci jsou třikrát týdně vypouštěni do nylonových sítí. Celkový životní cyklus flebotomů trvá v laboratorních podmínkách 5-8 týdnů. V pokusech byly použity kolonie druhů *Phlebotomus papatasi*, pocházející z Turecka, *Phlebotomus duboscqi* ze Senegalu a *Lutzomyia longipalpis* původem z Brazílie.

Pro pitvu střeva samic flebotomů byly použity pitvací drátky (minucie vsazená do dřevěné špejle) a binokulární lupa. Samice znehybněná chladem byla přenesena na podložní sklo pod binokulární lupou do kapky fyziologického roztoku nebo trisového pufru. Po oddělení hlavy bylo vytaženo střevo za poslední zadečkové články a odstraněny malpighické trubice. Dále byla střevo buď shromažďována pro přípravu vzorků v trisovém pufru v malých (500 µl) mikrozkušných a skladována v -70 °C nebo přímo prohlížena pod mikroskopem pro stanovení intenzity infekcí. Po sání byly pitvány pouze plně nasáté samice.

Pro přípravu vzorků byla napitvaná střevo homogenizována v trisovém pufru ručním minimixérem a poté centrifugována 5 minut rychlostí 10 000 otáček/min při teplotě 4°C. Použitým vzorkem byl výsledný supernatant.

3.3 Stanovení proteinové koncentrace

Koncentrace proteinů byla měřena metodou dle Bradfordové (Bradford, 1976). K tomuto účelu byly použity nesterilní mikrotitrační destičky typu P (Gama). Kalibrační křivka byla sestavena podle standardů bovinního sérumalbuminu (BSA, Sigma) o známých koncentracích (50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 µg/ml). Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 20 µl pufru. Do první jamky bylo navíc dodáno 20 µl vzorku (ředěného ve stejném pufru), který byl poté rozlitrován dvojkovou řadou. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 µl Bradfordova činidla (BioRad) 5x ředěného destilovanou vodou a přefiltrovaného přes filtrační papír. Absorbance byla měřena za pokojové teploty při vlnové délce 590 nm na spektrofotometru (Labsystems Multiskan RC) a to do 20 min po přidání činidla.

3.4 Leishmanie, jejich kultivace a infekční sání flebotomů přes membránu

K pokusům byl použit druh *Leishmania major* kmen Friedlin (MHOM/JL/80/Friedlin) a od něj odvozené linie mutantní v genech pro ISPs.

Použité linie:

Leishmania major wild type - MHOM/JL/80/Friedlin - (WT)

L. major 4618 ISP 2a3 knock-out klon A (kloA)

L. major 4854 ISP 2a3 knock-out klon C (kloC)

L. major 5033 ISP 2a3 reexpressor na pozadí kloA (kAR)

L. major ISP1 knock-out na pozadí kloC (6893)

L. major ISP1 reexpressor na pozadí linie 6893 (7018)

Všechny použité linie byly získány G. Coombse, University of Glasgow.

Linie kloA a kloC mají knock-outované geny pro ISP 2 a 3 (double KO). Obě alely těchto genů, umístěných v genomu *L. major* v tandemu, byly nahrazeny homologní rekombinací geny pro rezistenci k selekčním antibiotikům. Tyto linie tedy neexprimují ISP2 ani ISP3.

Linie kAR, vytvořená z linie kloA, reexprimuje ISP2 a ISP3 z plasmidové DNA. Tato linie byla kultivována v médiu se selekčním antibiotikem geneticinem (G418) (MP Biomedicals) v koncentraci 25 µg/ml.

Linie 6893, vytvořená z linie kloC, má knock-outované geny pro ISP1, 2 i 3 (triple KO), neexprimuje tedy žádný ISP.

Linie 7018, vytvořená z linie 6893, reexprimuje ISP1. Gen pro tento inhibitor má re-integrovaný do genomové DNA. Tato linie exprimuje pouze ISP1.

Leishmanie byly kultivovány v plochých kultivačních zkumavkách v tekutém mediu RPMI 1640 s Hapes (Sigma) s 10% fetálním bovinním sérem (Gibco) + antibiotikum gentamicin o koncentraci 40-100 µg/ml (Lek) v teplotě 23°C. Linie byly skladovány v kryobance.

Samice *P. papatasi* 5-7 dní staré byly infikovány sáním defibrinované sterilní králičí krve (Bioveta) smíchané s promastigoty leishmanií. Samice flebotomů sály přes kuřecí kůžičku (z 1-3 dny starých kuřat) nataženou na sterilním skleněném krmítku. Čtyřdenní kultura *L. major* (exponenciální fáze růstu) byla promyta v médiu RPMI 1640, spočítána koncentrace leishmanií a naředěna na koncentraci 1×10^7 . Kůžičky z kuřat zbavené peří a tuku byly 2x po 10 minutách propláchnuty v etanolu a 2x po 10 minutách ve sterilním fyziologickém roztoku. Na sterilní krmítko byly nataženy tak, aby flebotomové sáli na vnější straně kůžičky. Krmítko bylo naplněno třemi mililitry inaktivované krve, smíchané s leishmaniemi v poměru 10:1 (výsledná koncentrace leishmanií v krvi byla 1×10^6). Králičí krev byla nejprve inaktivována (inaktivace komplementu) v 56 °C 35-40 minut. Na krmítko byla na 2 hodiny připevněna síťka se samicemi flebotomů. Během sání bylo krmítko temperováno vodní lázní s vnější cirkulací na 37 °C.

Klícky s flebotomy byly poté ponechány ve 28 °C a následující den byly nasáté samice vytříděny od nenasátých. Nasáté samice *P. papatasi* byly pitvány 2., 4. a 7. den po infekčním sání. Při pitvě 2. den (48h) po sání měly samice ve střevě ještě natrávenou krev, 4. den již byly po defekaci. Střevo bylo vypitváno a prohlíženo pod mikroskopem při zvětšení 16x10. Podle množství parazitů byla infekce určována jako slabá (1-100 promastigotů), střední (100-1000 promastigotů) nebo silná (více než 1000 promastigotů). Tato metoda určování síly infekce je v naší laboratoři dobře zavedena (Čiháková a Volf, 1997).

3.5 Exprese a purifikace rekombinantních proteinů ISP2 a ICP

Použité chemikálie:

ampicilin (AppliChem) – používaná koncentrace 100 µg/ml

kanamycin (MP biochemicals) - používaná koncentrace 25 µg/ml

IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid) (Sigma) - používaná koncentrace 1mM

Ni-NTA agarosa (QIAGEN)

Exprese

K expresi byly použity buňky *Escherichia coli* (viz níže) transformované expresními pET vektory se zaklonovaným ICP *L. mexicana* resp. ISP2 *L. major* genem získané od Prof. Coombse (University of Glasgow). *L. mexicana* ICP zaklonovaný ve vektoru pET-28a(+) (Novagen) byl exprimován v buňkách *E. coli* BL21/DE3. Vektor pET-28a(+) obsahuje gen pro rezistenci ke kanamycinu a 6x-His-Tag. *L. major* ISP2 (LmjF15.0510) (bez čtyř N-koncových aminokyselinových zbytků) zaklonovaný ve vektoru pET-15b (Novagen) byl exprimován v buňkách *E. coli* BL21/DE3 pLysS. Vektor pET-15b obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu a 6x-His-Tag. Dřívějšími pokusy bylo potvrzeno, že His-Tag ani chybějící 4 N-koncové aminokyseliny nemají vliv na aktivitu rekombinantního ICP resp. ISP2 (G. Coombs, ústní sdělení).

Transformované buňky *E. coli* byly vyočkovány ze zásobního roztoku (kultura + 15% glycerol, -80°C) na agarové LB plotny s příslušným antibiotikem a pěstovány při teplotě 37 °C. Vybrané kolonie byly pak dále kultivovány v tekutém LB médiu s příslušným antibiotikem při téže teplotě za třepání. Koncentrace buněk *E. coli* byla stanovena jako optická denzita v oblasti světla o vlnové délce 600 nm (spektrofotometr Labsystems Multiskan RC). Při optické denzitě kultury asi 0,6 byla indukována produkce rekombinantního proteinu přidáním IPTG v konečné koncentraci 1 mM a v případě exprese ISP2 přidán také další ampicillin (100 µg/ml). Kultura byla dále inkubována 4h při 37°C. Po této době byly buňky centrifugovány (5000 otáček/min, 20 min, 4°C), supernatant odstraněn a buňky zamrazeny v – 20°C.

Purifikace

Zamražené centrifugované buňky z 50 ml kultury byly resuspendovány ve 4 ml lyzačního pufru a poté sonikovány 3 min na 40% amplitudy (5s on/ 5s off) na ledu na přístroji VibraCell 72405 (Bioblock Scientific). Pak byly centrifugovány (4000 otáček/min, 4°C, 10min), supernatant byl přefiltrován přes filtry o průměru 0,22 µm. Asi

100 µl supernatantu bylo odebráno na elektroforetickou analýzu (viz níže, vzorek 1). Připravená Ni-NTA agarosová kolona (2ml Ni-NTA agarosy nalité do 5ml stříkačky s vatou na dně) byla promyta lyzačním pufrem a poté přelita přefiltrovaným supernatantem (z toho asi 100 µl roztoku, který prošel kolonou bylo použito na elektroforetickou analýzu, vzorek 2). Kolona byla promyta 30 ml lyzačního pufru. Navázaný protein byl vymyt elučním pufrem (6x po 1ml) a frakce prošlé kolonou sbírány. Po analýze na SDS-PAGE elektroforéze (viz níže) byly frakce obsahující purifikovaný rekombinantní protein smíchány a dialyzovány (přes noc, 4°C, dialyzační membrána Pierce 3,5 kDa) proti dialyzačnímu pufru a zamraženy do -70°C.

3.6 Fluorometrické měření proteázové aktivity ve střevě flebotomů

Proteázová aktivita vzorků střeva flebotomů byla měřena na přístroji FluoroMax-3 a MicroMax 384 (Horiba Jobin Yvon) s použitím syntetických substrátů. Peptidické substráty jsou na C-konci značeny 7-amino-4-methylcoumarinem (AMC) a na N-konci blokovány proti štěpení aminopeptidázami. AMC byl excitován zářením o vlnové délce 355 nm a měřeno emitované záření o vlnové délce 460 nm. AMC je excitován pouze ve volné formě tedy po odštěpení od peptidického řetězce.

Použité substráty (Bachem):

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (dále v textu jako Suc-AAPF-AMC) substrát pro chymotrypsin.

Boc-Val-Leu-Lys-AMC (dále v textu jako Boc-VLK-AMC) substrát pro plasmin, acrosin, calpain a papain.

Boc-Leu-Gly-Arg-AMC (dále v textu jako Boc-LGR-AMC) fluorogenní substrát pro soybean trypsin-like enzym, komponenty C3/C5 konvertáz, koagulační faktor Xa a macropain.

Z-Phe-Arg-AMC . HCl (dále v textu jako Z-FR-AMC) fluorogenní substrát pro katepsin B, katepsin L , papain, a soybean trypsin-like enzym.

Z-Arg-Arg-AMC (dále v textu jako Z-RR-AMC) substrát pro katepsin B.

Měření probíhalo v černých 96 jamkových kultivačních destičkách Nunclon delta (NUNC). Celkový objem v jedné jamce byl 200µl. Každý vzorek byl měřen ve dvou nebo třech jamkách. V grafech jsou uvedeny hodnoty průměru (\pm směrodatné odchylky).

Naměřené hodnoty jsou udávány v relativních fluorescenčních jednotkách za minutu (rfu/min). Protože se ve všech provedených pokusech jedná o porovnávání aktivit, nikoliv o jejich absolutní hodnotu, nebyla provedena kalibrace na množství AMC. Přístroj MicroMax 384 není možné jiným jednoduchým způsobem seřadit tak, aby si hodnoty naměřené při různých měřeních odpovídaly. Uvedená jednotka rfu má proto stálou hodnotu pouze u pokusů, jejichž výsledky jsou uváděny v rámci stejné kapitoly.

3.6.1 Stanovení pH optima proteázové aktivity ve střevě flebotomů

Proteázovou aktivitu homogenátů střeva *P. duboscqi* 48h po sání jsme testovali proti pěti syntetickým substrátům (viz 3.6) a stanovili pH optimum této aktivity. Flebotomové sáli na myši BALB/c a poté byli drženi ve 25 °C. Střeva deseti flebotomů byla smíchána do jednoho vzorku (10 střev do 100 µl trisového pufru). Aktivita proti jednotlivým substrátům byla měřena při čtrnácti hodnotách pH v rozmezí 3 – 10,5.

Použité pufrы:

Citrát-fosfátový pufr- pH 3; 4; 5; 5,5; 6; 6,5 a 7

Glycinový pufr – pH 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10 a 10,5

Do každé jamky byl napipetován vzorek střev (finální koncentrace v jamce jsou uvedeny ve výsledcích pokusu), DTT (dithiothreitol; finální koncentrace 2 mM) a substrát (finální koncentrace 20µM). Ihned po přidání substrátu bylo započato měření fluorescence uvolněného AMC v intervalech 1 min po dobu 30 min při pokojové teplotě.

3.6.2 Inhibice střevní proteázové aktivity

Proteázovou aktivitu homogenátů střeva *P. duboscqi* 48h po sání proti substrátům Suc-AAPF-AMC, Boc-VLK-AMC, Z-FR-AMC a Z-RR-AMC jsme inhibovali v pH optimu zjištěném v předchozím pokusu přidáním PMSF (phenylmethylsulfonyl fluorid). Byl použit Trisový pufr pH 8. Flebotomové sáli na myši BALB/c a poté byli drženi ve 25°C. Střeva deseti flebotomů byla smíchána do jednoho vzorku (10 střev do 100 µl trisového pufru). Do každé jamky byl napipetován homogenát střev (finální koncentrace 0,15 střeva/ml u substrátu Suc-AAPF-AMC a 3×10^{-3} střeva/ml u ostatních substrátů) nebo trypsin (Sigma; finální koncentrace 0,3 µg/ml), DTT (dithiothreitol; finální koncentrace 2mM) a PMSF (finální koncentrace 1 nebo 2 mM, specifikováno ve výsledcích). U negativní kontroly byl inhibitor nahrazen pufrem. Po deseti minutách inkubace při

pokožkové teplotě byl do jamky přidán substrát (finální koncentrace 20 μ M). Ihned po přidání substrátu bylo započato měření fluorescence uvolněného AMC v intervalech 1 min po dobu 10 min při pokojové teplotě.

3.6.3 Individuální variabilita střevní proteázové aktivity

Měřili jsme střevní proteázovou aktivitu u jedinců druhu *P. papatasi* ve čtyřech časech po sání, a to 12, 18, 24 a 30 hodin. Flebotomové sáli na myši BALB/c. V pokusu byly zahrnuty 2 skupiny flebotomů, které byly po sání umístěny v rozdílných teplotách - 23°C a 28°C. V každém intervalu po sání bylo vypitváno šest jedinců z každé skupiny (1 střevo do 50 μ l trisového pufru) a aktivita v každém střevě měřena samostatně. Byly použity dva syntetické substráty – Suc-AAPF-AMC a Boc-VLK-AMC. Do každé jamky byl napipetován vzorek střeva (finální koncentrace v jamce jsou uvedeny ve výsledcích pokusu) a substrát (finální koncentrace 20 μ M). Vzorky i substrát byly naředěné v Trisovém pufru pH 8 pro substrát Suc-AAPF-AMC a pH 8,5 pro substrát Boc-VLK-AMC. Ihned po přidání substrátu bylo započato měření fluorescence uvolněného AMC v intervalech 1 min po dobu 30 min při pokojové teplotě.

3.6.4 Dynamika střevní proteázové aktivity *P. papatasi* a *P. duboscqi*

Po zjištění vysoké individuální variability jsme experimenty popsané v předchozí kapitole modifikovali následujícím způsobem. Měřili jsme hladinu střevní proteázové aktivity *P. papatasi* a *P. duboscqi* před sáním a poté v sedmi intervalech po sání (12, 20, 28, 36, 48, 60, 72 hodin). Flebotomové sáli na myši BALB/c. V pokusu byly zahrnuty dvě skupiny flebotomů, které byly po sání umístěny v rozdílných teplotách - 23°C a 28°C. V každém intervalu po sání bylo vypitváno deset jedinců z každé skupiny. Střeva flebotomů ze stejné skupiny a ze stejného intervalu byla smíchána do jednoho vzorku (10 střev do 100 μ l trisového pufru). Byla měřena aktivita proti dvěma syntetickým substrátům – Suc-AAPF-AMC a Boc-VLK-AMC. Do každé jamky byl napipetován vzorek střev (finální koncentrace v jamce jsou uvedeny ve výsledcích pokusu) a substrát (finální koncentrace 20 μ M). Měření probíhalo v Trisovém pufru pH 8 pro substrát Suc-AAPF-AMC a pH 8,5 pro substrát Boc-VLK-AMC. Ihned po přidání substrátu bylo započato měření fluorescence uvolněného AMC v intervalech 1 min po dobu 30 min při pokojové teplotě.

3.6.5 Srovnání trypsinových aktivit v různých teplotách

Sledovali jsme závislost střevní proteázové aktivity jak na teplotě, ve které byli drženi flebotomové, tak na teplotě, při které byly vzorky inkubovány se substrátem. Měřili jsme hladinu střevní proteázové aktivity *P. duboscqi* 36h po sání a srovnávali aktivitu proteáz u dvou skupin flebotomů držných po sání v různých teplotách (23 a 28°C) a vzorků inkubovaných v různých teplotách (18, 23, 28 a 33°C). Flebotomové sáli na myši BALB/c, 36h po sání bylo vypitváno deset jedinců z každé skupiny a střeva flebotomů ze stejné skupiny byla smíchána do jednoho vzorku (10 střev do 100μl trisového pufru). Byla měřena aktivita proti substrátu Boc-VLK-AMC. Vzorek střev (finální koncentrace 0,075 střeva/ml) a substrát (finální koncentrace 20μM) naředěné v Trisovém pufru pH 8 byly inkubovány po dobu 10 min ve vodní lázni příslušné teploty. Poté byl ke vzorku přidán inhibitor proteáz Leupeptin (Sigma; finální koncentrace 100μM) a změřena fluorescence uvolněného AMC při pokojové teplotě. Od této hodnoty byla odečtena hodnota “blanku” (substrát + leupeptin).

3.6.6 Inhibiční účinky ISP2 na střevní proteázovou aktivitu

Testovali jsme, zda rekombinantní protein ISP2 *L. major* inhibuje proteázovou aktivitu homogenátů střeva *P. papatasi* a *L. longipalpis*. Flebotomové sáli na myši BALB/c a poté byli drženi ve 25 °C. Po 48h po sání bylo vypitváno 10 flebotomů (10 střev do 100μl trisového pufru) a byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku. Vzorek o zjištěné koncentraci 5 mg/ml *P. papatasi* a 3,2 mg/ml *L. longipalpis* byl naředěn v trisovém pufru pH 8 a inkubován se substrátem Boc-LGR-AMC po dobu 10 min při pokojové teplotě (finální koncentrace vzorku *P. papatasi* 0,3 μg/ml, *L. longipalpis* 0,2 μg/ml, koncentrace substrátu 20 μM). Ihned po přidání substrátu bylo započato měření fluorescence uvolněného AMC v intervalech 1 min po dobu 10 min. V pozitivní kontrole byl vzorek nahrazen bovinním trypsinem (Sigma, EC 3.4.21.4) (finální koncentrace 0,2 nM). Rekombinantní protein ISP2 byl přidán ke vzorku střeva resp. trypsinu 5 min před přidáním substrátu v koncentracích 2, 5, 10, 100 a 1000 nM. V negativní kontrole bylo ISP2 nahrazeno trisovým pufrem.

3.6.7 Inhibiční účinky ICP na střevní proteázovou aktivitu

Obdobným způsobem jsme testovali, zda rekombinantní protein ICP *L. mexicana* inhibuje proteázovou aktivitu homogenátů střeva *L. longipalpis* a *P. papatasi*. Vzorky střev (viz předchozí odstavec) byly naředěny v octanovém pufru (pH 5,0) nebo trisovém

pufri (pH 7,8) s 2mM EDTA a 1mM DTT a inkubován se substrátem Z-FR-AMC po dobu 10 min při pokojové teplotě (finální koncentrace vzorku *L. longipalpis* 5 ug/ml, *P. papatasi* 7,5 ug/ml; koncentrace substrátu 20 uM). Ihned po přidání substrátu bylo započato měření fluorescence uvolněného AMC v intervalech 1 min po dobu 10 min. V pozitivní kontrole byl vzorek nahrazen papainem (Sigma, EC 3.4.22.2) (finální koncentrace 0,2 nM). Rekombinantní protein ICP byl přidán ke vzorku střeva resp. papainu 5 min před přidáním substrátu v koncentracích 5, 50 a 500 nM. V negativní kontrole byl ICP nahrazen pufrem.

3.7 Elektroforéza

K testovaným vzorkům a standardům byl přidán neredukující pufr nebo redukující vzorkový pufr s 2-merkaptetanolem (Laemmli, 1970) v poměru 3:1 a vzorek s pufrem byl povařen 3 min ve vodní lázni. Byla použita SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (Laemmli, 1970). Jako aparatura byla použita vertikální elektroforéza Mini-Protean III (BioRad) a jako zdroj napětí PS 500 XT (Hoefler). Dělení proteinů probíhalo v 10%, 12% nebo 15 % homogenním gelu o tloušťce 0,75 mm za konstantního napětí 200 V. Poté byly rozdělené proteiny barveny Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bollag a Edelstein, 1991) nebo stříbrem (Ausubel, 1992). Molekulové hmotnosti separovaných proteinů byly odečítány podle standardů.

Pro testování proteolytické aktivity byly použity substrátové gely, tzn. polyakrylamidový gel (viz výše) s 0,1% želatinou. Jako standard byl použit bovinní trypsin (Sigma; 23,8 kDa). Vzorky byly smíchány s neredukujícím pufrem a nebyly povařeny. V průběhu elektroforetické separace (podmínky viz výše) byla aparatura chlazena vodou s ledovou tříští. Poté byl gel zbaven SDS inkubací 30min v 0,5% Tritonu ve fosfátovém pufri. Následně byl gel inkubován přes noc v uzavřené Petriho misce při téměř 100% vlhkosti při teplotě 37 °C a poté obarven Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bollag a Edelstein, 1991). Při inhibičních pokusech byly vzorky před elektroforetickou separací na substrátovém gelu 30min inkubovány při pokojové teplotě s inhibitorem. V kontrole byl inhibitor nahrazen pufrem. Použity byly inhibitory PMSF v koncentraci 1mM a E-64 v koncentraci 10 μM.

Proteolytická aktivita byla testována také kapáním vzorků na substrátový gel (10% polyakrylamidový gel bez SDS s 0,1 % želatinou). Následně byl gel inkubován přes noc v uzavřené Petriho misce při téměř 100% vlhkosti a teplotě 37 °C a poté obarven Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bollag a Edelstein, 1991).

3.8 Gelová filtrace

Homogenát střev *P. duboscqi* (200 střev) 48h po sání na myši byl centrifugován (1000 otáček/min) a supernatant přefiltrován přes filtry o průměru 0,22 μm (Amicon) při 8000 otáček/min 5 min a nanesen na kolonu (objem vzorku 300 μl). Separace probíhala na koloně BioPrep SE-1000/17 (objem~30 ml, BioRad) za izokratických podmínek v Trisovém pufru pH 7,8 (pufr odvzdušněný a přefiltrovaný) při průtoku 0,5 ml/min. Absorbance byla měřena při 280 nm. Jednotlivé frakce o objemu 0,5 ml byly jímány do mikroskopavek. Následně byly frakce testovány na proteolytickou aktivitu kapáním na substrátový gel a elektroforeticky separovány v substrátovém gelu (viz výše).

4 Výsledky

Výsledky předkládané práce zahrnují dva tematické okruhy. První část obsahuje částečnou charakterizaci střevních proteáz flebotomů. Informace získané touto částí práce nám umožnily optimalizovat provedení dalších pokusů, jejichž cílem bylo zkoumat možnou roli inhibitorů proteáz ICP a ISP leishmanií při vývoji ve vektorovi.

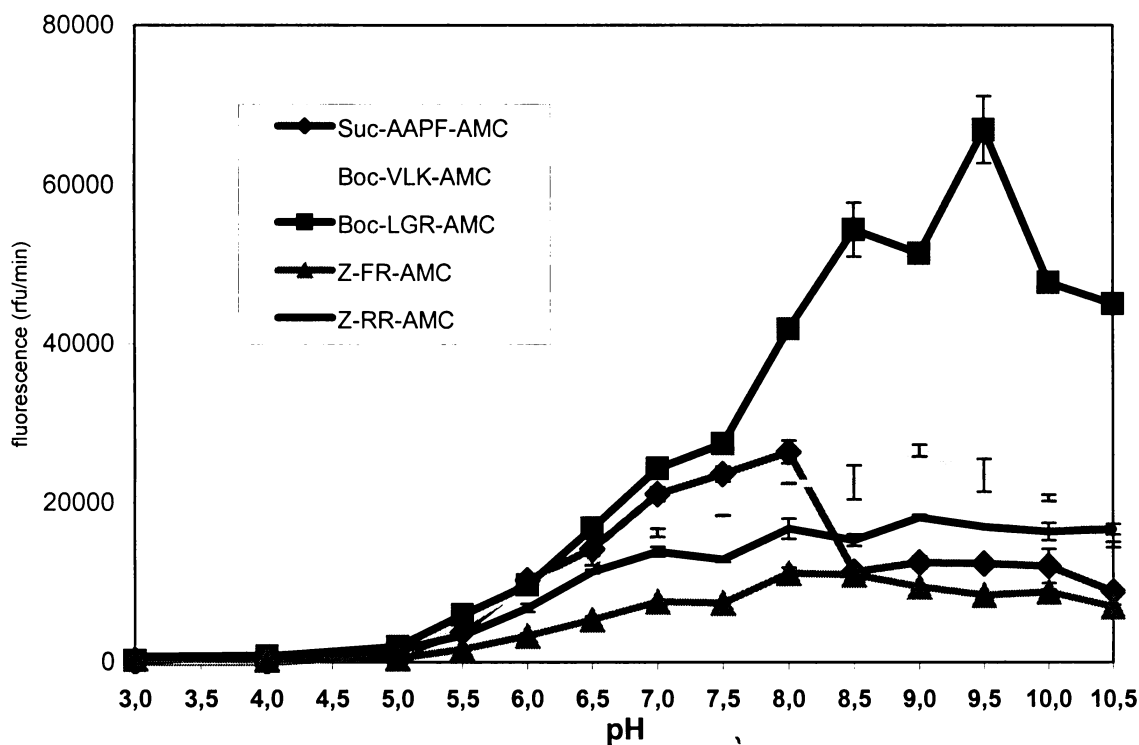
4.1 Stanovení pH optima proteázové aktivity ve střevě flebotomů

Testovali jsme aktivitu homogenátů střeva *P. duboscqi* 48h po sání proti pěti syntetickým substrátům a stanovili pH optimum této aktivity. Aktivita byla detekována proti všem testovaným substrátům. pH optimum se ve všech případech nacházelo v alkalické oblasti mezi hodnotami 8 a 9,5 stupně pH. Výsledky jsou znázorněny v grafu 4-1.

Graf 4-1: Střevní proteázová aktivita *P. duboscqi*: pH optimum

Koncentrace substrátů = 20 μ M; koncentrace vzorku při měření se substrátem Suc-AAPF-AMC = 1,5 střeva/ml; koncentrace vzorku při měření s ostatními substráty = 0,015 střeva/ml

pH optima proteázové aktivity ve střevě *P. duboscqi* 48h po sání



4.2 Inhibice střevní proteázové aktivity

Proteázovou aktivitu proti syntetickým substrátům detekovanou v předchozím pokusu jsme se pokusili zainhibovat při zjištěném optimálním pH. Aktivita proti substrátům Suc-AAPF-AMC, Boc-VLK-AMC, Z-FR-AMC a Z-RR-AMC byla plně inhibována přidáním PMSF (koncentrace je uvedena v tabulce). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4-1.

Tab. 4-1: Inhibice střevní proteázové aktivity *P. duboscqi* 48h po sání

SD = směrodatná odchylka

substrát	vzorek	průměr rfu/min	SD
Suc-AAPF-AMC	homogenát	10171	2757
	homogenát+ PMSF 1mM	0	
Boc-VLK-AMC	homogenát	18885	112
	homogenát + PMSF 1mM	1734	845
	homogenát + PMSF 2 mM	0	
Z-FR-AMC	homogenát	9385	908
	homogenát + PMSF 1mM	0	
Z-RR-AMC	homogenát	26559	2616
	homogenát + PMSF 1mM	0	
Z-FR-AMC	trypsin	14014	1232
	trypsin + PMSF 1mM	0	

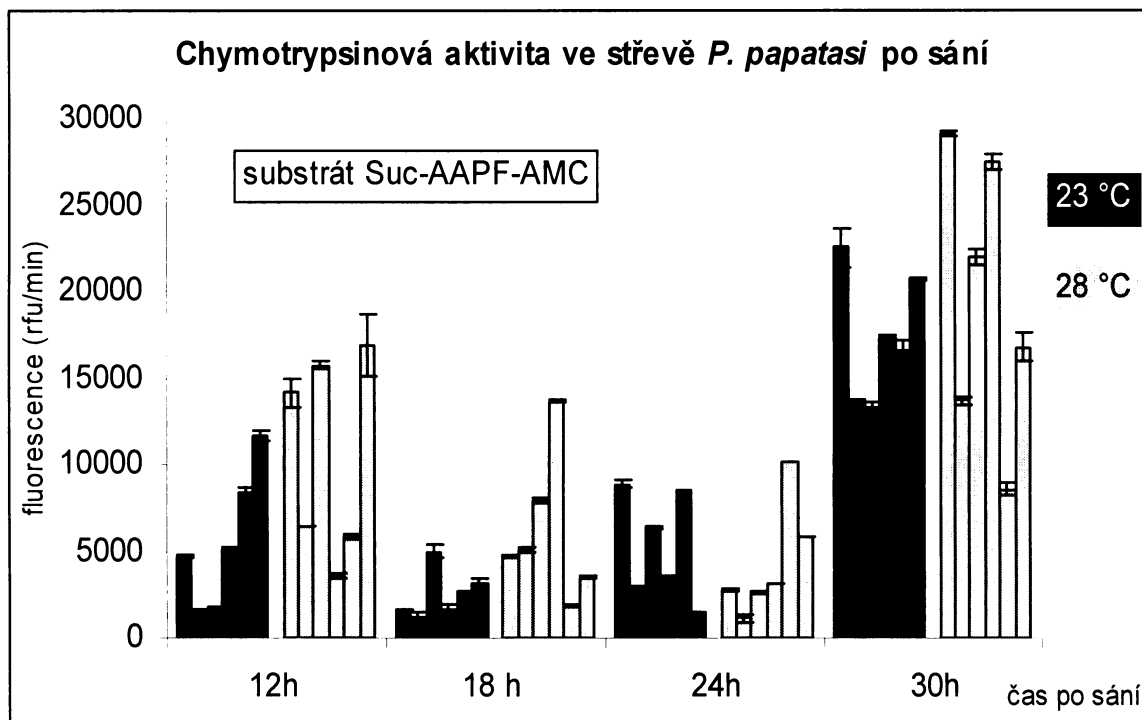
4.3 Individuální variabilita střevní proteázové aktivity

Měřili jsme střevní proteázovou aktivitu u jedinců druhu *P. papatasi* ve čtyřech časech po sání, a to 12, 18, 24 a 30 hodin. V pokusu byly zahrnuty 2 skupiny flebotomů, které byly po sání umístěny v rozdílných teplotách: 23°C a 28°C. Aktivita v každém střevě byla měřena samostatně. Výsledky jsou znázorněny v grafech 4-2 a 4-3.

Aktivita ve střevě jednotlivých jedinců se velmi výrazně liší. Například 30 hodin po sání u skupiny držené v 28 °C se hodnoty trypsinové aktivity lišily až o 80 procent. V dalších pokusech byly proto používány směsné vzorky z 10 střev.

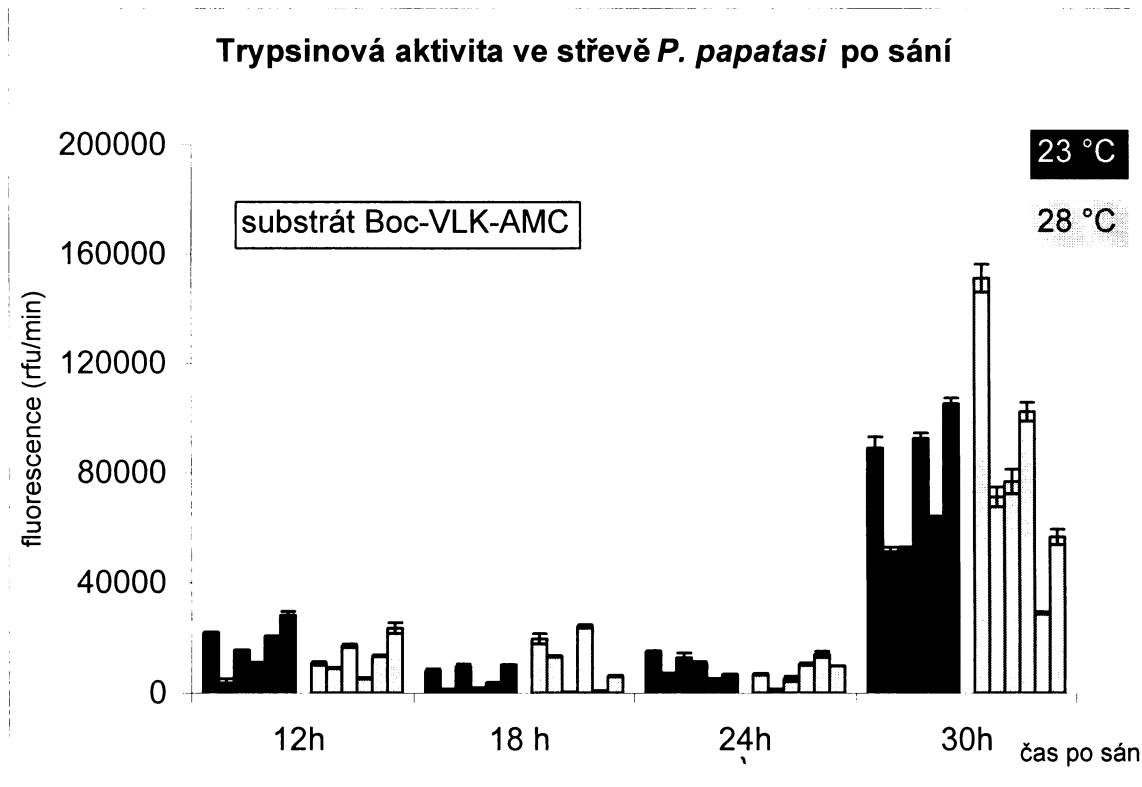
Graf 4-2: Chymotrypsinová aktivita *P. papatasi*: individuální variabilita

sloupce grafu představují aktivitu v jednotlivých střevech; koncentrace substrátu = 20µM, koncentrace vzorku střeva = 0,3 střeva/ml; 23°C a 28°C = teplota, ve které byli flebotomové umístěni po sání



Graf 4-3: Trypsinová aktivita *P. papatasi*: individuální variabilita

sloupce grafu představují aktivitu v jednotlivých střevech; koncentrace substrátu = 20µM, koncentrace vzorku střeva = 0,015 střeva/ml; 23°C a 28°C = teplota, ve které byli flebotomové umístěni po sání



4.4 Dynamika střevní proteázové aktivity *P. papatasi* a *P. duboscqi*

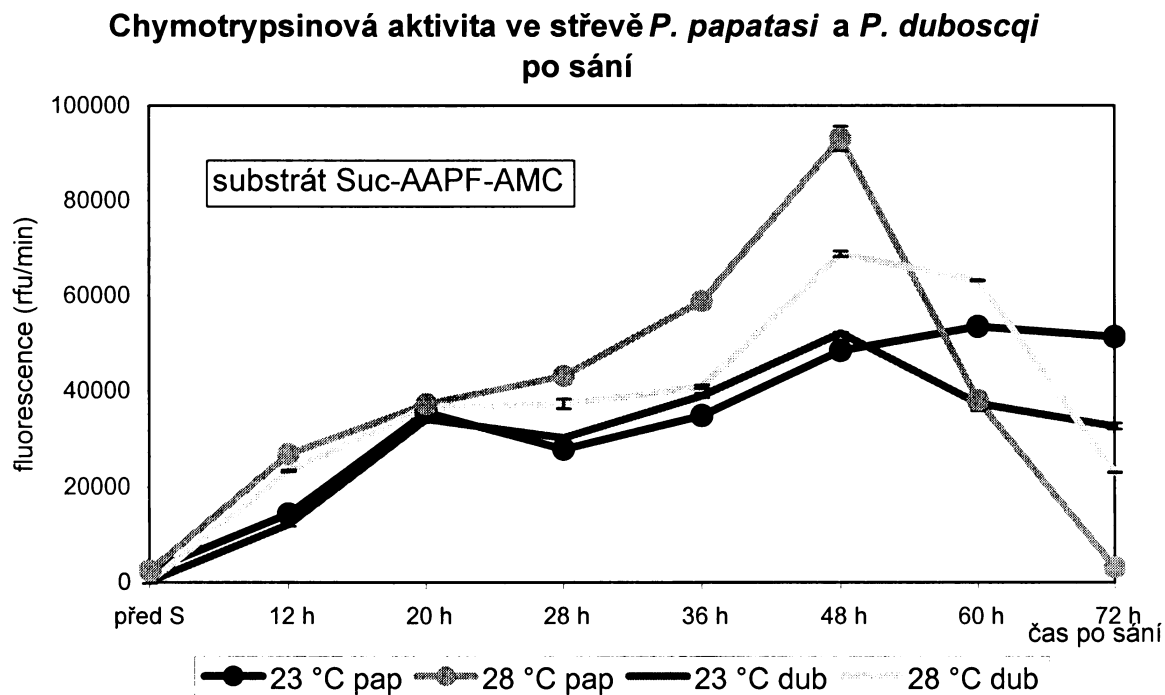
Měřili jsme hladinu střevní proteázové aktivity *P. papatasi* a *P. duboscqi* před sáním a poté v sedmi intervalech po sání (12, 20, 28, 36, 48, 60, 72 hodin). V pokusu byly zahrnuty dvě skupiny flebotomů, které byly po sání umístěny v rozdílných teplotách - 23°C a 28°C. Vzorky jsou směsí deseti střev flebotomů ze stejné skupiny a ze stejného intervalu. Výsledky jsou znázorněny v grafech 4-4 a 4-5.

Maximální aktivita trypsinových (substrát Boc-VLK-AMC) i chymotrypsinových (substrát Suc-AAPF-AMC) proteáz byla detekována 48h po sání. Jedinou výjimkou je maximum chymotrypsinové aktivity ve střevě *P. papatasi* ze skupiny 23°C naměřené až 60h po sání. U *P. papatasi* je maximální trypsinová i chymotrypsinová aktivita vyšší ve skupině chované ve 28°C než ve skupině chované ve 23°C. U *P. duboscqi* je maximální chymotrypsinová aktivita vyšší u skupiny chované ve 28°C, zatímco trypsinová aktivita je za obou teplot podobná.

Při teplotě 28°C jsme zaznamenali rychlejší pokles proteázové aktivity než za nižší teploty: 72 hodin po sání je aktivita za vyšší teploty téměř nebo úplně redukována. Při teplotě 23°C pozorujeme u obou druhů flebotomů dvojitý vrcholový průběh vylučování proteáz. První vrchol aktivity byl detekován 20h po sání; 28h po sání aktivita mírně klesá a poté maximální hodnoty nabývá 48h po sání. Detekovaná maximální trypsinová aktivita je několikanásobně větší než maximální chymotrypsinová aktivita; u *P. papatasi* asi 70x, u *P. duboscqi* asi 100x. V rychlosti a průběhu trávení nebyly mezi sledovanými dvěma druhy flebotomů zjištěny významné rozdíly.

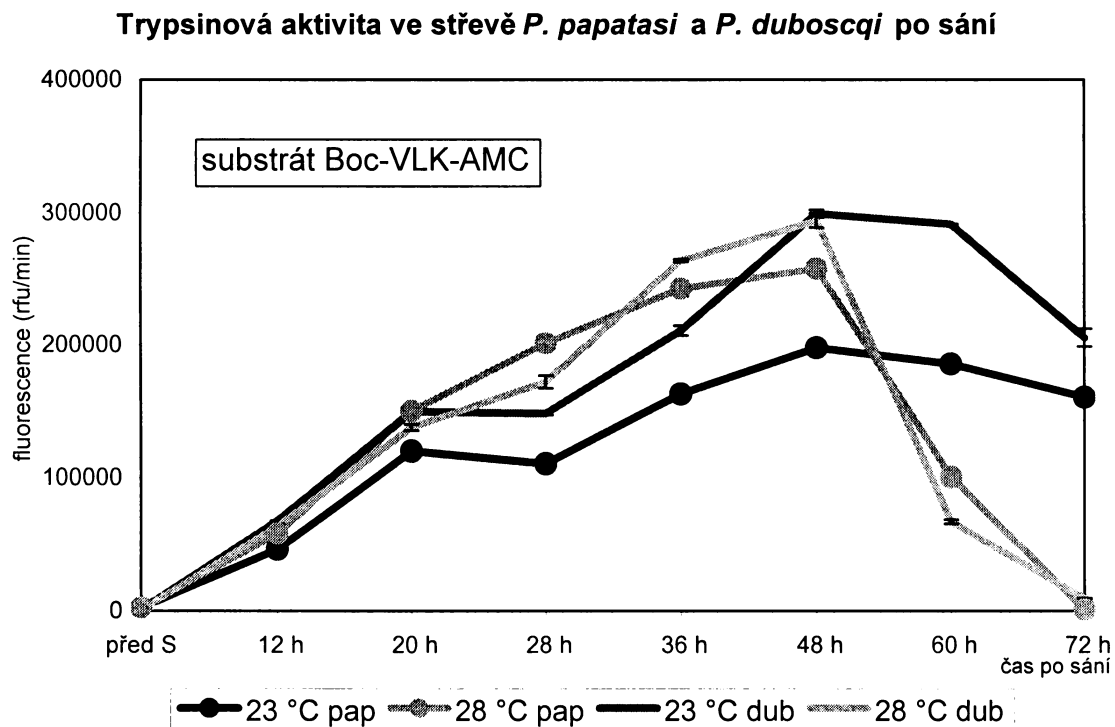
Graf 4-4: Střevní chymotrypsinová aktivita flebotomů chovaných za různé teploty

Před S = před sáním; dub = *P. duboscqi*, pap = *P. papatasi*; koncentrace substrátu = 20 μ M; koncentrace vzorku střeva = 0,3 střeva/ml



Graf 4-5: Střevní trypsinová aktivita flebotomů chovaných za různé teploty

Před S = před sáním; dub = *P. duboscqi*, pap = *P. papatasi*; koncentrace substrátu = 20 μ M; koncentrace vzorku střeva = 0,015 střeva/ml



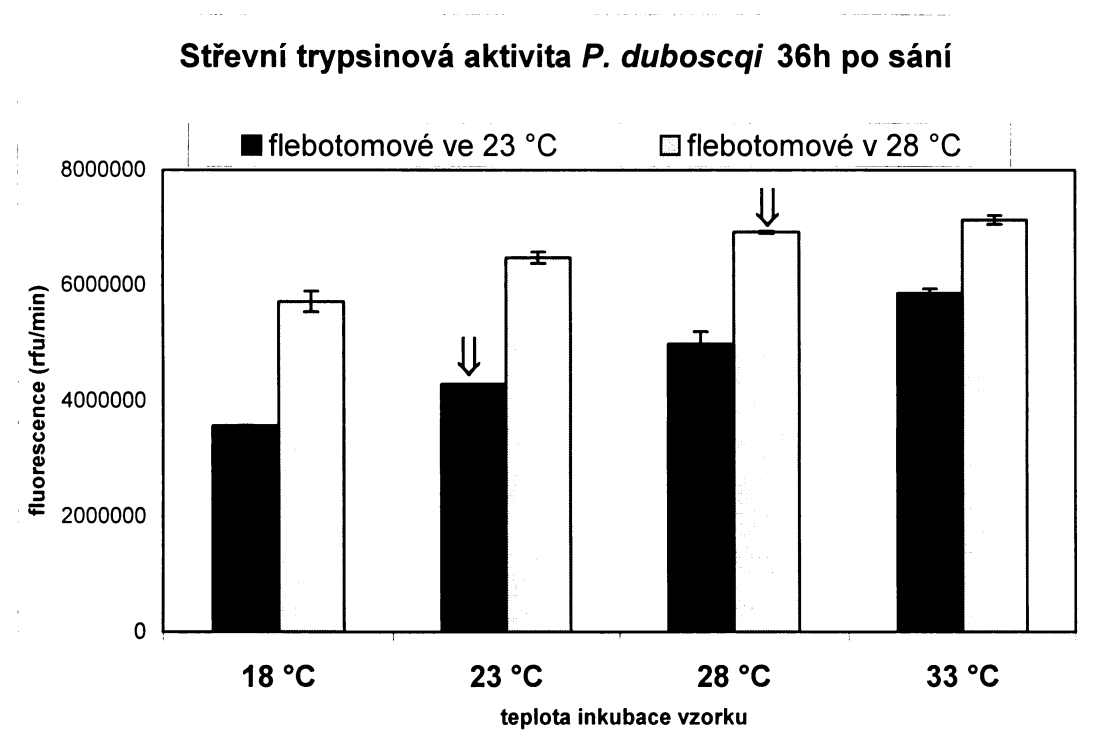
4.5 Srovnání trypsinových aktivit v různých teplotách

Hladinu střevní trypsinové aktivity *P. duboscqi* 36h po sání jsme srovnávali u dvou skupin flebotomů držených po sání v různých teplotách (23°C – skupina 1 a 28°C – skupina 2). Navíc byly vzorky inkubovány 10 min s fluorogenním substrátem (Boc-VLK-AMC) v různých teplotách (18, 23, 28 a 33°C), abychom se mohli více přiblížit podmínkám *in vivo*. Výsledky jsou znázorněny v grafu 4-6 a tabulce 4-2.

Zjistili jsme, že se stoupající teplotou inkubace se trypsinová aktivita zvyšuje. U skupiny 1 byla aktivita při inkubaci v 18°C pouze 61% ve srovnání s aktivitou ve 33°C. U skupiny 2 byl tento nárůst z 80% na 100%. Zároveň byla aktivita flebotomů ze skupiny 1 v každé z testovaných teplot vyšší. Srovnáme-li aktivitu ve střevě flebotomů skupiny 1 (flebotomové ve 23°C) inkubovaném ve 23°C a skupiny 2 (flebotomové ve 28°C) inkubovaném ve 28°C, tedy v podmínkách nejbližších dvěma možným situacím *in vivo*, najdeme rozdíl 38% (tedy skupina 1 má 62% aktivity skupiny 2). V grafu jsou tyto srovnávané aktivity označeny symbolem ↓↓.

Graf 4-6: Trypsinová aktivita *P. duboscqi* chovaných za různých teplot měřená za různých teplot.

Hodnoty srovnávané v textu jsou označeny symbolem ↓↓



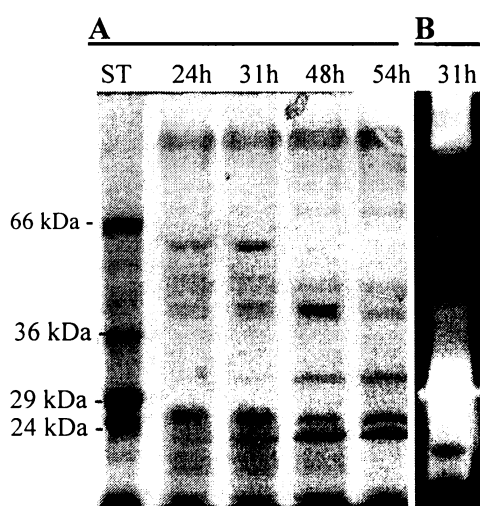
Tab. 4-2: Trypsinová aktivita *P. duboscqi* chovaných za různých teplot měřená za různých teplot.

vzorek	průměr rfu	% aktivity
blank	474241	
18°C, skupina 1	3572106	61
23°C, skupina 1	4287375	73
28°C, skupina 1	4977912	85
33°C, skupina 1	5857934	100
18°C, skupina 2	5714513	80
23°C, skupina 2	6474312	91
28°C, skupina 2	6924650	97
33°C, skupina 2	7135435	100

Pozn. Hodnoty rfu jsou u vzorků uváděny po odečtení hodnoty blanku.

4.6 Charakterizace a částečná purifikace střevních proteáz *P. duboscqi*

V 10% polyakrylamidovém gelu jsme rozdělili homogenáty střeva *P. duboscqi* 24, 31, 48, a 54h po sání na myši. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 4-1A. V substrátovém gelu (10% polyakrylamidový gel s 0,1% želatinou) jsme rozdělili homogenát střeva *P. duboscqi* 31h po sání na myši (viz Obrázek 4-1B). Proteázovou aktivitu ve střevě po sání vykazuje mnoho proteinů o různých molekulových hmotnostech.

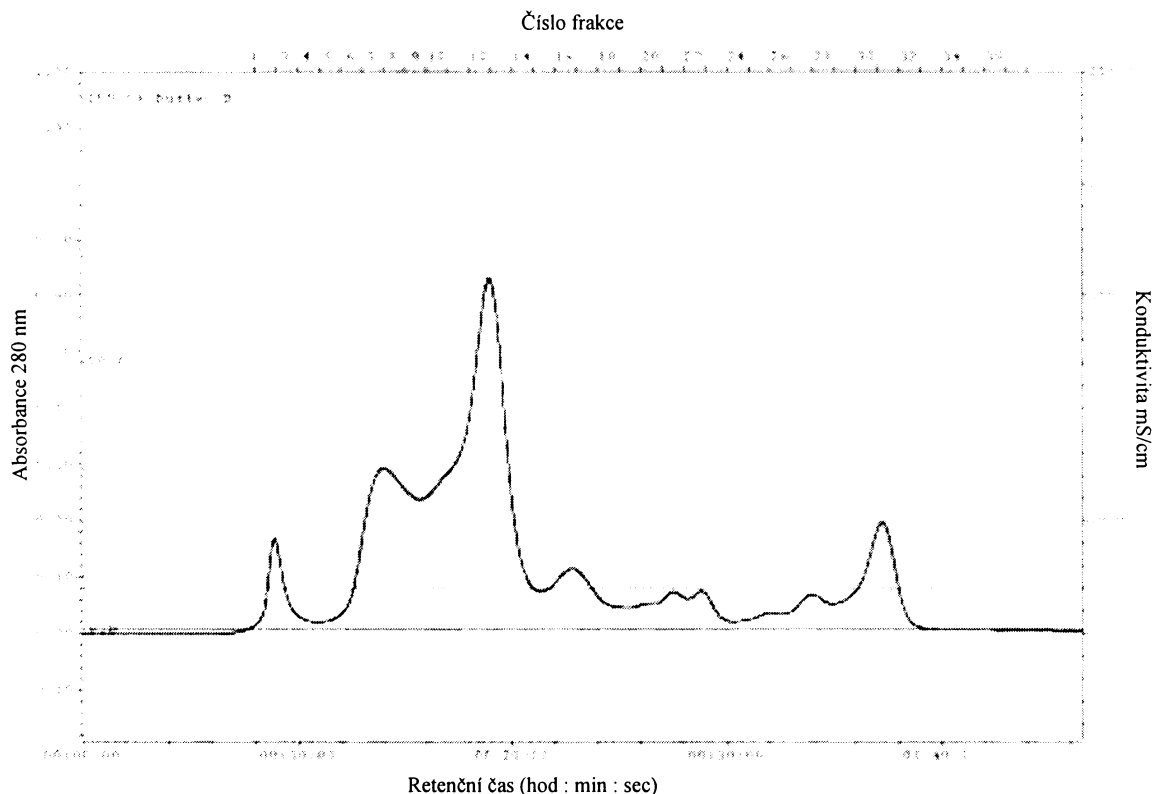


Obr. 4-1 Proteinový profil střeva *P. duboscqi* po sání a proteázová aktivita 31h po sání

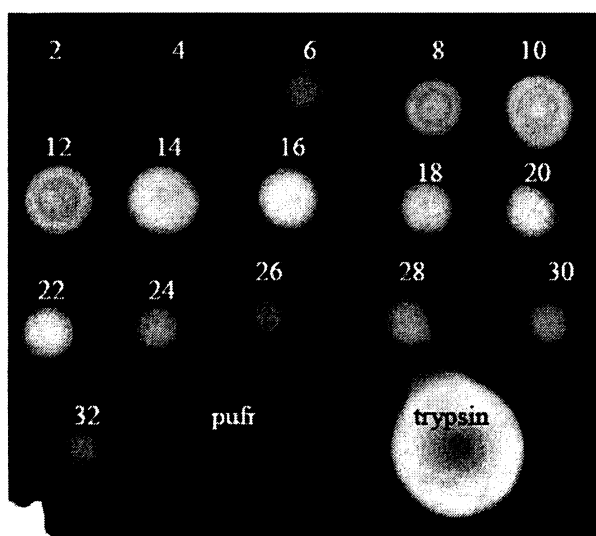
A: ST – standard Dalton Mark VII (Sigma); 24h, 31h – homogenát střeva po sání v množství ekvivalentním 1střevo/jamka; 48h, 54h – homogenát střeva po sání v množství ekvivalentním 2 střeva/jamka; vzorky byly smíchány s neredukujícím pufrem a nebyly povařeny.
B: homogenát střeva 31h po sání v množství ekvivalentním 0,5 střeva/jamka

Homogenát střeva *P. duboscqi* 48h po sání na myši byl rozdělen gelovou filtrací na koloně BioPrep. Eluční profil je znázorněn na obrázku 4-2.

Obr. 4-2 Eluční profil proteinů střeva *P. duboscqi* po rozdělení na koloně BioPrep.



Jednotlivé frakce pak byly testovány na proteolytickou aktivitu nakapáním na substrátový gel (10% polyakrylamidový gel bez SDS s 0,1 % želatinou) (obrázek 4-3). Ve všech testovaných frakcích byla detekována proteázová aktivita.

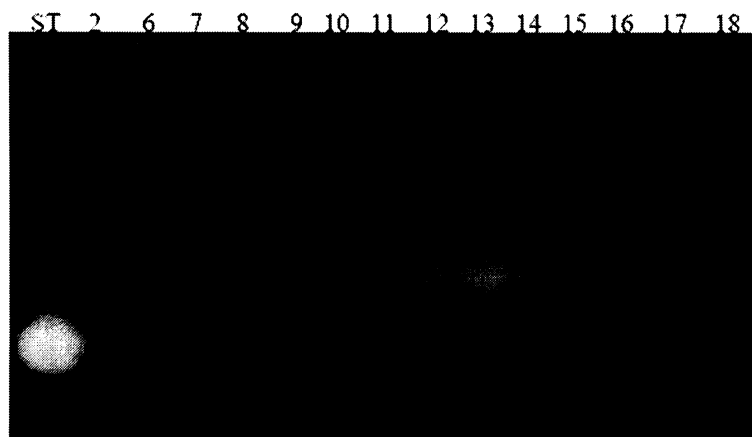


Obrázek 4-3 Proteázová aktivita frakcí z gelové filtrace

2 = frakce č. 2 atd. Objem vzorků nanesený na gel je 5 μ l; koncentrace trypsinu (Sigma) = 1 μ g/ml.

Frakce byly dále elektroforeticky analyzovány na 12% polyakrylamidovém gelu s želatinou. Z obrázku 4-4 je patrné, že frakce nejsou dobře rozděleny podle molekulové hmotnosti. Ve všech frakcích byla zjištěna proteázová aktivita několika proteinů o 3 až 4 různých molekulových hmotnostech. Ve frakcích 7 až 13 byla navíc patrna aktivita proteinu/ů o molekulové hmotnosti přibližně 90kDa. Ve frakcích 12-14 byla navíc zjištěna dobře patrná proteázová aktivita proteinu/ů o molekulové hmotnosti přibližně 28-30kDa.

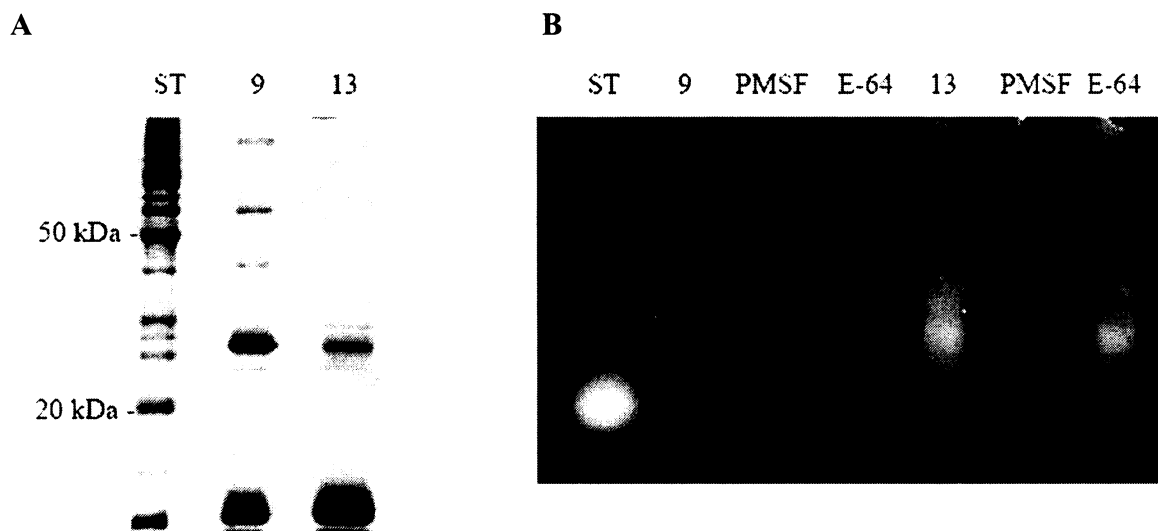
Obrázek 4-4 Frakce z gelové filtrace rozdělené elektroforézou v substrátovém gelu
ST = trypsin (Sigma; 23,8 kDa); 2 = frakce č. 2, objem 8 μ l/jamka atd.; profil frakcí 19 – 32 byl podobný jako frakce 18 (výsledky nezobrazeny).



Frakce 9 a 13 jsem se pokusila zainhibovat přidáním PMSF a E-64. Po rozdělení v 12% polyakrylamidovém gelu s želatinou bylo zjištěno, že detekovaná proteázová aktivita těchto frakcí byla významně inhibována přidáním PMSF. Nebyla pozorována výrazná inhibice přidáním E-64. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 4-5B. Na obrázku 4-5A je znázorněn celkový proteinový profil frakcí 9 a 13.

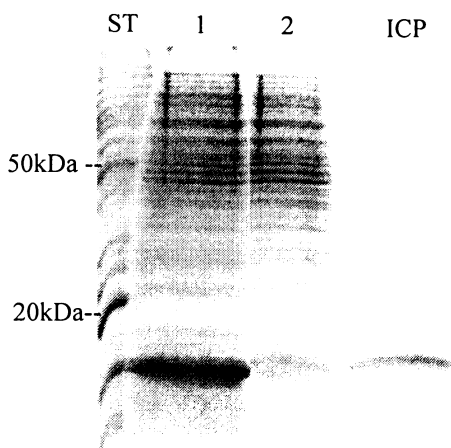
Obr. 4-5 Proteinový profil dvou frakcí z gelové filtrace a inhibice jejich proteázové aktivity

frakce nanoseny v objemu 8 µl/jamka; **A:** (12% polyakrylamidový gel barvený stříbrem), ST = standard (BenchMark Protein Ladder; Invitrogen); **B:** ST = trypsin (Sigma; 23,8 kDa); E-64 = daná frakce inkubovaná s E-64; PMSF = daná frakce inkubovaná s PMSF



4.7 Expres a purifikace ISP2 a ICP

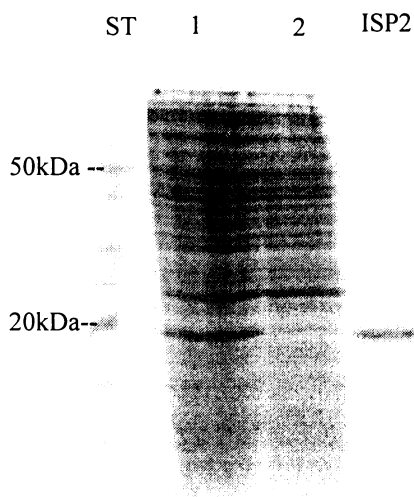
Protein ICP (6x-His-Taggovaný) exprimovaný v buňkách *E. coli* BL21/DE3 byl purifikován na Ni-agarosové koloně. Elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu bylo ověřeno, že protein ICP o váze 13,3 kDa byl exprimován a úspěšně purifikován.



Obr. 4-6 Purifikovaný ICP

ST = standard (BenchMark Protein Ladder; Invitrogen); 1 = supernatant z indukovaných buněk *E. coli* po sonikaci; 2 = proteiny, které se nenavázaly na kolonu; objem vzorků 13μl/jamka; vzorky byly smíchány s redukujícím pufrem.

Protein ISP2 (bez 4 koncových zbytků aminokyselin, 6x-His-Taggovaný) exprimovaný v buňkách *E. coli* BL21/DE3 pLysS byl purifikován na Ni-agarosové koloně. Elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu bylo ověřeno, že protein ISP2 o váze 19,7 kDa byl exprimován a úspěšně purifikován.



Obr. 4-7 Purifikovaný ISP2

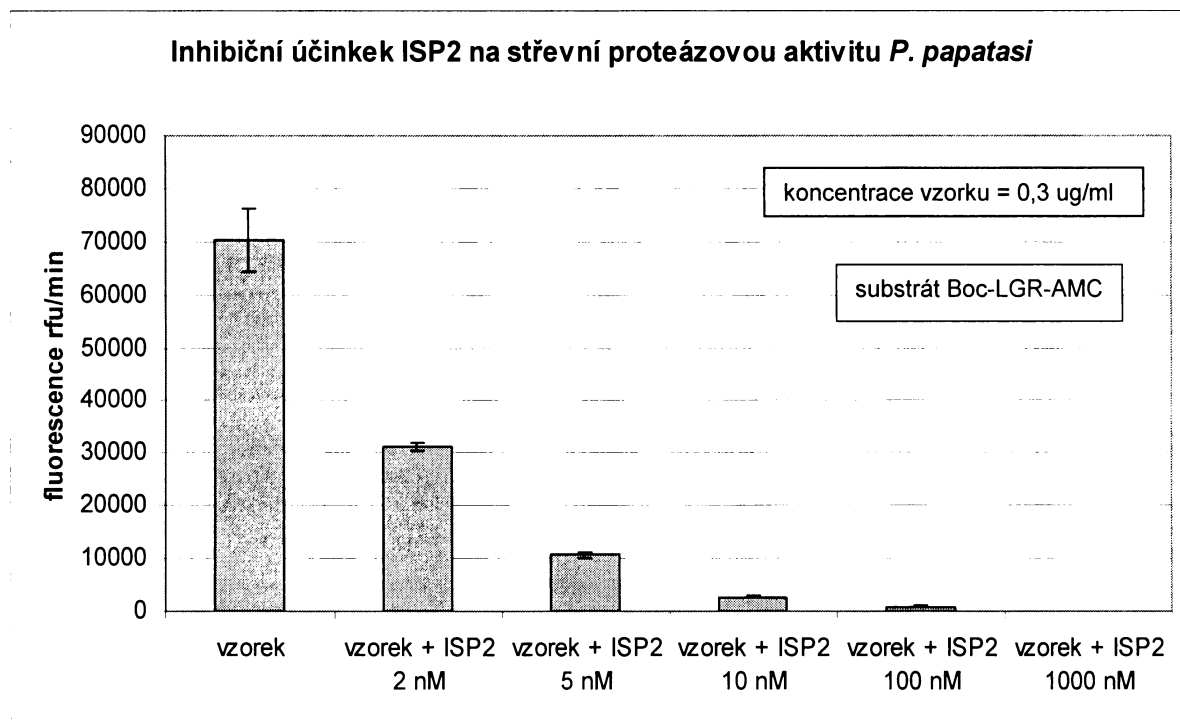
ST = standard (BenchMark Protein Ladder; Invitrogen); 1 = supernatant z indukovaných buněk *E. coli* po sonikaci; 2 = proteiny, které se nenavázaly na kolonu; objem vzorků 13μl/jamka; vzorky byly smíchány s redukujícím pufrem.

4.8 Inhibiční účinky ISP2 na střevní proteázovou aktivitu

Testovali jsme, zda rekombinantní protein ISP2 inhibuje proteázovou aktivitu homogenátů střeva flebotomů proti substrátu Boc-LGR-AMC. Zjistili jsme, že ISP2 signifikantně inhibuje proteázovou aktivitu homogenátů střeva *P. papatasi* i *L. longipalpis* sátých na myši. Aktivita *P. papatasi* proti substrátu Boc-LGR-AMC byla redukována 2nM ISP2 na 44% a 10nM ISP2 na 4%. Aktivita *L. longipalpis* byla redukována 2nM ISP2 na 18 % a 10nM ISP2 na 7%. Aktivita homogenátů střeva byla inhibována podobně jako srovnatelná aktivita bovinního trypsinu. Pokus byl opakován 2x s podobnými výsledky. Výsledky jsou shrnuty v grafech 4-7, 4-8 a 4-9 a tabulce 4-2.

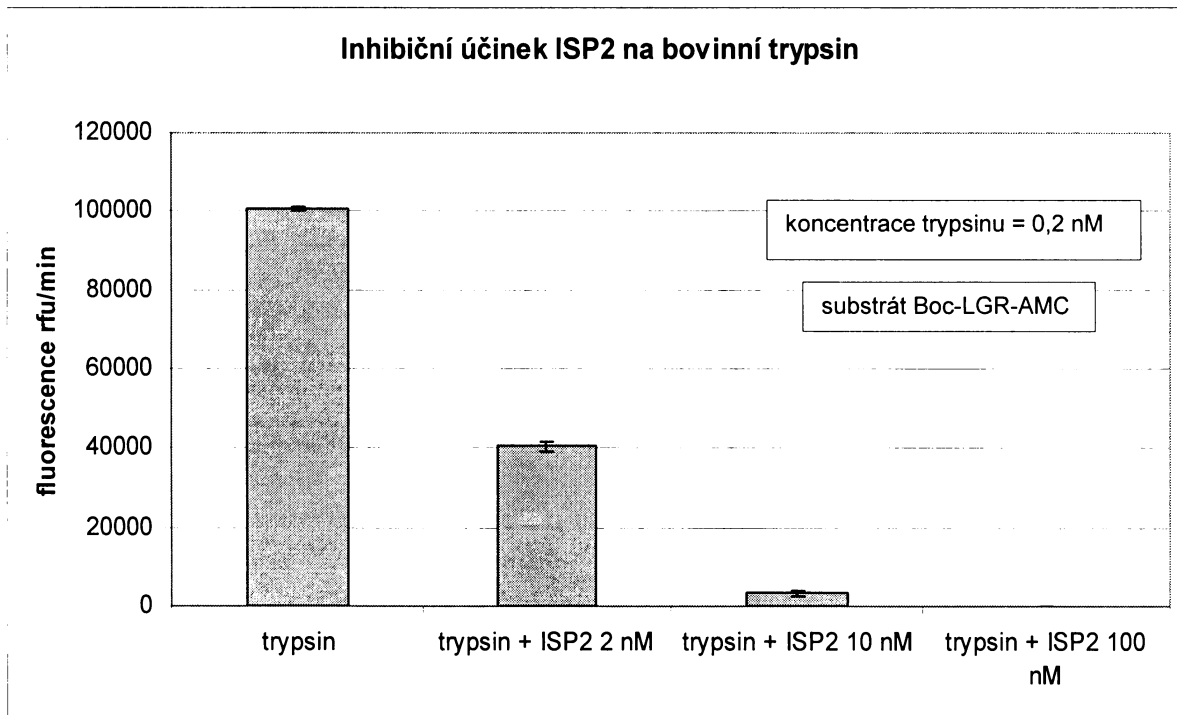
Graf 4-7 Inhibice střevní proteázové aktivity *P. papatasi* proteinem ISP2

Vzorek = homogenát střeva *P. papatasi* 48h po sání; koncentrace substrátu = 20 μ M



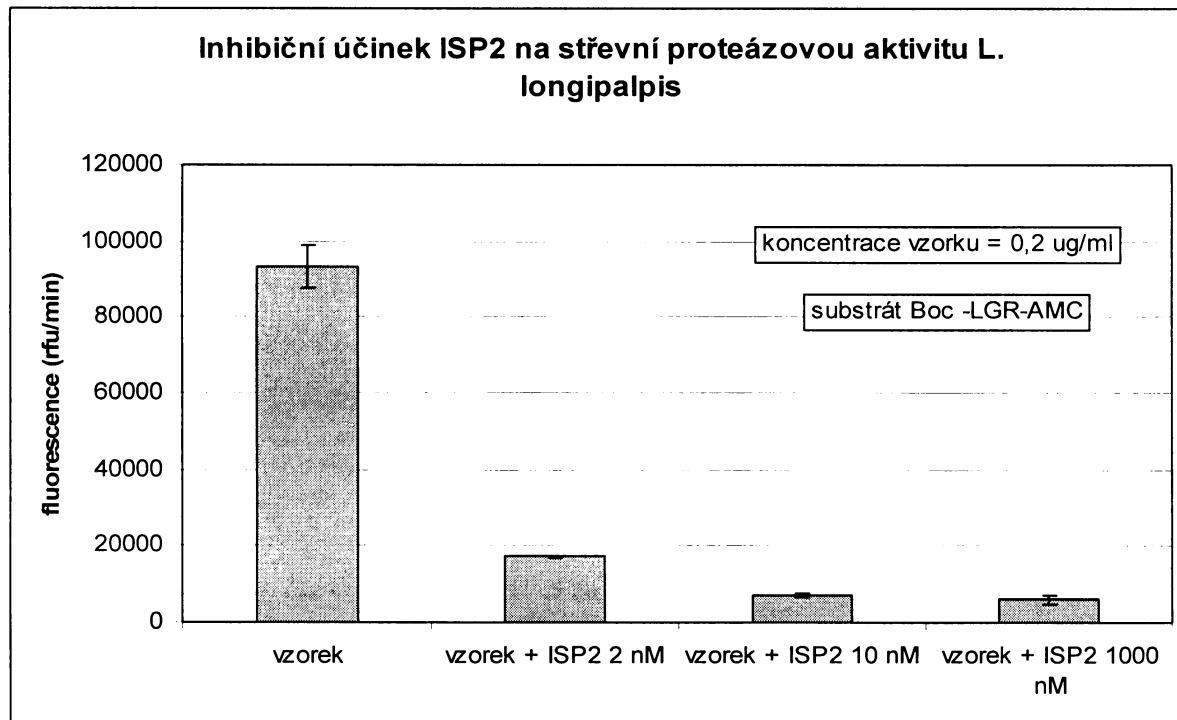
Graf 4-8 Inhibiční účinek ISP2 na bovinní trypsin

Vzorek = homogenát střeva *P. papatasi* 48h po sání; koncentrace substrátu = 20 μ M



Graf 4-9 Inhibice střevní proteázové aktivity *L. longipalpis* proteinem ISP2

Vzorek = homogenát střeva *L. longipalpis* 48h po sání; koncentrace substrátu = 20 μ M



Tab. 4-2 Inhibice proteázové aktivity inhibitorem ISP2

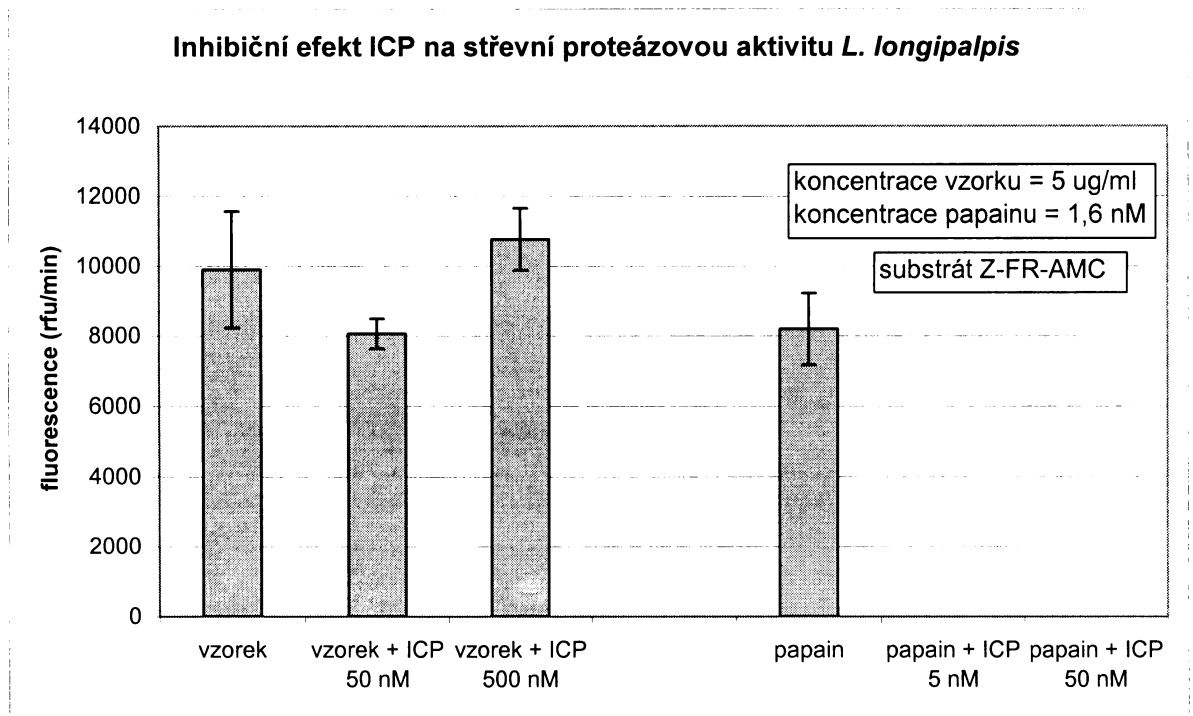
	průměr rfu/min	% aktivity
vzorek <i>P. pap</i>	70447	100
vzorek <i>P. pap</i> + ISP2 2 nM	31157	44
vzorek <i>P. pap</i> + ISP2 5 nM	10621	15
vzorek <i>P. pap</i> + ISP2 10 nM	2768	4
vzorek <i>P. pap</i> + ISP2 100 nM	824	1
vzorek <i>P. pap</i> + ISP2 1000 nM	0	0
trypsin	100695	100
trypsin + ISP2 2 nM	40494	40
trypsin + ISP2 10 nM	3224	3
trypsin + ISP2 100 nM	0	0
vzorek <i>L. lon</i>	93299	100
vzorek <i>L. lon</i> + ISP2 2 nM	17222	18
vzorek <i>L. lon</i> + ISP2 10 nM	6992	7
vzorek <i>L. lon</i> + ISP2 1000 nM	5865	6

4.9 Inhibiční účinky ICP na střevní proteázovou aktivitu

Testovali jsme, zda rekombinantní protein ICP inhibuje proteázovou aktivitu homogenátů střeva flebotomů 48h po sání na myši proti substrátu Z-FR-AMC. Zjistili jsme, že ICP neinhibuje signifikantně střevní proteázovou aktivitu *L. longipalpis* ani *P. papatasi*. Papain, který byl použit jako pozitivní kontrola, byl inhibován. Výsledky měření při pH 5 jsou shrnuty v grafech 4-10 a 4-11 a v tabulce 4-3. Pokus byl opakován 2x s podobnými výsledky. Výsledky měření při pH 7,8 byly podobné (data nejsou uvedena).

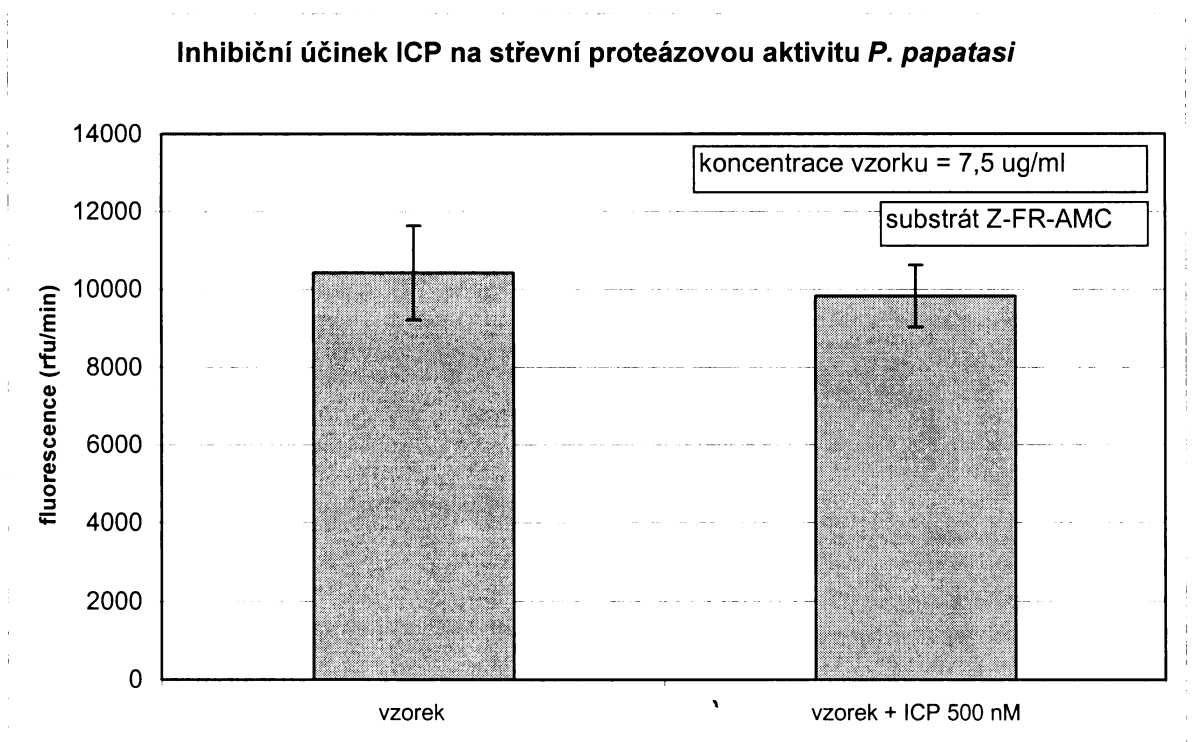
Graf 4-10 Inhibiční účinek ICP na střevní proteázovou aktivitu *L. longipalpis* a papain

Vzorek = homogenát střeva *L. longipalpis* 48h po sání; koncentrace substrátu = 20 μ M



Graf 4-11 Inhibiční účinek ICP na střevní proteázovou aktivitu *P. papatasi*

Vzorek = homogenát střeva *P. papatasi* 48h po sání; koncentrace substrátu = 20 μ M



Tab 4-3 Inhibiční účinky ICP

	průměr rfu/min	% aktivity
vzorek <i>L. lon</i>	9901	100
vzorek <i>L. lon</i> + ICP 50 nM	8067	81
vzorek <i>L. lon</i> + ICP 500 nM	10771	109
papain	8198	100
papain + ICP 5 nM	0	0
papain + ICP 50 nM	0	0
vzorek <i>P. pap</i>	10427	100
vzorek <i>P. pap</i> + ICP 500 nM	9826	94

4.10 Experimentální infekce *P. papatasi*

Role ISPs *L. major* v přenašeči byla zkoumána *in vivo* pomocí sání *P. papatasi* na inaktivované králičí krvi smíchané s promastigoty *L. major*: s přírodním kmenem (wild type) a s liniemi mutantními ve genech pro ISPs.

Použité linie:

Leishmania major wild type - MHOM/JL/80/Friedlin - (WT)

L. major 4618 ISP 2a3 knock-out klon A (kloA)

L. major 4854 ISP 2a3 knock-out klon C (kloC)

L. major 5033 ISP 2a3 reexpressor na pozadí klonu A (kAR)

L. major ISP1 knock-out na pozadí kloC (6893)

L. major ISP1 reexpressor na pozadí linie 6893 (7018)

Experimenty byly opakovány nejméně dvakrát a výsledky byly otestovány χ^2 – testem v programu S-PLUS. Hladina pravděpodobnosti byla zvolena 95% (P = 0,05).

Srovnání WT a kloC

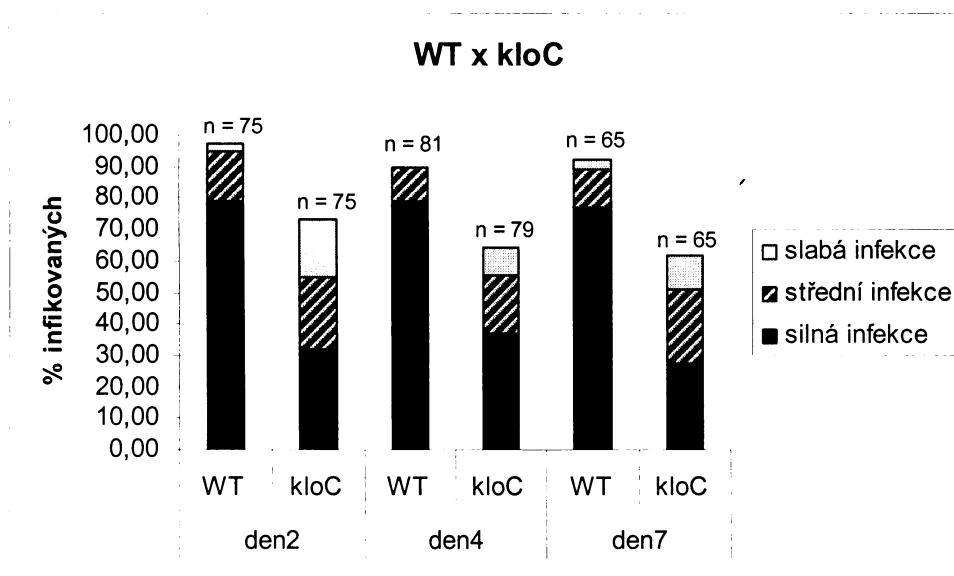
Výsledky pěti pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-4 a znázorněny v grafu 4-12. Mezi infekcemi linií WT a kloC byly zjištěny signifikantní rozdíly všechny tři dny po sání (den 2, 4 a 7). Infekce kloC byly horší co do síly infekce i procenta infikovaných samic. (intenzita infekce den 2 - $\chi^2 = 39.3$, $P = 1.46e-008$; den 4 - $\chi^2 = 32.6$, $P = 3.61e-007$; den 7 - $\chi^2 = 33.3$, $P = 2.78e-007$) (procenta infikovaných samic den 2 - $\chi^2 = 17.2$, $P = 0.00003$; den 4 - $\chi^2 = 15.0$, $P = 0.0001$; den 7 - $\chi^2 = 17.3$, $P = 0.00003$)

Tab.4-4 Srovnání infekcí liniemi WT a ISP 2a3 knock-out klon C

	den2		den4		den7	
	WT	kloC	WT	kloC	WT	kloC
neinfikované	2	20	8	28	5	25
slabá infekce	2	14	0	7	2	7
střední infekce	12	17	9	15	8	15
silná infekce	59	24	64	29	50	18

Graf 4-12 Srovnání infekcí liniemi WT a ISP 2a3 knock-out klon C

(n = počet pitvaných samic)



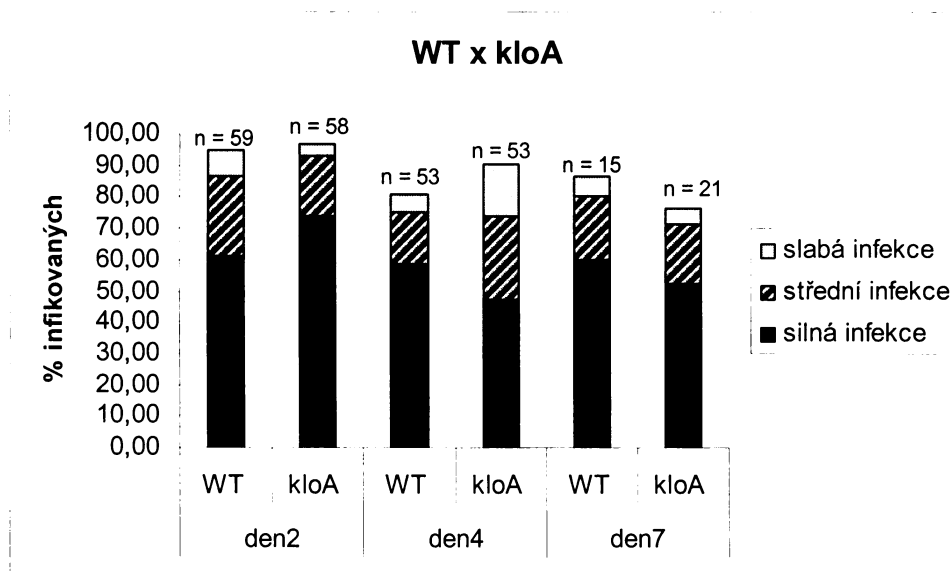
Srovnání WT a kloA

Výsledky čtyř pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-5 a znázorněny v grafu 4-13. Mezi infekcemi linií WT a kloA nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly. (intenzita infekce den 2 - $\chi^2 = 2.7$, $P = 0.438$; den 4 - $\chi^2 = 6.4$, $P = 0.0938$; den 7 - $\chi^2 = 0.6$, $P = 0.8857$)
(procento infikovaných samic den 2 - $\chi^2 = 0.2$, $P = 0.6617$; den 4 - $\chi^2 = 1.9$, $P = 0.1635$; den 7 - $\chi^2 = 0.6$, $P = 0.4336$)

Tab. 4-5 Srovnání infekcí liniemi WT a ISP 2a3 knock-out klon A

	den2		den4		den7	
	WT	kloA	WT	kloA	WT	kloA
neinfikované	3	2	10	5	2	5
slabá infekce	5	2	3	9	1	1
střední infekce	15	11	9	14	3	4
silná infekce	36	43	31	25	9	11

Graf 4-13 Srovnání infekcí liniemi WT a ISP 2a3 knock-out klon A



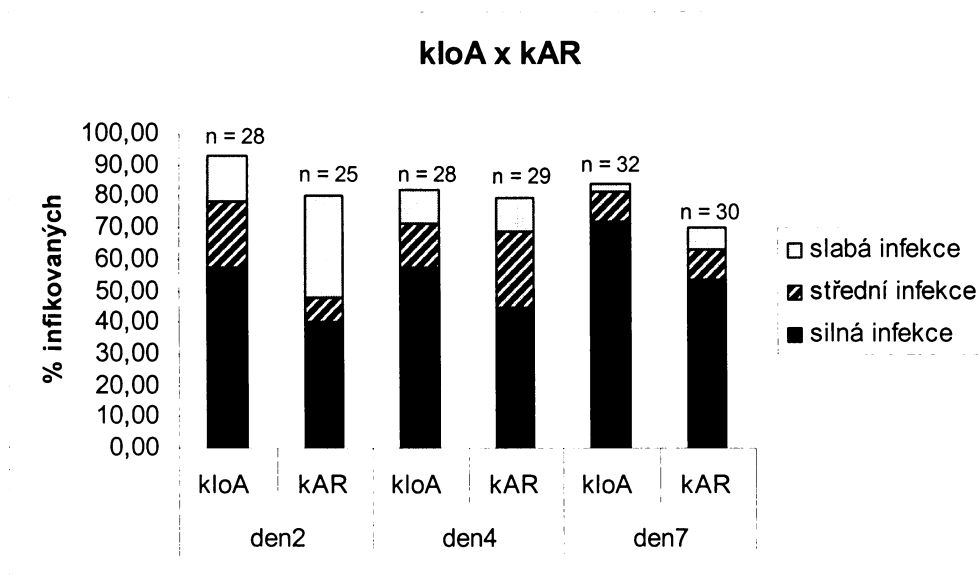
Srovnání kloA a kAR

Výsledky dvou pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-6 a znázorněny v grafu 4-14. Mezi infekcemi linií kloA a kAR nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly. (intenzita infekce den 2 - $\chi^2 = 5.9$, $P = 0.1190$; den 4 - $\chi^2 = 1.2$, $P = 0.7524$; den 7 - $\chi^2 = 2.7$, $P = 0.4452$) (procento infikovaných samic den 2 - $\chi^2 = 1.9$, $P = 0.1676$; den 4 - $\chi^2 = 0.07$, $P = 0.7865$; den 7 - $\chi^2 = 1.8$, $P = 0.1761$)

Tab. 4-6 Srovnání infekcí liniemi ISP 2a3 knock-out klon A a ISP 2a3 reexpressor na pozadí klonu A

	den2		den4		den7	
	kloA	kAR	kloA	kAR	kloA	kAR
neinfikované	2	5	5	6	5	9
slabá infekce	4	8	3	3	1	2
střední infekce	6	2	4	7	3	3
silná infekce	16	10	16	13	23	16

Graf 4-14 Srovnání infekcí liniemi ISP 2a3 knock-out klon A a ISP 2a3 reexpressor na pozadí klonu A



Srovnání linií WT, 6893 a 7018

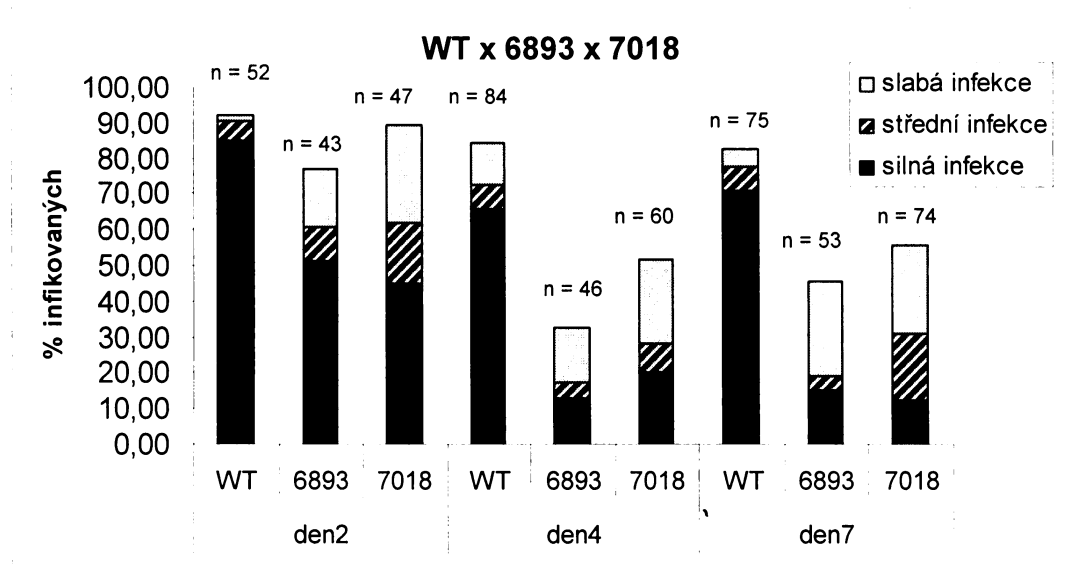
Výsledky pěti pokusů jsou shrnuty v tabulce 4-7 a znázorněny v grafu 4-15. Infekce linií 6893 (ISP 1, 2 a 3 knock-out) i 7018 (ISP1 reexpressor) se liší od infekcí WT. U infekcí 6893 a 7018 jsou signifikantně menší procenta nakažených samic den 4 a den 7 po sání (den 2 - $\chi^2=5.4$, $P = 0.0680$; den 4 - $\chi^2=37.5$, $P = 7.1e-009$; den 7 - $\chi^2=21.3$, $P = 2.3e-005$). Infekce jsou také signifikantně slabší a to ve všech testovaných dnech po infekci (intenzita infekce den 2 - $\chi^2=26.3$, $P = 0.0002$; den 4 - $\chi^2=55.6$, $P = 3.5e-010$; den 7 - $\chi^2=77.1$, $P = 1.4e-014$).

Signifikantní rozdíl mezi liniemi 6893 a 7018 byl zjištěn pouze čtvrtý den po sání: procento nakažených samic je větší u linie 7018 (den 4 - $\chi^2=3.8$, $P = 0.0497$); v intenzitě infekcí není signifikantní rozdíl (den 4 - $\chi^2=3.9$, $P = 0.2719$). Druhý a sedmý den po sání se infekce 6893 a 7018 nelišily (intenzita infekce: den 2 - $\chi^2=4.7$, $P = 0.1989$; den 7 - $\chi^2=6.5$, $P = 0.0888$; procento nakažených samic den 2 - $\chi^2=2.6$, $P = 0.1086$; den 7 - $\chi^2=1.3$, $P = 0.2604$).

Tab. 4-7 Srovnání infekcí liniemi WT, 6893 (ISP triple knock-out) a 7018 (ISP1 reexpressor)

	den2			den4			den7		
	WT	6893	7018	WT	6893	7018	WT	6893	7018
neinfikované	4	10	5	13	31	29	13	29	33
slabá infekce	1	7	13	10	7	14	4	14	18
střední infekce	3	4	8	6	2	5	5	2	14
silná infekce	44	22	21	55	6	12	53	8	9

Graf 4-15 Srovnání infekcí liniemi WT, 6893 (ISP triple knock-out) a 7018 (ISP1 reexpressor)



Výsledky umělého infekčního sání *P. papatasi* na krvi s promastigoty různých linií *L. major* lze shrnout takto:

- Mezi infekcemi přirozenou linií (WT), linií s knock-outovanými geny pro ISP2 a ISP3 klon A (kloA) a reexprimující linií (kAR) nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.
- Linie s knock-outovanými geny pro ISP2 a ISP3 klon C (kloC) infikuje *P. papatasi* signifikantně hůře než přirozená linie (WT).
- Knock-out ISP1, 2 a 3 (6893) a linie reexprimující ISP1 (7018) infikují *P. papatasi* signifikantně hůře než přirozená linie (WT). Infekce triple knock-out linií a ISP1 reexpressorem jsou si podobné; reexpressor se vyvíjí poněkud lépe ale rozdíly mezi těmito dvěma liniemi jsou ve většině případů nesignifikantní.

5 Diskuze

Vývoj leishmanií v přenašeči je ovlivněn proteolytickou aktivitou ve střevě přenašeče (Schlein a Romano 1986, Borovsky a Schlein 1987, Dillon a Lane 1993b, Schlein a Jacobson 1998, Pimenta a kol.1997). Ve své práci jsem se proto zabývala studiem proteolytické aktivity ve střevě dvou druhů flebotomů a role leishmaniových inhibitorů proteáz při vývoji v přenašeči. Při studiu střevní proteolytické aktivity jsme použili několik přístupů.

Překvapující výsledek přineslo srovnání proteázové aktivity ve střevech jednotlivých flebotomů druhu *P. papatasi*. Bylo zjištěno, že hladina proteázové aktivity proti použitým syntetickým substrátům v daném čase po sání se mezi jedinci velmi významně liší. Velké rozdíly byly zjištěny navzdory tomu, že k pokusu byly použity pouze samice, které měly abdomen po sání zcela vyplněn krví a zdály se být plně nasáté. Zjištěné rozdíly mohou vypovídat o rozdílné rychlosti trávení u různých jedinců nebo o rozdílech v maximální hodnotě proteolytické aktivity. Pravděpodobně platí obě tyto možnosti.

U komárů bylo zjištěno, že maximální hladina enzymatické aktivity ve střevě i doba, po které je maxima proteolytické aktivity dosaženo je závislá na objemu přijaté krve (Briegel a Lea, 1975). Podobnou závislost lze očekávat i u flebotomů. Výsledky pokusů I. Benkové (nepublikováno) ukázaly, že množství krve nasáté samicemi *P. papatasi*, které se na pohled zdají být plně nasáté, se pohybuje od 0,4 μ l do 1,1 μ l. Pozorované rozdíly v proteázové aktivitě proto vyplývají zřejmě do velké míry z rozdílů v množství přijaté krve. Pokud jsou tyto rozdíly dány i jinými faktory (individuální rozdíly v odpovědi jedinců na příjem krve), mohou mít vliv i na schopnost jedinců daného druhu flebotoma přenášet leishmanie. Z metodického hlediska tento pokus potvrdil nutnost použití směsného vzorku z většího počtu střev v následujících pokusech.

Při stanovení pH optima endopeptidázové aktivity ve střevě *P. duboscqi* po sání byla u všech pěti syntetických substrátů zjištěna maximální aktivita při zásaditém pH, a to při hodnotách pH 8 až 9,5 (podle použitého substrátu). Tyto výsledky jsou ve shodě s pozorováním Dillon a Lane (1993a), kteří zjistili pH optimum trypsinové aktivity ve

střevě *P. papatasi* a *P. langeroni* mezi pH 7,5 a 9,5 za použití BApNA (benzoyl-arginine-p-nitroanilid) jako substrátu.

Použité substráty Boc-VLK-AMC, Z-FR-AMC a Z-RR-AMC jsou štěpeny jak serinovými, tak cysteinovými proteázami. Inhibiční pokusy ukázaly, že aktivita proti všem testovaným substrátům je plně inhibována přidáním PMSF, který je za redukčních podmínek specifickým inhibitorem serinových proteáz. Z této skutečnosti usuzujeme, že použité substráty jsou byly štěpeny serinovými proteázami, podle složení substrátů konkrétně nejspíše trypsinovými (substráty Boc-VLK-AMC, Z-FR-AMC a Z-RR-AMC) a převážně chymotrypsinovými (substrát Suc-AAPF-AMC) enzymy. Podobně jako v pokusech Dillon a Lane (1993a) byla zjištěná maximální chymotrypsinová aktivita asi 100x menší než aktivita trypsinová, přestože byly použity jiné substráty. Výsledky provedených pokusů také naznačují, že v trávení krve *P. duboscqi* nehrají významnou úlohu cysteinové proteázy katepsin L nebo katepsin B typu s optimální aktivitou při kyselém pH, jako je tomu u některých jiných zástupců hematofágního hmyzu, např. ploštic rodu *Triatoma* a *Rhodnius* (Lehane, 1994; Kollien a kol., 2004).

Dále jsme srovnávali dynamiku střevní proteázové aktivity dvou druhů flebotomů chovaných ve dvou různých teplotách. Teploty 23 a 28°C použité v našich experimentech jsou uvnitř fyziologického rozmezí teplot, ve kterých jsou *P. duboscqi* a *P. papatasi* v přírodních podmínkách aktivní (Volf, ústní sdělení). Tyto teploty jsou také často používány při experimentálních infekcích flebotomů. Zajímalo nás proto, zda jsou proteázové aktivity za těchto teplot odlišné. Trávení *P. papatasi* a *P. duboscqi* probíhalo obdobně. V nenasátém střevě nebyla detekována žádná trypsinová ani chymotrypsinová aktivita. Maximální hodnoty proteázové aktivity byly u obou druhů v obou teplotách zaznamenány 48h po sání s výjimkou chymotrypsinové aktivity ve střevě *P. papatasi* při 23°C, kde byla maximální hodnota naměřena až 60h po sání. Bylo pozorováno, že při 23°C ve střevě přetrvává vysoká proteolytická aktivita po delší dobu než za vyšší teploty. Při 28°C byla 72h po sání proteolytická aktivita střeva zcela nebo z podstatné části redukována, zatímco při 23°C byl zaznamenán jen pozvolný pokles. U *P. papatasi* je maximální trypsinová i chymotrypsinová aktivita větší ve skupině 28°C než ve skupině 23°C. U *P. duboscqi* se liší pouze maximální chymotrypsinová aktivita, maximální trypsinová aktivita je za obou teplot podobná. Na základě těchto výsledků jsme při experimentálních infekcích *P. papatasi* liniemi leishmanií deficitními v inhibitech ISP použili teplotu 28°C.

Při 28°C je zjištěná dynamika trypsinové aktivity *P. papatasi* podobná, jako popisují Ramalho-Ortigao a kol. (2003). Při teplotě 23°C jsme ale u obou druhů flebotomů pozorovali dvojrcholový průběh vylučování proteáz. První vrchol aktivity byl detekován 20h po sání; 28h po sání aktivita mírně klesá a poté nabývá maximální hodnoty 48h po sání. Pozorovaný dvojrcholový průběh aktivity při 23°C může nasvědčovat, že 20h po sání jsou za většinu endoproteázové aktivity zodpovědné jiné enzymy než v pozdějších fázích (48h). Při vyšších teplotách nemusí být tento rozdíl patrný, protože se obě fáze více překrývají, neboť při 28°C je trypsinová aktivita blízká maximální hodnotě již 36h po sání. Ramalho-Ortigao a kol. (2003) prokázali, že množství mRNA pro jednotlivé trypsinové a chymotrypsinové proteázy ve střevě *P. papatasi* po sání se liší, ale o regulaci těchto proteáz na translační úrovni není mnoho známo. Množství mRNA pro trypsinové proteázy *Pptrypl* a *Pptryp2* je redukováno během časné fáze trávení (do 30h), naopak množství mRNA pro *Pptryp 4* stoupá ještě 30h po sání. Dvě chymotrypsinové proteázy se také profilem exprese mRNA liší: *Ppchym1* je v největší míře přítomna 6h po sání, zatímco *Ppchym2* výrazně stoupá až 30h po sání. Dvojrcholový průběh trypsinové a/nebo chymotrypsinové aktivity jako v našem experimentu ovšem nezaznamenali ani Ramalho-Ortigao a kol. (2003), dřívější práce (Dillon a Lane, 1993a; Schlein a Jacobson, 1998; Pimenta, 1997). Srovnání s těmito výsledky je ale obtížné, protože se různí jak teploty, za kterých byly experimenty prováděny (24-29°C), tak způsob sání flebotomů a typ přijaté krve.

V dalším experimentu jsme se pokusili ověřit, zda se stoupající teplotou se kromě množství syntetizovaných proteáz ve střevě flebotomů 36h po sání zvyšuje i jejich enzymatická aktivita. Měřili jsme střevní trypsinovou aktivitu *P. duboscqi* a srovnávali tuto aktivitu u dvou skupin flebotomů držných po sání v různých teplotách (23°C – skupina 1 a 28°C – skupina 2) a vzorků inkubovaných 10 min s fluorogenním substrátem v různých teplotách (18, 23, 28 a 33°C). Zjistili jsme, že se stoupající teplotou inkubace se proteázová aktivita vzorku významně zvyšuje. Tyto výsledky nejsou překvapivé a jsou i v souladu s nárůstem aktivity trávicích proteáz pozorované u komárů (shrnutí Clements, 1992).

Pozorovaný nárůst jak v množství tak v aktivitě trávicích enzymů syntetizovaných 36h po sání vede k významnému zvýšení proteázové aktivity ve střevě flebotomů držných za 28°C. Srovnáme-li aktivitu ve střevě *P. duboscqi* skupiny 1 (flebotomové ve 23°C) inkubované ve 23°C a skupiny 2 (flebotomové ve 28°C) inkubované ve 28°C, najdeme rozdíl 38% (tedy skupina 1 má 62% aktivity skupiny 2). Vzhledem k tomu, že

proteázová aktivita nepříznivě ovlivňuje vývoj leishmanií ve střevě přenašeče (Schlein a Romano 1986, Borovsky a Schlein 1987, Dillon a Lane 1993b, Schlein a Jacobson 1998), a to zřejmě i v závislosti na jejím načasování (Pimenta a kol., 1997), mohou být rozdílné teploty prostředí, ve kterém flebotomové tráví přijatou krev, faktorem ovlivňujícím přenos leishmaniózy. Podle jediné publikované práce, která se zabývala vývojem leishmanií v přenašeči za různých teplot (Leaney, 1977), se *L. mexicana* při experimentálních nálezích *L. longipalpis* vyvíjí podstatně hůře ve 28°C než v nižších teplotách (25 a 22°C). Příčinou tohoto rozdílu může být právě větší proteolytická aktivita, které jsou paraziti za vyšších teplot vystaveni.

Enzymy zodpovědné za proteázovou aktivitu ve střevě flebotomů jsme se pokusili charakterizovat pomocí elektroforetických a chromatografických metod. Původním záměrem bylo izolovat z gelu protein(y) s proteázovou aktivitou a molekulovou hmotností zřetelně odlišnou od dosud charakterizovaných proteáz ze střeva flebotomů (Ramalho-Ortigao a kol., 2003), zjistit jejich aminokyselinovou sekvenci a určit o jaký typ proteázy se jedná.

Rozdělením homogenátu nasátého střeva *P. duboscqi* v substrátovém gelu jsme zjistili, že proteázovou aktivitu má ve střevě po sání mnoho proteinů o různých molekulových hmotnostech. Za účelem rozdělení proteinů v nasátém střevě podle molekulové hmotnosti jsme použili gelovou filtraci. Takto získané frakce byly testovány na proteolytickou aktivitu. Aktivita byla detekována ve všech testovaných frakcích. Frakce byly dále elektroforeticky separovány v substrátovém gelu. Bylo zjištěno, že metodou gelové filtrace nebyl homogenát dobře rozdělen podle molekulové hmotnosti a ve všech frakcích je patrná proteolytická aktivita několika proteinů o různých molekulových hmotnostech. Nejsilnější proteázová aktivita, detekovaná ve 3 frakcích (12-14), byla zjištěna u proteinů o molekulové hmotnosti přibližně 30kDa. Dá se předpokládat, že za tuto aktivitu jsou zodpovědné dříve charakterizované trypsinové a chymotrypsinové proteázy s molekulovou hmotností 27.7 až 29.2 kDa (Ramalho-Ortigao a kol., 2003). Tomu odpovídá i fakt, že námi pozorovaná aktivita byla dobře inhibována přidáním PMSF, inhibitoru serinových proteáz. Také veškerá další detekovaná proteolytická aktivita byla částečně nebo úplně inhibována PMSF a nebyla pozorována výrazná inhibice E-64. Tyto výsledky jsou však pouze orientační a není možné z nich jednoznačně odvodit typ enzymů, které jsou za pozorovanou aktivitu zodpovědné. Ze srovnání s celkovým proteinovým profilem několika frakcí vyplývá, že proteiny zodpovědné za detekovanou proteolytickou aktivitu nejsou v těchto frakcích co do množství dominantní.

Pro lepší separaci proteáz by bylo vhodné použít kombinace gelové filtrace a isoelektrické fokusace nebo jiné separační techniky a až následně izolovat dané proteiny z gelu a sekvenovat. Vzhledem k tomu, že dané proteiny tvoří malou část celkového proteinového obsahu nasátého střeva a při použití zmíněných technik se nelze vyhnout ztrátám, bylo by k takové analýze potřeba získat obrovské množství materiálu.

Leishmanie jsou během vývoje ve flebotomech vystaveny střevní hydrolytické aktivitě, a to především v časně fázi infekce (před defekací). Bylo navrženo několik mechanismů, kterými se buňky parazita účinkům proteolytických enzymů vektora brání. Zaznamenán byl význam povrchových nebo sekretovaných fosfoglykanů (Sacks a kol., 2000) a povrchové proteázy gp63 (Hajmová a kol., 2004) při přežití leishmanií v časně fázi infekce střeva flebotomů. V nedávné době byly v genomu leishmanií objeveny geny pro inhibitory proteolytických enzymů, konkrétně inhibitor cysteinových peptidáz (ICP) a inhibitory serinových peptidáz (ISP). Jejich funkce nebyla zatím uspokojivě objasněna. Díky tomu, že jsem měla z laboratoře prof. Coombse (University of Glasgow) k dispozici linie *E. coli* produkující rekombinantní proteiny *L. major* ISP2 a *L. mexicana* ICP a také linie *L. major* deficitní v ISP, zkoumala jsem roli těchto inhibitorů při vývoji leishmanií v přenašeči. Tato úloha byla studována pomocí *in vitro* inhibice střevní proteázové aktivity střeva flebotomů rekombinantními inhibitory a pomocí experimentálních infekcí s liniemi deficitními v ISP.

Výsledky pokusů *in vitro* ukázaly, že rekombinantní ISP2 účinně inhibuje proteázovou aktivitu homogenátu střeva flebotomů proti syntetickému substrátu Boc-LGR-AMC. Jak aktivita homogenátu střeva *P. papatasi*, tak aktivita homogenátu střeva *L. longipalpis* byly inhibovány obdobně jako srovnatelná aktivita bovinního trypsinu. Tato data napovídají, že studium role inhibitorů ISP při vývoji leishmanií v přenašeči má své opodstatnění. Při zkoumání možné role inhibitorů ISP *in vivo* je třeba brát v úvahu, že podle dostupných dat tyto proteiny nejsou buňkami leishmanií sekretovány (Coombs, nepublikováno). Předpokládáme, že k inhibici proteáz z vnějšího prostředí, tedy například střevních proteáz flebotomů, by mohlo docházet buď po endocytóze těchto enzymů do buňky parazita nebo po smrti a dezintegraci parazitární buňky. Vzhledem k tomu, že při infekcích flebotomů je běžně pozorována redukce počtu přijatých parazitů během časně fáze infekce až na 50% (Pimenta a kol., 1997, Rogers a kol., 2002), není vyloučeno, že přeživší parazité jsou částečně chráněni před účinkem proteáz inhibitory uvolněnými z mrtvých buněk.

V pokusech s rekombinantním ICP *L. mexicana* nebyl detekován žádný inhibiční účinek tohoto proteinu na proteázovou aktivitu homogenátů střeva *P. papatasi* ani *L. longipalpis* proti syntetickému substrátu Z-FR-AMC. Tento substrát byl přitom štěpen proteázou rodiny C1 (papainem), pro kterou jsou inhibitory ICP specifické. Také inhibiční aktivita purifikovaného ICP na papain byla ověřena. Výsledky tohoto pokusu naznačují, že protein ICP zřejmě neslouží leishmaniím k obraně před proteolytickými enzymy ve střevě přenašeče. Tyto výsledky jsou v souladu s tím, že ve střevě flebotomů nebyla zaznamenána aktivita cysteinových peptidáz papainové rodiny (viz výše uvedené výsledky), a takové enzymy nebyly nalezeny ani v cDNA knihovně střeva *P. papatasi* (Ramalho-Ortigao, 2003). Možná úloha inhibitoru ICP ve vektorovi tak zůstává nejasná.

Pomocí experimentálních infekcí *P. papatasi* promastigoty různých linií *L. major*, včetně linií defektních v genech pro inhibitory ISP, jsem se pokusila zjistit, zda tyto inhibitory hrají roli *in vivo* při vývoji *L. major* v přenašeči. Mezi infekcemi přirozenou linií (WT), ISP 2a3 knock-out klonem A (kloA) a ISP 2a3 reexpressorem na pozadí klonu A (kAR) nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly. Naopak ISP 2a3 knock-out klon C (kloC) infikuje druh *P. papatasi* signifikantně hůře než přirozená linie (WT) a to jak v časně (den2), tak v pozdní (den7) fázi infekce. Je překvapivé, že kloA a kloC se při vývoji v přenašeči chovají různě, ačkoliv se jedná o linie, u nichž byly stejným postupem (homologní rekombinací) knock-outovány stejné geny (tj. geny pro ISP2 a ISP3). Při následných pokusech s linií defektní v genech pro všechny tři inhibitory ISP (linie 6893) jsme zjistili, že linie 6893 a ISP1 reexpressor na pozadí linie 6893 (linie 7018) infikují *P. papatasi* signifikantně hůře než přirozená linie (WT). Infekce liniemi 6893 a 7018 jsou si podobné; linie 7018 se vyvíjí poněkud lépe ale rozdíly mezi těmito dvěma liniemi jsou většinou nesignifikantní.

Vzhledem k tomu, že jsme neměli k dispozici reexprimující linie ke všem použitým knock-out mutantům, není možné vyloučit, že některé pozorované rozdíly od přirozené linie jsou ovlivněny poškozením parazitů během genetické manipulace. Z výsledků experimentálních infekcí vyplývá, že linie s odstraněnými geny pro ISP2 a ISP3 mají nižší schopnost infikovat flebotomy a vyvíjejí se v jejich střevě hůře než přirozená linie. Zdá se, že odstranění ISP1 nemá signifikantní vliv na rozvoj infekce v flebotomech. Celkově lze říci, že výsledky experimentálních infekcí nasvědčují významu ISP2 a/nebo ISP3 *L. major* při vývoji v přenašeči.

Pro další studium této problematiky je podle mého názoru vhodné použít metodu experimentálních infekcí flebotomů amastigotními stádii leishmanií. Tato metoda je u

infekcí druhem *L. major* náročnější než infekce promastigotní. Domnívám se však, že by mohla přinést jasnější informace o roli inhibitorů ISP u leishmanií. Této domněnce nasvědčují výsledky Pimenty a kol. (1997), kteří pozorovali, že k účinkům proteáz jsou nejcitlivější parazité v průběhu transformace z amastigotních stadií v promastigotní.

Výsledky této práce hovoří pro význam zkoumání úlohy inhibitorů ISP v přenašeči. Pomocí výše zmíněné metody amastigotních infekcí bych ráda v budoucnu pokračovala ve studiu této problematiky.

6 Shrnutí

- Proteolytickou aktivitu ve střevě *P. duboscqi* po sání vykazuje mnoho proteinů o různých molekulových hmotnostech. Pomocí syntetických substrátů byla zaznamenána aktivita serinových proteáz s maximálním účinkem při zásaditém pH mezi hodnotami 7,5 a 9,5. Nebyla detekována žádná aktivita cysteinových proteáz papainové rodiny.
- Hladina střevní trypsinové a chymotrypsinové aktivity jedinců *P. papatasi*, kteří vypadají plně nasátí, se liší mezi jednotlivými samicemi až o 80 %. Tato vysoká individuální variabilita může být částečně způsobena rozdílným množstvím nasáté krve. Z výsledků tohoto pokusu vyplývá, že při měření střevní proteolytické aktivity flebotomů je nutné používat směsné vzorky z několika střev.
- Ve střevě *P. duboscqi* a *P. papatasi* po sání chovaných ve 23°C jsme zaznamenali dvojevrcholový průběh trypsinové a chymotrypsinové aktivity. Za proteolytickou aktivitu v časně fázi (do 30h) mohou být zodpovědny jiné enzymy než v pozdní fázi (asi 48h) trávení krve ve střevě flebotomů. Proteázová aktivita ve střevě flebotomů chovaných při 28°C vykazovala jednovrcholový průběh. Důležité je, že při této teplotě byla aktivita ve střevě *P. duboscqi* asi o 40% větší než u flebotomů chovaných při teplotě 23°C. Teplota prostředí tak může ovlivňovat vývoj leishmanií v přenašeči.
- Účinek inhibitorů proteáz přítomných u leishmanií na střeva flebotomů jsme testovali různými metodami. Rekombinantní inhibitor serinových proteáz ISP2 *L. major* účinně inhiboval proteázovou aktivitu homogenátů střeva flebotomů proti syntetickému substrátu. Naproti tomu inhibitor cysteinových peptidáz ICP *L. mexicana* detekovanou proteázovou aktivitu homogenátů střeva flebotomů neinhiboval.

- Pokusy *in vivo* prokázaly, že linie *L. major* s odstraněnými geny pro inhibitory ISP2 a ISP3 mají nižší schopnost infikovat přirozeného přenašeče *P. papatasi* a vyvíjejí se v jeho střevě signifikantně hůře než přirozená linie. Naproti tomu odstranění genu pro ISP1 nemělo signifikantní vliv na rozvoj infekce *L. major* ve flebotomech.
- Výsledky *in vitro* i *in vivo* experimentů nasvědčují, že inhibitory ISP2 a/nebo ISP3 *L. major* mohou hrát roli v obraně parazita před proteolytickou aktivitou ve střevě přenašeče.

7 Literatura

Adler, S. (1938) Factors determining the behaviour of *Leishmania* sp. in sandflies, *Harefuah* 14, 1-6

Ausubel, F.M. (editor) (1992) *Short protocols in molecular biology* (second edition). Wiley, New York.

Barillas-Mury, C., Noriega, F.G., Wells M.A. (1995) Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 241-246

Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (2000) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic press, 1666 stran

Berner, R., Rudin, W., Hecker, H. (1983) Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta, Diptera) under normal and experimental conditions. *Journal of ultrastructure research* 83, 195-204

Besteiro, S., Coombs, G.H., Mottram, J.C. (2004) A potential role for ICP, a leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Molecular Microbiology* 54(5), 1224-1236

Bollag, D.M. a Edelstein, S.J. (1991) *Protein methods*. Wiley-Liss, New York. 230 str.

Borovsky, D. (2003a) Biosynthesis and control of mosquito gut proteases. *IUBMB Life* 55, 435-441

Borovsky, D. (2003b) Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *The Journal of Experimental biology* 206, 3869-3875

Borovsky, D., Schlein, Y. (1987) Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Medical and Veterinary Entomology* 1, 235-242

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Briegel, H., Lea, A.O. (1975) Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 21, 1597-1604.

Caroci, A.S., Calvo, E., Ribolla, P.E., De Bianchi, A.G., Marinotti, O. (2003) Two digestive trypsins occur in three species of neotropical anophelines. *Journal of Medical Entomology* 40, 991-995

- Caroci, A.S., Noriega F.G. (2003) Free amino acids are important for the retention of protein and non-protein meals by the midgut of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology* 49, 839-844
- Chung, C.H., Ives, H.E., Almeda, S., Goldberg, A.L. (1983) Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *Journal of Biological Chemistry* 258, 11032-11038
- Clements, A.N. (1992) *The biology of Mosquitoes* 1, Chapman and Hall, London. 509 str.
- Davies, C.R., Cooper, A.M., Peacock, C., Lane, R.P., Blackwell, J.M. (1990) Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 101, 337-343.
- de Almeida, R.W., Tovar, F.J., Ferreira, I.I., Leoncici, O. (2003) Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 307-315
- Dillon, R.J., Lane R.P. (1993a) Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Medical and Veterinary Entomology* 7, 225-232
- Dillon, R.J., Lane R.P. (1993b) Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*, *Parasitology Research* 79, 492-496
- Edwards, M. J., Lemos, F. J. A., Donnelly-Doman, M., Jacobs-Lorena, M. (1997) Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 1063-1072
- Eggers, C.T., Murray, I.A., Delmar, V.A., Day, A.G., Craik, C.S. (2004) The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase. *Biochemical Journal* 379, 107-118
- Felix, C. R., Betschart, B., Billingsley, P. F., Freyvogel, P. A. (1991) Post feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is separable into two phases. *Insect Biochemistry* 21, 197-203
- Giannoni, F., Muller, H.M., Vizioli, J., Catteruccia, F., Katafos, F.C., Crisanti, A. (2001) Nuclear factors bind to a conserved DNA element that modulates transcription of *Anopheles gambiae* trypsin genes. *Journal of Biological Chemistry* 276, 700-707
- Gontijo, N.F., Almeida-Silva, S., Costa, F.F., Mares-Guia, M.L., Williams, P., Melo, M.N. (1998) *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. *Experimental Parasitology* 90, 212-219
- Hajmová, M., Chang, K. W., Kolli, B., Volf, P. (2004) Down-regulation of GP63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early infection of the midgut of *Lutzomyia longipalpis*, *Microbes and Infection* 6, 646-649

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., and Myler, P.J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442

Jiang, Q., Hall, M., Noriega, F.G., Wells, M. (1997) cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 283-289

Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., McMaster, W.R. (2002) Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 33-40

Joshi, P.B., Sacks, D.L., Modi, G., McMaster, W.R. (1998) Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Molecular Microbiology* 27, 519-530.

Killick-Kendrick, R. (1979) Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. V: Biology of Kinetoplastida II. Lumsden, W. H. R., Evans, D. A. (editors). Academic press, London/New York, 395-460

Killick-Kendrick, R. (1999) The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinics in Dermatology* 17, 279-289

Kollien, A.H., Waniek, P.J., Nisbet, A.J., Billingsley, P.F., Schaub, G.A. (2004) Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Molecular Biology* 13 (6), 569-579

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lainson, R., Ward, R.D., Shaw, J.J. (1977) *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complex. *Proceedings of the Royal Society B* 199, 309-320

Lavazec, C., Bonnet, S., Thiery, I., Boisson, B., Bourgoignie, C. (2005) *cpbAg1* encodes an active carboxypeptidase B expressed in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 14, 163-174

Leaney, A.J. (1975) The effect of temperature on *Leishmania* in sandflies. British Society for Parasitology: Proceedings, 28.

Lehane, M.J. (1994) Digestive enzymes, hemolysis and symbionts in the search for vaccines against bloodsucking insects. International Journal for Parasitology 24 (1), 27-32

Mahmood, F., Borovsky, D. (1992) Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in immature *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 29, 489-495

Mahmood, F., Borovsky, D. (1993) Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 30, 683-688

McGrath, M.E., Gillmor, S.A., Fletterick, R.J. (1995) Ecotin: Lessons on survival in protease-filled world. Protein Science 4, 141-148

Mullen, G.R., Durden, L.A. (editoři) (2002) Medical and veterinary entomology. Academic Press, San Diego. 597 str.

Muller H.M., Crampton J.M., della Torre, A., Sinden, R., Crisanti, A. (1993) Members of trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. The EMBO Journal 12, 2891-2900

Muller, H.M., Catteruccia, F., Vizioli, J., della Torre, A., Crisanti, A. (1995) Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. Experimental Parasitology 81, 371-385

Noriega, F. G., Shah, D. K., Wells, M. A., (1997) Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology 6, 63-66

Noriega, F.G., Colonna, A.E., Wells, M.A. (1999) Increase in size of the amino acid pool is sufficient to activate translation of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti* midgut. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29, 243-247

Noriega, F.G., Edgar, K.A., Bechet, R., Wells, M.A. (2002) Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. Journal of Insect Physiology 48, 205-212

Noriega, F.G., Edgar, K.A., Goodman, W.S., Deepa K.S., Wells M.A. (2001) Neuroendocrine factors affecting the steady-state levels of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology 47, 515-522

Peters, W., Killick.Kendrick, R. (1987) The leishmaniasis in biology and medicine. Academic Press, London.

Pimenta, P.F., Modi, G.B., Pereira S.T., Shahabuddin, M., Sacks D.L. (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitology 115, 359-369

Ramalho-Ortigao, J.M., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M.C., Valenzuela, J. G. (2003) Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sandfly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 163-171

Roberts, D.M. (1994) Arabian sandflies (Diptera, Psychodidae) prefer the hottest nights. *Medical and Veterinary Entomology* 8, 194-198

Rogers, M. E., Chance, M. L., Bates, P. A. (2002) The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124, 495-507

Sacks, D. L. (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular Microbiology* 3, 1-9

Sacks, D., Kamhawi, S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* 55, 453-483

Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., Beverley S.M. (2000) The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (1), 406-411

Sádlová, J. (1999) The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63, 331-366

Sanderson, S.J., Westrop, G.D., Scharfstein, J., Mottram, J.C., Coombs, G.H. (2003) Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens. *FEBS Letters* 542, 12-16

Santos, C.C., Sant'Anna, C., Terres, A., Cunha-e-Silva, N., Scharfstein, J., Lima A.P.C.D. (2005) Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *Journal of Cell Science* 118, 901-915

Schlein, Y. (1993) *Leishmania* and Sandflies - Interactions in the Life Cycle and Transmission. *Parasitology Today* 9, 255-258.

Schlein, Y., Jacobson, R.L. (1996) Why is man an unsuitable reservoir for the transmission of *Leishmania major*? *Experimental Parasitology* 82, 298-305

Schlein, Y., Jacobson, R.L. (1998) Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloomeal. *Parasitology* 117, 467-473

Schlein, Y., Romano, H. (1986) *Leishmania major* and *L. donovani*: Effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). *Experimental Parasitology* 62, 376-380

- Schlein, Y., Schnur, L. F., Jacobson, R. L. (1990) Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 353-5
- Smith, B.O., Picken, N.C., Westrop, G. D., Bromek, K., Mottram, J.C., Coombs, G.H. (2006) The structure of *Leishmania mexicana* ICP provides evidence for convergent evolution of cysteine peptidase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 5821–5828
- Tang, Y., Anez, N., Bates, P.A. (1998) Phenol red method for measuring the pH of the gut contents in *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae: Diptera). *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 16, 62-65
- Vizioli, J., Catteruccia, F., della Torre, A., Reckmann, I., Muller, H.M. (2001) Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* – Molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *European Journal of Biochemistry* 268, 4027-4035
- Voet D., Voetová J. G. (1995) *Biochemie*. Victoria publishing, Praha. 1362 str.
- Volf, P., Svobodová, M., Dvořáková E. (2001) Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus dubosqi*: effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Medical and Veterinary Entomology* 15, 281-286
- Yang, S.Q., Wang, C.I., Gillmor, S.A., Fletterick, R.J., Craik, C.S. (1998) Ecotin: A serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *Journal of Molecular Biology* 279 (4), 945-957