

3026

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2009

Jindřich Srba

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233145358

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra biochemie

Rekombinantní cysteinové peptidasy klíšťat

Jindřich Srba

Diplomová práce


Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele
RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne: 4.5.2009

Podpis: 

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. za cenné rady, vstřícnost a ochotu při realizaci diplomové práce. Děkuji Mgr. Martinu Hornovi, CSc. za pomoc při řešení praktických i odborných problémů, za jeho trpělivost a laskavý přístup a Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za posouzení celé práce.

Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Seznam použitých zkratek

AMC	7-amido-4-methylkumarin
Abz	aminobenzoyl
CA-074	[L-3-trans-(propylkarbamoyl)oxiran-2-karbonyl]-L-isooleucyl-L-Prolin
DMK	diazomethylketon
DMSO	dimetylsulfoxid
DS	dextran sulfát
DTT	dithiothreitol
E-64	N-[N-(L-3-trans-karboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]-agmatin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
F*	nitrofenylalanin
FPLC	"Fast Protein Liquid Chromatography"
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
Hb	hemoglobin
HOAc	kyselina octová
homoPhe	homofenylalanin
kDa	kilo Dalton
Na-Ac	sodno-acetátový pufr
Ni-NTA	Ni ²⁺ -nitriltrioctová kyselina
PEG	polyethylenglykol
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PTH	fenylthiohydantoin
PVDF	polyvinyliden fluorid
qRT-PCR	"quantitative Real Time Reverse Transcription"
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Z	benzyloxykarbonyl

Zkratky aminokyselin

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

Obsah

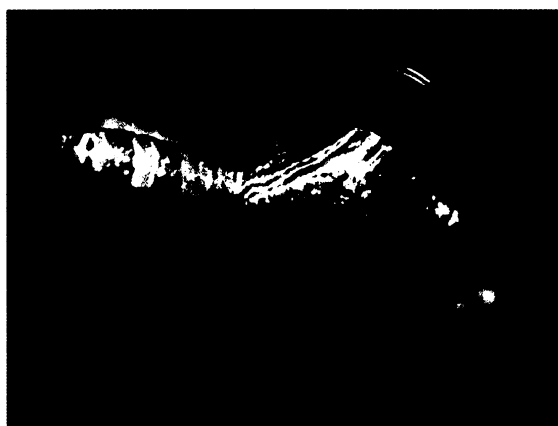
1 Parazitismus.....	11
1.1 Druhy parazitismu.....	11
1.2 Krev sající ektoparazité.....	12
1.3 Klíšťata (Ixodida).....	12
1.3.1 Taxonomie.....	12
1.3.2 Životní vývoj klíšťete.....	13
1.3.3 Sací ústrojí.....	14
1.4 Interakce klíšťe - hostitel.....	14
1.4.1 Inhibice agregace trombocytů.....	15
1.4.2 Inhibice vazokonstrikce.....	15
1.4.3 Inhibice koagulační kaskády.....	15
1.4.4 Inhibice zánětlivé reakce hostitele.....	16
1.5 Klíšťe jako přenašeč chorob.....	18
1.5.1 Interakce s patogenem.....	18
1.5.2 Slinami aktivovaný přenos patogenu.....	18
1.5.3 Klíšťaty přenášená onemocnění a jejich původci.....	19
1.5.3.1 Lymská boreliosa.....	19
1.5.3.2 Ehrlichiosa.....	20
1.5.3.3 Klíšťová encefalitida.....	20
1.5.3.4 Babesiosa.....	20
1.6 Hemoglobin jako zdroj živin.....	21
1.7 Peptidasy.....	22
1.7.1 Funkce peptidas parazitických organismů.....	23
1.7.1.1 Trávení.....	23
1.7.1.2 Migrace a vývoj parazita uvnitř hostitele.....	24
1.7.1.3 Ovlivnění imunitní odpovědi hostitele.....	24
1.7.1.4 Aktivace enzymů.....	24
1.8 Cysteinové peptidasy.....	24
1.8.1 Struktura cysteinových peptidas papainového typu.....	25
1.8.2 Mechanismus katalýzy.....	25
1.8.3 Substrátová specificita.....	26
1.8.4 Struktura katepsinu B a L.....	27
1.9 Inhibitory cysteinových peptidas.....	28
1.9.1 Proteinové inhibitory.....	28
1.9.2 Nízkomolekulární peptidové inhibitory.....	29
2 Cíl.....	31
3 Materiál a metody.....	32
3.1 Materiál.....	32
3.1.1 Rekombinantní peptidasy.....	32
3.1.2 Chemikálie.....	32
3.1.2.1 Pufry.....	32
3.1.2.2 Substráty.....	32
3.1.2.3 Inhibitory.....	33
3.1.2.4 Ostatní chemikálie.....	33

3.2	Přístroje a vybavení.....	34
3.3	Metody.....	35
3.3.1	Rozpuštění inkluzních tělísek.....	35
3.3.2	Afinitní chromatografie.....	35
3.3.3	Refolding.....	36
3.3.4	Aktivace proenzymů.....	36
3.3.5	Iontoměničová chromatografie.....	37
3.3.5.1	FPLC na koloně MonoS.....	37
3.3.5.2	FPLC na koloně MonoQ.....	37
3.3.6	Analytické metody.....	38
3.3.6.1	Stanovení koncentrace proteinů v roztoku.....	38
3.3.6.2	Acetonová precipitace proteinů.....	38
3.3.6.3	Tricin SDS-PAGE.....	39
3.3.6.4	SDS-PAGE.....	39
3.3.6.5	Degradace hemoglobinu katepsinem L.....	39
3.3.6.6	Značení afinitní fluorescenční značkou.....	40
3.3.6.7	Western blot.....	40
3.3.6.8	Určení N-koncové aminokyselinové sekvence.....	40
3.3.7	Kinetická stanovení pomocí fluorogenních substrátů.....	41
3.3.7.1	Stanovení aktivity.....	41
3.3.7.2	Závislost aktivity na pH.....	41
3.3.7.3	Inhibiční specifita.....	42
4	Výsledky.....	43
4.1	Katepsin B.....	43
4.1.1	Příprava rekombinantního katepsinu B.....	43
4.1.1.1	Purifikace proteinu z inkluzních tělísek.....	43
4.1.1.2	Refolding.....	44
4.1.1.2.1	Určení základní strategie refoldingu.....	44
4.1.1.2.2	Optimalizace refoldingu.....	46
4.1.1.3	Aktivace proenzymu.....	48
4.1.1.3.1	Vliv pH.....	48
4.1.1.3.2	Průběh aktivace a její modulace.....	48
4.1.1.4	Chromatografická purifikace refoldovaného proteinu.....	49
4.1.2	Charakterizace katepsinu B.....	50
4.1.2.1	Analýza aktivní formy katepsinu B.....	50
4.1.2.2	Závislost aktivity na pH.....	51
4.1.2.3	Substrátová specifita.....	52
4.1.2.4	Inhibiční specifita.....	53
4.2	Katepsin L.....	55
4.2.1	Příprava rekombinantního katepsinu L.....	55
4.2.1.1	Optimalizace refoldingu.....	55
4.2.1.2	Aktivace proenzymu.....	56
4.2.1.2.1	Vliv pH a dextran sulfátu.....	56
4.2.1.2.2	Průběh aktivace.....	56
4.2.1.3	Chromatografická purifikace refoldovaného proteinu.....	57
4.2.2	Charakterizace katepsinu L.....	58
4.2.2.1	Analýza aktivní formy katepsinu L.....	58
4.2.2.2	Závislost aktivity na pH.....	59

4.2.2.3 Substrátová specificita.....	60
4.2.2.4 Inhibiční specificita.....	60
5 Diskuse.....	62
6 Závěr.....	64
7 Literatura.....	65

1 Parazitismus

Parazitismus je vztah dvou organismů, z nichž první (parazit) profituje na úkor druhého (hostitel). Parazit je schopen přiživovat se na potravě hostitele nebo se přímo živit jeho tkáněmi, čímž snižuje životaschopnost hostitele. Jedním z příkladů takového parazita je tasemnice *Leucochloridium paradoxum*, která jako své mezihostitele využívá plže (Obr. 1). Během svého pobytu v tykadlu plže pozměňuje jeho chování, pohyb, morfologii, dokonce i zabarvení svého hostitele [1].



Obr. 1: *Leucochloridium paradoxum* v tykadlu plže. Převzato z [2].

1.1 Druhy parazitismu

Dle biologické podstaty organismu je možné parazitismus rozlišit na obligatorní (závazný) a fakultativní (příležitostný). Dle místa působení parazita vůči hostiteli dělíme cizopasníky na ektoparazity a endoparazity. Ektoparazité žijí vně hostitele, přičemž typickými zástupci jsou komár nebo blecha. Endoparazité žijí uvnitř hostitele, jako například krevnička nebo tasemnice [3].

1.2 Krev sající ektoparazité

Krev sající ektoparazité žijí mimo hostitele, na jeho povrchu. Patří sem komár, blecha, klíště nebo pijavice. Jejich hlavním zdrojem potravy je krev hostitele. Sání a trávení krve je nezbytné pro jejich přežití, vývoj a produkci další generace parazitů [3].

1.3 Klíšřata (*Ixodida*)

Klířřata patří mezi obligatorní ektoparazity. Svým životním stylem, společně s viry a bakteriemi, které přenáší, snižují životaschopnost mnoha organismů, ať už domestikovaných nebo volně žijících zvířat .

1.3.1 Taxonomie

Taxonomické zařazení klíšřat:

- 1) Nadřířše: *Eukaryota*
- 2) Řířše: *Animalia* (živočichové)
- 3) Kmen: *Arthropoda* (členovci)
- 4) Třída: *Arachnida* (pavoukovci)
- 5) Řád: *Acari* (roztoči)
- 6) Podřád: *Ixodida* (klíšřata)

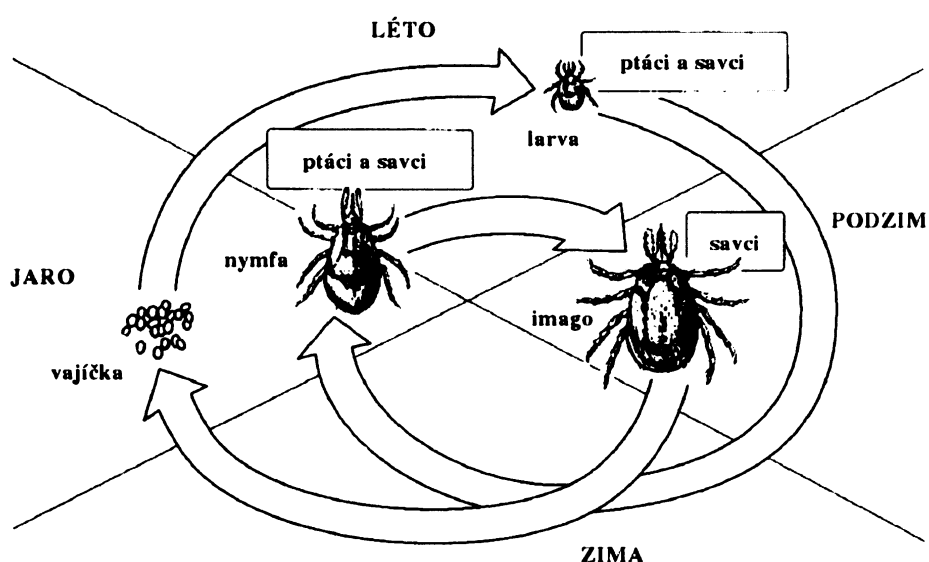
Významní parazité a častí přenařeči patogenů na člověka jsou klíšřata rodu *Ixodes* patřící do podřádu *Ixodida*. Dnes je známo u rodu *Ixodes* 16-18 podrodů, které zahrnují 249 druhů klíšřat [4]. Fylogenetické rozčlenění podrodů bylo provedeno na základě morfologických odlišností [5], nebo analýzou DNA jednotlivých druhů [6].

Jako své lidské hostitele si nejvíce vybírají tito zástupci: *Ixodes scapularis* (Amerika), *Ixodes persulcatus* (Evropa, Asie) a *Ixodes ricinus* (Evropa, Asie) [7]. V České republice se vyskytuje okolo 17 zástupců rodu *Ixodes* [3,8].

1.3.2 Životní vývoj klíštěte

Klíšťata jsou obecně velice mikroklimaticky senzitivní, především na vlhkost okolí. Průměrná doba života klíšťat se pohybuje okolo 2 let, avšak při nepříznivých podmínkách jsou schopné prodloužit tuto dobu až na 6 let. To je neuvěřitelně flexibilní prvek, uvědomíme-li si, že během svého vývoje sají krev hostitele 2-3krát. Aby klíšťata zůstala hydratovaná a životaschopná v mezidobích, bez vhodného hostitele, produkují slinné žlázy hygroskopickou látku, umožňující absorbovat vodní páry ze vzduchu [9].

Klíšťata procházejí během života třemi stadii, přičemž jsou závislá na jednom až třech hostitelích. Z vajíček nakladených samičkou, jejichž počet dosahuje několika tisíc, se líhnou larvy. Larvy jsou šestinohé formy klíšťat, čekající na zemi na svého prvního hostitele. V této chvíli se jedná především o drobné hlodavce. Po nasátí a odpadnutí dochází k metamorfóze larvy v osminohou formu klíštěte, nymfy. Nymfy čekají na svého dalšího hostitele, jako např. králíky, vyšší zvěř a člověka. Po sání a odpadnutí prochází další přeměnou v dospělého jedince, imago. Sameček dospělého jedince hledá samičku, která je přichycená k hostiteli, aby ji mohl oplodnit. Samička po sání a odtrhnutí se od hostitele klade vajíčka (Obr. 1.3.2).



Obr. 1.3.2: Vývojový cyklus klíšťat. Převzato a upraveno z [10].

1.3.3 Sací ústrojí

Typickým znakem klíšťat je sací ústrojí. Hypostom tvoří zploštělý výběžek obklopený nazad obrácenými zoubky. Po stranách hypostomu se nachází chelicery (klíšťky) a pedipalpy, které obalují a chrání celé ústrojí (Obr. 1.3.3 A). Jakmile se klíště rozhodne atakovat hostitele, roztáhne pedipalpy a pomocí chelicer se zasekne do kůže, kterou přitahuje k hypostomu. Ten vnikne do kůže (Obr. 1.3.3 B). Po vypuštění slin se dostane do ranky i látka, která vytvoří okolo hypostomu tzv. cementovou vrstvu. Tímto způsobem přilne klíště pevně k hostiteli [11].



Obr. 1.3.3: Sací ústrojí klíšťat. A/ Sací ústrojí. Roztažené pedipalpy (zelená šipka) odkrývají chelicery (červená šipka), pod kterými se skrývá hypostom (modrá šipka). Převzato a upraveno z [11]. B/ Hypostom zanořený do kůže hostitele. Převzato z a upraveno z [12].

1.4 Interakce klíště - hostitel

Veškeré procesy, probíhající mezi klíštětem a hostitelem během jejich interakce, jsou značně komplexní, koordinované a poměrně dlouho trvající (až několik dnů). Po průniku epidermis hostitele dochází k interakci exkretu slinných žláz klíštěte a plazmy hostitele. Fyzická a chemická infiltrace vyvolává v hostiteli hemostatické, zánětlivé a imunitní reakce. Navzdory tomu jsou klíšťata schopna zůstat pevně ukotvena k hostiteli.

Hemostatický systém omezující průtok krve v místě narušení tkáně hostitele je

překonán díky chemické výbavě obsažené v exkretu slinných žláz klíštěte. Klíště je schopno regulovat vazokonstrikci (redukce průtoku krve), agregaci krevních destiček (trombocytů) a krevní koagulační kaskádu [7,13].

1.4.1 Inhibice agregace trombocytů

Jedním z prvních mechanismů, kterým se snaží zabránit hostitelský organismus ztrátě krve je agregace krevních destiček. Schopnost klíšťat zabránit procesu agregace je dána přítomností specifických molekul zabraňujících vzájemné interakci mezi krevními destičkami [14]. Ty mohou být aktivovány různými mechanismy (agonisty), např. při poranění kůže narušením a odkrytím kolagenu [15].

1.4.2 Inhibice vazokonstrikce

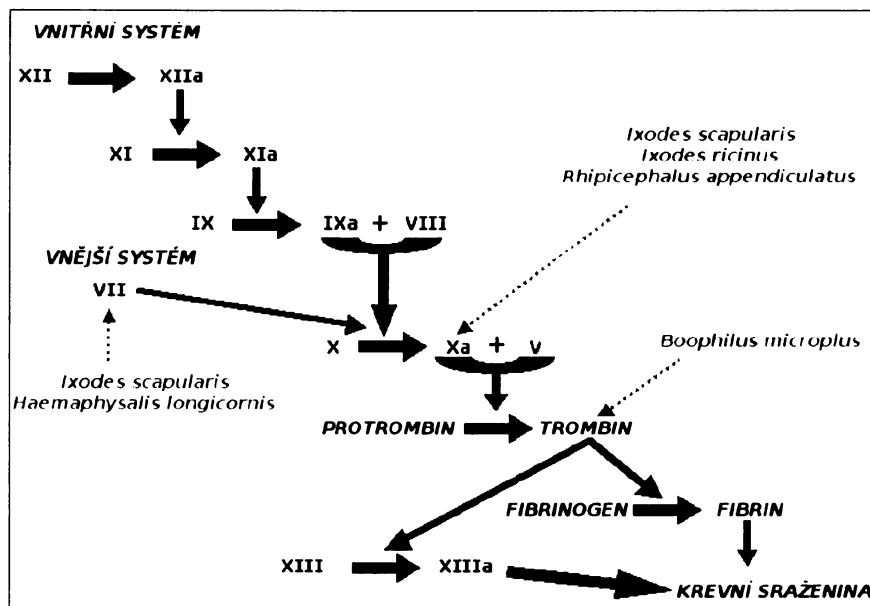
Ve chvíli narušení krevních kapilár a následné aktivaci krevních destiček dochází k uvolnění kyseliny arachidonové, která je přeměněna na tromboxan A₂, což je velice silný agonista vazokonstrikce, agregace trombocytů a jejich degranulace [16].

Ve slinách klíšťat jsou přítomny vazodilatační látky, antagonisté vazokonstriktorů, které rozšiřují cévy a zvyšují průtok krve. Vazodilátory působí na buňky hladkého svalstva přímo nebo nepřímo. Mohou aktivovat enzymy adenylátcyklázu nebo guanylátcyklázu, což vede k tvorbě cAMP a cGMP. Tyto molekuly způsobují svalovou relaxaci [14]. Příkladem může být prostacyclin, derivát kyseliny arachidonové, přítomný ve slinách *Ixodes dammini* [17].

1.4.3 Inhibice koagulační kaskády

Při poranění krevních kapilár dochází k aktivaci krevní koagulační kaskády. Jedná se o komplexní mechanismus proteolytických pochodů, na jehož konci dochází k aktivaci trombinu. Ten přeměňuje fibrinogen na fibrin, který zabraňuje ztrátě krve tvorbou krevní sraženiny. Ve slinách klíšťat je řada molekul schopná specificky blokovat konkrétní peptidasy koagulační kaskády (Obr. 1.4.3, str. 16), nebo alespoň zpomalovat dobu sání [16].

Ve slinách klíštěte *I. scapularis* byla nalezena sekvence cDNA kódující protein o 140 aminokyselinách, zvaný ixolaris, u kterého byla pozorována inhibice faktoru VII a Xa [18]. Podobně malá proteinová molekula madanin u *Haemaphysalis longicornis*, inhibuje faktory VII vnější dráhy i V a VIII vnitřní dráhy koagulační kaskády [19].



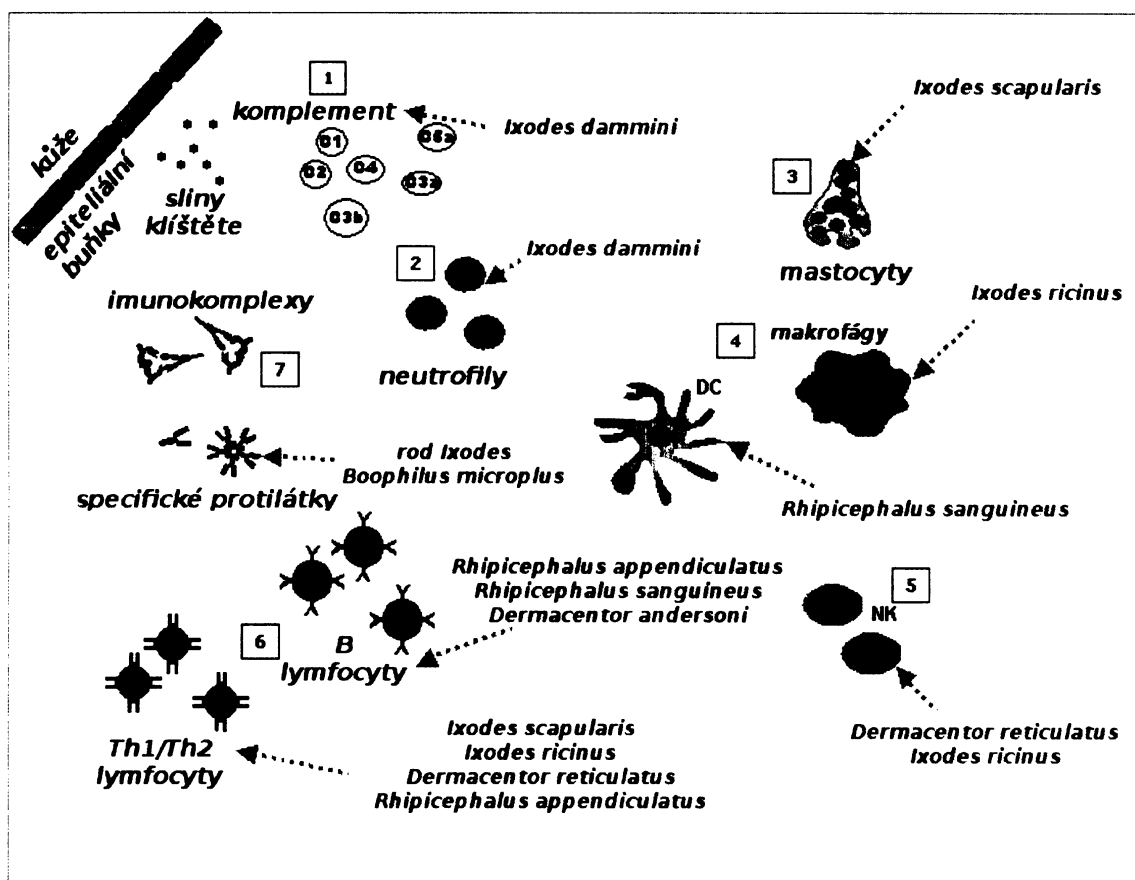
Obr. 1.4.3: Krevní koagulační kaskáda (vnitřní i vnější dráha) aktivována poraněním tkáně je specificky inhibována molekulami ve slinách jednotlivých druhů klíšťat. Aktivovaná koagulační kaskáda vede k tvorbě trombinu, který proteolyticky štěpí fibrinogen na fibrin, z něhož ve výsledku vzniká krevní sraženina. Antikoagulační molekuly v exkretu slinných žláz jednotlivých klíšťat specificky inhibují peptidasy v koagulační kaskádě. Inhibice cílových složek faktoru VII (*I. scapularis*, *H. longicornis*), Xa (*I. scapularis*, *I. ricinus*, *R. appendiculatus*) a trombinu (*B. microplus*) vede k inhibici nebo zpomalení koagulačního efektu. Převzato a upraveno z [15].

1.4.4 Inhibice zánětlivé reakce hostitele

Klíšťata sají krev hostitele po dobu několika dnů. Ve chvíli průniku hypostomu klíštěte skrz epidermis hostitele nastupuje imunitní reakce hostitele. Ta zahrnuje přirozenou imunitu – aktivaci komplementu, proteiny akutní fáze, působení granulocytů, mastocytů, dendroidických buněk, makrofágů a NK buněk. Společně se specifickým imunitním systémem – imunoglobuliny, B lymfocyty a T lymfocyty, vlastní hostitel velice komplexní obranný systém, kterým by se měl ektoparazita zbavit (Obr. 1.4.4, str. 17) [15].

Klíšťata vlastní velice širokou škálu molekul pro zablokování, či alespoň oslabení imunitního systému hostitele. Extrakt slinných žláz klíštěte *I. dammini* blokuje aktivaci

komplementu – C3a složku [20] a funkci neutrofilů [21]. Sliny dalšího zástupce rodu Ixodes, *I. ricinus*, inhibují produkci NO makrofágy, cytotoxicitu NK buněk [22], redukuje množství přítomného konkanavalinu A a zároveň IL-2, který aktivuje T-lymfocyty [23].



Obr. 1.4.4: Modifikace hostitelské imunitní odpovědi v přítomnosti extraktu slinných žláz klíšťat. Molekuly obsažené v extraktu slinných žláz mají vliv na různé efektorové buňky a mediátory imunitního systému. 1) **Systém komplementu:** inhibice vazoaktivních mediátorů komplementu (*I. dammini*), 2) **Neutrofilly:** inhibice funkce neutrofilů (*I. dammini*), 3) **Mastocyty:** redukce degranulace a uvolnění pro-zánětlivých mediátorů (*I. scapularis*), 4) **Makrofágy:** inhibice produkce NO (*I. ricinus*), **DC – dendridické buňky:** redukce diferenciaci a zrání dendridických buněk a produkce cytokinů (*R. sanguineus*), 5) **NK – přirození zabijáci:** redukce cytotoxicity NK buněk (*D. reticulatus*, *I. ricinus*), 6) **Lymfocyty:** B buňky: inhibice buněčné proliferace a modulační produkce imunoglobulinů (*R. appendiculatus*, *R. sanguineus*, *D. andersoni*), **T buňky:** inhibice buněčné proliferace a regulace produkce cytokinů (*I. scapularis*, *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *R. appendiculatus*), 7) **Protilátky a imunokomplexy:** modulační imunoglobulinového profilu hostitele (*B. microplus*, klíšťata rodu *Ixodes*). Převzato a upraveno z [15].

1.5 Klíště jako přenašeč chorob

Klíšťata jsou velice úspěšní přenašeči patogenů, které mohou způsobit závažná onemocnění u různých druhů organismů, včetně člověka. Ve vztahu k patogenům nekončí jejich role u přenosu nebezpečných bakterií, virů, či prvků na hostitele, ale u řady patogenů probíhají metabolické proměny během vývoje uvnitř vektoru, např. bakterie způsobující lymskou boreliosu [13].

1.5.1 Interakce s patogenem

Během kontaktu infikovaného klíštěte s hostitelem dochází k interakci klíště – patogen – hostitel. Patogen, který pronikne do klíštěte nebo hostitele, tento organismus infikuje a replikuje svou genetickou informaci v jeho buňkách, či extracelulárním prostoru. Imunitní systém klíštěte korigující infekci je z větší části neznámý. Infekce v hostitelském organismu závisí na tropismu patogenu k hostitelské buňce nebo tkáni, imunitním stavu hostitele a patogenním fenotypu [7].

1.5.2 Slinami aktivovaný přenos patogenu

Společně s patogenem je v místě průniku klíštěte do hostitele vpraven extrakt slinných žláz klíšťat, obsahující směs látek, které modulují nebo snižují lokální imunitní odpověď hostitele. Tím usnadňují průnik a přežití patogenu ve tkáních hostitele.

Příkladem může být usnadněný přenos a zvýšení infekce v případě, kdy je do hostitele injikován patogen s extraktem slinných žláz v porovnání s injikací samotného patogenu. Např. u viru *Thogoto* infikujícího klíště *R. appendiculatus* byla prokázána zvýšená aktivita v přítomnosti extraktu slinných žláz (Tab. 1.5.2, str. 19) [7].

Tab. 1.5.2: **Infekce klíšťat virem *Thogoto*.**

Způsob infekce morčat (<i>Guinea pigs</i>)	Procento infikovaných klíšťat*
Vpravení samotného viru	0,06
Vpravení viru a extraktu slinných žláz	0,58
Paralelní sání v přítomnosti infikovaných klíšťat	0,85

* Infekce nymf *R. appendiculatus* krmících se na morčatech (*Guinea pigs*), která byla očkována virem bez/v přítomnosti extraktu slinných žláz, nebo pomocí infikovaných klíšťat. Převzato z [7].

1.5.3 Klíšťaty přenášená onemocnění a jejich původci

Jak již bylo zmíněno, klíšťata jsou známými vektory infekčních agens, která vyvolávají vážná onemocnění u lidí i zvířat (Tab. 1.5.3).

Tab. 1.5.3: **Přehled patogenů, přenášených klíšťaty *Ixodes* a onemocnění, které způsobují.**

Patogen	Onemocnění
<i>Borrelia afzelii</i>	Lymeská boreliosa [24]
<i>Borrelia garinii</i>	Lymeská boreliosa [24]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lymeská boreliosa [24]
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	Ehrlichiosa [28]
Vir klíšťové encefalitidy	Klíšťová encefalitida [29]
<i>Babesia divergens</i>	Babesiosa [3]

1.5.3.1 Lymeská boreliosa

Lymeská nemoc byla poprvé popsána v roce 1976 (původně lymeská artritida). Jedná se o komplexní onemocnění, postihující kůži, klouby, nervy i srdce [24]. Původce tohoto, bakterie-spirochety *B. burgdorferi*, onemocnění byl označen v roce 1982 skupinou vědců v čele s Dr. Burgdoférem [25]. Dnes jsou známy čtyři významní patogenní představitelé, *B. burgdorferi*, *B. spielmanii*, *B. afzelii*, *B. garinii*, z nichž poslední dva jmenovaní jsou odpovědní za onemocnění vyskytující se především v Evropě a Asii [24].

Přenos lymeské boreliosis byl pozorován také u jiných vektorů, avšak efektivita přenosu nedosahuje úrovně klíšťat. To je zřejmě dáno adaptací infekčních agens v systému v prostředí, jež vytváří klíště během sání na hostiteli. *B. burgdorferi* využívá exprese vlastního specifického proteinu OspC pro adhezi k buňkám slinné žlázy klíštěte

I. scapularis [26]. Dále dochází ke zvyšování exprese proteinu *I. scapularis* Salp 15, který se adhezuje na vnější membránu spirochet a brání jejich zničení zprostředkované protilátky v těle hostitele [27].

1.5.3.2 Ehrlichiosa

Ehrlichiosa je infekční onemocnění způsobené obligatorní intracelulární gram-negativní bakterií rodu *Ehrlichia*, která napadá leukocyty. Vektor infekčních agens, *Ehrlichia* spp., je mezi jinými stejně jako u lymfské boreliosisy, klíště *I. ricinus*. Symptomy tohoto onemocnění jsou horečka, bolesti svalů, kloubů a hlavy, nevolnost, zvracení [28].

1.5.3.3 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida byla poprvé popsána rakouským lékařem Schneiderem v roce 1931. V roce 1937 ruský vědec Zilber prokázal přenos tohoto onemocnění na člověka klíštětem *I. persulcatus*. Přestože jsou hlavními hostiteli drobní hlodavci, příležitostně to mohou být i lidé, přičemž nejběžnějšími přenašeči jsou *I. persulcatus* a *I. ricinus*.

Virus klíšťové encefalitidy patří do skupiny Flavivirů, společně s virem japonské encefalitidy, žluté horečky a dengue. Jedná se o RNA viry obsahující jádro a obal, tvořený lipidy a dvěma glykoproteiny.

První příznaky tohoto chřipkového onemocnění mají chřipkový charakter. Po přechodném zlepšení dochází k infekci nervové soustavy, což se projevuje jako zánět mozkových blan, doprovázený bolestmi hlavy, světloplachostí a horečkou [29].

1.5.3.4 Babesiosa

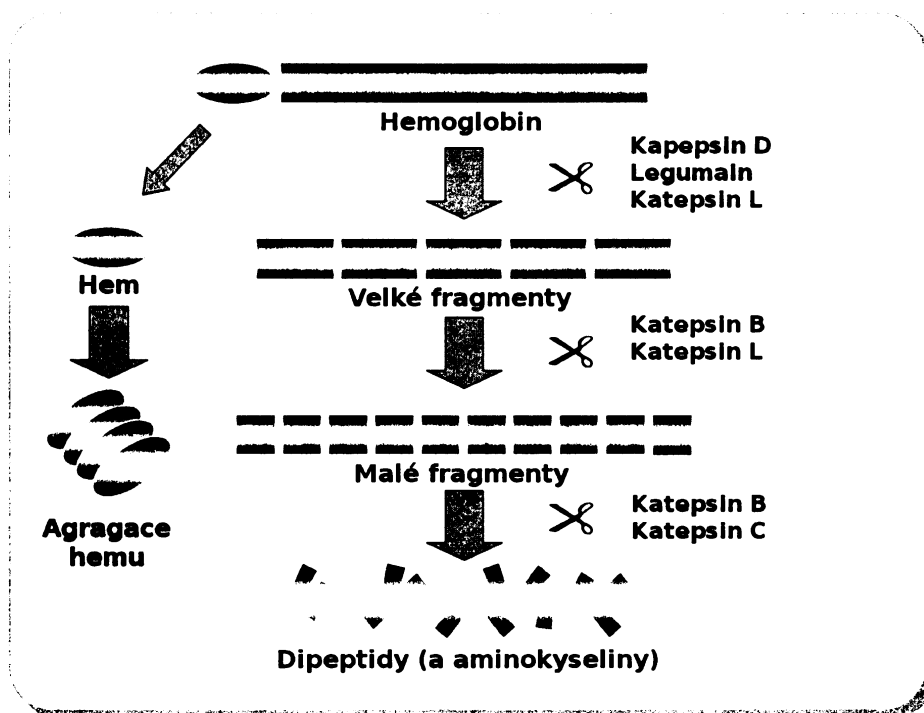
Jedná se o intra-erytrocytární infekci způsobenou prvoky rodu *Babesia*, jejichž vývoj je závislý jak na klíšťatech, tak na teplokrevných zvířatech. Rod *Babesia* byl identifikován již roku 1888, avšak první případ tohoto onemocnění u člověka byl zaregistrován až roku 1957.

Přestože jsou hlavními hostiteli volně žijící zvířata, příležitostně dochází k infekci

lidí. Velice často končí smrtelně. Specificky v Evropě, kde nejběžnějším infekčním agens je *B. divergens*. Onemocnění je způsobeno asexuální reprodukcí prvoka uvnitř erytrocytů a následným rozpadnutím erytrocytů [3, 30].

1.6 Hemoglobin jako zdroj živin

Ve chvíli sání krve hostitele se zvyšuje koncentrace erytrocytů ve střevním lumenu klíštěte. Zde jsou erytrocyty tráveny pomocí látek zvaných hemolyziny. Uvolňuje se hemoglobin, který je důležitým zdrojem metabolitů a energie pro život klíšťat. Hemoglobin je pomocí specifických receptorů endocytován do intracelulárního prostoru digestivních buněk střevního epitelu klíštěte. Trávení hemoglobinu je pomalým intracelulárním procesem, lokalizovaným v endosomech a lysosomech těchto buněk, při kterém se z tetrametru hemoglobinu uvolňují hem a podjednotkové řetězce, které jsou štěpeny peptidasami na peptidy, dipeptidy a aminokyseliny [31] (Obr. 1.6).



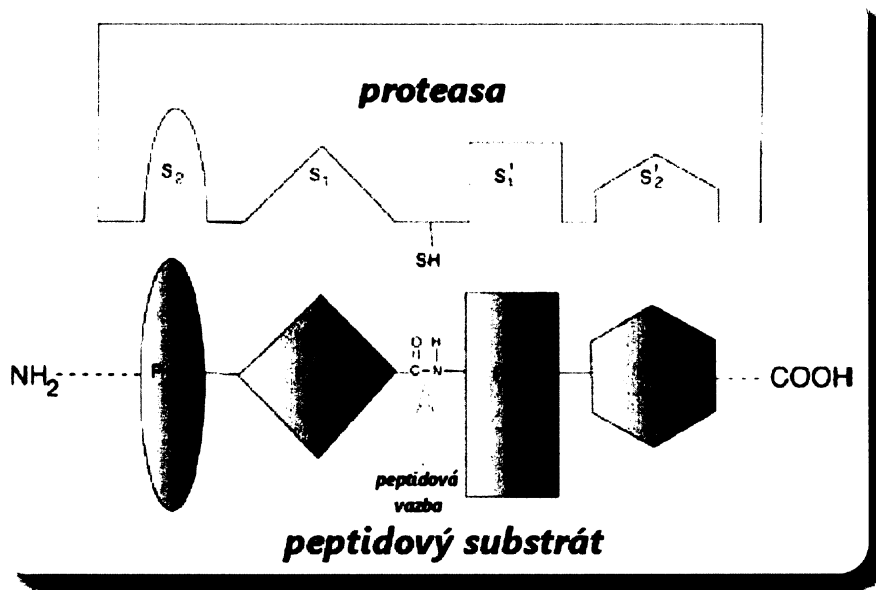
Obr. 1.6: **Degradace hemoglobinu klíštětem.** Během intracelulární degradace hemoglobinu se rozpadá tetramerní struktura hemoglobinu, ze které se uvolňuje hem. Jednotlivé polypeptidové monomery jsou degradovány na velké fragmenty působením aspartátové peptidasy katepsinu D a cysteinových peptidas legumainem a katepsinem L. Velké fragmenty jsou dále degradovány na menší působením katepsinu B a L, které jsou nakonec štěpeny na dipeptidy a aminokyseliny působením cysteinových dipeptidyl exopeptidas katepsinem B a C. Zpracováno dle [32, 31].

1.7 Peptidasy

Základní funkcí peptidas je štěpení peptidových vazeb proteinů a peptidů. Jejich vysoká katalytická účinnost umožňuje štěpit až milion peptidových vazeb za sekundu.

Proteasy mohou být endopeptidasy i exopeptidasy. Endopeptidasy jsou schopné vázat do katalytické oblasti, o velikosti okolo 15 Å, substrátové zbytky po obou stranách od štěpené peptidové vazby (Obr. 1.7). Naproti tomu u exopeptidas je vazba substrátu do katalytické oblasti částečně blokována, peptidasa pak štěpí substrát pouze z N-konce substrátu (aminopeptidasa), případně z C-konce (karboxypeptidasa).

Na základě mechanismu katalýzy jsou peptidasy rozděleny do několika skupin. Mezi nejpočetnější patří serinové, threoninové, aspartátové, cysteinové a metalo peptidasy [34].



Obr. 1.7: Schématické znázornění interakce peptidas – substrát v katalytické doméně cysteinových proteas. S₁-S₂ a S₁'-S₂' značí podmísta peptidas od místa štěpení substrátu. P₁-P₂ a P₁'-P₂' značí úseky substrátu od místa štěpení substrátu. Převzato a upraveno z [34].

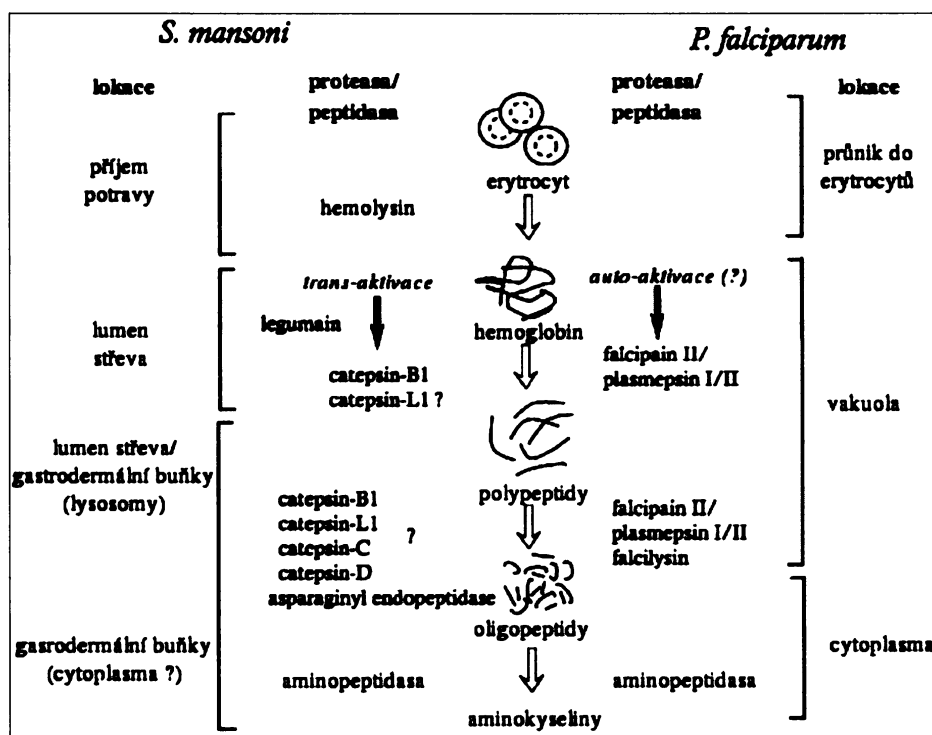
1.7.1 Funkce peptidas parazitických organismů

Peptidasy parazitických organismů mají v porovnání s peptidasami svých hostitelů mnohem širší pole působnosti. K významným funkcím peptidas u parazitů patří trávení, migrace a vývoj parazita uvnitř hostitele a ovlivnění imunitní odpovědi [34].

1.7.1.1 Trávení

Významnou funkcí peptidas parazitů je trávení proteinů hostitele, které slouží jako zdroj živin a energie pro růst a vývoj parazitů. Exogenní proteiny, např. hemoglobin, jsou degradovány parazitickými prvky [35] nebo helminty [36] (Obr. 1.7.1.1).

U krev sajících parazitů se pro trávení nezávisle vyvinuly dvě sítě peptidas. Jedna založená na cysteinových a aspartátových peptidasach (prvoci, helminti) a druhá založená na serinových peptidasach (členovci) [37].



Obr. 1.7.1.1: Schematický diagram porovnávající degradaci hemoglobinu intracelulárními prvky *P. falciparum* a krevničkou *S. mansoni*. Převzato a upraveno z [34].

1.7.1.2 Migrace a vývoj parazita uvnitř hostitele

Parazitické organismy využívají peptidasy pro průnik do hostitele a k usnadnění pohybu uvnitř hostitele. Pro migraci skrz tkáně a buňky hostitele je významná přítomnost serinových peptidas [38] a metalopeptidas [39] parazitů.

Vedle toho bylo identifikováno i několik cysteinových peptidas, které jsou důležité pro vývoj parazita uvnitř hostitele. Nedostatek cysteinových peptidas u *Leshmania mexicana*, znemožňuje přeměnu tohoto parazita uvnitř makrofágů hostitele [40].

1.7.1.3 Ovlivnění imunitní odpovědi hostitele

Upravením buněčné imunitní odpovědi (Kap. 1.4.4), nebo degradací imunitních efektorů pomáhají peptidasy parazitů vyhnout se imunitní reakci hostitele. Během infekce parazitem *T. vaginalis* hostitele je ochranný inhibitor peptidasy sekrečních leukocytů degradován katalytickou činností cysteinové peptidasy katepsinu L [41].

1.7.1.4 Aktivace enzymů

Další funkcí peptidas parazitů je schopnost aktivovat prekurzory jiných enzymů. Například cysteinová peptidasa katepsin B krevničky *S. mansoni* je exprimována ve formě zymogenu, který se trans-aktivuje fragmentací pomocí asparaginylní endopeptidasy [42].

1.8 Cysteinové peptidasy

Pro mnohé parazitické formy organismů jsou cysteinové peptidasy nezbytné. Jejich přítomnost je zřejmě klíčová pro průnik parazita do buněk a tkání, blokování imunitního systému, aktivaci enzymů a virulenci (Kap. 1.7.1, str. 23).

Cysteinové peptidasy jsou rozděleny do několika hlavních skupin, tzv. klanů. Klan CA obsahuje několik rodin. Rodina C1 je označována jako papainová rodina, neboť první peptidasa, která byla purifikována, charakterizována, a jejíž struktura byla vyřešena, byla nalezena v ovoci papaya a nazvána papain [43].

1.8.1 Struktura cysteinových peptidas papainového typu

Cysteinové peptidasy rodiny papainu mají nejčastěji monomerní strukturu (výjimka je tetramerní struktura katepsinu C). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 20-30 kDa (po odštěpení proregionu) a jsou tvořeny 200-300 aminokyselinami.

Mezi tyto peptidasy patří katepsin B a katepsin L. Mají dvě domény o zhruba stejné velikosti. Levá doména obvykle obsahuje 3 α šroubovice. V pravé doméně dominuje β barel tvořený 5-6 vlákny (Obr. 1.8.1). Obě domény jsou stabilizovány pomocí disulfidových můstků. V prohlubni mezi doménami se nachází aktivní místo s postranními řetězci aminokyselin podílejících se na procesu katalýzy hydrolytického štěpení peptidové vazby. V levé doméně se nachází Cys a v pravé doméně His, které tvoří thiolát-imidazolový iontový pár (Kap. 1.8.3, str. 26) [43].

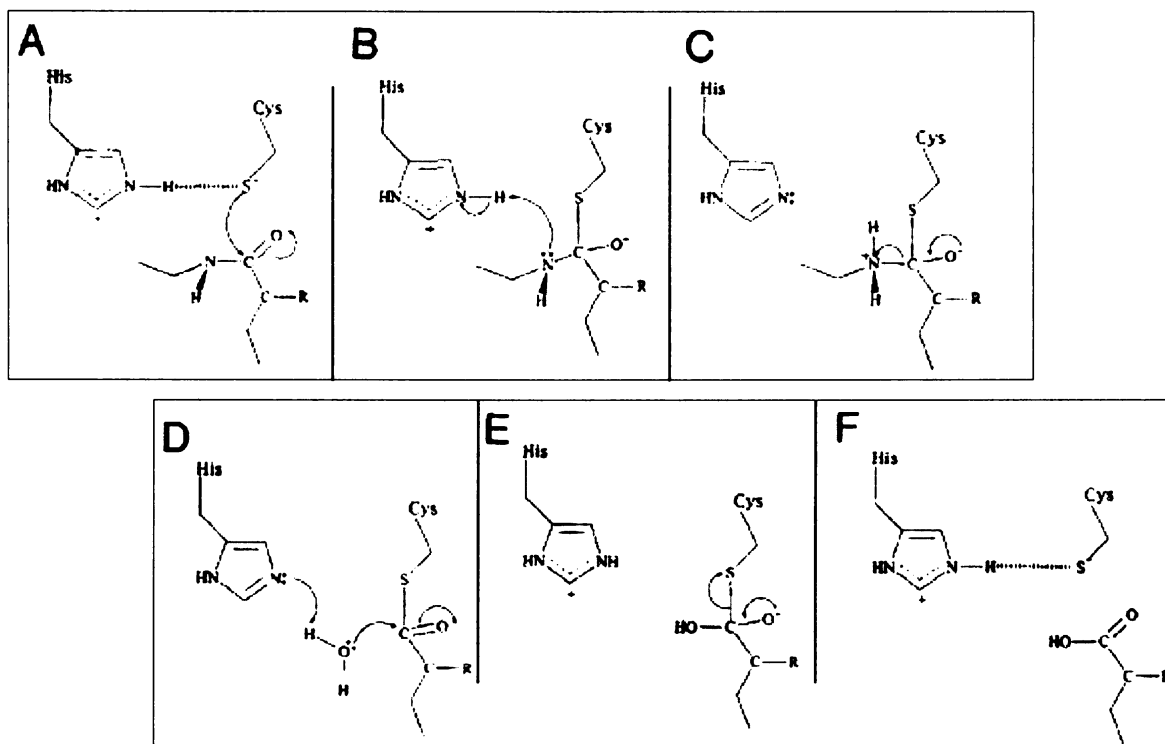


Obr. 1.8.1: Schematické názornění katepsinu K. Postranní řetězce katalytických zbytků Cys 25, His 159, Asn 175 jsou zvýrazněny černě. Převzato z [43].

1.8.2 Mechanismus katalýzy

Katalytická oblast cysteinových peptidas se nachází na rozhraní levé a pravé domény. Levá doména obsahuje katalytické postranní řetězce aminokyselin Cys a Gln, zatímco pravá doména His a Asn.

Hydrolýza peptidové vazby je katalyzována thiolovou skupinou cysteinu, která vytváří s imidazolovou skupinou histidinu thiolát-imidazolový iontový pár. Vznikne silně nukleofilní thiolátový anion, který atakuje karbonylový uhlík peptidové vazby (Obr. 1.8.2) [44].



Obr. 1.8.2: Schematické znázornění mechanismu katalýzy cysteinových peptidas. Katalytická oblast zahrnuje spolupůsobení dvou postraních řetězců Cys a His. A) Nukleofilní atak ionizované thiolové skupiny cysteinu na karbonylový uhlík. B) Poskytnutí protonového vodíku imidazolové skupiny histidinu aminové skupině v peptidové vazbě. C) Vznik tetrahedrálního kovalentního meziprojektu enzym/substrát a jeho rozpad – rozštěpení původní peptidové vazby. D) Tvorba acyl-enzymového meziprojektu. E) Hydrolýza vody. F) Navrácení enzymu do svého původního stavu. Převzato a upraveno z [44].

1.8.3 Substrátová specifita

Většina cysteinových peptidas rodiny papainu jsou endopeptidas, které do katalytické oblasti vážou postranní řetězce substrátů po obou stranách od hydrolyzované vazby. Exopeptidasová aktivita katepsinu H nebo katepsinu B je způsobena částečným zablokováním vazebných míst aktivního místa.

Hlavními oblastmi zajišťujícími katalytickou činnost a specifitnost cysteinových

peptidas rodiny papainu jsou vazebná místa S1 a S2. Vazebné místo S1 je tvořena elementy levé domény. Zprostředkovává vazbu mezi hlavními a postranními atomy, navíc obsahuje skupiny zprostředkovávající katalýzu nukleofilního útoku na karbonylový uhlík substrátu nebo inhibitoru. Na pozici P1 je preferován Arg, Ala nebo homoPhe.

Rozhodujícím prvkem, určujícím specifitu enzymu, je vazebné místo S2. Ta je ve tvaru hydrofobní 'kapsy' tvořená postranními řetězci z levé i pravé domény. Vhodné aminokyseliny v pozici P2 jsou Phe, případně Arg u katepsinu B.

1.8.4 Struktura katepsinu B a L

Katepsin B a L mají obecnou strukturu cysteinových peptidas papainového typu (Kap. 1.8.1, str. 25). Katepsin B má významné strukturální a funkční vlastnosti, které ho odlišují od cysteinových peptidas papainového typu, včetně katepsinu L. Unikátním prvkem katepsinu B je flexibilní struktura tzv. "occluding loop" [45] (Obr. 1.8.4, zelená šipka, str. 28), která blokuje v aktivním místě vazebné místo S'3. Je tak částečně omezen přístup substrátu do katalytické oblasti. Katepsin B je díky tomu nejen endopeptidasou, ale také karboxy dipeptidasou [45,46]. Vytvořené mutantní formy postrádající tento strukturální prvek endopeptidasovou aktivitu prokazovaly, avšak jejich karboxypeptidásová aktivita byla potlačena, či zcela vymizela [47].

Dalším strukturálním prvkem odlišujícím katepsin B od katepsinu L je délka prosegmentu, která je u zymogenu katepsinu B mnohem kratší než u katepsinu L. Navzdory tomu je funkce prosegmentů stejná - kontrola hydrolytické aktivity a stabilizace enzymu. Prosegmenty vedou skrz substrát-vazací oblast ve zpětné orientaci, kde je v kontaktu s vazebnými místy S1, S2, S'1, S'2 a potlačuje hydrolytickou aktivitu peptidas. Oblast vazací prosegment je v obou případech vysoce hydrofobní, v kontaktu s postranními řetězci (Obr. 1.8.4, str. 28) [48].



Obr. 1.8.4: **Stužkové znázornění překrývajících se struktur lidských proenzymů katepsinu B a katepsinu L.** Aktivní forma a prosegment katepsinu B jsou znázorněny *tyrkysovou* a *červenou* barvou. Aktivní forma a prosegment katepsinu L jsou znázorněny *fialovou* a *tmavě modrou* barvou. Flexibilní strukturní prvek prokatepsinu B, tzv. "occluding loop", znázorněný zelenou šipkou, se nachází v odlišné pozici vlivem sterického pnutí s elementy prosegmentu, který u aktivovaného katepsinu B chybí. Převzato a upraveno dle [43].

1.9 Inhibitory cysteinových peptidas

1.9.1 Proteinové inhibitory

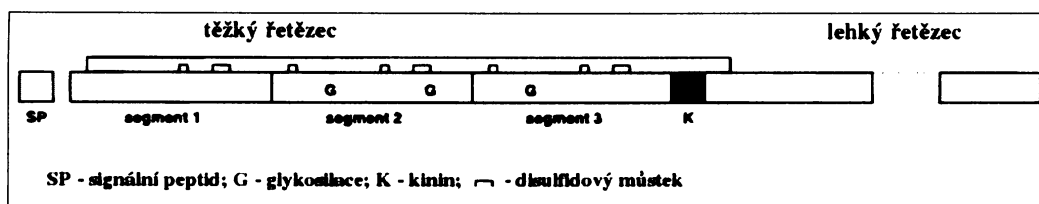
Inhibitory cysteinových peptidas proteinového charakteru (Cystatiny) jsou vysoce specifické právě pro cysteinové peptidasy, kromě bromelainu [49] a glycyloendopeptidasy [50], které nejsou inhibovány žádným z cystatinů.

Na základě homologní sekvence jsou cystatiny rozděleny do 3 rodin [51]:

A/ Stefiny, proteiny o molekulové hmotnosti okolo 11 kDa (cca 100 AK), u kterých nejsou přítomny disulfidické můstky, ani glykosylované postranní řetězce.

B/ Cystatiny, proteiny o molekulové hmotnosti okolo 12-13 kDa (cca 110-120 AK), u kterých nejsou postranní řetězce glykosylované, ale obsahují pár disulfidických můstků.

C/ Kininogeny, proteiny s molekulovou hmotností okolo 120 kDa, obsahují několik disulfidových můstků i glykosylované postranní řetězce. Jsou složeny z těžkého a lehkého řetězce (Obr. 1.9.1, str. 29) [52].



Obr. 1.9.1: Schéma struktury kininogenu. Těžký řetězec je tvořen signálním peptidem (SP), segmenty 1, 2, 3 a kininem. Hlavní řetězec je stabilizovaný disulfidovými můstky. Postranní skupiny jsou glykosylované [51].

1.9.2 Nízkomolekulární peptidové inhibitory

Významné peptidové inhibitory cysteinových peptidas byly nalezeny v extraktu *Aspergillus japonicus*. Jedná se o vysoce aktivní ireverzibilní inhibitory cysteinových peptidas papainového typu. Molekula byla identifikována jako (trans-epoxysukcinylnyl-L-leucylamido-4-guanidinobutan), E-64 (Obr. 1.9.2, str. 30) [56]. Epoxidový zbytek reaguje s S1 oblastí v aktivním místě enzymu, zatímco leucylový zbytek interaguje s S2 oblastí. Proto je směr peptidového řetězce opačný, než u substrátů vazajících se do katalytické oblasti (Obr. 1.9.2, str. 30). Dále se testovaly inhibiční vlastnosti derivátů E-64. Byl tak nalezen např. nejvíce selektivní inhibitor pro katepsin B, CA-074 (Obr. 1.9.2, str. 30) [53].

Struktura syntetických inhibitorů vychází ze struktury přirozeného substrátu nebo inhibitoru, obsahující peptidový segment rozpoznatelný enzymem. Peptidový segment s dostatečnou afinitou k enzymu musí být dlouhý více jak dvě aminokyseliny. To platí minimálně pro endopeptidasy. Reaktivní skupina inhibitoru (substrátu) [54] se váže k nukleofilní skupině, kde reaguje s postranním řetězcem cysteinu v aktivním místě.

Pořadí rostoucí síly syntetických peptidových inhibitorů cysteinových peptidas je: Trifluormethylketon << derivát α -ketokarboxylové kyseliny = α -diketon < aldehyd. Peptidyl aldehydy jsou inhibitory serinových a cysteinových peptidas izolované z rodu *Streptomyces*. Patří sem leupeptiny nebo chymostatiny [51].

2 Cíl

Klíštěte obecné *I. ricinus* je významný krev sající parazit člověka, který je přenašečem patogenů zodpovědných za onemocnění lymfskou boreliózou nebo klíšťovou encefalitidou. Diplomová práce se zabývá peptidasami, které fungují jako trávicí enzymy klíštěte umožňující degradaci hemoglobinu jako hlavního potravního zdroje. Peptidasy jsou perspektivním cílem při vývoji nových vakcín potlačujících interakci klíštěte s hostitelem a přenos patogenů. Práce se soustředí na dvě významné cysteinové peptidasy papainového typu, katepsin B a katepsin L.

Konkrétně budou řešeny následující dílčí úkoly:

A/ Příprava rekombinantního katepsinu B a L zahrnující vypracování postupu pro refolding, aktivaci a chromatografickou purifikaci.

B/ Biochemická charakterizace aktivního katepsinu B a L zahrnující určení pH optima a analýzu substrátové a inhibiční specifity.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Rekombinantní peptidasy

Rekombinantní proteasy prokatepsin B a L se exprimovaly v bakteriích *Escherichia Coli* s polyhistidinovou kotvou na N konci obou proenzymů. Izolovaná inkluzní tělíška obou enzymů poskytl Dr. Petr Kopáček z Parazitologického ústavu, BC AVČR, České Budějovice.

3.1.2 Chemikálie

3.1.2.1 Pufry

100 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 mM Tris pH 8,0

0,2 M Na-Ac pH 4,0-6,5

50 mM Tris pH 6,5-9,0

50 mM Na-Ac pH 4,2

0,1 M citrát-fosfát pH 3-8

Využito pro:

inkluze, Ni-NTA

fluorescaminový test, aktivace

refolding, FPLC

FPLC

pH profil

3.1.2.2 Substráty

Bachem, Švýcarsko:

Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC

ÚOCHB AVČR, ČR:

Abz-Phe-Arg-Phe*-X-OH, Abz-Phe-Arg- X- Phe*-OH

3.1.2.3 Inhibitory

Sigma, USA:

E-64

Cílové peptidasy:

katepsin B a L

Bachem, Švýcarsko:

CA-074

katepsin B

Z-FF-DMK

katepsin L

3.1.2.4 Ostatní chemikálie

Sigma, USA:

dithiothreitol (DTT), k. ethylendiamintetraoctová (EDTA), glycin, imidazol, močovina, fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'-tetramethyl ethylendiamin (TEMED), Tris báze, akrylamid

Fluka, NDR:

dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol

Serva, NDR:

Coomassie Brilliant Blue, močovina, N,N'-metylenbisakrylamid, Tris, peroxidisíran amonný (APS)

Lachema, ČR:

chlorid sodný, chlorid vápenatý, dusičnan stříbrný, ethanol, hydroxid sodný, k. octová, k. chlorovodíková, methanol

Hmotnostní standardy pro SDS-PAGE:

Page Ruler[®] Prestained Protein Ladder Plus

Fermentas, Lotyšsko

3.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy AE 163	Mettler, Švýcarsko
Centrifugy:	
Centrifuga Eppendorf 5415D	Eppendorf, NDR
Centrifuga Heraeus Biofuge Fresco	DJB Labcare, Velká Británie
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	Thermosavant, USA
Ultrafree-MC Microcentrifuge filter, 0,22 µM	Millipore, USA
Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	Tecan, Rakousko
Fluorescenční scanner Typhoon	GE Healthcare Life, Švédsko
pH metr pH Pracitronic MW 870	Pracitronic, NDR
Termoblok	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Vertikální elektroforéza	Bio-Rad, USA
Blotovací zařízení	Bio-Rad, USA
FPLC ÄKTA Explorer	GE Healthcare Life, Švédsko
 <u>Kolony a nosiče:</u>	
Ni-NTA Superflow	Qiagen, USA
MonoS HR 5/5	GE Healthcare Life, Švédsko
MonoQ HR 5/5	GE Healthcare Life, Švédsko
 <u>Ostatní vybavení:</u>	
Superloop 50 ml	GE Healthcare Life, Švédsko
PVDF membrána	Millipore, USA

3.3 Metody

3.3.1 Rozpuštění inkluzních tělísek

500 mg inkluzních tělísek izolovaných po expresi prokatepsinu B a L z bakterií *E. coli*, se rozpustilo v 5 ml roztoku o složení: 100 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 mM Tris pH 8,0; 6 M guanidin; 10 mM 2-merkaptoethanol. Inkluze se inkubovaly přes noc při pokojové teplotě za míchání. Nerozpustný podíl se odstranil centrifugací (10000xg, 15 min, 4°C).

3.3.2 Afinitní chromatografie

K separaci klíčtějších rekombinantních prokatepsinů B a L exprimovaných s histidinovou kotvou se využilo afinitní chromatografie s nosičem Ni-NTA Superflow (Ni²⁺-nitriltriocetová kyselina). Nikl imobilizovaný na tomto nosiči vázal histidinový hexapeptid umístěný na N-konci obou enzymů, které byly posléze z nosiče kompetitivně vytěsněny imidazolem.

Kolona o objemu 10 ml se promyla cca 15 ml ekvilibračního pufru. Po nanesení 5 ml vzorku rozpuštěných inkluzí se kolona znovu promyla cca 15 ml ekvilibračního pufru. Poté se promyla cca 15 ml promývacího pufru. Nakonec byly pomocí elučního pufru s 250 mM imidazolem eluovány proenzymy, přičemž průběh purifikace byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Kap. 3.3.6.4, str. 39). Rychlost průtoku kolonou byla 1 ml/min, frakce byly sbírány po 2 ml.

Složení ekvilibračního pufru: 100 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 mM Tris pH 8,0; 8 M močovina

Složení promývacího pufru: 100 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 mM Tris pH 8,0; 8 M močovina;
20 mM imidazol

Složení elučního pufru: 100 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 mM Tris pH 8,0; 8 M močovina;
250 mM imidazol

3.3.3 Refolding

Refoldingový proces zahrnoval 2 dílčí kroky:

1/ Preinkubace proenzymů (ve 100 μ l):

Proenzym purifikovaný afinitní chromatografií na koloně Ni-NTA (Kap. 3.3.2, str. 35) byl přidán do 100 μ l preinkubačního roztoku ve třech variantách s následujícím složením (uvedeny jsou finální koncentrace): (1) 50 mM GSH [66], (2) 2,5% k. octová nebo (3) 13% k. octová [55]. Roztoky se inkubovaly 1 hod při 37°C za míchání. Všechny tři preinkubační roztoky se pomalu přidaly do 900 μ l refoldingové směsi (viz dále).

2/ Refolding proenzymů (v 1 ml):

Proenzymy ve 100 μ l preinkubačního roztoku se pomalu přidaly za míchání při pokojové teplotě do 900 μ l refoldingové směsi, jejíž složení bylo měněno u jednotlivých složek a pH v uvedených rozmezích: 50 mM Tris pH 7,1-9,0; 0-0,50 M L-arginin; 10-30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0-1 mM EDTA; 0,5 mM GSSG. Finální směs o celkovém objemu 1 ml se nejprve inkubovala 30 min při pokojové teplotě za míchání, a poté se nechala po dobu 1-5 dnů ve 4°C.

Analogický postup byl použit pro refolding o celkovém objemu 100 ml. Jako preinkubační roztok byl použit 50 mM GSH a refoldingová směs o složení: 50 mM Tris pH 8,0; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Směs se refoldovala 4 dny ve 4°C.

3.3.4 Aktivace proenzymů

Časový průběh aktivace prokathepsinu B a L byl sledován při 37°C po upravení pH jejich roztoku na pH 4,0-6,5 (pomocí 20% HOAc) a přidáním DTT na 2,5 mM koncentraci, popř. i asparaginylní endopeptidasy na koncentraci 5 μ g/ml nebo dextran sulfátu na koncentraci 50 μ g/ml. V časových intervalech se odebíraly alikvoty reakční směsi a byla stanovena aktivita se substrátem Z-FR-AMC (Kap. 3.3.7.1, str. 41).

3.3.5 Iontoměničová chromatografie

3.3.5.1 FPLC na koloně MonoS

Prokatepsin B se refoldoval ve finální směsi o celkovém objemu 100 ml (Kap. 3.3.3, str. 36). Poté se nechal aktivovat upravením pH na 4,2 (Kap. 3.3.4, str. 36). Tento materiál byl separován s využitím iontoměničové chromatografie na koloně MonoS HR 5/5 pomocí FPLC.

Kolona se ekvilibrovala 5 ml nanášecího pufru. Po nanesení 100 ml směsi s aktivovaným katepsinem B (s izoelektrickým bodem pI 5,15) byla kolona promyta 5 ml nanášecího pufru. Eluce katepsinu B probíhala pomocí lineárního gradientu elučního pufru (2% za minutu). Sbíraly se 2 ml frakce, průtok kolonou byl 0,5 ml/min. Průběh purifikace se sledoval kontinuálním měřením absorpance při vlnové délce 280 nm a detekcí aktivity v jednotlivých frakcích - jako míra štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC (Kap. 3.3.7.1, str. 41).

Složení nanášecího pufru: 50 mM Na-Ac pH 4,2; 10% glycerol; 0,05% 2-merkптоethanol

Složení elučního pufru: 50 mM Na-Ac pH 4,2; 10% glycerol; 0,05% 2-merkптоethanol;
0,5 M NaCl

3.3.5.2 FPLC na koloně MonoQ

Prokatepsin L se refoldoval ve finální směsi o celkovém objemu 100 ml (Kap. 3.3.3, str. 36). Poté se nechal aktivovat upravením pH na 4,2 (Kap. 3.3.4, str. 36). Tento materiál byl separován s využitím iontoměničové chromatografie na koloně MonoQ HR 5/5 pomocí FPLC.

Kolona se ekvilibrovala 5 ml nanášecího pufru. Po nanesení 100 ml směsi s prokatepsinem L (s izoelektrickým bodem pI 5,77) byla kolona promyta 5 ml nanášecího pufru. Eluce katepsinu B probíhala pomocí lineárního gradientu elučního pufru (2% za minutu). Sbíraly se 2 ml frakce, průtok kolonou byl 0,5 ml/min. Průběh purifikace se sledoval kontinuálním měřením absorpance při vlnové délce 280 nm a detekcí aktivity

v jednotlivých frakcích - jako míra štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC (Kap. 3.3.7.1, str. 41).

Složení nanášecího pufru: 50 mM Tris pH 8,0; 10% glycerol; 0,05% 2-merkaptoethanol

Složení elučního pufru: 50 mM Tris pH 8,0; 10% glycerol; 0,05% 2-merkaptoethanol,
0,5 M NaCl

3.3.6 Analytické metody

3.3.6.1 Stanovení koncentrace proteinů v roztoku

Koncentrace proteinů v roztocích byla stanovena metodou podle Bradfordové [58]. Pro tvorbu standardní křivky se použil hovězí sérový albumin rozpuštěný v H₂O o koncentracích 0-1000 µg/ml. Test se prováděl v jamkách mikroděstiček. K 5 µl standardu a vzorku se přidalo 200 µl činidla. Po inkubaci 10 min při 37°C ve tmě se změřila absorbance při 595 nm. Koncentrace proteinů ve vzorcích se určila z konstruované standardní křivky (změřená A₅₉₅ proti koncentraci standardu).

3.3.6.2 Acetonová precipitace proteinů

Acetonová precipitace proteinů se prováděla v přítomnosti 80% acetonu. K 200 µl vzorku se přidalo 800 µl vychlazeného 100% acetonu. Vzorky se inkubovaly 30 min, při -20°C. Po centrifugaci (10000xg, 15 min, 4°C), odstranění supernatantu a vysušení na vakuové odparce SpeedVac se přidalo 12 µl vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Směs se nechala inkubovat 5 min při 65°C a nanasla se na SDS-PAGE (Kap. 3.3.6.4, str. 39).

Složení pufru pro SDS-PAGE: 100 mM Tris pH 6,8; 1% SDS; 4% 2-merkaptoethanol;
0,02% Comassie Brilliant Blue; 24% glycerol

3.3.6.3 Tricin SDS-PAGE

Degradace hovězího hemoglobinu se detekovala pomocí Tricinové polyakrylamidové elektroforézy založené na postupu dle Schäggera [56]. Na vertikální elektroforéze Bio-Rad byly použity 16% gely s 6 M močovinou o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm. Po elektroforéze byly proteiny v gelech fixovány 1 hodinu v 5% glutaraldehydu a poté 30 min v roztoku obsahujícím 45% ethanol, 10% k. octovou. K barvení proteinů se použil roztok Coomassie Brilliant Blue [57].

3.3.6.4 SDS-PAGE

Jednotlivé procesy: rozpouštění, purifikace, refolding a aktivace peptidas se analyzovaly využitím polyakrylamidové elektroforézy v přítomnosti 0,1% SDS založené na postupu dle Laemmliho [58]. Na vertikální elektroforéze Bio-Rad se použily 15% gely s SDS o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm. Fixace proteinů v gelech probíhala 15 min v roztoku obsahujícím 45% ethanol, 10% kyselinu octovou. K vizualizaci proteinů se použil roztok Coomassie Brilliant Blue [57] nebo barvení stříbrem [59].

3.3.6.5 Degradace hemoglobinu katepsinem L

Reakční směs o celkovém objemu 70 μ l obsahovala: 20 μ l roztoku prokatepsinu L (eluční frakce FPLC); 0,2 M Na-Ac pH 4,0; 2,5 mM DTT a 0,6 mg/ml hovězího hemoglobinu. Směs se inkubovala při 37°C a v časových intervalech 0-12 h se odebíraly alikvoty o objemu 6 μ l, ve kterých byla ukončena reakce přidáním 6 μ l 2krát koncentrovaného vzorkového pufru pro Tricin SDS-PAGE a inkubací 5 minut při 65°C. Vzorky byly nanášeny na Tricin SDS-PAGE (Kap. 3.3.6.3, str. 39).

Složení pufru pro Tricin SDS-PAGE: 100 mM Tris-HCl; pH 6,8; 1% SDS;
4% 2-merkaptoethanol; 0,02% Coomassie Brilliant Blue; 24% glycerol

3.3.6.6 Značení afinitní fluorescenční značkou

Refoldované proenzymy se aktivovaly 30 min upravením na pH 4,0 (Kap. 3.3.4, str. 36). K 200 μ l takto aktivované peptidasy se přidal do výsledné koncentrace 0,5 μ M inhibitor cysteinových peptidas DCG04 s navázanou fluorescenční značkou Bodipy 530/550 (Green-DCG04) [60]. Vzorek se inkuboval ve tmě 1 h při 37°C.

Byla provedena acetonová precipitace proteinů (Kap. 3.3.6.2, str. 38). Po vysušení se přidalo 12 μ l vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Směs se nechala inkubovat 5 min při 65°C a nanesla se na SDS-PAGE (Kap. 3.3.6.4, str. 39).

Gel, 3krát promytý 10 min v H₂O, se následně analyzoval na fluorescenčním skeneru Typhoon Imager s excitačním laserem o vlnové délce 532 nm a emisním filtrem propouštějícím vlnovou délku 550 nm.

3.3.6.7 Western blot

Po provedení SDS-PAGE se podložky, filtrační papíry, gel a PVDF membrána o velikosti gelu (navlhčená nejprve methanolem) ekvilibrovaly 15 min v transferovém pufru (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glycin; 20% methanol). Po ekvilibraci byly navrstveny do blotovacího přístroje v pořadí: anoda, podložka, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, podložka, katoda. Přenos proteinů probíhal 1 h za konstantního napětí 100 V. Poté se membrána obarvila roztokem Coomassie Brilliant Blue [62]. Odbarvila se 50% methanolem a promyla se 3krát 30 min v H₂O. Pás s proteinem se vystříhl z membrány pro určení N-koncové aminokyselinové sekvence (Kap. 3.3.6.8).

3.3.6.8 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence

Vzorky určené k analýze se separovaly pomocí SDS-PAGE (Kap. 3.3.6.4, str. 39) a přenesly se na PVDF membránu metodou Western blot (Kap. 3.3.6.7). Pás s proteinem se vystříhl z membrány. Určování N-koncové aminokyselinové sekvence prováděl Ing. Z. Voburka na ÚOCHB AV ČR: Při automatickém Edmanově odbourávání N-koncových aminokyselin se použil proteinový sekvenátor ABI Procise 491. Jednotlivé PTH-deriváty se identifikovaly pomocí RP-HPLC.

3.3.7 Kinetická stanovení pomocí fluorogenních substrátů

Enzymové aktivity katepsinu B a L se stanovovaly měřením fluorescence, která vzniká při štěpení fluorogenního substrátu. Enzymová měření byla prováděna při 37°C na mikrodestičkách pomocí fluorescenčního spektrometru GENios. Uvolňování produktu bylo monitorováno měřením fluorescence u substrátů s fluorescenční značkou AMC při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm a s Abz při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 410 nm [61].

3.3.7.1 Stanovení aktivity

K 10 μ l vzorku s aktivovaným enzymem se přidalo 90 μ l substrátové směsi preinkubované 10 min při 37°C. Finální směs o celkovém objemu 100 μ l byla pipetována do jamek mikrodestičky. Aktivita se měřila jako míra štěpení fluorogenního substrátu enzymem (Kap. 3.3.7).

Složení substrátové směsi pro katepsin B: 0,2 M Na-Ac pH 5,5; 2,5 mM DTT; 0,1% PEG 1500; 40 μ M fluorogenní substrát (Z-FR-AMC, Z-RR-AMC, Abz-FRF^{*}X-OH, Abz-FRXF^{*}-OH)

Složení substrátové směsi pro katepsin L: 0,2 M Na-Ac pH 4,0; 2,5 mM DTT; 40 μ M fluorogenní substrát (Z-FR-AMC, Z-RR-AMC)

3.3.7.2 Závislost aktivity na pH

Pro stanovení závislosti aktivity katepsinů B a L na pH se využily vzorky přečištěné pomocí FPLC. Katepsin B se nacházel po purifikaci na koloně MonoS v aktivované formě. Katepsin L byl přečištěn ve formě proenzymu, proto se nejprve aktivoval po dobu 60 min upravením pH jeho roztoku na pH 4 (Kap. 3.3.4, str. 36).

Pro stanovení aktivity v prostředí o různém pH byly odebírány 10 μ l alikvoty

s aktivovaným enzymem, ke kterým se přidalo 90 μ l substrátové směsi preinkubované 10 min při 37°C. Finální směs o celkovém objemu 100 μ l byla pipetována do jamek mikrodostičky. Aktivita se měřila jako míra štěpení fluorogenního substrátu enzymem (Kap. 3.3.7., str. 41).

Složení substrátové směsi pro katepsin B: 0,2 M citrát-fosfát pH 3,0-6,2; 2,5 mM DTT; 0,1% PEG 1500; 1 mM EDTA; 50 μ M Z-FR-AMC

Složení substrátové směsi pro katepsin L: 0,2 M citrát-fosfát pH 2,8-4,3; 2,5 mM DTT; 0,1% PEG 1500; 50 μ M Z-FR-AMC

3.3.7.3 Inhibiční specifita

Pro stanovení inhibiční specifity peptidas byly využity vzorky přečištěné pomocí FPLC (Kap. 3.3.7.2, str. 42).

Do jednotlivých jamek mikrodostičky se pipetovalo 10 μ l roztoku enzymu a 40 μ l inhibiční směsi a tato směs byla protřepána a ponechána inkubovat 30 min při 37 °C. Poté bylo přidáno 50 μ l substrátové směsi preinkubované 10 min při 37°C a byla měřena zbytková aktivita katepsinů B a L na fluorescenční čtečce GENios (Kap. 3.3.7, str. 41).

Složení směsi pro katepsin B

Inhibiční směs: 0,2 M Na-Ac pH 5,5; 2,5 mM DTT; 5 μ M inhibitor (E-64, CA-074, Z-FF-DMK)

Substrátová směs: 0,2 M Na-Ac pH 5,5; 2,5 mM DTT; 0,1% PEG 1500; 40 μ M Z-FR-AMC

Složení směsi pro katepsin L

Inhibiční směs: 0,2 M Na-Ac pH 4,0; 2,5 mM DTT; 5 μ M inhibitor (E-64, CA-074, Z-FF-DMK)

Substrátová směs: 0,2 M Na-Ac pH 4,0; 2,5 mM DTT; 40 μ M Z-FR-AMC

4 Výsledky

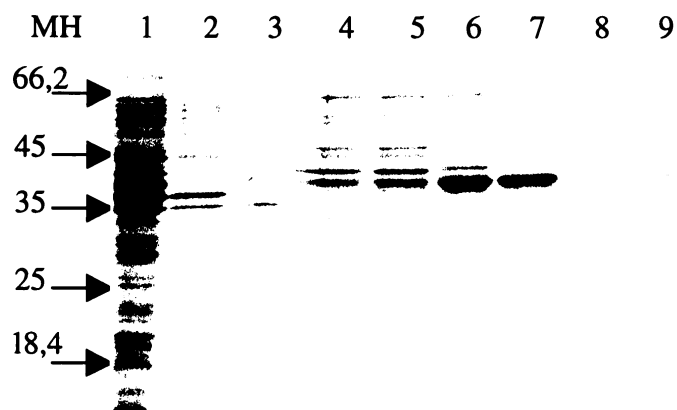
4.1 Katepsin B

4.1.1 Příprava rekombinantního katepsinu B

4.1.1.1 Purifikace proteinu z inkluzních tělísek

Pro purifikaci prokatepsinu B z rozpuštěných inkluzních tělísek byla použita chromatografie na koloně Ni-NTA Superflow. Chromatografie využívá interakce histidinového hexapeptidu jako kotvy umístěné na N-konci exprimovaného proteinu s niklem vázaným na chromatografickém nosiči. Nitriltriocetová kyselina imobilizovaná na agarose váže ionty niklu, na který se specificky navazují histidinové hexapeptidy. K vytěsnění proteinů z Ni-NTA nosiče se používá 250 mM imidazolu, který kompetuje o nikelnaté ionty s histidinovou kotvou.

500 mg inkluzí obsahujících prokatepsin B bylo rozpuštěno (Kap. 3.3.1, str. 35) a naneseno na kolonu Ni-NTA Superflow. Výsledné množství prokatepsinu B po purifikaci na koloně Ni-NTA činí 2,8 mg proteinu. Frakce z jednotlivých promývacích a elučních kroků byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 4.1.1.1, str. 44).



Obr. 4.1.1.1: Purifikace prokatepsinu B z rozpuštěných inkluzí pomocí chromatografie na Ni-NTA nosiči. Na 15% gelu SDS-PAGE jsou v drahách 1-9 vybrané frakce z jednotlivých chromatografických kroků, barvené pomocí Coomassie Brilliant Blue. Šipky značí molekulové hmotnosti standardů.

Dráha:	M_r	Relativní molekulová hmotnost v kDa
1		Nanášený vzorek - inkluze rozpuštěné v pufru s 6 M guanidinem
2		Nenavázaný materiál
3		Promytí ekvilibračním puftrem
4-5		Promytí ek. puftrem obsahujícím 20 mM imidazol
6-9		Eluce ek. puftrem obsahujícím 250 mM imidazol

4.1.1.2 Refolding

4.1.1.2.1 Určení základní strategie refoldingu

1/ Složení preinkubačního roztoku

Prokatepsin B purifikovaný afinitní chromatografií na koloně Ni-NTA (Kap. 3.3.2, str. 35) byl přidán do 100 μ l preinkubačního roztoku ve třech variantách s následujícím složením (uvedeny jsou finální koncentrace): (1) 50 mM GSH [62], (2) 2,5% k. octové nebo (3) 13% k. octové [63]. Poté se daný roztok postupně přidal do 900 μ l refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris pH 7,1; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Účinnost refoldingu prokatepsinu B se stanovovala pomocí aktivního testu, jakožto míra štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC. Aktivní test obsahoval úvodní aktivační krok v kyselém pH umožňující konverzi prokatepsinu B na aktivní enzym

(Kap. 3.3.4, str. 36). Porovnáním aktivit peptidasy (Obr. 4.1.1.2.1 A, str. 46) je zřejmé, že při preinkubaci prokatepsinu B v přítomnosti kyseliny octové nedošlo k úspěšnému zrefoldování. Pouze v přítomnosti 50 mM GSH při preinkubaci, následnému refoldingu a aktivaci je pozorovatelná aktivita.

2/ Složení refoldingové směsi

Preinkubační směs obsahující 50 mM GSH (uvedená v předchozím odstavci jako varianta 1) byla postupně přidána do 900 μ l refoldingové směsi v následujících variantách o složení:

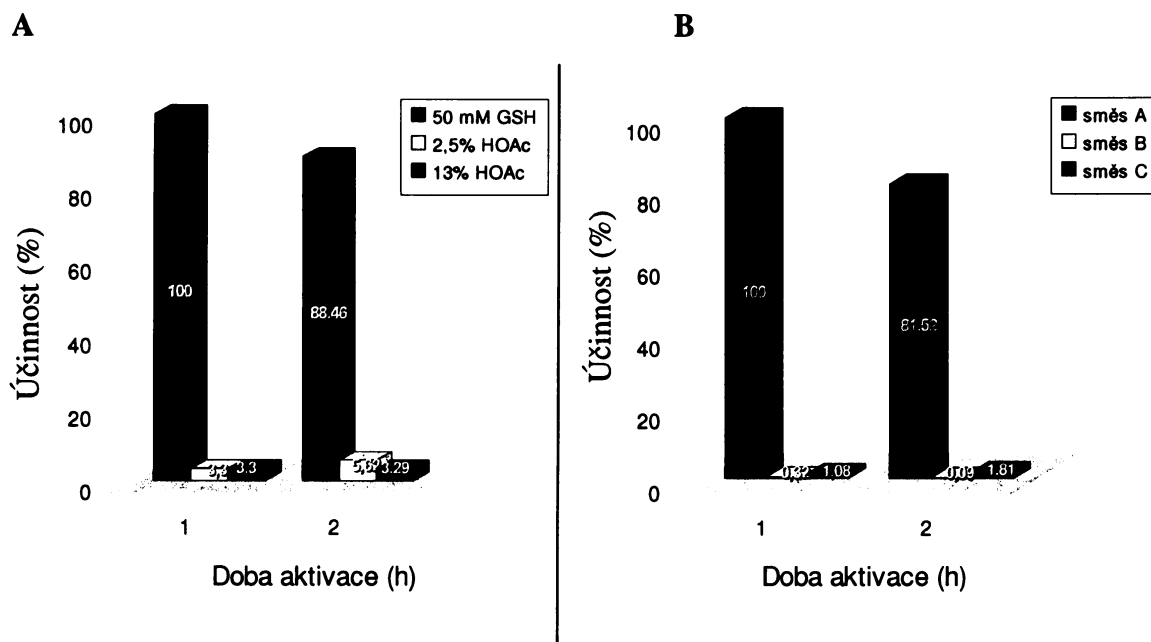
A/ 50 mM Tris pH 7,1; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG

B/ 50 mM Tris pH 9,0; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 1 mM EDTA; 0,5 mM GSSG

C/ 50 mM Tris pH 7,1; 0,5 M L-arginin; 10% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG

V tomto optimalizačním kroku se měnilo složení refoldingové směsi z předchozího odstavce (zde označena jako A) změnou koncentrace glycerolu, argininu, GSH a pH.

Účinnost refoldingu prokatepsinu B se stanovovala pomocí aktivního testu - jako míra štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC po aktivaci prokatepsinu (viz předchozí odstavec). Z porovnání aktivit peptidasy (Obr. 4.1.1.2.1 B, str. 46) je zřejmé, že refoldingové směsi B a C nejsou vhodné pro úspěšný refolding. Naproti tomu směs A poskytla účinný refolding prokatepsinu B.



Obr. 4.1.1.2.1: **Optimalizace refoldingu rekombinantního prokatepsinu B.** **A) Závislost účinnosti refoldingu na složení preinkubační směsi.** Uvedeno je finální složení preinkubační směsi ve třech variantách. Následný refolding probíhal 24 h ve variantě směsi A (viz panel B). Aktivita katepsinu B byla měřena po aktivaci v časových intervalech 1 a 2 h (osa x) a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y). **B) Závislost účinnosti refoldingu na složení refoldingové směsi.** Refolding probíhal 24 h ve třech variantách finálních směsí: **A/** 50 mM Tris pH 7,1; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG; **B/** -50 mM Tris pH 9; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 1 mM EDTA; 0,5 mM GSSG; **C/** 50 mM Tris pH 7,1; 0,5 M L-arginin; 10% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Aktivita byla měřena jako v panelu A.

4.1.1.2.2 Optimalizace refoldingu

1/ Finální složení refoldingové směsi

Testovány byly tři varianty složení finální refoldingové směsi, které se odlišovaly v pH (7,1 na 8,0) a v obsahu L-argininu, jenž je znám pro svou schopnost usnadnit refolding řady proteinů [64].

Preinkubační směs obsahující 50 mM GSH (Kap. 4.1.1.2.1, str. 44) byla postupně přidána do 900 μ l refoldingové směsi v následujících variantách o složení:

A/ 50 mM Tris pH 8,0; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG

B/ 50 mM Tris pH 7,1; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG

C/ 50 mM Tris pH 8,0; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG

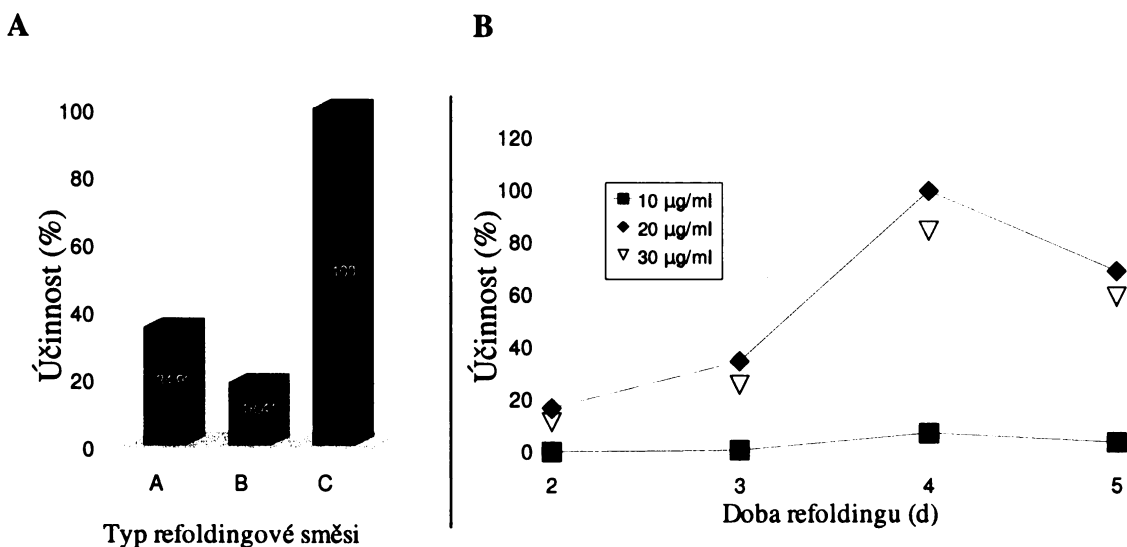
Účinnost refoldingu prokatepsinu B se stanovovala pomocí aktivního testu - jako

míra štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC po aktivaci prokatepsinu. Porovnáním aktivit katepsinu B (Obr. 4.1.1.2.2 A) je zřejmé, že nejuspěšnější refolding inkluzí probíhal ve finální směsi C, která neobsahovala arginin a měla pH 8,0. Tato optimalizovaná varianta refoldingového protokolu byla používána v další práci.

2/ Závislost na koncentraci proteinů a době refoldingu

Provedla se optimalizace refoldingu prokatepsinu B v závislosti na době jeho refoldování a na koncentraci 10-30 μg proteinů/ml ve finální směsi. Refolding probíhal po dobu 2-5 dnů. Účinnost refoldingu prokatepsinu B se stanovovala pomocí aktivního testu - jako míra štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC po aktivaci prokatepsinu (Obr. 4.1.1.2.2 B).

Do 4. dne účinnost refoldingu rostla. Mnohonásobně vyšší účinnost je možné pozorovat v případě koncentrace 20 μg proteinů/ml, oproti 10 μg proteinů/ml finální směsi. Zvyšování koncentrace na 30 μg proteinů/ml neměl vliv na další zvýšení účinnosti.

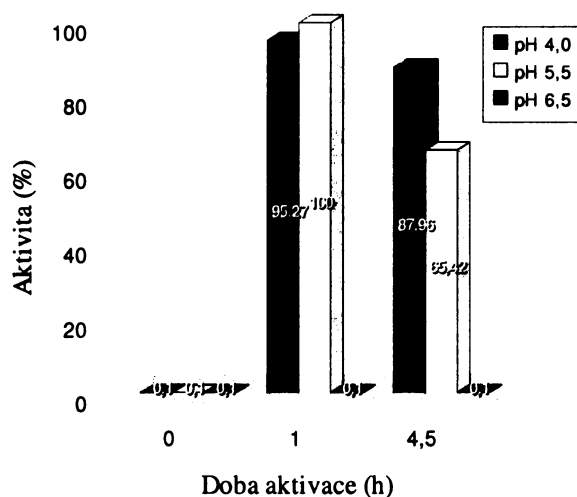


Obr. 4.1.1.2.2: **Optimalizace refoldingu katepsinu B.** A) **Optimalizace refoldingové směsi.** Refolding probíhal 24 h ve třech ve třech variantách refoldingových směsí (osa x): A/ 50 mM Tris pH 8,0; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG; B/ 50 mM Tris pH 7,1; 0,25 M L-arginin; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG; C/ 50 mM Tris pH 8,0; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Aktivita katepsinu B byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y). B) **Závislost na koncentraci proteinu a době refoldování.** Refolding probíhal 2-5 dní (osa x) ve variantě směsi C (viz panel A). Výsledná koncentrace proteinů během refoldingu je uvedena. Aktivita byla měřena jako v panelu A.

4.1.1.3 Aktivace proenzymu

4.1.1.3.1 Vliv pH

Refoldovaný proenzym se následně auto-aktivoval převedením do prostředí o pH 4,0; 5,5; 6,5 a přidáním DTT. V časech 0; 1 a 4,5 h se měřila aktivita katepsinu B v testu při pH 5,5 s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. (Obr. 4.1.1.3.1). Výsledky ukázaly, že aktivace prokatepsinu B probíhá pouze v pH 4,0 a 5,5, při pH 6,5 neprobíhá; v pH 4,0 a 5,5 se aktivovalo přibližně stejné množství proenzymu, který si udržuje aktivitu i po 4,5 h aktivace.

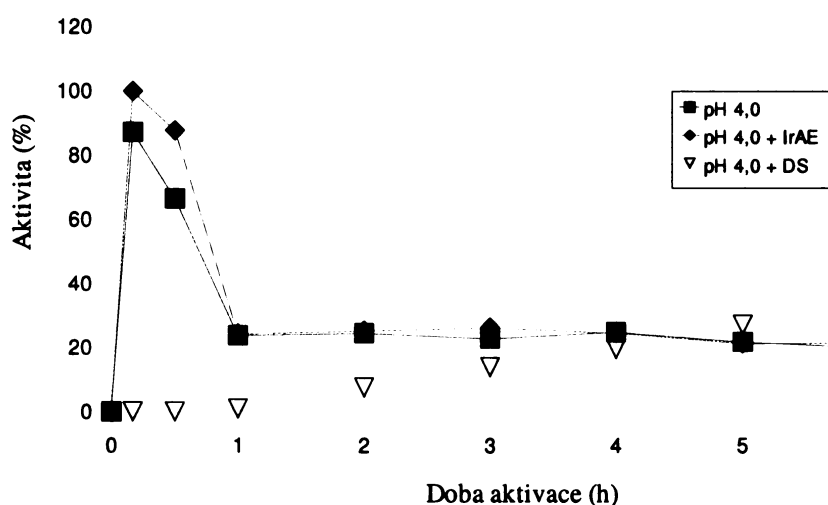


Obr. 4.1.1.3.1: **Vliv pH na aktivaci prokatepsinu B.** Aktivace proenzymu v uvedených pH se měřila v časových intervalech (osa x) pomocí testu provedeném při pH 5,5 se substrátem Z-FR-AMC. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.1.3.2 Průběh aktivace a její modulace

Sledovala se aktivace prokatepsinu B v pH 4,0 a v přítomnosti dextran sulfátu (DS), neboť byla publikována schopnost sulfatovaných polysacharidů usnadňovat aktivaci lidského prokatepsinu B [65]. Také byla testována možnost trans-aktivace prokatepsinu B asparaginylní endopeptidasou (legumainem), jak bylo popsáno pro schistosomální prokatepsin B, který obsahuje v prosegmentu aminokyselinovou sekvenci vhodnou pro hydrolýzu právě legumainem [66].

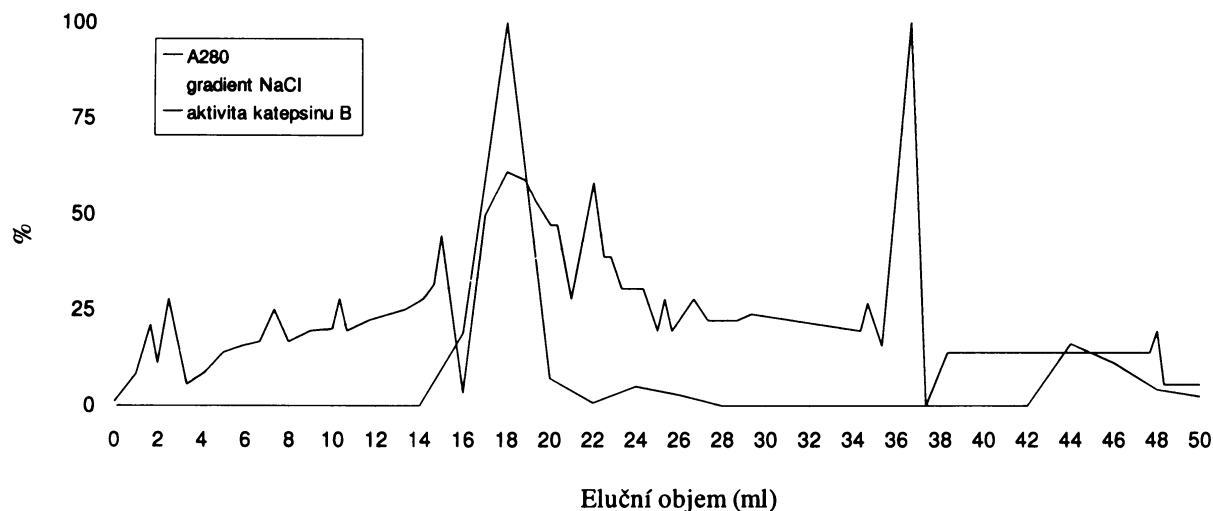
Proenzym se nechal aktivovat pouze v pH 4,0 nebo v pH 4,0 v přítomnosti DS případně legumainu. Aktivita katepsinu B byla měřena při pH 5,5 v testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (Obr. 4.1.1.3.2). Ve všech případech docházelo k auto-aktivaci proenzymu. Při pH 4,0 a v přítomnosti legumainu se proenzym zcela aktivoval po 10 min aktivace a po 1 hodině aktivita prudce klesla. Z kinetického testu nevyplývá, že by legumain umožnil lepší trans-aktivaci prokatepsinu B. V přítomnosti DS aktivita rostla pouze pomalu a ani po 7 h aktivace nedosáhla maxima.



Obr. 4.1.1.3.2: Průběh aktivace prokatepsinu B. Aktivace proenzymu probíhala v pH 4,0 a v přítomnosti DS nebo legumainu. Aktivita katepsinu B detekovaná štěpením substrátu Z-FR-AMC v pH 5,5 je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.1.4 Chromatografická purifikace refoldovaného proteinu

Využitím iontoměničové chromatografie s kolonou MonoS HR 5/5 se separovala aktivní forma katepsinu B od špatně refoldovaného a neaktivovaného prokatepsinu B (Obr. 4.1.1.4, str. 50). Na kolonu bylo naneseno 100 ml aktivovaného katepsinu B. Eluce z kolony probíhala lineárním gradientem 0-0,5 M NaCl v pufru o pH 4,2. Aktivní forma katepsinu B byla detekována v testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. Nejvyšší aktivita přečištěného katepsinu B se nachází v elučním objemu 16-20 ml.



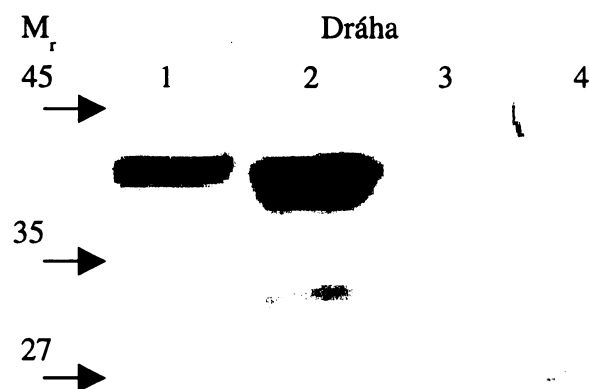
Obr. 4.1.1.4: **Izolace katepsinu B chromatografií na koloně MonoS.** Na kolonu byl nanesen refoldovaný aktivovaný katepsin B, jehož pH bylo upraveno na pH 4,2. Eluce probíhala lineárním gradientem 0-0,5 M NaCl v pufru o složení: 50 mM Na-Ac pH 4,2; 10% glycerol; 0,05% 2-merkptoethanol. Sbírány byly frakce po 2 ml (osa x). Průběh chromatografie byl monitorován absorbcí při 280 nm a stanovením enzymatické aktivity katepsinu B v jednotlivých frakcích. Měřené parametry jsou normalizovány na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.2 Charakterizace katepsinu B

4.1.2.1 Analýza aktivní formy katepsinu B

Po purifikaci aktivního katepsinu B pomocí FPLC na koloně MonoS HR 5/5, se spojené frakce obsahující aktivní katepsin B analyzovaly na SDS-PAGE (Obr. 4.1.2.1, dráha č. 3, str. 51). Aktivovaný katepsin B migroval jako pás s M_r cca 27 kDa, naproti tomu denaturovaný nebo refoldovaný prokatepsin B tvoří pásy s M_r cca 40 kDa (Obr. 4.1.2.1, dráhy č. 1 a 2, str. 51)

Pro identifikaci aktivovaného katepsinu B v gelu se použila metoda fluorescenčního afinitního značení. Katepsin B se před elektroforetickým dělením inkuboval s ireverzibilním inhibitorem cysteinových peptidas DCG04 s navázanou fluorescenční značkou Bodipy 530/550 (Green-DCG04) [60]. Využitím fluorescenčního skeneru s laserem o vlnové délce 532 nm a emisním filtrem o 550 nm se vizualizoval pás s M_r cca 27 kDa (Obr. 4.1.2.1, dráha č. 4, str. 51).

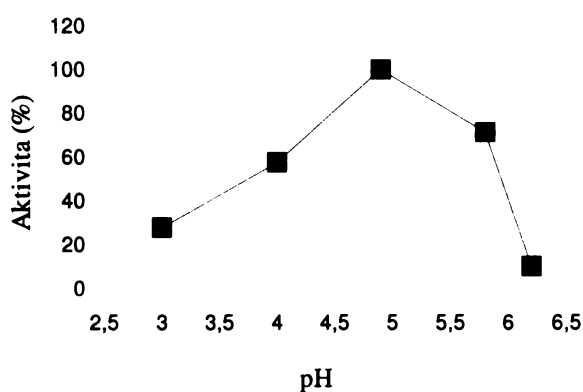


Obr. 4.1.2.1: Analýza aktivní formy katepsinu B na SDS-PAGE. Šipky značí velikost složek standardu.

Dráha:	M_r	Relativní molekulová hmotnost v kDa
	1	Nerelaxovaný prokatepsin B, barvení proteinů stříbrem.
	2	Relaxovaný prokatepsin B, barvení proteinů stříbrem.
	3	Aktivovaná forma katepsinu B, barvení proteinů stříbrem.
	4	Aktivovaná forma katepsinu B, vizualizovaná pomocí fluorogenní značky, která se kovalentně váže do aktivního místa.

4.1.2.2 Závislost aktivity na pH

Pro stanovení pH profilu katepsinu B se použil fluorogenní substrát Z-FR-AMC. Katepsin B štěpí tento substrát v kyselé oblasti v pH 4,5-5,5 (Obr. 4.1.2.2). Při přechodu z pH 5 k zásaditějším nebo kyselějším hodnotám dochází k pozvolnému poklesu proteolytické aktivity katepsinu B.

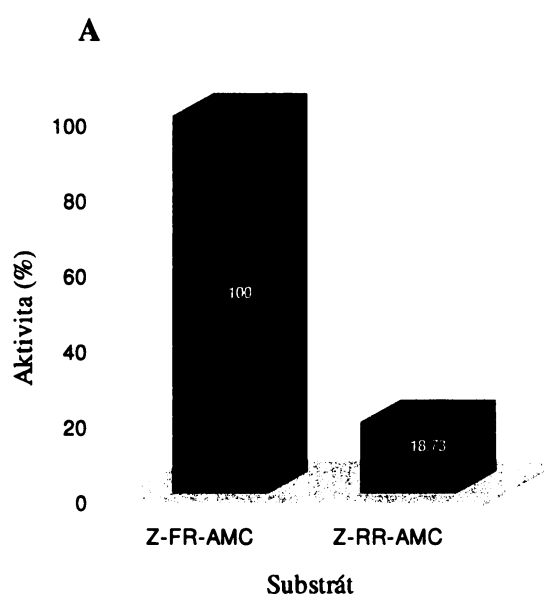


Obr. 4.1.2.2: Stanovení pH profilu katepsinu B. Jako substrát se použil Z-FR-AMC. Stanovení aktivity katepsinu B v prostředí o různém pH je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.2.3 Substrátová specifita

Lidský katepsin B preferuje na pozici P1 endopeptidasových substrátů především Arg, na pozici P2 akceptuje Phe nebo Arg [43]. Možnost hydrolyticky štěpit peptidovou vazbu u endopeptidasových substrátů s Arg na pozici P2 ho odlišuje od katepsinu L, který není schopen takové substráty štěpit. U fluorogenních substrátů Z-FR-AMC a Z-RR-AMC (Obr. 4.1.2.3) se sledovala jejich degradace v přítomnosti klíčícího katepsinu B.

Katepsin B štěpí oba substráty, přičemž degradace Z-RR-AMC je v porovnání se Z-FR-AMC přibližně pětkrát méně účinná.

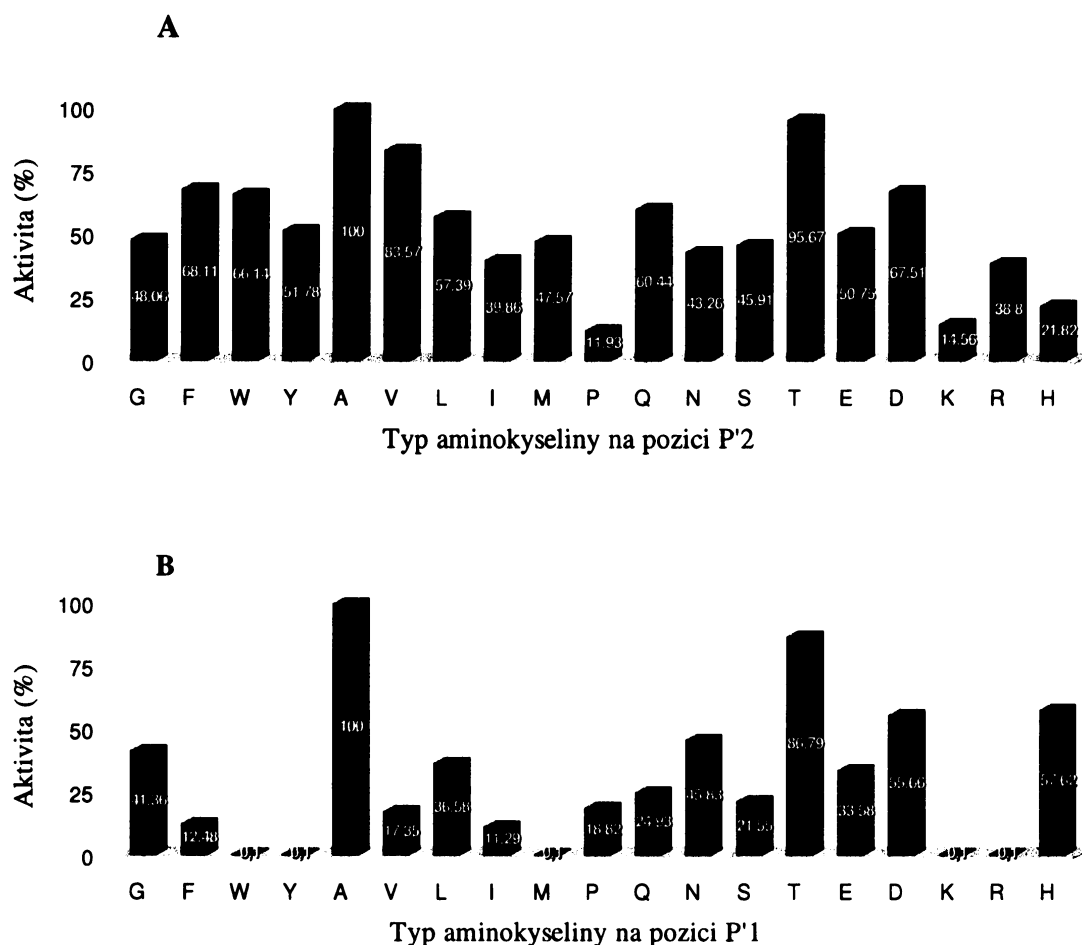


Obr. 4.1.2.3 **Specifita katepsinu B k endopeptidasovým substrátům.** Rozsah hydrolyzy substrátů Z-FR-AMC a Z-RR-AMC (osa x) je vyjádřen v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

Sledovala se také exopeptidasová (dipeptidyl peptidasová) aktivita katepsinu B se 2 sadami 19 syntetických substrátů Abz-FRF^{*}X-OH a Abz-FRXF^{*}-OH (kde F^{*} je nitrofenylalanin). Tyto substráty obsahují pozice P2-P'2. Na pozicích X (pozice P'1 a P'2) mají jednu z 19 proteinogenních aminokyselin (kromě cysteinu). Každá taková aminokyselina s odlišným postranním řetězcem ovlivňuje afinitu substrátu ke katepsinu B v jeho aktivním místě. To se projeví na výsledné aktivitě katepsinu B a vede k určení substrátové specifity ve vazebných místech S'1 a S'2.

U sady substrátů Abz-FRF^{*}X-OH a Abz-FRXF^{*}-OH je nejvyšší hydrolytická

aktivita katepsinu B pozorovatelná, jsou-li na pozicích P'2 resp. P'1 aminokyseliny s ne příliš objemným postranním řetězcem, konkrétně Ala, Thr a Asp (Obr. 4.1.2.3.1 A a B).



Obr. 4.1.2.3.1: Určení substrátové specificity katepsinu B ve vazebných místech S1' a S2'. Aktivita katepsinu B byla stanovena v kinetickém fluorescenčním testu u sady 19 exopeptidasových substrátů Abz-FRFX-OH (A) a Abz-FRFX'-OH (B), kde X značí uvedené proteinogenní aminokyseliny (osa x). Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.1.2.4 Inhibiční specifita

Byla určena inhibiční specifita katepsinu B s vybranými ireversibilními inhibitory cysteinových peptidas. V kinetickém testu se substrátem Z-FR-AMC byla stanovována zbytková aktivita katepsinu B po inkubaci s inhibitory a porovnávána s neinhibovaným katepsinem B. Aktivita katepsinu B se stanovila v přítomnosti těchto specifických

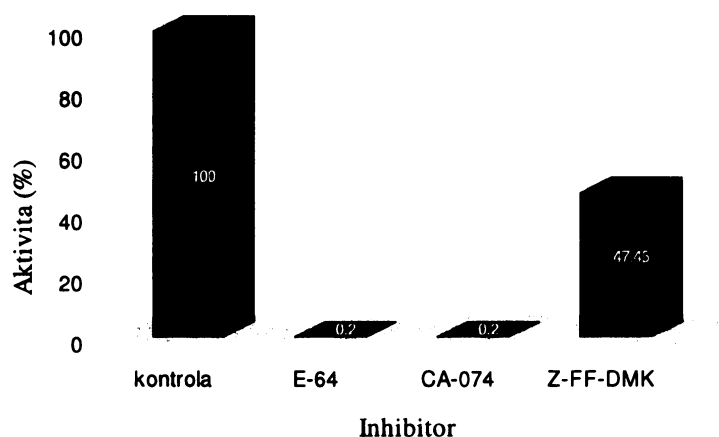
inhibitorů:

E-64 skupinový inhibitor cysteinových peptidas papainového typu

CA-074 inhibitor katepsinu B

Z-FF-DMK inhibitor katepsinu L

V přítomnosti inhibitorů o výsledné 5 μM koncentraci E-64 a CA-074 došlo k absolutnímu zablokování aktivity katepsinu B. V přítomnosti Z-FF-DMK došlo k přibližně 50% inhibici (Obr. 4.1.2.4).



Obr. 4.1.2.4: Inhibiční specifita katepsinu B s vybranými inhibitory cysteinových peptidas. Zobrazena je zbytková aktivita katepsinu B (v relativních fluorescenčních jednotkách) v přítomnosti 5 μM inhibitorů E-64, CA-074, Z-FF-DMK (osa x) vztažená k neinhibovanému katepsinu B.

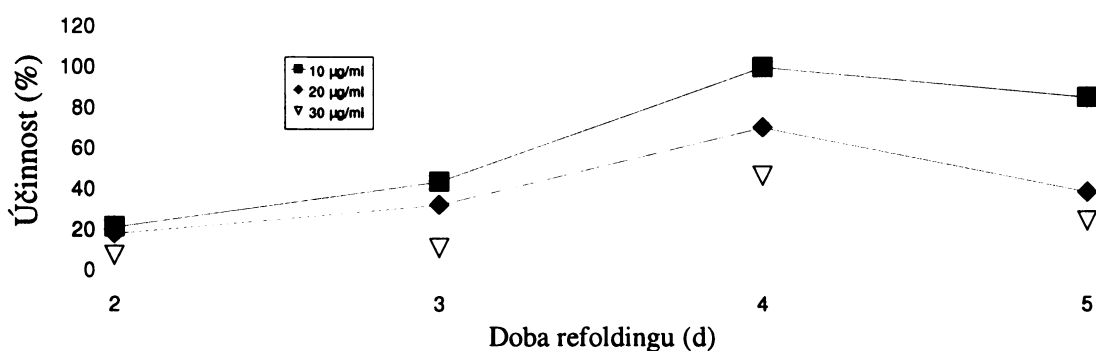
4.2 Katepsin L

4.2.1 Příprava rekombinantního katepsinu L

4.2.1.1 Optimalizace refoldingu

Rekombinantní prokatepsin L přečištěný pomocí afinitní chromatografie (kolona Ni-NTA) byl přidán do 100 μ l preinkubačního roztoku s výslednou koncentrací 50 mM GSH a 100-300 μ g proteinů/ml. Poté se směs za míchání postupně přidala do 900 μ l refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris pH 8,0; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Prokatepsin L nechal ve směsi refoldovat po dobu 2-5 dnů při 4°C (Obr. 4.2.1.1). Účinnost refoldingu prokatepsinu L se stanovovala pomocí aktivitního testu, jakožto míra štepení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC. Aktivitní test obsahoval úvodní aktivační krok v kyselém pH umožňující konverzi prokatepsinu L na aktivní enzym (Kap. 3.3.4, str. 36).

Výsledky ukázaly, že do 4. dne účinnost refoldingu rostla. Vyšší aktivita katepsinu L je pozorovatelná v případě koncentrace 10 μ g proteinů/ml, oproti 20 a 30 μ g proteinů/ml (ve finální refoldingové směsi), tj. zvyšování koncentrace proteinů ve finální směsi pouze snižovalo účinnost refoldingu.



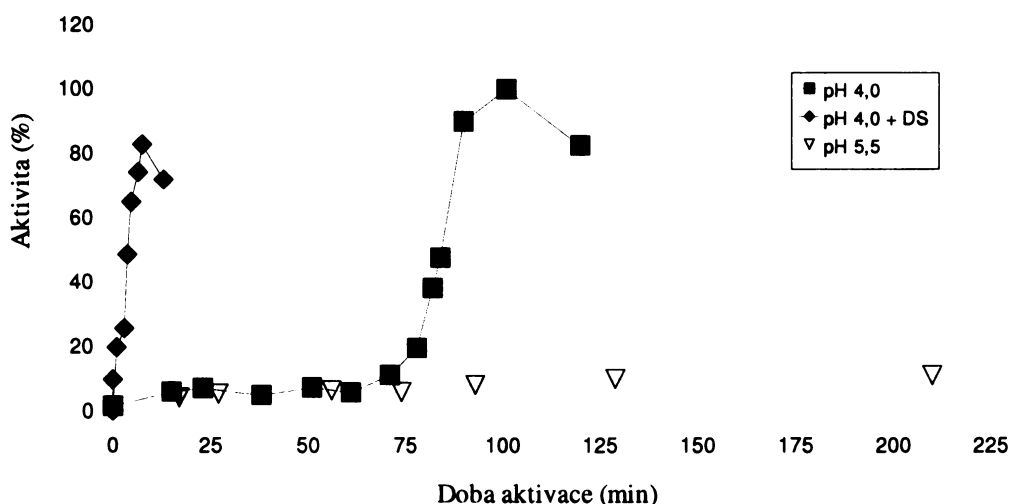
Obr. 4.2.1.1: Závislost účinnosti refoldingu na koncentraci proteinu a době refoldování. Refolding probíhal 2-5 dní (osa x) po přidání k refoldingové směsi o složení: 50 mM Tris pH 8,0; 30% glycerol; 0,05% PEG 1500; 0,5 mM GSSG. Výsledná koncentrace proteinů během refoldingu je uvedena. Aktivita katepsinu L byla měřena po aktivaci a je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.1.2 Aktivace proenzymu

4.2.1.2.1 Vliv pH a dextran sulfátu

Refoldovaný proenzym se následně auto-aktivoval převedením do prostředí o pH 4,0 nebo 5,5 a nebo pH 4,0 v přítomnosti dextran sulfátu (DS). V časových intervalech se měřila aktivita katepsinu L v testu při pH 4,0 s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC (Obr. 4.2.1.2.1).

Výsledky ukázaly, že se katepsin L v prostředí pH 4,0 kompletně aktivoval po 100 min. V přítomnosti DS, došlo k urychlení auto-aktivačního procesu, takže po 10 min byl katepsin L zcela aktivován. V pH 5,5 k auto-aktivaci prokatepsinu L nedošlo ani po 200 min.



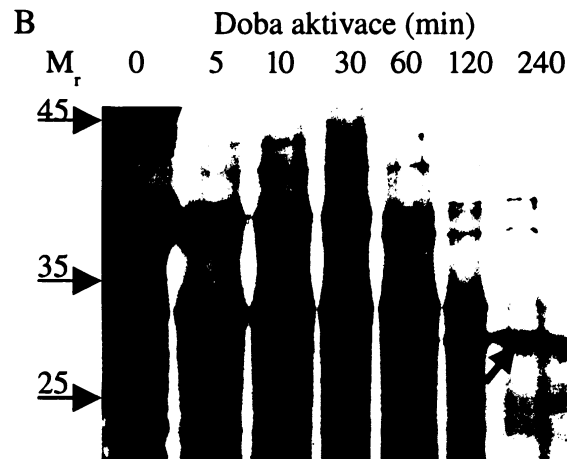
Obr. 4.2.1.2.1: Vliv pH a dextran sulfátu (DS) na aktivaci prokatepsinu L. Aktivace proenzymu probíhala při uvedených hodnotách pH a v přítomnosti DS. Výsledná aktivita se měřila v časových intervalech (osa x) pomocí testu provedeném při pH 4,0 se substrátem Z-FR-AMC. Aktivita je vyjádřena v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.1.2.2 Průběh aktivace

Ke sledování průběhu aktivace prokatepsinu L při pH 4,0 byla využita kromě aktivního testu (Obr. 4.2.1.2.1) také analýza pomocí SDS-PAGE.

Pomocí SDS-PAGE byla sledována aktivace prokatepsinu L v časových intervalech 0-240 min (Obr. 4.2.1.2.2 B, str. 57). Pás zymogenu s M_r cca 40 kDa se s postupujícím

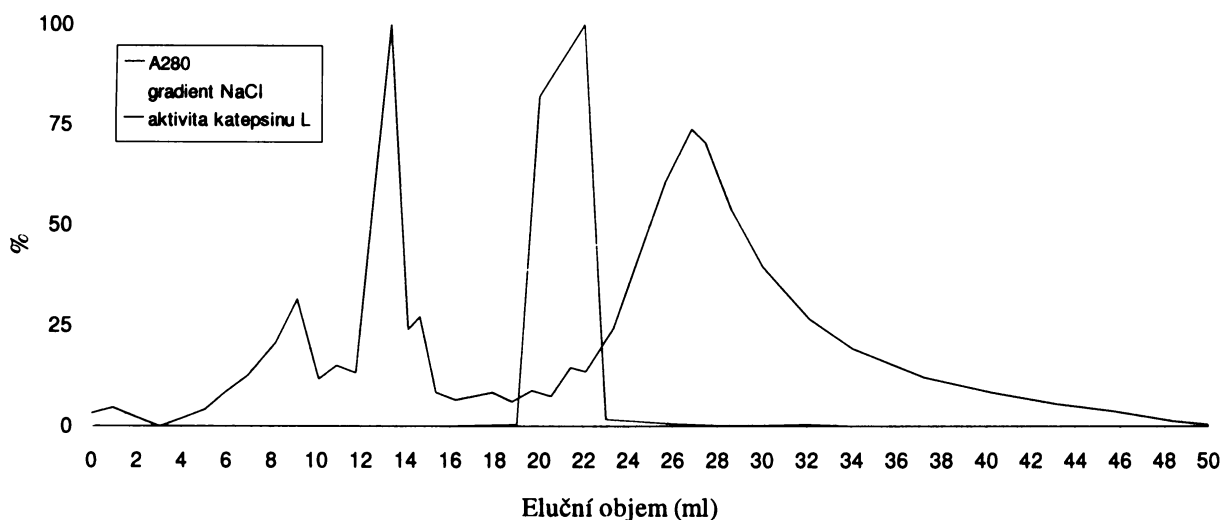
časem ztrácel. Docházelo k jeho vnitřní konverzi na aktivní formu katepsinu L (pás s M_r cca 32 kDa). Po 1 h auto-aktivace postupně mizel i tento pás a v časech 2 a 4 h od aktivace vznikaly pásy s M_r cca 30 kDa. Tento výsledek vysvětluje data z aktivitního testu, kdy rostla aktivita katepsinu L do 100 min po aktivaci (Obr. 4.2.1.2.1, str. 56) a poté došlo ke ztrátě aktivity, zjevně v důsledku auto-degradační činnosti katepsinu L.



Obr. 4.2.1.2.2: Sledování průběhu aktivace prokatepsinu L pomocí SDS-PAGE. Pásy s M_r cca 40 kDa představují prokatepsin L (zelená šipka). Pásy s M_r cca 32 a 30 kDa představují konvertovaný prokatepsin L (zelená resp. červená šipka). Černé šipky značí velikost složek standardu.

4.2.1.3 Chromatografická purifikace refoldovaného proteinu

Využitím iontoměničové chromatografie s kolonou MonoQ HR 5/5 se separoval správně refoldovaný od špatně refoldovaného prokatepsinu L (Obr. 4.2.1.3, str. 58). Na kolonu bylo nanášeno 100 ml finální refoldingové směsi obsahující prokatepsin L. Eluce z kolony probíhala lineárním gradientem 0-0,5 M NaCl v pufru o pH 8,0. Správně refoldovaná forma prokatepsinu L byla detekována po aktivaci (Kap. 3.3.4, str. 36) v testu s fluorogenním substrátem Z-FR-AMC. Tento materiál se nachází v elučním objemu 19-23 ml.



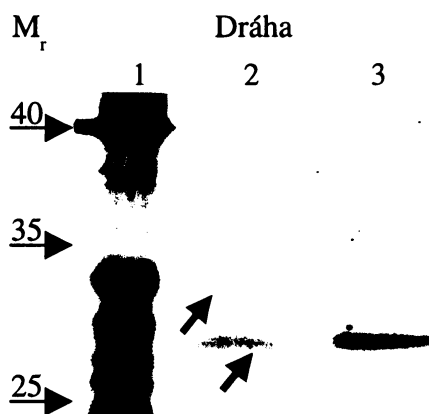
Obr. 4.2.1.3: Izolace prokatepsinu L chromatografií na koloně MonoQ. Na kolonu byl nanesen refoldovaný prokatepsin L v pH 8,0. Eluce probíhala lineárním gradientem 0-0,5 M NaCl v pufru o složení: 50 mM Tris pH 8,0; 10% glycerol; 0,05% 2-merkptoethanol. Sbírány byly frakce po 2 ml (osa x). Průběh chromatografie byl monitorován absorbcí při 280 nm a stanovením enzymatické aktivity katepsinu L v jednotlivých frakcích. Měřené parametry jsou normalizovány na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.2 Charakterizace katepsinu L

4.2.2.1 Analýza aktivní formy katepsinu L

Po purifikaci prokatepsinu L pomocí FPLC na koloně MonoQ HR 5/5, se spojené frakce obsahující prokatepsin L nechaly aktivovat 1 h (Kap. 3.3.4, str. 36) a poté se analyzovaly pomocí SDS-PAGE (Obr. 4.2.2.1, dráhy č. 1 a 2, str. 59). Neaktivovaný prokatepsin L (pás s M_r cca 40 kDa) a aktivovaný katepsin L (pásky s M_r cca 30 a 32 kDa) byly patrné po barvení stříbrem.

Pro identifikaci aktivovaného katepsinu L v gelu se použila metoda fluorescenčního afinitního značení. Katepsin L se před elektroforetickým dělením inkuboval s ireverzibilním inhibitorem cysteinových peptidas DCG04 s navázanou fluorescenční značkou Bodipy 530/550 (Green-DCG04) [60]. Využitím fluorescenčního skeneru se vizualizovaly pásky s M_r cca 30 a 32 kDa, které byly touto metodou prokázány jako aktivní formy enzymů (Obr. 4.2.2.1, dráha č. 3, str. 59).

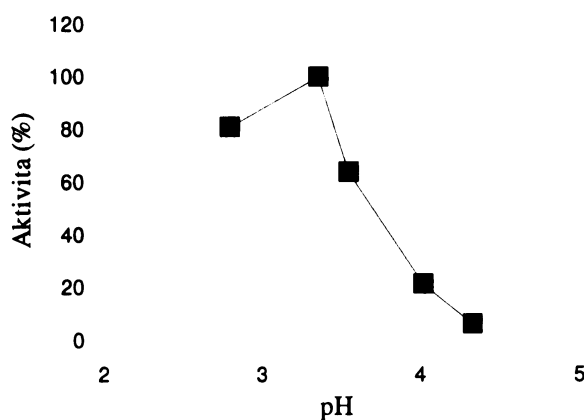


Obr. 4.2.2.1: Analýza aktivní formy katepsinu L na SDS-PAGE. Černé šipky značí velikost složek standardu. Zelená šipka ukazuje pozici prokatepsinu L, červená a modrá šipka ukazuje formy aktivovaného katepsinu L.

Dráha:	M_r	Relativní molekulová hmotnost v kDa
1		Refoldovaný prokatepsin L , barvení proteinů stříbrem.
2		Aktivovaná forma katepsinu L, barvení proteinů stříbrem.
3		Aktivovaná forma katepsinu L, vizualizovaná pomocí specifické fluorescenční značky, která se kovalentně váže do aktivního místa.

4.2.2.2 Závislost aktivity na pH

Pro stanovení pH profilu katepsinu L se použil fluorogenní substrát Z-FR-AMC. Katepsin L štěpí tento substrát v kyselé oblasti výrazně v pH 3,0-3,5 (Obr. 4.2.2.2). Enzym není aktivní při pH vyšším než 4,5.

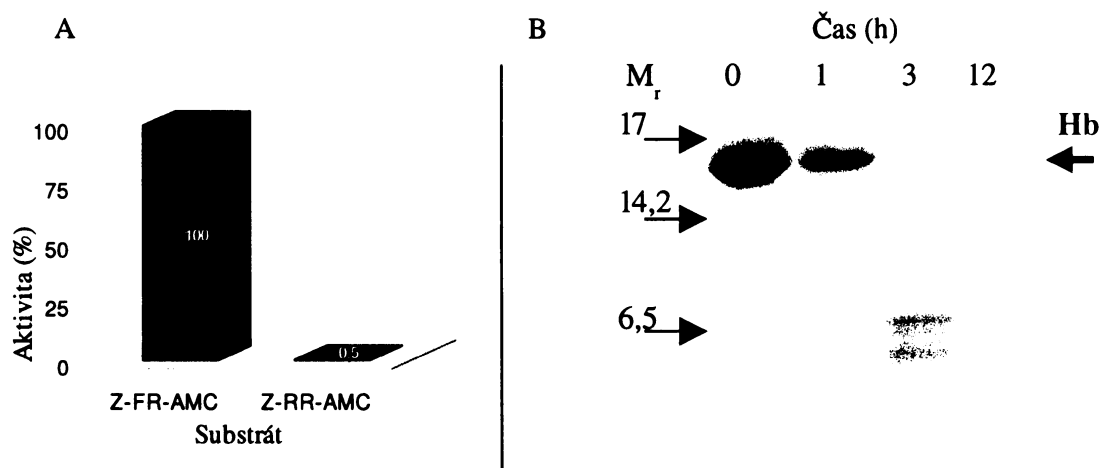


Obr. 4.2.2.2: Stanovení pH profilu katepsinu L. Jako substrát se použil Z-FR-AMC. Stanovení aktivity katepsinu L v prostředí o různém pH je vyjádřeno v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y).

4.2.2.3 Substrátová specifita

Lidský katepsin L preferuje na pozici P1 především Arg, na pozici P2 akceptuje Phe, nikoli však Arg jako je tomu u katepsinu B [43]. U fluorogenních substrátů Z-FR-AMC a Z-RR-AMC (Obr. 4.2.2.3 A) se sledovala jejich hydrolýza v přítomnosti katepsinu L. Z výsledků je patrná schopnost katepsinu L štěpit substrát Z-FR-AMC, zatímco Z-RR-AMC, dle předpokladu, nebyl štěpen vůbec.

Hemoglobin je jednou z nejdůležitějších složek potravy klíštěte. Katepsin L patří mezi hlavní endopeptidasy, podílející se na úvodní degradaci hemoglobinu [32]. Analyzovala se proto degradace hemoglobinu katepsinem L v pH 4,0 v závislosti na čase pomocí Tricin SDS-PAGE (Obr. 4.2.2.3 B). S postupujícím časem mizel pás hemoglobinu s M_r cca 16 kDa, po 3 h vznikly degradační produkty jako pásy s M_r cca 6,5 kDa, které byly po 12 h rozštěpeny na malé peptidy, které SDS-PAGE neumožňuje detekovat.



Obr. 4.2.2.3: **Analýza substrátové specifity katepsinu L.** A/ Štěpení endopeptidásových substrátů. Rozsah hydrolýzy substrátů Z-FR-AMC a Z-RR-AMC (osa x) je vyjádřen v procentech relativních fluorescenčních jednotek normalizovaných na 100% nejvyšší naměřené hodnoty (osa y). B) Degradace Hb v závislosti na čase analyzovaná pomocí Tricin SDS-PAGE. V jednotlivých drahách byl hovězí hemoglobin (Hb, červená šipka) degradován katepsinem L po dobu 0-12 h. Černé šipky značí velikost složek standardu.

4.2.2.4 Inhibiční specifita

Byla určena inhibiční specifita katepsinu L s vybranými ireversibilními inhibitory cysteinových peptidas. V kinetickém testu se substrátem Z-FR-AMC byla stanovována

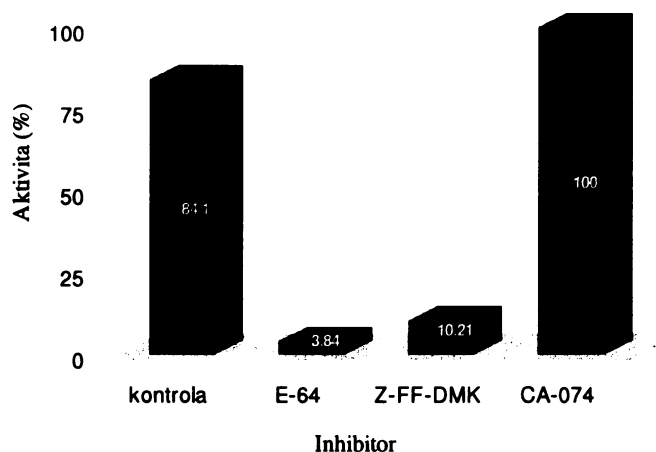
zbytková aktivita katepsinu L po inkubaci s inhibitory a porovnána s neinhibovaným katepsinem L. Aktivita katepsinu L se stanovila v přítomnosti těchto specifických inhibitorů:

E-64 skupinový inhibitor cysteinových peptidas papainového typu

CA-074 inhibitor katepsinu B

Z-FF-DMK inhibitor katepsinu L

V přítomnosti inhibitorů o výsledné 5 μ M koncentraci E-64 a Z-FF-DMK došlo k téměř absolutnímu zablokování aktivity katepsinu B. V přítomnosti CA-074 k inhibici nedošlo (Obr. 4.2.2.4).



Obr. 4.2.2.4: **Inhibiční specifita katepsinu L s vybranými inhibitory cysteinových peptidas.** Zobrazena je zbytková aktivita katepsinu L (v relativních fluorescenčních jednotkách) v přítomnosti 5 μ M inhibitorů E-64, CA-074, Z-FF-DMK (osa x) vztažená k neinhibovanému katepsinu L.

5 Diskuse

Diplomová práce se zabývala cysteinovými peptidasami papainového typu, katepsinem B a L z klíštěte *Ixodes ricinus*. Sekvence proenzymů byly identifikovány z cDNA knihovny střevní tkáně klíštěte *I. ricinus*, kde jsou oba enzymy podle qRT-PCR výlučně expimovány [65]. V laboratoři ÚOCHB byl nedávno pomocí metod funkční proteomiky identifikován komplexní proteolytický systém, zahrnující peptidasy několika tříd, jehož funkcí je trávení krevních proteinů hostitele, především hemoglobinu [32]. Katepsin B a L jsou důležitou součástí tohoto systému, který efektivně degraduje hemoglobin výsledně až na dipeptidy a aminokyseliny nezbytné pro metabolismus klíštěte. Předkládaná diplomová práce je zaměřena na získání aktivního rekombinantního katepsinu B a L po expresi v *E. coli* a jejich následnou biochemickou charakterizaci.

Po expresi prokatepsinů B a L v *E. coli* a jejich purifikaci z inkluzních tělísek afinitní chromatografií (Ni-NTA Sepharosa), se hledala základní strategie, která by umožnila dosáhnout úspěšného refoldingu, tj. převedení obou proteinů na nativní konformaci. Byly testovány dva základní protokoly refoldingu regulovaného pomocí pH [55, 62]. Vhodným typem refoldingu se ukázal pro oba studované prokatepsiny "bazický" refolding, jako tomu bylo u příbuzných parazitických cysteinových proteas, např. u prvoků *Plasmodium falciparum* [62] nebo *Entamoeba histolytica* [67].

Dále byla v práci studována aktivace prokatepsinů B a L, tj. konverze na aktivní formu enzymu. Probíhala auto-aktivačním procesem v kyselém prostředí pH 4,0; u katepsinu B (nikoli katepsinu L) také při pH 5,5. Sulfatovaný polysacharid dextran sulfát (DS) proces auto-aktivace prokatepsinu L urychluje, avšak v případě katepsinu B je jeho efekt opačný. To je nečekané zjištění, neboť DS auto-aktivaci cysteinových peptidas rodiny papainu obecně urychluje [68]. Děje doprovázející aktivaci na proteinové úrovni byly zároveň sledovány pomocí analýzy N-koncové aminokyselinové sekvence. Předběžné výsledky naznačují místa štěpení: prokatepsin B se aktivuje odštěpením celého prosegmentu, prokatepsin L odstraněním větší části prosegmentu.

Aktivace prokatepsinu B z *I. ricinus* se odlišuje od blízkého homologu prokatepsinu B ze *Schistosoma mansoni*, který není schopen auto-aktivace, ale pouze trans-aktivace pomocí asparaginylyl endopaptidasy (legumainu) [69]. Modulace aktivace

prokatepsinu B z *I. ricinus* pomocí legumainu nebyla ale prokázána.

Biochemická charakterizace enzymů byla provedena provedla s materiálem purifikovaným pomocí navržené izolační procedury zahrnující iontoměničovou chromatografii. Byla určena závislost aktivity na pH, substrátová a inhibiční specifická. Testovaly se modelové substráty pro cysteinové endopeptidasy: Z-RR-AMC byl štěpen katepsinem B, zatímco Z-FR-AMC byl štěpen oběma katepsiny B a L, což odpovídá obecné specifické známé také u savčích homologů těchto peptidas. Určilo se pH optimum katepsinu B a L při hydrolytickém štěpení fluorogenního substrátu Z-FR-AMC. Pro katepsin B se pH optimum nachází v rozmezí pH 4,5-5,5 a pro katepsin L v rozmezí pH 3,0-3,5. Oba enzymy katalyzují hydrolytické procesy v kyselém prostředí, což odpovídá výsledkům získaným při studiu pH optim pro katepsin B a L v extraktu střevní tkáně klíštěte *I. ricinus* [33]. U katepsinu B se testovala také její exopeptidásová aktivita (přesněji peptidyl dipeptidásová aktivita, odštěpující dipeptidy z C-konce substrátů) [46] pomocí knihovny syntetických substrátů typu Abz-FRF*X-OH a Abz-FRXF*-OH (kde X je proměnná aminokyselina). Klíštěcí katepsin B preferoval v obou pozicích X aminokyseliny s menšími postranními řetězci - nepolárním (Ala), polárním (Thr) nebo negativně nabitým (Asp). U katepsinu L byla prokázána hemoglobinolytická aktivita, což potvrzuje předchozí předpoklad tohoto enzymu jako významné endopeptidasy, která se podílí na počáteční fragmentaci hemoglobinu [32].

V přítomnosti specifických inhibitorů pro katepsin B a L byla katalytická činnost obou peptidas eliminována. Oba enzymy byly blokovány skupinovým inhibitorem cysteinových peptidas papainového typu (E-64). Katepsin B byl dále inhibován pomocí CA-074 a katepsin L pomocí Z-FF-DMK, což jsou specifické inhibitory navržené pro savčí katepsin B resp. L. Oba enzymy zároveň interakovali s proteomickou značkou DCG-04 (irreversibilním inhibitorem s navázanou fluorogenní skupinou) specificky se vázající do aktivního místa, což usnadnilo detekci aktivní formy katepsinů B a L.

Výsledky této diplomové práce ukazují, že katepsiny B a L produkované ve střevě klíštěte *I. ricinus* vykazují výraznou exo- resp. endo-peptidasovou aktivitu, což potvrzuje jejich předpokládanou úlohu v proteolytické kaskádě degradace proteinů z krve hostitele. Tyto proteiny představují potenciální antigeny při vývoji vakcíny zabraňující sání klíštěte a patogenů.

6 Závěr

Byly připraveny a biochemicky charakterizovány dvě trávicí cysteinové peptidasy, katepsin B a L, z klíštěte obecného *I. ricinus*.

PŘÍPRAVA KATEPSINU B a L

Příprava těchto rekombinantních enzymů vycházela z materiálu inkluzních tělísek získaných expresí v bakteriích *E. coli* (Parazitologický ústav AVČR).

- ✓ Prokatepsiny byly izolovány z inkluzních tělísek pomocí afinitní chromatografie (na základě interakce s histidinovou kotvou proteinu) za denaturačních podmínek.
- ✓ Byly nalezeny podmínky pro refolding prokatepsinů pomocí ředící metody v alkalickém pH v oxidačně-redukčním systému využívajícím glutathion.
- ✓ Bylo zjištěno, že prokatepsiny jsou schopné auto-aktivace na aktivní formu v kyselém pH (se specifickým intervalem pH pro každý katepsin). Rychlost auto-aktivace je modulována v přítomnosti sulfatovaného polysacharidu, a to pozitivně u prokatepsinu L a negativně u prokatepsinu B.
- ✓ Při přípravě finálního enzymového preparátu byla využita purifikace pomocí iontoměničové FPLC.

CHARAKTERIZACE KATEPSINŮ B a L

- ✓ Aktivovaná forma katepsinů B a L byla vizualizována na SDS-PAGE pomocí fluorescenční značky Green-DCG04 vázající se do aktivního místa enzymu.
- ✓ Byla analyzována substrátová specifita katepsinů B a L. Testovány byly modelové fluorogenní peptidové substráty pro cysteinové endopeptidasy: Z-FR-AMC a Z-RR-AMC. Katepsin B štěpil oba substráty, zatímco katepsin L byl schopen štěpit pouze Z-FR-AMC. U katepsinu B byla prokázána exopeptidásová aktivita a určena její specifita s využitím knihovny syntetických substrátů typu Abz-FRF^{*}X-OH a Abz-FRFX^{*}-OH. U katepsinu L byla určena hemoglobinolytická aktivita.
- ✓ Bylo určeno pH optimum se substrátem Z-FR-AMC: Optimální hydrolýza byla pozorována v pH 4,5-5,5 pro katepsin B a pH 3,0-3,5 pro katepsin L.
- ✓ Byla analyzována inhibiční specifita katepsinů B a L. Katepsin B byl specificky inhibován pomocí inhibitoru CA-074 a katepsin L pomocí inhibitoru Z-FF-DMK.

7 Literatura

- 1) http://en.wikipedia.org/wiki/Leucochloridium_paradoxum (7.11.2008)
- 2) Marek Snowarski, www.atlas-rostlin.pl (7.11.2008)
- 3) Vokurka M., Hugo J. a kolektiv: Velký Lékařský Slovník, Maxdorf s. r. o. (2002)
- 4) Barker S. C., Murrell A.; *Parasitol* 129:7, 15-36 (2004)
- 5) Klompen J. S. H.; *Ann Entomol Soc Am* 85:55, 541-560 (1992)
- 6) Fukunaga M., Yabuki M., Hamase A., Oliver J. H. Jr., Nakao M.; *J Parasitol* 86(1), 38-43 (2000)
- 7) Nuttal P. A., Labuda M.; *Parasitology* 129:7, 177-189 (2004)
- 8) Jongejan F., Uilenberg G.; *Parasitology* 129:7, 3-14 (2004)
- 9) Bowman A. S., Bauer J. R.; *Parasitology* 129:7, 67-81 (2004)
- 10) Ostfeld R. S., Jones C. G., Wolff J. O.; *Bioscience* 46(5), 323-330 (1996)
- 11) Stafford III K. C.: Tick management handbook, www.caes.state.ct.us (22.11.2008)
- 12) Parola P., Raoult D.; *Clin Infect Dis* 32(6), 897-928 (2001)
- 13) Singh S. K., Girschick H. J.; *Curr Sci* 85:99, 1284-1298 (2003)
- 14) Valenzuela J. G.; *Parasitol* 129:7, 83-94 (2004)
- 15) Andrade B. B., Teixeira C. R., Barral A., Barral-Netto M.; *An Acad Bras Cienc* 77(4), 665-693 (2004)
- 16) Ribeiro J. M. C.; *Annu Rev Entomol* 32, 463-478 (1987)
- 17) Ribeiro J. M. C., Makoul G. T., Robinson D. R.; *J Parasitol* 74(6), 1068-1069 (1988)
- 18) Francischetti I. M., Valenzuela J. G., Andersen J. F., Mather T. N., Ribeiro J. M.; *Blood* 99(10), 3602-3612 (2002)
- 19) Iwanaga S., Okada M., Isawa H., Merita A., Yuda M., Chinzei Y.; *Chembiochem* 270(9), 1926-1934 (2003)
- 20) Ribeiro J. M.; *Exp Parasitol* 64(3), 347-353 (1987)
- 21) Ribeiro J. M., Weis J. J., Telford S. R.; *Exp Parasitol* 70(4), 382-388 (1990)
- 22) Kopecky J., Kuthejllova M.; *Parasite Immunol* 20(4), 169-174 (1998)
- 23) Schorderet S., Brossard M.; *Med Vet Entomol* 7(2), 186-192 (1993)
- 24) Steere A. C.; *N Engl J Med* 76, 115-125 (2001)
- 25) Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E., Davis J. P.; *Science* 216(4552), 1317-1319 (1982)

- 26) Paul U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L. K., Anderson J. F., Flavell R. A., Norgard M. V., Fikrig E.; *J Clin Invest* 113(2), 220-230 (2004)
- 27) Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pal U., Bao F., Yang X. F., Fish D., Anguita J., Norgard M. V., Kantor F. S., Anderson J. F., Koski R. A., Fikrig E.; *Nature* 436(7050), 573-577 (2005)
- 28) Blanco J. R., Oteo J. A.; *Clin Microbiol Infect* 8(12), 763-772 (2002)
- 29) Dumpis U., Crook D., Oksi J.; *Clin Infect Dis* 28(4), 882-890 (1999)
- 30) Homer M. J., Aguilar-Delfin I., Telford S. R., Krause P. J., Persing D. H.; *Clin Microbiol Rev* 13(3), 451-469 (2000)
- 31) Soneshine D. E., Hynes W. L., Cerual S. M., Mitchell R., Benzine T.; *Exp Appl Acarol* 36(3), 207-223 (2005)
- 32) Srba J.; Degradace hemoglobinu u klíštat: Bakalářská práce, PřF UK v Praze (2007)
- 33) Kovářová Z.; Trávicí enzymy klíštat: Bakalářská práce, PřF UK v Praze (2007)
- 34) Sajid M., McKerrow J. H.; *Mol Biochem Parasitol* 120(1), 1-21 (2002)
- 35) McKerrow J. H., Sun E., Rosenthal P. J., Bouvier J.; *Annu Rev Microbiol* 47, 821-853 (1993)
- 36) Tort J., Brindley P. J., Knox D., Wolfe K. H., Dalton J. P.; *Parasitol* 43, 161-266 (1999)
- 37) Billingsley P. F.; *Arch Insect Biochem Physiol* 15(3), 149-163 (1990)
- 38) Sajid M., Withers-Martinez C., Blackman M. J.; *J Biol Chem* 275(1), 631-641 (2000)
- 39) Hotez P., Haggerty J., Hawdon J., Milstone L., Gamble H. R., Schad G., Richards F.; *Infect Immun* 58(12), 3883-3892 (1990)
- 40) Frame M. J., Mottram J. C., Coombs G. H.; *Parasitology* 121(4), 367-377 (2000)
- 41) Stewart G. A., Bird C. H., Krska K. D., Colloff M. J., Thompson P. J.; *Exp Appl Acarol* 16(1-2), 165-180 (1992)
- 42) Caffrey C. R., Ruppel A.; *Parasitol Res* 83(6), 632-635 (1997)
- 43) McGrath M. E.; *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 181-204 (1999)
- 44) Beveridge A. J.; *Protein Sci* 5(7), 1355-1365 (1996)
- 45) Cygler M., Sivaraman J., Gruchulski P., Coulombe R., Storer A. C., Mort J. S.; *Structure* 4(4), 405-416 (1996)

- 46) Mort J. S., Buttle D. J.; *Int J Biochem Cell Biol* 26(5), 715-720 (1997)
- 47) Illy Ch., Quraishi O., Wang J., Purisima E., Vernet T., Mort J. S.; *J Biol Chem* 272(2), 1197-1202 (1997)
- 48) Musil D., Zucic D., Turk D., Engh R. A., Mayr I.; *EMBO J* 10(9), 2321-2330 (1991)
- 49) Ritonja A., Rowan A. D., Buttle D. J., Rawlings N. D., Turk V., Barrett A. J.; *FEBS Lett* 247(2), 419-424 (1989)
- 50) Buttle D., Ritonja A., Dando P., Abrahamson M., Shaw E., Wikstrom P., Turk V., Barrett A.; *FEBS Lett* 262(1), 58-60 (1990)
- 51) Otto H. H., Schirmeister T.; *Chem Rev* 97(1), 133-172 (1997)
- 52) Turk V., Bode W.; *FEBS Lett* 285(2), 213-219 (1991)
- 53) Sumiya S., Yoneda T., Kitamura K., Murata M., Yokoo C., Tamai M., Yamamoto A., Inoue M., Ishida T.; *Chem Pharm Bull* 40(2), 299-303 (1992)
- 54) Powers J. C., Asgian J. L., Ekici D., James K. E.; *Chem Rev* 102(12), 4639-4750 (2002)
- 55) Cheng Y. S. E., Yin F. H., Foundling S., Blomstrom D., Kettner C. A.; *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24), 9660-9664 (1990)
- 56) Schägger H.; *Nat Protoc* 1(1), 16-22 (2006)
- 57) Blakesley R.W., Boezy J.A.; *Anal Biochem* 82(2), 580-582 (1977)
- 58) Laemmli U. K.; *Nature* 227(5259), 680-685 (1970)
- 59) Blum H., Beier H., Gross H. J.; *Electrophoresis* 8(2), 93-99 (1987)
- 60) Greenbaum D., Baruch A., Hayrapetian L., Darula Z., Burlingame A., Medzihardsky K. F., Bogyo M.; *Mol Cell Proteomics* 1(1), 60-68 (2002)
- 61) Morita T., Kato H., Iwanaga S., Takada K., Kimura T.; *J Biochem* 82(5), 1495-1498 (1977)
- 62) Sijwali P. S., Brinen L. S., Rosenthal P. J.; *Protein Expr Purif* 22(1), 128-134 (2001)
- 63) Cheng Y. S. E., Yin F. H., Foundling S., Blomstrom D., Kettner C. A.; *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24), 9660-9664 (1990)
- 64) Rudolph R., Lilie H.; *The FASEB Journal* 10(1), 49-56 (1996)
- 65) Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdušek O., Caffrey C. R., Mareš M., Kopáček P.; *Parasit Vectors* 1(1), 1-13 (2008)
- 66) Mathieu M. A., Bogyo M., Caffrey C. R., Choe Y., Lee J., Chapman H., Sajid M.,

- Craik C. S., McKerrow J. H.; *Mol Biochem Parasitol* 121(1),99-105 (2002)
- 67) Hellberg A., Nowak N., Leippe M., Tannich E., Bruchhaus I.; *Protein Expr Purif* 24(1), 131-137 (2002)
- 68) Brömme D., Nallaseth F. S., Turk B.; *Methods* 32(2), 199-206 (2004)
- 69) Sajid M., McKerrow J. H., Hansell E., Mathieu M. A., Lucas K. D., Hsieh I., Greenbaum D., Bogyo M., Salter J. P., Lim K. C., Christopher F., Kim J. H., Caffrey C. R.; *Mol Biochem Parasitol* 131(1), 65-75 (2003)