

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Terézia Perháová

Diplomová práce

Katepsíny L cercárií *Diplostomum pseudospathaceum*

Cathepsins L of *Diplostomum pseudospathaceum* cercariae

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Praha, 2015

Po akovanie:

akujem svojmu kolite ovi RNDr. Liborovi Mike-ovi, Ph.D., pod jeho vedením som sa naučila samostatnosti a práci pod asovým stresom. alej akujem v-etkým lenom Helmintologickej laborato e, ktorých som rôzne otravovala so fliados ami o rady a vfdy boli ochotní a trpezliví (minimálne ma svojimi blbými vtipmi uvádzali do stálej nepohody). Menovite akujem za pomoc Hanke Dvo ákovej, Lucke Jedli kovej a Líbe Turjanicovej. Tiefl Jane Bulantovej, za pomoc s prácou s elektrónovým mikroskopom, pred ktorým som sa cítila ako opica vo vesmírnej stanici. Rada by som tiefl po akovala svojej rodine za zázemie, ktoré mi poskytli a za nekone né mnofstvo bezcenných rád a kon-tatovaní ako ve mi to nezvládam. Bez toho by moje -túdium a písanie závere nej práce bolo ove a menej napínavé.

Prohlá-ení:

Prohla-uji, fle jsem záv re nou práci zpracovala samostatn a fle jsem uvedla v-echny pouflité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná ást nebyla p edloflena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

.....

podpis

ABSTRAKT

Táto štúdia sa zaoberá cysteínovými peptidázami cercárií motolice *Diplostomum pseudospataceum*. Naväzuje na doterajší výskum, ktorý u cercárií biochemicky a hmotnostnou spektrometriou potvrdil prítomnosť cysteínovej peptidázy o veľkosti približne 24 kDa a postuloval jej histolytickú funkciu pri penetrácii tkanív cercáriami.

Pri pokuse o purifikáciu danej peptidázy a charakterizáciu jej peptidolytickej aktivity bolo zistené, že v homogenáte cercárií sa nachádza viac rôznych cysteínových peptidáz, líšiacich sa ich pI. Podľa peptidolytickej aktivity a testov jej inhibície ide o cathepsin L-like peptidázy, so širokým spektrom pH v ktorom sú aktívne a optimom aktivity pri slabom až neutrálnom pH.

Pomocou degenerovaných primerov vytvorených na základe konzervovaných miest cysteínových peptidáz bola získaná čiastočná sekvencia troch génov pre katepsíny L *D. pseudospataceum* (DpCL1, 2 a 3). Následne boli získané kompletne sekvencie génov DpCL2 a 3 a čiastočná sekvencia bez 5' konca DpCL1 pomocou RACE PCR.

Pre potvrdenie funkcie daných peptidáz bol uskutočnený pokus imunolokalizovať ich. Predpoklad bol, že sa nachádzajú v penetračných fázách. Preliminárne výsledky naznačujú, že by sa niektoré z katepsínov mohli nachádzať hlbšie v revách cercárií.

Pre detailnejšiu biochemickú charakterizáciu a imunolokalizáciu bol vytvorený rekombinantný katepsín DpCL3, ktorý je pravdepodobne cercáriami exprimovaný najviac.

Kľúčové slová

motolice, cercária, *Diplostomum*, proteáza, peptidáza, penetrácia, katepsín L

ABSTRACT

This study is focused on cercarial cysteine peptidases of the trematode *Diplostomum pseudospathaceum*. It follows previous research which confirmed the presence of a 24kDa cysteine peptidase in cercariae biochemically and by mass spectrometry. It was postulated, that the function of this peptidase is histolytic, when cercariae penetrate the tissues.

During an attempt to purify this peptidase and characterize its peptidolytic activity, it was found out that the cercarial homogenate contains more different peptidases varying in their pI. Tests of peptidolytic activity and inhibition have shown that these peptidases are cathepsin L-like. They are active over a broad spectrum of pH with optima of activities in weakly acidic or neutral pH.

Using degenerate primers based on conserved motifs of cysteine peptidases, partial sequences of three genes for cathepsin L of *D. pseudospathaceum* (DpCL1, 2 and 3) were obtained. Then the complete sequences of DpCL2 and 3 genes and partial sequence (without 5' end) of DpCL1 were obtained by RACE PCR.

To confirm function of these peptidases we tried to immunolocalize them. We assumed that they are localized in penetration glands. Preliminary results suggested that some of the cathepsins could be also localized in the gut of cercariae.

For more detailed biochemical characterization and immunolocalization the recombinant cathepsin DpCL3, which is probably the most expressed one by cercariae, has been produced.

Key words:

trematode, cercaria, *Diplostomum*, protease, peptidase, penetration, cathepsin L

Obsah

1. ÚVOD	7
2. LITERÁRNY PREHľad	8
2.1. MODELOVÝ ORGANIZMUS <i>DIPLOSTOMUM PSEUDOSPETHACEUM</i>	8
2.1.1. životný cyklus	8
2.1.2. Morfológia a anatómia cercárií	9
2.1.2.1. Penetračné formy cercárií	9
2.1.2.2. Tráviaca sústava cercárií	10
2.2. PEPTIDÁZY MOTOLÍC	10
2.2.1. Charakteristika cysteínových (lyzozomálnych) peptidáz so zameraním na katepsín L	11
2.3. PEPTIDÁZY MOTOLÍC ZAPOJENÉ V HISTOLÝZE HOSTITEĽSKÝCH TKANÍV	13
2.3.1. Peptidázy zapojené do invázie tkanív u zástupcov rodu <i>Fasciolidae</i>	14
2.3.2. Peptidázy <i>P. westermani</i> s funkciou histolýzy tkanív	16
2.3.3. Cercariálne peptidázy	16
2.3.3.1. Cercariálna elastáza schistosom	17
2.3.3.2. Cysteínové peptidázy cercárií zapojené do penetrácie hostiteľa	18
2.4. PEPTIDÁZY MOTOLÍC S FUNKCIOU TRÁVENIA	19
2.4.1. Trávenie u digenetických motolíc	19
2.4.2. Peptidázy <i>Fasciola spp.</i> zapojené do trávenia	19
2.4.4. Peptidázy u elade <i>Ophisthorchiidae</i> s funkciou trávenia	22
2.5. PEPTIDÁZY CERKÁRIÍ <i>D. PSEUDOSPETHACEUM</i>	22
3. METODIKA	24
3.1. ZBER A PRÍPRAVA MATERIÁLU	24
3.1.1. Izolácia RNA	24
3.1.2. Materiál na histologické spracovanie	24
3.1.3. Proteínové vzorky	24
3.2. BIOCHEMICKÉ METÓDY	25
3.2.1. Chromatografická purifikácia proteínov	25
3.2.1.1. Analýza proteínov vo frakciách po chromatografii	25
3.2.2. Meranie aktivity enzýmu	25
3.2.3. Detekcia cysteínových peptidáz biotinylovanou próbou	26
3.2.4. 2D elektroforéza	27
3.3. MOLEKULÁRNE METÓDY	28
3.3.1. Syntéza ss cDNA	28
3.3.2. PCR	29
3.3.3. Klonovanie do plazmidu a transformácia buniek <i>E. coli</i>	29
3.3.4. Kontrola transformácie buniek a izolácia plazmidu	30
3.3.5. 3' a 5' RACE PCR	31
3.3.5.1. Izolácia RNA a príprava cDNA	31
3.3.5.2. Modifikácie návodu kitu v príprave cDNA	32
3.3.5.3. 3' a 5' RACE	32
3.4. TVORBA REKOMBINANTNÉHO KATEPSÍNU L V <i>P. PASTORIS</i>	33
3.4.1. Transformácia kvasiniek <i>P. pastoris</i>	33
3.4.2. Expresia rekombinantného proteínu	36
3.5. HISTOLOGICKÉ METÓDY, IMUNOLOKALIZÁCIA, TEM	37
3.5.1. Histologické spracovanie vzoriek	37
3.5.1.1. Zalievanie tkanív do parafínu	37
3.5.1.2. Zalievanie cercárií do JB-4	37
3.5.1.3. Prehľadové farbenie parafínových a JB-4 rezov hematoxyln-eozínom	38
3.5.2. Imunolokalizácia katepsínu L v cercáriách	39
3.5.2.1. Tvorba protilátok	39

3.5.2.2.	Testovanie špecifity protilátok - Western blotting	39
3.5.2.3.	Imunohistochemická lokalizácia	40
3.4.3.	Príprava vzorkov na TEM	40
4.	VÝSLEDKY.....	42
4.1.	BIOCHEMICKÉ METÓDY	42
4.1.1.	Chromatografická purifikácia proteínov	42
4.1.2.	Meranie aktivity enzýmu	44
4.1.3.	Detekcia cysteínových peptidáz biotinylovanou próbou DCG-04.....	47
4.1.5.	Hmotnostná spektrometria (MS).....	49
4.2.	MOLEKULÁRNE METÓDY	50
4.2.1.	PCR.....	50
4.2.2.	3´ a 5´ RACE PCR.....	50
4.2.3.	Identifikácia a alignment génov	52
4.2.4.	Tvorba a expresia rekombinantného katepsínu	54
4.3.	HISTOLOGICKÉ FARBENIE, TEM A IMUNOLOKALIZÁCIA KATEPSÍNOV L.....	55
4.3.1.	Prehľadové mikroskopické pozorovanie anatómie cerkárií	55
4.3.2.	Tvorba protilátok a imunolokalizácia katepsínov L	57
5.	DISKUSIA	59
6.	ZÁVERE NÉ ZHRNUTIE.....	67
	PRÍLOHA : POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, KITY, PRIMERY SOFTWARE	69
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	73

1. ÚVOD

Diplostomum pseudospathaceum je strigeidná motolica z e ade Diplostomidae. Má troj-hostite ský cyklus a je zaujímavá lokalizáciou metacerkárií. Cerkárie penetrujú koflu rýb a migrujú do o nej –o–ovky, kde sa nachádzajú ako neencystované metacerkárie typu diplostomulum. Tie spôsobujú zhor–ené videnie a fl stratu zraku, o môfle ma v chovoch rýb negatívny ekonomický dopad (Horák *et al.*, 2014).

Cerkárie motolíc, ktoré aktívne invadujú hostite a, musia by vybavené peptidázami, ktoré degradujú tkanivá –tiepením proteínov extracelulárnej matrix. Najviac poznatkov o peptidázach motolíc pochádza zo –túdií venujúcim sa medicínsky dôleflitým motoliciam (napr. z e adí Fasciolidae, Schistosomidae, Ophistorchidae, Paragonimidae). Okrem penetrácie tkanív hrajú peptidázy motolíc úlohu aj v al–ích podstatných procesoch ako napríklad trávenie a únik pred imunitným systémom hostite a (Ka–ný *et al.*, 2009).

Existuje relatívne málo prác, ktoré sa venujú peptidázam al–ích motolíc. U strigeidných motolíc existuje pár –túdií, ktoré biochemicky popisujú peptidázy u cercárií, bez predlofenia sekvencií génov daných peptidáz.

Táto práca je zameraná na cysteínové peptidázy cercárií *D. pseudospathaceum*. Predchádzajúce –túdie, venujúce sa týmto peptidázam potvrdili rôznymi spôsobmi prítomnos cysteínových peptidáz v cercáriach (Mike– *et Man*, 2003; Moczon, 1994a/b). Predmetom tejto práce je dané poznatky roz–íri , molekulárne a biochemicky charakterizova dané peptidázy, lokalizova ich v tele cercárií a potvrdi ich postulovanú funkciu pri penetrácií tkanív cercáriami.

Cie e práce:

- biochemická charakteristika cysteínovej peptidázy cercárií *Diplostomum pseudospathaceum*
- získanie génovej sekvencie pre túto cercariálnu cysteinovú peptidázu
- imunolokalizácia tejto peptidázy v tele cercárií
- tvorba rekombinantnej peptidázy na základe získaného génu

2. LITERÁRNY PREHĽAD

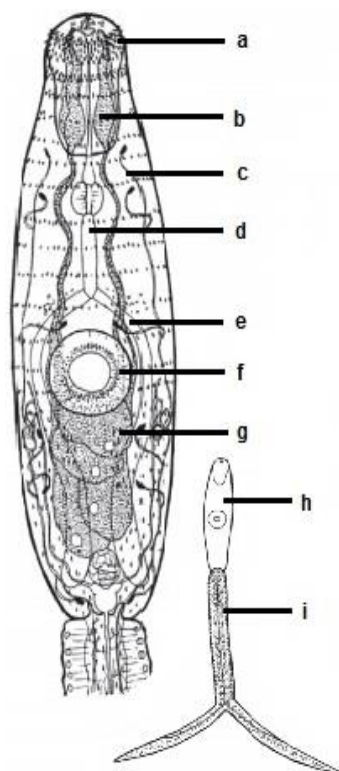
2.1. Modelový organizmus *Diplostomum pseudospathaceum*

Diplostomum pseudospathaceum Niewiadomska 1984 (Trematoda, Diplostomidae) je strigeidná motolica, ktorá patrí do ríše Diplostomidae. Rod *Diplostomum* zahrňuje okolo 30 druhov vyskytujúcich sa hlavne v Eurázii a Severnej Amerike. Tieto druhy sa len málo líšia morfológicky, predovšetkým v larválnych štádiách. To je tiež dôvod prečo druh *D. pseudospathaceum* bol vylenený až v roku 1984 od druhu *D. spathaceum* (Niewiadomska et Laskowski, 2002).

2.1.1. Životný cyklus

D. pseudospathaceum je vtácou motolicou a v životnom cykle má dvoch medzihostiteľov. Prvé larválne štádia, miracidia sa líhnu z vajíc okolo vo vode, vyhadávajú a penetrujú prvého medzihostiteľa, slimáka *Lymnea stagnalis* alebo *Galba palustris* (Lymnaeidae). Tu sa vytvárajú materské a následne dcérske sporocysty, lokalizované v hepatopankrease. Cercárie uvoľnené do vody aktívne vnikajú do ryby (druhý medzihostiteľ) cez pokožku a migrujú tkanivami do obojstrannej obojky, kde dozrievajú metacercárie typu diplostomulum (Chappell et al., 1994). *D. pseudospathaceum* je schopné nakaziť široké spektrum sladkovodných rýb (Rellstab et al., 2011). Definitívny hostiteľ, rybožravý vták, sa nakazí požitím druhého hostiteľa a s metacercáriami, ktoré dospievajú v tenkom čreve a vajcia sa do vonkajšieho prostredia dostávajú s trusom (Niewiadomska, 1986, Horák et al., 2014).

2.1.2. Morfológia a anatómia cercárií



Cercárie *D. pseudospathaceum* sú furkocercárie (podľa morfológieho delenia), majú chvost nakonci rozdvojený (s tzv. furkou). Nemajú očné škrvy. Majú acetábulum (brunú prísavku), ktoré je otrnené, tak ako aj hlavový orgán (nemajú ústnu prísavku) (vi obr. 1). Exkretná sústava je tvorená plamienkovými bunkami, ktoré sa zbiehajú do exkretných kanálov a následne do exkretnej mechúry (Niewiadomska, 1997). Cercárie obsahujú tiež penetračné flázy a dobre vyvinutú tráviacu sústavu, ktoré sú podrobnejšie popísané nižšie, preto sú podstatnejšie z hľadiska tejto práce.

Obr. 1 Morfológia cercárií *D. pseudospathaceum*. Telo cercárie: a- hlavový orgán, b- rozvetrené dukty penetračných fliaz, c- plamienkové bunky s exkretnými kanálmi, d- foregut, e- cékum, f- acetábulum, g- penetračné flázy, h- telo cercárie, i- chvost cercárie s furkou. Zdroj:

Faltýnková (2007), upravené

2.1.2.1. Penetračné flázy cercárií

Cercárie *D. pseudospathaceum* obsahuje dva páry penetračných fliaz umiestnených za ventrálnou prísavkou, menší anteriorný pár v strede, väčší posteriorný pár situovaný symetricky. Tieto unicelulárne flázy majú vývody-dukty smerom k anteriornému (hlavovému) orgánu. V neskorom štádiu embryogenézie tieto dukty zformujú rozvetveniny, rezervoáry v anteriornom orgáne, ktoré sú naplnené sekrečnými granulami (Moczon, 1994b).

Tieto flázy sa za inajú vyprázdňovať pri penetrácii, takže pravdepodobne obsahujú látky podielajúce sa na invázii cercárií o proteolytické enzýmy. Imunohistochemicky bolo dokázané, že flázy samotné aj ich rozvetrené dukty obsahujú cysteínové peptidázy (Moczon, 1994b). V priebehu migrácie diplostomula v penetračných flázach aj ich duktoch zostáva ešte množstvo sekrečného materiálu, pravdepodobne vyprázdneného aľ v ošivke ryby. Flázové bunky podliehajú resorpcii skôr (po 5-6 dňoch) než ich dukty (10 dní) (Podvyznaya, 2015, osobné zdelenie).

2.1.2.2. Tráviaca sústava cerkárií

Tráviaca sústava je zložená z dvoch morfoloicky odlišných regiónov, zvláštného reva tvoreného dvoma cékami a prednej časti tráviaceho traktu (tzv. šforegut), ktorý je tvorený orálnou oblasťou, prefarynxom, farynxom a ezofágom. Tieto časti sú ohraničené tenkým bezjadrovým syncytiom gastrodermis anteriorne napojeným na povrchový tegument a naväzujúcim na epitel reva. Reva dospelých cerkárií sa rozdeľuje na dve vetvy (céka), objemný lumen každej komunikuje s lumenom foregut a je plný elektronegativného amorfného materiálu. Lumen cék je ohraničený veľmi sploštenými gastrodermálnymi bunkami. Tieto bunky majú slabšie vyvinuté hrubé endoplazmatické retikulum (RER) a sú synteticky a sekretno málo aktívne na rozdiel od skorších vývojových štádií, kde je dobre vyvinuté RER. Bunky vytvárajú mnoho sekretných granúl a sekretujú materiál do lumen reva (Podvyaznaya, 2006). V obsahu cék bola histochemicky detekovaná serínová peptidáza (Moczon, 1994b).

2.2. Peptidázy motolíc

Peptidázy motolíc sa zúčastňujú množstva životne dôležitých funkcií ako napríklad invázia tkanív, migrácia, únik pred imunitným systémom, aktivácia iných enzýmov, virulencia, excystácia, liahnutie a trávenie (Sajid *et al.* McKerrow 2002).

Podľa Rawlings and Barrett (1993) sa peptidázy rozdeľujú podľa katalytického mechanizmu do katalytických tried (serínové, cysteínové, threonínové, aspartátové, glutamátové, asparaginové, metaloproteázy, zmiešané a nezaradené peptidázy - v databáze MEROPS). Triedy sú členené do jednotlivých rodín a klanov. Rodina opisuje skupinu peptidáz, ktoré sú evolučne príbuzné aspoň s jednou ďalšou peptidázou z danej rodiny (na základe podobnosti jej primárnej štruktúry, teda sekvencie aminokyselín). Rodiny sú označované skratkou danej triedy peptidáz - cysteínové peptidázy (C) a číslom (C1...). Klany zahŕňujú rodiny, ktoré vykazujú evolučné vzťahy napriek málo významnej podobnosti v sekvenciách, hlavne na základe terciárnych štruktúr a umiestnenia katalytických skupín v sekvencii. Klany peptidáz sú označované podľa triedy a následne písmenom (CA, CB atď. sú klany cysteínových peptidáz) (MEROPS The Peptidase Database, <http://merops.sanger.ac.uk/>).

Táto časť práce sa bude venovať najmä peptidázam, ktoré sú zapojené do invázie hostiteľa a migrácie motolíc a ďalším peptidázam, ktoré hrajú rolu v trávení motolíc.

Najväšie množstvo študovaných peptidáz motolíc patrí do skupiny papain-like cysteínových peptidáz, z klanu CA a rodiny C1A. Tieľ patria k najviac exprimovaným peptidázam u motolíc. Napríklad takmer 15 % transkribovanej RNA u dospelcov *Fasciola hepatica* a 10 % u *Clonorchis sinensis* je produktom transkripcie génov pre cysteínové peptidázy. Tieto peptidázy sa podieajú na vyšie zmienených procesoch spolu s alími, napríklad serínovými peptidázami pri invázií tkanív. Trávenie (predovšetkým krvi u hematofágnych motolíc) je zložitý proces zahrujúci okrem cysteínových peptidáz tieľ aspartátové a metalopeptidázy (Kañý *et al.*, 2009).

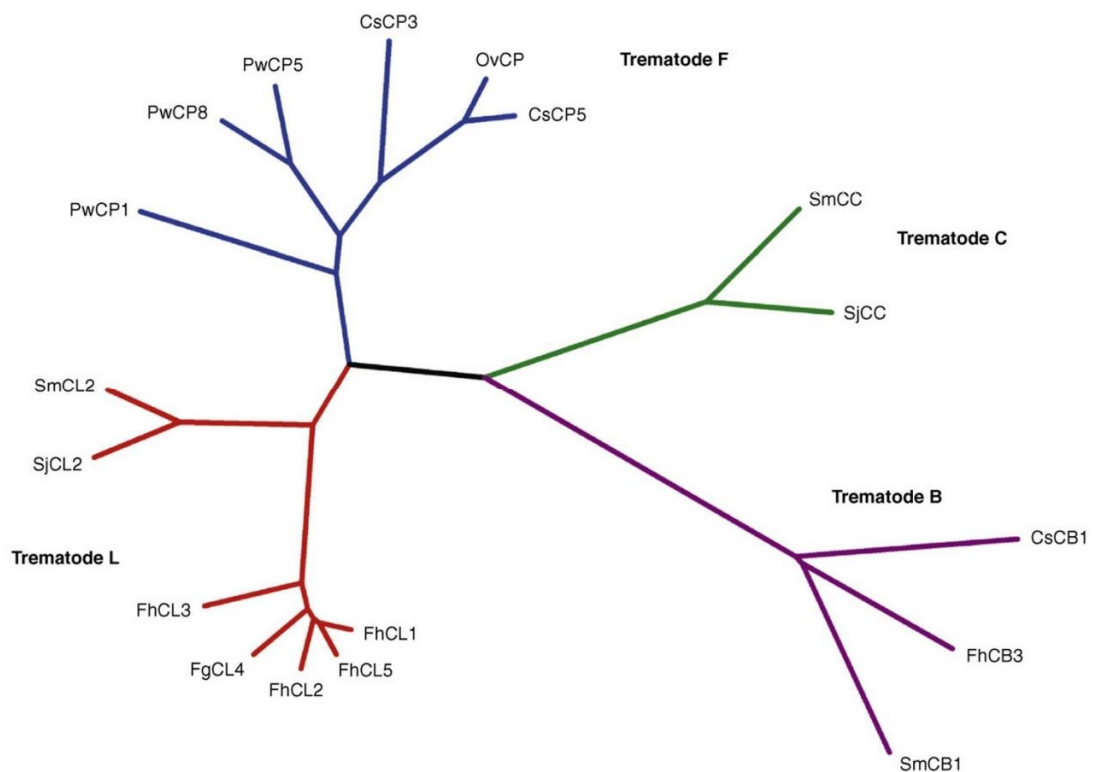
2.2.1. Charakteristika cysteínových (lyzozomálnych) peptidáz so zameraním na katepsín L

Lyzozomálne peptidázy, myslené predovšetkým cysteínové katepsíny z rodiny C1A a klanu CA sa vyskytujú ubikvitárne v lyzozómoch eukaryotických buniek. Tam sa podieajú na procese endolyzozomálnej proteolýzy pri bunenom trávení (zhrnuté v Guha *et al.*, 2008). U parazitov tieto sa tieto katepsíny často vyskytujú nielen ako lyzozomálne peptidázy. V závislosti na funkcii môžu byť sekretované do vonkajšieho prostredia a teda musia byť tomu prispôsobené niektorými vlastnosťami (viššie).

K lyzozomálnym cysteínovým peptidázam patrí tieľ alia peptidáza- legumain, z rodiny C13 (legumain-like asparaginylové endopeptidázy - AE) a klanu CD. Je nazývaná ako asparaginylová peptidáza, pre silnú preferenciu k Asn na P1 pozícií, inak má katalytickú diádu His/Cys ako cysteínové peptidázy (MEROPS The Peptidase Database, <http://merops.sanger.ac.uk/>). Legumain bol najprv popísaný z vakuol rastlín s funkciou degradácie proteínov a šprocessingu peptidáz (tzn. odštiepenie prosegmentu a aktivácia peptidáz) (Müntz *et al.*, 2002). Neskôr bol nájdený v lyzozómoch živočíšnych buniek, kde má funkciu processingu peptidáz a tieľ spracovanie antigénov u MHC II prezentujúcich buniek (Chen *et al.*, 1997, Schwarz *et al.*, 2002). U motolíc sa legumainy (AE) tieľ vyskytujú mimo lyzozómov, s alími funkciami.

Lyzozomálne peptidázy z rodiny C1A boli rozdelené do dvoch skupín: cathepsin L-like (katepsíny L, V, K, S, W, F a H) a cathepsin B-like (katepsíny B a X) (Karrer *et al.* 1993). Maturovaná sekvencia týchto enzýmov je sekvencie podobná, hlavné determinujúce znaky sa nachádzajú v proregióne. Prvá skupina obsahuje vysoko konzervovaný aminokyselínový motív v proregióne ER(W)FNIN (názov podľa aminokyselín v motíve),

ktorý katepsíny B nemajú. Katepsíny B sa líšia tiež prítomnosťou štruktúry, ktorá je nazývaná occluding loop. Je to peptidická slučka v katalytickej doméne zodpovedná za exopeptidázovú (peptidyl dipeptidázovú) aktivitu týchto katepsínov (Musil *et al.* 1991). Na základe genomickej organizácie a modifikovaného motívu ERFNAQ v propeptide katepsínov F a W bola od cathepsin L-like oddelená podskupina cathepsin F-like (Wex *et al.* 1999) (vi obr. 2 - skupina F u motolíc). Katepsíny C, O a X neobsahujú ER(W)FNIN motív a neboli zaradené. Neskôr Turk *et al.* (2000) postuloval, že katepsín X patrí ku cathepsin B-like skupine, na základe prítomnosti štruktúry podobnej occluding loop.



Obr. 2 - Papaín-like peptidázy trematod v strome fylogeneticky rozdelené do skupín(L, B, F a C). CB - katepsín B, CC - katepsín C, CL - katepsín L, CP - cysteínové peptidázy, Cs - *Clonorchis sinensis*, Fg - *Fasciola gigantica*, Fh - *Fasciola hepatica*, Ov - *Opisthorchis viverrini*, Pw - *Paragonimus westermani*, Sj - *Schistosoma japonicum*, Sm - *Schistosoma mansoni*. Zdroj: Robinson *et al.* (2008)

Peptidázy z klanu CA sú syntetizované ako neaktívne prekurzory, zložené z troch častí: N-terminálna signálna sekvencia dlhá 10-20 AA, nasleduje propeptid (propeptid) dlhý 38-250 AA a tretia časť samotný maturovaný enzým. Terciárna štruktúra je charakteristická dvoma doménami (pravá a ľavá), medzi ktorými sa nachádza aktívne miesto v štruktúre (McGrath, 1999).

Propeptidy udrflujú peptidázy inaktívne tým, že zakrývajú aktívne miesto. U katepsínov C1 rodiny majú veľkú variabilitu. Propeptidy CL sú dlhšie (cca 100 AK) než tie u CB (cca 60 AK), najkratší propeptid má katepsín X, len 38 AK (Turk *et al.*, 2000). Výnimkou je tiež katepsín F s extrémne dlhým propeptidom (250 AK), ktorého N-terminálna časť vykazuje štruktúrnu podobnosť s cystatínmi (inhibitorami cysteínových peptidáz) (Nägler *et al.*, 1999).

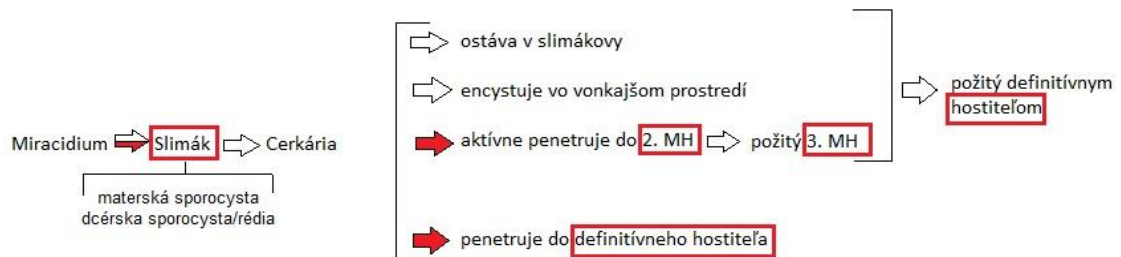
Väčšina týchto enzýmov sú endopeptidázy, s niektorými výnimkami. Už spomínaný CB má karboxydipeptidázovú aktivitu, za ktorú je zodpovedná occluding loop. Occluding loop je ale flexibilná, môže sa odklopiť, takže CB má okrem exopeptidázovej aj endopeptidázovú aktivitu (Musil *et al.*, 1991). Tiež katepsín X štiepi peptidy ako karboxy(di)peptidáza so slabou endopeptidázovou aktivitou. Aminopeptidázy sú zastúpené katepsínom H, ktorý je tiež aj endopeptidáza. Ozajstnou výnimkou je katepsín C, ktorý pracuje ako tetramér a má len aminodipeptidázovú aktivitu (Guncar *et al.*, 1998, Turk *et al.*, 2000)

Cysteínové peptidázy majú obvykle katalytickú triádu Cys/His/Asn. Špecifita viazania substrátu je relatívne konzervovaná na P1 pozícii (bazické aminokyseliny ako napr. Arg). Preferencie pre aminokyseliny substrátu, pod a ktorých by sa dali jednotlivé katepsíny odlišiť, sú hlavne na P2 a P3 pozíciách (Choe *et al.*, 2006). Katepsín L má v aktívnom mieste oxyaniónovú diery, v ktorej sa nachádza Cys25 (šíslovanie aminokyselín pod a papaínu), ktorý tvorí thiolimidazolový pár s His159. Oxyaniónová diery je stabilizovaná Gln19 a Asn175 z katalytickej triády. Katepsíny L preferujú Arg/Lys na P1 pozícií a striktne hydrofóbnu AK na P2 pozícií, z dôvodu stavby S2 kapsy, ktorá je hydrofóbná, úzka a hlboká. Na rozdiel od väčšiny katepsínov, ktoré viažu alifatické AK v tejto pozícií, tu katepsíny L preferujú aromatické AK (Phe, Trp, Tyr). Dôvodom je iasto ne mutácia Gly na Ala135 z S2 kapsy (Gly je v tejto pozícií napr. u katepsínov S). Na pozícií P3 viažu katepsíny L široké spektrum AK, ale preferujú bázické AK (Arg, Lys) (Fujishima *et al.*, 1997, Choe *et al.*, 2006)

2.3. Peptidázy motolíc zapojené v histolýze hostite ských tkanív

Úspešnosť motolíc, parazitov všeobecne, dokonca životný cyklus, závisí na tom, ako sú jednotlivé štádiá schopné infikovať daného hostite a migrovať do miesta konej lokalizácie a vyhnúť sa obranným mechanizmom hostite a. Pri aktívnej penetrácii a

migrácii v hostiteovi, keď je nutné ťažiť a degradovať tkanivá, sa uplatňuje peptidázová výbava motolíc. Tie sú veľkou syntetizované a skladované ako neaktívne zymogény, ktoré sú schopné sa samé aktivovať pri zmene podmienok alebo k tomu potrebujú iné peptidázy (trans-splicing). Peptidázy zapojené do histolýzy tkanív sú všeobecne prispôbené tejto funkcii schopnosťou ťažiť proteíny extracelulárnej matrix a stabilitou v neutrálnom pH (Dalton *et al.*, 2006). Existuje niekoľko spôsobov, akou môže byť dostávaná von z tela motolice, kde pôsobia. Niektoré sú len teoreticky postulované: sekrécia z apikálnych fliaž (miracidia), penetračných fliaž rôznych typov (cerkárie), dostávajú sa na povrch zo sekretorických vezikúl tegumentu, z exkrementného mechúra alebo sú sekretované do riev a odtiaľ sa dostávajú do okolia ústnym otvorom (viď pokračovanie).



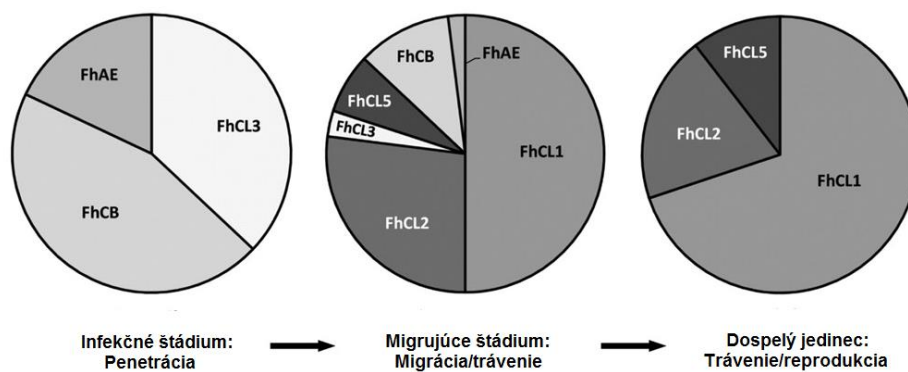
Obr. 3 - Zjednodušený prehľad životných cyklov motolíc s vyznačením štádií, ktoré musia aktívne invadovať hostiteľa (červená šípka) a hostiteľa, v ktorých môže prebiehať telná migrácia (červený rámček).

Obrázok 3 sumarizuje štádiá v životných cykloch motolíc, ktoré aktívne penetrujú do hostiteľa a štádiá, ktoré môžu mať migračnú fázu v hostiteľoch. Pozornosť bude venovaná hlavne motoliciam, ktorých cercárie invadujú definitívneho hostiteľa (DH), alebo druhého medzihostiteľa (MH) a migrujú ním (Schistosomatidae, Diplostomidae). Tiež motoliciam, ktorých metacercárie (z vonkajšieho prostredia alebo z MH) sú požití DH a ich juvenilní jedinci majú zložitú telesnú migráciu (Fasciolidae, Paragonimidae).

2.3.1. Peptidázy zapojené do invázie tkanív u zástupcov rodu Fasciolidae

Pri infekcii DH larvy *Fasciola* spp. musia preniknúť stenou duodena, migrovať cez peritoneum a invadovať tkanivo pečene, ktorým sa flivia. Finálna lokalizácia dospelých jedincov je v žilových kanáloch, kde sa flivia krvou a produkujú vajčka. *F. hepatica*

exprimuje veľké množstvo rôznych katepsínov L, ktoré sú rozdelené podľa príbuznosti do 5 vetiev - FhCL1-5, každá vetva obsahuje niekoľko izoform daných katepsínov. U infekčného štádia *F. hepatica* majú funkciu pri penetrácii duodena hlavne katepsíny FhCB, vetva FhCL3 a tiež legumainy 1 a 2, ktoré aktivujú zymogény CL a CB odtiepením prosegmentu (obr. 4). Na druhú stranu u štádií, ktoré začínajú migrovať pečeňou sú podstatné katepsíny z vetiev FhCL1, FhCL2 a FhCL5 nevyhnutné pre degradáciu tkanív (obr. 4) a výživu a tiež legumainy, ktoré sa okrem aktivácie katepsínov tiež zúčastňujú priamo podieľať na degradácii tkanív (Robinson *et al.*, 2008, Robinson *et al.*, 2009).



Obr. 4 - Porovnanie pomeru expresie najdôležitejších peptidáz v životnom cykle *F. hepatica* u jednotlivých štádií spolu s funkciou, ktorú majú. Zdroj: Robinson *et al.* (2008), upravené

U infekčných a migrujúcich štádií *F. hepatica* boli objavené tri katepsíny B - FhCB1, 2 a 3. Tieto katepsíny B, z ktorých je najviac abundantný FhCB3 (obr. 4), preferujú substrát s Arg na S2 pozícií, čo je pre ne typické, s optimom aktivity pri pH7. Od infekčných štádií sa expresia CB postupne znižuje. Pri testovaní špecifity voči substrátu bola u peptidáz infekčných a migrujúcich štádií objavená schopnosť štiepiť substrát s Pro na P2 pozícií (popri štiepení substrátov charakteristických pre katepsíny L a B). Schopnosť štiepiť substrát s Pro na P2 pozícií medzi cysteínovými peptidázami majú katepsíny K a preto dokážu štiepiť kolagén, ktorého každá tretia AK je Pro (Gly-Pro-Xaa). Za túto aktivitu u *F. hepatica* je zodpovedný aj FhCL3, ktorý sa podieľa na histolýze tkanív, týmto je aktívny pri neutrálnom pH a je schopný štiepiť kolagén extracelulárnej matrix. Túto schopnosť viazať Pro na P2 pozícií má tiež FhCL2 a súvisí s mutáciou AK Leu67 na Tyr67 (u katepsínov K a FhCL2) alebo na Trp67 u FhCL3. Táto aminokyselina výrazne ovplyvňuje tvar S2 kapsy a takto mení substrátovú preferenciu na tomto mieste (Corvo *et al.*, 2009, Cancela *et al.*, 2008). U juvenilných štádií *F. gigantica* je

exprimovaný ortológ FhCL3 ó FgCL1G s rovnakou funkciou. *F. gigantea* má tiež katepsíny B ortológne ku katepsínom B *F. hepatica*, sú to FgCB1, 2 a 3 (Cancelaet *al.*, 2008, Chantree *et al.*, 2012, Sethadavid *et al.*, 2009).

Peptidázy infekčných štádí sú syntetizované gastrodermálnymi bunkami do sekrečných granúl, exocytované do lumen reva a trans-aktivované legumainom v kyslom prostredí reva. revo motolice v tomto štádiu je schopné sekretovať, ale nie absorbovať živiny. Absorbujú funkciu nadobúda až pri štádiu migrácie, keď sa motolice začínajú flivovať v lyzovaným tkanivom (Fairweather *et al.*, 1999).

Katepsíny štádí migrujúcich peceou sa flivia okolitým tkanivom, tzn. vo funkčných revách, exprimujú dominatne FhCL1 a FhCL2, ktoré sú aktívne v širokom spektre pH (nízke pH 4-4,5 v revách a neutrálne okolité prostredie) a FhCL2 dokáže štípať kolagén ECM. Tieto peptidázy sa tiež sekundárne zúčastňujú procesu migrácie a degradácie tkanív po tom, čo sú regurgitované s obsahom riev (Dalton *et al.*, 2004).

2.3.2. Peptidázy *P. westermani* s funkciou histolýzy tkanív

Metacerkárie *P. westermani* po požití penetrujú duodenum a započnú zložitú telovú migráciu intra-abdominálnymi orgánmi a brániou, koniacu v púchach, kde dospievajú.

Uerstvo excystovaných metacerkárií je sekretovaných niekoľko cysteínových peptidáz. Ide o PwMc27 (27 kDa) a PwMc28 (28 kDa), ktorá má dve izoformy (93,6% sekvennej identity), ktoré slúžia k invázii tkanív (nazvané nezávisle, podľa štádia motolice Mc - metacerkárie a ve kosti v kDa). Obe peptidázy štípu pri neutrálnom pH a sú schopné štípať proteíny ECM vrátane kolagénu a laminínu. Podľa motívu ERFNAQ v prosegmente sú to katepsínové peptidázy a boli lokalizované v tegumente prednej časti a orálnej prísavky parazita, čo naznačuje, že by mohli byť exocytované zo sekretorických vezikúl v tegumente (Na *et al.*, 2006). Podľa inej štúdie, ktorá imunolokalizovala tieto cysteínové peptidázy, sa obe nachádzajú v exkrečnom mechúri metacerkárií, takže v tomto prípade epitel exkrečného mechúra preberá aj sekrečnú funkciu (Yang *et al.* 2002).

2.3.3. Cerkariálne peptidázy

Pre inváziu hostiteľa sú cercárie vybavené súborom peptidáz, ktoré sú sekretované spolu s inými látkami z unicelulárnych fliaz rôzneho typu. U cercárií je ade

Schistosomatidae existujú acetabulárne flazy (pre- a postacetabulárne), hlavové flazy a subtegumentálne telieska, ktoré vďaka zrejme hrajú rolu v invázií hostiteľa (Curven *et al.*, 2003).

2.3.3.1. Cerkariálna elastáza schistosom

Cerkariálna elastáza bola prvá objavená u cercarií *S. mansoni*. Je to serínová peptidáza chymotrypsin-like typu z PA klanu, rodiny C1, pomenovaná podľa schopnosti rozštiepiť elastín ECM (tiefelne elastínové komponenty ako napr. kolagén, laminin, keratin). Má typickú katalytickú triádu (His68/Asp126/Ser218) a substrátovú špecifitu chymotrypsin-like peptidáz, ktoré preferujú veľkú hydrofóbnu postrannú skupinu AK na P1 pozícii, pričom P2 a P3 pozície nie sú úplne špecifické (Kany *et al.*, 2009, Salter *et al.*, 2002).

Gény pre cercariálnu elastázu (CE) boli objavené u *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* a *Schistosomatium douthitti* a podľa Salter *et al.* (2000) sú cercariálne elastázy esenciálne v invázií tkanív. U *S. mansoni* bolo nájdených niekoľko kópií génov pre SmCE s orthológmi u *S. haematobium* (najbližšie príbuzné), zaradených do dvoch skupín SmCE1 a SmCE2, najexprimovanejšie sú SmCE1a a CE1b, ktoré sa funkčne nelíšia, ich pH optimum aktivity je 9 a substrátová špecifita je najviac selektívna na P2 pozícii pre Pro (Salter *et al.*, 2002, Dvořák *et al.*, 2008).

Cerkariálne elastázy sú exprimované hlavne v skorých štádiách cercarií vo vnútri sporocyst ako neaktívne zymogény a sú lokalizované v preacetabulárnych flazách. U cercarií v sporocystách sú elastázy úplne aktívne, čo naznačuje, že by mohli hrať rolu aj pri aktívnom úniku cercarie z hepatopankreasu slimáka (Ingram *et al.*, 2012). Podľa štúdie sú cercariálne elastázy lokalizované v oboch skupinách acetabulárnych fliaz (pre- aj postacetabulárnych) (Salter *et al.*, 2002).

Cerkariálna elastáza bola identifikovaná aj v sekretných produktoch cercarií vtácej schistosomy *Trichobilharzia ocellata* (syn. *T. szidati*). Táto elastáza má optimum aktivity pri pH 10,5 a má cca 2-3 krát vyššiu aktivitu než SmCE (Bahgat *et Ruppel*, 2002). Túto štúdiu ale zpochybuje práca Mikeš *et al.* (2005), ktorá sa venuje charakterizácii obsahu penetračných fliaz *T. szidati* a dokazuje, že elastáza sa v týchto flazách cercarie nevyskytuje. Tiefel gén pre túto elastázu nebol nájdený v cercariálnom genóme (Leontovič, osobné zdieľanie)

2.3.3.2. Cysteínové peptidázy cercárií zapojené do penetrácie hostite a

Niektoré schistosomy, ktorých cercárie neexprimujú serínové peptidázy, potrebujú iné nástroje pre penetráciu hostite a. U *S. japonicum* bola v sekrečných produktoch z acetabulárnych fliaz detekovaná aktivita cysteínových proteáz, plne inhibovaná inhibítorom pre katepsín B, s pH optimom aktivity 4,5 a fliadna aktivita serínových peptidáz (Dvoák *et al.*, 2008). Tento katepsín B (SjCB2) je ortológom SmCB2. Tento katepsín B je jediná cysteínová peptidáza *S. mansoni*, ktorá má potenciál degradovať proteíny ECM. Je lokalizovaná v tegumente, s nejasnou funkciou (Ingram *et al.*, 2011; Caffrey *et al.*, 2002). Acetabulárne flazy *S. mansoni* tiež obsahujú katepsín B, ale s cca 40 krát nižšou aktivitou než u *S. japonicum* (Dvoák *et al.*, 2008).

Cercárie všetkých schistosomy *Trichobilharzia regenti* taktiež nedisponujú cercariálnou elastázou (Kaniš *et al.*, 2007), ale bol u nich objavený ortológ SmCB2, katepsín TrCB2, ktorý je lokalizovaný v postacetabulárnych fliazách a hrá rolu pri penetrácii kože hostite a. Rekombinantný TrCB2 má optimum aktivity pri pH 6 a je schopný roztrhnúť proteíny ECM, ale tiež nervové tkanivo, ktorým schistosomulum migruje. TrCB2 je sekvencielne podobný SmCB2 (77%) a SjCB2 (78%) (Doležalová *et al.*, 2009).

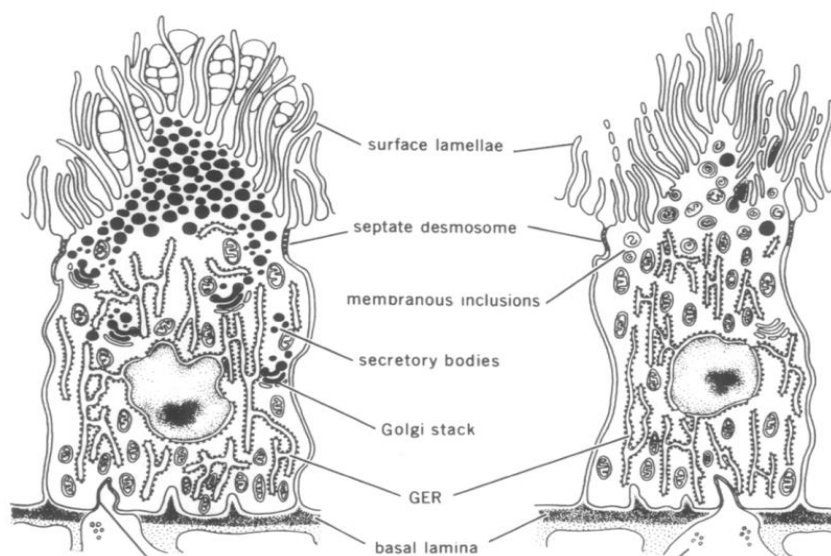
Okrem cercariálnych peptidáz schistosom je známych niekoľko málo cercariálnych peptidáz strigeidných motolíc. Ich cercárie invadujú druhého MH. U cercárií *Cotylurus cornutus* (2. MH je vodný slimák) bola zaznamenaná aktivita cysteínových peptidáz, s optimom aktivity pri pH 6,8-7,2. Táto cysteínová peptidáza bola lokalizovaná v penetračných fliazách cercárie (Moczon, 2011). Táto cysteínová peptidáza (CP) bola lokalizovaná v penetračných fliazách cercárií *Tylodelphys excavata* (2. MH je ryba). Táto CP s optimom aktivity tiež pri neutrálnom pH (6,8-7,2) sa pravdepodobne, tak ako aj predchádzajúca u *C. cornutus*, podieľa na penetrácii hostite a cercariami (Moczon, 2007). Bohužiaľ o týchto peptidázach existujú len dôkazy biochemické - na základe merania peptidolytickej aktivity, ale nie sú známe ich sekvencie, ani sekvencie ich génov.

Výskumná časť tejto práce sa venuje peptidázam cercárií strigeidnej motolice *D. pseudospathaceum*, o ktorých sú doterajšie poznatky zhrnuté nižšie.

2.4. Peptidázy motolíc s funkciou trávenia

2.4.1. Trávenie u digenetických motolíc

U digenetických motolíc prebieha trávenie primárne extracelulárne v revách (ceacum). U *Fasciola* spp. revný epitel neobsahuje špecializované flazmaté bunky, ale gastrodermálne bunky sekretujú tráviace enzýmy v prvej fáze trávenia a v druhej fáze absorbujú živiny (obr. 5). Vo všeobecnosti gastrodermis plní sekrečnú aj absorpčnú funkciu. Schistosomy majú trávenie iasto ne rozdelené do kompartmentov, ezofágus je flazmatý s množstvom sekretorických granúl a gastrodermis tiež je primárne absorpčiaci. Záleží na druhu motolíc, či je gastrodermis bunková (*Fasciola* spp.) alebo syncytiálna (*Schistosoma* spp.). Jednou zo stratégií získavania proteínových živín u dospelých digenét je hematofágia. Odpadový produkt trávenia hemoglobínu, hemozoin, je lokalizovaný v lumen reva a v pravidelných intervaloch regurgitovaný s obsahom reva (Halton, 1997, Dalton *et al.*, 2006).



Obr. 5 - Schematické znázornenie buniek gastrodermis *Fasciola* spp vo fázach: sekretorickej naľavo a absorpčnej napravo. Zdroj: Halton (1997)

2.4.2. Peptidázy *Fasciola* spp. zapojené do trávenia

Na trávení hemoglobínu u *Fasciola* sa naväzou mierou podieľajú katepsíny L z vetiev FhCL1, CL2 a CL5 (vi kapitulu 2.3.1.) (dohromady tvoria asi 80% sekretomu dospelých *F. hepatica*). Katepsíny z vetvy FhCL1 a ich ortológy u *F. gigantica* sa alej

delia do podskupín A, B, C (katepsíny *F. gigantica* sú len v skupine C), (Robinson *et al.*, 2009).

Bolo dokázané, že FhCL1 (súbor izoforiem katepsínov), ktorý je exprimovaný najviac, je schopný degradovať hemoglobín na krátke peptidy (3-14 AA). Následne sú absorbované gastrodermis, kde sú katabolizované katepsínom C a aminopeptidázami (Robinson *et al.*, 2008). Podstatná črta FhCL1 je široká škála pH, pri ktorej ostáva aktívny (pH 3-9) a zároveň stabilný. Jeho špecifické prispôsobenie je v substrátovej špecifite. V porovnaní s uhl spomínaným FhCL2, FhCL1 na P2 pozícií lepšie viaže hydrofóbne AA, na ktoré je obmedzený, čo naznačuje adaptáciu na majoritný substrát - hemoglobín, ktorého 42% tvoria hydrofóbne AA (Stack *et al.*, 2008). Schopnosť FhCL2 degradovať kolagén je podstatná, keď *Fasciola* migruje pečeňou a šíri sa tkanivom.

Procesu trávenia sa nepriamo úastní tiež legumain-like asparaginylová endopeptidáza (u *F. gigantica* tiež nájsené dve izoformy), ktorá odštiepuje proenzým katepsínov L a tým ich aktivuje (trans-splicing). Maturované katepsíny potom odštiepujú prosegment štiepím. Túto funkciu potvrdzuje tiež to, že všetky katepsíny fasciol majú konzervovaný motív AA v mieste štiepenia prosegmentu, ktorý je špecifický ako substrát pre tieto asparaginylové peptidázy. Okrem tejto funkcie má legumain tiež hemoglobínolytickú aktivitu (Robinson *et al.*, 2008b, Adisakwattana *et al.* 2007).

2.4.3. Proces trávenia u schistosom

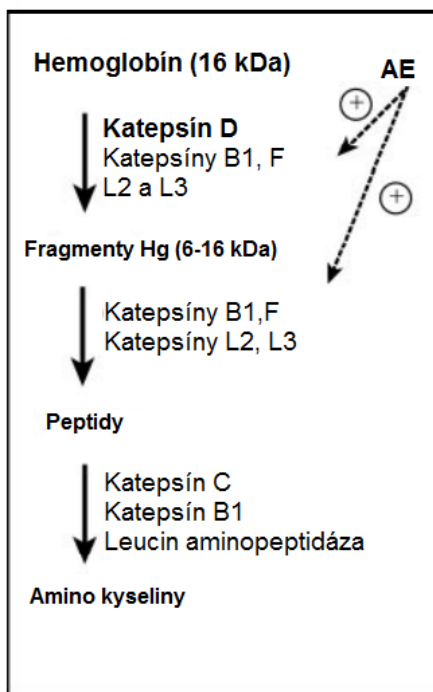
Proces trávenia krvi u schistosom začína degradáciou erytrocytov, proteínová zložka hemoglobínu je štiepená kaskádou endo- a exopeptidáz a na jednotlivé AA/dipeptidy absorbované gastrodermis.

Vreve schistosom sa nachádzajú cysteínové peptidázy - asparaginylová endopeptidáza (legumain, AE), katepsíny B1, L2, L3, F, C, alej aspartický katepsín D a tiež metalopeptidáza LAP - leucin aminopeptidáza (Caffrey *et al.*, 2004).

Katepsín B1 je najviac abundantnou peptidázou vreve schistosom, má exo- aj endopeptidázovú aktivitu a na rozdiel od SmCB2 v ňom bol identifikovaný motív YWLIANSWxxDWGE, nachádzajúci sa v CB helmintov, ktoré štiepia hemoglobín (Baig

et al., 2002). Ďalší zaujímavý motív sa nachádza v propeptide tohoto katepsínu a ďalších CB asociovaných s revom motolíc je motív, ktorý viaže heparín (glykosaminoglykany) (Horn *et al.*, 2011). V práci Jílková *et al.* (2014) bolo dokázané že interakcia SmCB1 so sulfatovanými polysacharidmi, ako je heparín (práve týmto motívom v propeptide), je esenciálna pre autokatalytickú aktiváciu (Horn *et al.*, 2011).

Všetky tieto peptidázy pôsobia pri kyslom pH prostredia (v lumen reva je pH 4), pH optimum aktivity je najnižšie u katepsínu D (pH 3-4), spolu so substrátovou špecifitou pre objemné hydrofóbne AK na P1 a P1' pozícií je katepsín D dobre adaptovaný na štiepenie hemoglobínu (SmCD štiepi ľudský hemoglobín na dva krát viac miestach než iné CD) (Brindley *et al.*, 2001). Katepsín L2 je aktívny v len v kyslom pH s optimom cca pH 5 ale katepsíny F a L3 majú široké spektrum pH v ktorom sú aktívne. Primárne majú tieto katepsíny funkciu trávenia (Dvořák *et al.*, 2009, Brady *et al.*, 2000). Sú exprimované v gastrodermis, u SmCL2 to bolo dokázané v práci Bogitsh *et al.* (2001). Nachádzajú sa ale aj v iných tkanivách (reprodukčná sústava) a štádiách, s ďalšími funkciami (Dvořák *et al.*, 2009, Brady *et al.*, 2000).



Súbor týchto peptidáz pracuje v kaskáde, podľa Delcroix *et al.* (2006) (obr. 6). Katepsíny sú transaktívované AE, degradáciu hemoglobínu zahajuje katepsín D, ktorý primárne štiepi natívny hemoglobín. Jeho fragmenty sú štiepené katepsínmi B, F, L2 a L3 (Dvořák *et al.*, 2009, Brady *et al.*, 2000) a finálne, krátke peptidy sú štiepené exopeptidázami a katepsínom C, B1 a LAP.

Obr. 6 - Kaskáda trávenia hemoglobínu u schistosom.

Zdroj: Delcroix *et al.* (2006), upravené

2.4.4. Peptidázy u elade Ophisthorchiidae s funkciou trávenia

Motolice z elade Ophisthorchiidae sa odlišujú od predchádzajúcich motolíc tým, že sa neživí krvou, žijú v lymfatických kanáloch a zdrojom živín sú predovšetkým lipoproteínové metabolity v krvi (micely, HDL, LDL, ktoré sú zložené z fosfolipidov, MK, cholesterolu a amfipatických proteínov). Genómové a transkriptomové analýzy ukázali, že tieto motolice sú adaptované expresiou rodín fosfolipáz, lipáz a peptidáz. Peptidázy zahŕňajú cysteínové (katepsíny F, B a L, legumain), serínové, aspartátové (katepsín D) a tiež metalopeptidázy (Young *et al.*, 2014).

Proteomickou analýzou exkrečných produktov *Clonorchis sinensis* bola objavená rodina katepsínov F (12 peptidáz). Imunolokalizácia ukázala, že sú exprimované a sekretované hlavne do lumen čreva a ich expresia vzrastá dospievaním motolice, čo naznačuje, že sú zapojené do trávenia. U CsCF6, ktorý má optimum pH 4-5, bolo zistené, že tieto proteíny ECM len pri kyslom pH, nie pri neutrálnom, takže jeho primárna funkcia bude zrejme trávenie (Na *et al.*, 2008).

Okrem rodiny katepsínov F boli v črevách a exkrečných produktoch *C. sinensis* lokalizované katepsíny L, B1, B2, B3, B4 a exopeptidáza CC (Chen *et al.*, 2014, Liang *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2012). V bunkách gastrodermis boli lokalizované CsLAP1 a CsLAP2 (pH optimum 8 a stabilné v neutrálnom prostredí), ktoré sa pravdepodobne podieľajú na finálnej hydrolýze peptidov absorbovaných do buniek gastrodermis (Kang *et al.*, 2012). U *Opisthorchis viverrini* v črevách bol tiež nájdený katepsín D OvAPR1 s postulovanou funkciou trávenia tkanív (Suttiaprapa *et al.*, 2010).

2.5. Peptidázy cercárií *D. pseudopathaceum*

Prvá štúdia (Moczon, 1994a) zaoberajúca sa cercariálnymi peptidázami *D. pseudopathaceum* detekovala v cercariálnom homogenáte aktivitu cysteínových peptidáz. Pri zymografickej analýze v polyakrylamidovom géle v redukujúcich podmienkach bola peptidolytická aktivita viditeľná v dvojitém pruhu s veľkosťou približne 40 kDa. Neskôr boli histochemicky (na základe peptidolytickej aktivity voči fluorogénny substrátom) v cercáriách detekované cysteínové peptidázy v penetračných fázach a serínové peptidázy v cievkach (Moczon, 1994b).

V al-aj -túdií (Mike- et Horák, 2001) pracovali s proteínom považovaným za lektín, ktorý sa pri elektroforéze pohyboval ako dvojband o ve kosti cca 24 kDa. Pomocou protilátok bol lokalizovaný v cerkariálnych penetra ných flazách (v roz-irených duktoch). Neskôr (Mike- et Man, 2003) sa na zákade peptidolytickej aktivity zistilo, že ide o cysteínovú peptidázu. Podarilo sa ju vypurifikova z homogenátu cerkárií, ur i ve kos (23,9 kDa) a izoelektrickú kon-tantu (pI 10). Pomocou hmotnostnej spektrometrie bolo demon-trované, že ide o cysteínovú peptidázu - boli získané sekvencie tryptických -tepov, ktoré vykazovali podobnos cysteínovým proteázam.

3. METODIKA

3.1. Zber a príprava materiálu

Slimáky *Lymnea stagnalis* boli zbierané v rybníkoch okolo mesta Tebo . Po osvetení boli vy-etené pod binokulárnou lupou, i vylujú len cercárie *D. pseudospathaceum*. Tieto cercárie boli determinované pod a -pecifickej polohy, v ktorej sa nachádzajú vo vodnom stpci (chvost ohnutý v pravom uhle).

3.1.1. Izolácia RNA

Celková RNA bola izolovaná zo sporocyst *D. pseudospathaceum* (obsahujúcich cercárie v rôznom -ádiu vývoja) preparovaných z hepatopankreasu slimákov *Lymnea stagnalis*, pomocou Trizol Reagent (Invitrogen) pod a manuálu. Získaná RNA bola rozpustená v 20 μ l ddH₂O a koncentrácia bola meraná na spektrometre Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific).

3.1.2. Materiál na histologické spracovanie

Pre histologické metódy boli cercárie zbierané zo slimákov *L. stagnalis* vylujúci pri osvetení umelým svetlom. Cercárie boli zchladené v 50ml skúmavkách na ade a centrifugované pri 4°C a 4100 x g 5 min. Následne boli fixované v 4% paraformaldehyde (pH 7,2) cez noc pri 4 °C. Ten istý proces fixácie prebehol aj s kúskami tkaniva (cca 0,5 x 0,5 cm) hepatopankreasu nakazeného slimáka so sporocystami ihne po vypitvaní.

3.1.3. Proteínové vzorky

Cerkariálny homogenát bol pripravený sonikáciou cercarií lyofilizovaných v 10 mM HEPES puře pH 8 a rehydratovaných v ddH₂O v 1,5 ml mikroskúmavkách (Eppendorf) na prístroji Vibra cell (Bioblock scientific) 8 W, 3 x 15 s na ade. Následovala centrifugácia (16000 x g, 4°C, 10 min), supernatant bol odobraný a krok centrifugácie sa opakoval. Finálny supernatant bol uschovaný pri 6 20 °C do pouflitia.

Koncentrácia proteínov vo vzorku bola meraná pomocou kitu Quant-IT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) pod a návodu, v iernej 96 jamkovej do-ti ke (Nunc), na fluorometri Infinite M200 (TECAN).

3.2. Biochemické metódy

3.2.1. Chromatografická purifikácia proteínov

Cerkariálny homogenát bol rozriedený v 20mM HEPES pufrí (pH 8) na 5 ml (s finálnou koncentráciou cca 5 μ g/ μ l) a prefiltrovaný cez 0,22 μ m filter (Millipore). K purifikácii bola použitá kvapalná chromatografia FPLC na kolóne Mono-S cation exchange (Bio-Rad), ktorá bola ekvilibrovaná 20mM HEPES pufrom (pH 8). Proteíny zachytené na kolóne boli eluované pomocou gradientu NaCl od nulovej koncentrácie po 1M, v rovnakom pufrí. Získané frakcie (0,5ml) boli odsované a skoncentrované pomocou ultracentrifugácie na AmiconUltra mikrofiltroch (10 000 MWCO, Millipore) a skladované pri 4 20 °C.

3.2.1.1. Analýza proteínov vo frakciách po chromatografii

U získaných frakcií bola zmeraná celková koncentrácia proteínov spomínanou metódou. Potom boli tieto frakcie a homogenát analyzované pomocou SDS-PAGE na 12% polyakrylamidových géloch hrubých 1 mm. Vzorky s celkovým množstvom proteínu 3 μ g u jednotlivých frakcií, 15 μ g u homogenátu a flow-through vzoriek (proteíny ktoré sa pri separácii nenašli na kolóne a pretekli ňou) boli inkubované s redukujúcim vzorkovým pufrom 5 min pri 90 °C a nanosené na gél spolu s 7 μ l proteínového štandardu (vi príloha). Separácia prebiehala pod konštantným napätím 150 V na aparátúre MINI-Protean 3 cell (Bio-Rad). Gély boli nafarbené Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBBR-250) a oskenované na prístroji GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

3.2.2. Meranie aktivity enzýmu

Pre meranie aktivity enzýmu bolo použité celkové množstvo proteínu 5 μ g a 3 μ g vzorky homogenátu, 1 μ g, 0,1 a 0,01 μ g proteínu jednotlivých frakcií. Vzorky boli inkubované 5 min v 0,1M pufrí s rôznym pH (tab. 1) a s 2mM DTT, niektoré vzorky boli alej inkubované 5 min s rôznymi inhibítormi (20 μ M) (v redukujúcich aj neredukujúcich podmienkach - DTT) v tab. 2. Finálne bol pridaný fluorogenný substrát Z-Phe-Arg-AMC alebo Z-Arg-Arg-AMC s 50 μ M koncentráciou, celkový objem reakcie bol 200 μ l. Meranie fluorescence prebiehalo v čiernej 96 jamkovej doštičke (Nunc) pomocou fluorometru Infinite M200 (TECAN) 30x v 2min intervaloch pri teplote 25 °C a pri excitácii vlnovej dĺžky 355 nm a emisnej vlnovej dĺžky 460 nm. Výsledky merania aktivity

s inhibítormi prebiehali paralelne v duplete (grafy boli spracované z priemeru týchto dvoch hodnôt), a na meranie aktivity v -kále pH 2-12 u frakcie 25/26, ktoré bolo zopakované 6x.

Tab. 1 ó Pufry (a ich pH) poufíté pri meraní aktivity enzýmu pri zis ovaní pH optima aktivity

Citrátový pufr	pH 2 pH 3	MOPS pufr	pH 7 pH 7,5
Acetátový pufr	pH 4 pH 4,5	HEPES pufr	pH 8
Citrát- fosfátový pufr	pH 5	Tris-HCl pufr	pH 8,5 pH 9
Sukcinátový pufr	pH 5,5	Glycínový pufr	pH 9,5 pH 10
MES pufr	pH 6 pH 6,5	Fosfátový pufr	pH 12

Tab. 2 ó Inhibítory peptidáz poufíté pri meraní aktivity enzýmu a ich -pecifita

Názov inhibítora	-pecifita
Z-Phe-Phe-FMK (RR-FMK)	cysteínové peptidázy
Z-Phe-Ala- FMK (RA-FMK)	cysteínové peptidázy
Z-Phe-Tyr-FMK (RT-FMK), E-64	cysteínové peptidázy
CA 074	catepsín B, cysteínové pept.
Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH ₂ (iCL)	catepsín L, cysteínové pept.
Calpain inh.	calpain, cysteínové pept.
Elastatinal	elastáza, serínové pept.
Trypsin inh., aprotinin (BPTI)	trypsín, serínové pept.
DFP, TPCK, TLCK, PMSF	serínové peptidázy

3.2.3. Detekcia cysteínových peptidáz biotinylovnou próbou

Pre detekciu cysteínových peptidáz v homogenáte bola poufítá biotínom zna ená próba DCG-04, analóg inhibítora cysteínových peptidáz E-64 (Greenbaum *et al.*, 2000).

Vzorky cercariálneho homogenátu s množstvom 20µg proteínu boli inkubované 5 min s 5mM DTT a s 5mM MgCl₂. Niektoré vzorky boli alej inkubované 30 min s inhibítorm E-64 s koncentráciou 100µM. Následne bola ku vzorkám pridaná biotínom zna ená próba DCG-04 s finálnou 5µM koncentráciou a inkubácia pokračovala 1 hod pri laboratórnej teplote. Po inkubácií bol ku vzorkám pridaný redukujúci vzorkový pufr (zloženie v prílohe) (15 min pri laboratórnej teplote). Vzorky boli nanesené na 12% 1mm

hrubý polyakrylamidový gél spolu s proteínovým štandardom. Elektroforéza prebiehala pod konštantným napätím 150 V na aparátúre MINI-Protean 3 cell (Bio-Rad).

Po elektroforéze boli gély vložené do blotovacieho pufru (vi príloha) spolu s blotovacími papiermi a PVDF membránou (Immuno-Blot™, Bio-Rad), ktorá bola aktivovaná metanolom. Blotovanie na membránu prebiehalo 15 min pri 2,5 A na prístroji Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad)

Membrány boli premývané 3 x 5 min v PBS-T (zloženie v prílohe) a vložené do blokovacieho pufru (vi príloha) na 1 hod. Následne boli premyté v PBS-T (1 min) a inkubované 30 min so streptavidínom značenou chrenovou peroxidázou (Sigma) s koncentráciou 1 µg/ml v roztoku PBS-T + 1% boviným sérovým albumínom (BSA). Finálne boli membrány premyté 3 x 5 min v PBS-T a vyvíjané kitom Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad) a oskenované na prístroji GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

3.2.4. 2D elektroforéza

Vzorky homogenátu, množstvo 300 µg proteínu, boli preinkubované 5 min s 5mM DTT a s 5mM MgCl₂. Následne bola ku niektorým vzorkám pridaná biotínom značená próba DCG-04 s finálnou 5 µM koncentráciou a inkubácia pokračovala 1 hod pri laboratórnej teplote.

Niektoré vzorky homogenátu boli precipitované acetónom. Ku objemu vzorky bol pridaný 1 objem vychladeného acetónu (ó 20 °C), po zvortexovaní bola vzorka inkubovaná 20 min v ó 20 °C a následne zcentrifugovaná 16000 x g 10 min pri 2 °C. Pelet bol rozpustený v ddH₂O a inkubovaný s DCG-04 (vyššie popísané), alebo bol poufítený priamo.

Ku vzorkám po inkubácii alebo precipitácii bolo pridané 0,5% amfolytov (Bio-Lyte 3/10, Bio-Rad) a rehydratačný pufr doplnený do objemu 125 µl. Následne boli nanosené do rehydratačnej vlničky a prekryté gélovými izofokusačnými IPG prúfkami (ReadyStrip™ IPG Strips, 7 cm, pH 3-10, Bio-Rad). Pasívna rehydratácia prebiehala 12 hod pri laboratórnej teplote. Po rehydratácii nasledovala separácia proteínov izoelektrickou fokusáciou pri maximálnom el. prúde 50 µA, ktorá bola ukončená po dosiahnutí 30000 Vh (Protean IEF, Bio-Rad).

Po izofokusácii boli IPG prúfky ekvilibrované 10 min v ekvilibra nom pufrí I a následne 10 min v ekvilibra nom pufrí II (zlofenie vi príloha). Potom prebiehala SDS-PAGE pri konštantnom napätí 150 V. IPG prúfky boli vložené na 12% 2-D polyakrylamidové gély NuPAGE Bis-Tris Precast (Invitrogen) spolu s proteínovým štandardom. Separácia prebiehala pri konštantnom napätí 150 V na aparátúre X Cell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen).

Po elektroforéze boli gély nafarbené CBBR-250 a zdokumentované, alebo boli gély s proteínovými vzorkami inkubovanými s DCG-04 alebo preblotované na PVDF membránu štandardným postupom ako je uvedené vyššie.

1D aj 2D elektroforéza bola tiež aplikovaná na vzorky homogenátu inkubované s 20 μM fluorescenčným značiacim DCG-04 (Red) (rovnako ako s biotinylovaným DCG-04, s rozdielom, že všetky kroky prebiehali v tme) a gély boli zdokumentované pomocou fluorescenčného skeneru Molecular Imager FX (Bio-Rad) pri nastavení Cy 2 filtru (excitácia 488 nm, emisia 530 nm).

Vybrané prúfky alebo spoty z gélov 1D a 2D elektroforézy boli vyrezané, vložené na sucho do 0,5 ml skúmavky a poslané na analýzu do Laboratória hmotnostnej spektrometrie (Sekcie Biologie, Přírodovědná fakulta UK v Praze). Proteínové vzorky boli štápené trypsinom v géle a následne boli štápy eluované. Analýza prebiehala na prístroji 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex), ktorý obsahuje Nd:YAG laser (355 nm, bombardovanie s frekvenciou 200 Hz). Data boli analyzované pomocou programu MASCOT 2,2 (Matrix Science) a porovnávané s databázou, ktorá obsahuje približne 6000 proteínov, medzi ktoré boli zaradené aj nami dodané sekvencie katepsínov *L. D. pseudospathaceum* (vi kapitolu 4.2.3.).

3.3. Molekulárne metódy

3.3.1. Syntéza ss cDNA

Z celkovej RNA bola izolovaná mRNA pomocou kitu mRNA Capture Kit (Roche) podľa návodu. Tá bola použitá na syntézu ss cDNA pomocou kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit podľa návodu. Koncentrácia bola zameraná na spektrometre Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) a cDNA bola následne uchovaná pri 620 °C.

3.3.2. PCR

Nasyntetizovaná cDNA bola nariadená na koncentráciu 100 ng/μl a použitá v PCR reakcii ako templát spolu s degenerovanými primerami, ktoré boli navrhnuté pod a alignmentu sekvencií konzervovaného miesta cysteínových peptidáz. Reakcia (tab. 3) prebiehala na prístroji C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) s programom popísaným v tab. 4. K separácii amplifikovanej DNA bola použitá horizontálna DNA elektroforéza. Vzorky boli nanosené na 1,5% agarózový gél obsahujúci Sybr green v TAE pufri (Invitrogen), spolu s DNA markrom HyperLadder IV (Bioline). Elektroforéza prebiehala cca 30 min pri konstantnom napätí 100 V. Bandy naamplifikovanej DNA boli vyrezané pod modrým svetlom.

Tab. 3 ó Zloženie reaknej zmesi PCR

EmeraldAmp GT Master Mix (Takara)	12,5μl
cDNA (100 ng/μl)	1 μl
Primer-forward (10 μM) 5'- CAA/G GGN CAR TGY GGI TCN TGC/T TGG - 3'	1 μl
Primer-reverse (10 μM) 5'- CCA NSA/T RTT YTT IAC RAT CCA A/GTA - 3'	1 μl
ddH ₂ O	9,5 μl
Celový objem	25 μl

Tab. 4 ó Program PCR reakcie s degenerovanými primerami

	Reakcie	as	Teplota	Opakovanie
1.	Denaturácia	5 min	94 °C	1x
2.	Denaturácia	60 s	94 °C	35x
	Anealling	60 s	45 °C	
	Polymerácia	60 s	72 °C	
3.	Dokonenie polymerácie	10 min	72 °C	1x

3.3.3. Klonovanie do plazmidu a transformácia buniek *E. coli*

PCR amplifikovaná DNA bola z gélu izolovaná kitom Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) podľa návodu a eluovaná do 10 μl ddH₂O. Ihne bola zaligovaná do plazmidového vektoru pCR2.1-TOPO pomocou klonovacieho kitu TOPO

TA Cloning Kit (Invitrogen) pod a návodu (tab. 5). Ligácia prebiehala 12 hod pri teplote 14 °C v C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) .

Tab. 5 ó Liga ná zmes pre ligáciu DNA do plazmidového vektoru pCR2.1-TOPO

10 x liga ný pufr	1 µl
Plazmidový vektor	2 µl
PCR amplifikovaná DNA	3-6 µl
T4 DNA ligáza	1 µl
Celkový objem (doplnený ddH ₂ O)	10µl

Plazmid bol pomocou teplotného -oku transformovaný do kompetentných buniek (One Shot TOP10, Invitrogen), ktoré boli pomaly rozmrazené na ade a bola k nim pridaná liga ná zmes (3-5 µl). Po tepelnom -oku (45s, 42 °C) bolo k bunkám pridané S.O.C. médium (200µl, Invitrogen) s al-ím postupom pod a manuálu.

3.3.4. Kontrola transformácie buniek a izolácia plazmidu

Narastené kolónie buniek vyselektované na platniach s Low salt LB médium obsahujúcim kanamycín (25µg/ml) boli skontrolované nasledujúcim postupom, i obsahujú plazmid s poľadovaným inzertom. Bunky z kolónií boli na -pi ke prenesené do 8 µl ddH₂O a v thermocycleri C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) bol pouflitý program CRACK buniek (tab. 6).

Tab. 6 - Program CRACK buniek

	Teplota	as
1.	94 °C	5 min
2.	50 °C	1,5 min
3.	94 °C	1,5 min
4.	45 °C	1 min
5.	94 °C	1 min
6.	40 °C	1 min
7.	4 °C	2 min

K takto upraveným bunkám, ktoré boli zdrojom templátovej DNA bola primie-aná PCR reakcia s primerami -pecifickými pre daný plazmid M13 (tab. 7), s programom v tab. 8. Výsledok bol vyhodnotený na 1,5% agarózovom géle so Syber green, amplifikovaná

DNA bola vyrezaná z gélu pod modrým svetlom, izolovaná kitom Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) pod a návodu a eluovaná do 10 μ l ddH₂O. Vzorky DNA boli spracované pod a manuálu sekvena ného laboratória a poslané na sekvenáciu (Seqlab, P F UK v Praze).

Tab. 7 - Primery M13

M13 forward	5 ϕ - TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3 ϕ
M13 reverse	5 ϕ - CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3 ϕ

Tab. 8 - Program PCR reakcie s M13 primerami

	Reakcie	as	Teplota	Opakovanie
1.	Denaturácia	2 min	94 °C	1x
2.	Denaturácia	60 s	94 °C	30x
	Anealling	60 s	55 °C	
	Polymerácia	60 s	72 °C	
3.	Dokon enie polymerácie	10 min	72 °C	1x

Kolónie buniek, u ktorých bolo potvrdené, že obsahujú požadovaný inzert boli preo kované do tekutého média Low Salt LB (5 ml) a 12 hod inkubované na trepa ke (150 otá ok/min) pri 37 °C. Z kultúry bol následne vyizolovaný plazmid pomocou kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Izolované plazmidy boli poslané na sekvenáciu s M13 primerami rovnakým postupom ako produkty PCR reakcie po CRACKu buniek. Získané sekvenice boli vyhodnotené pomocou programu Geneious 8.1.2.

3.3.5. 3' a 5' RACE PCR

RACE (rapid amplification of cDNA ends) sa používa pre získanie neznámej sekvencie 5' a 3' koncov génov, nami použitý kit bol FirstChoice RML-RACE Kit. Bolo použitých niekoľko modifikácií návodu pre získanie sekvencií troch génov.

3.3.5.1. Izolácia RNA a príprava cDNA

Pre tieto metódy bola celková RNA izolovaná ufl popisovaným spôsobom a tiež pomocou kitu DirectZol RNA Mini Prep pod a návodu, sporocysty z hepatopankreasu boli skladované v Trizole, RNA bola eluovaná z kolóny do 20 μ l ddH₂O. alej príprava

cDNA prebiehala pod a návodu, pomocou kitu FirstChoice RML-RACE Kit, vstupné množstvo celkovej RNA bolo 10 µg.

3.3.5.2. Modifikácie návodu kitu v príprave cDNA

Návod kitu na prípravu cDNA pre syntézu 5'konca bol zmenený nasledujúcim spôsobom. Z celkovej RNA získanej pomocou kitu RNA Mini Prep bola vyizolovaná mRNA pomocou kitu mRNA Capture Kit (Roche) pod a návodu. Výsledkom bola mRNA naviazaná na povrchu 0,2 ml skúmavky pokrytej streptavidínom (cez biotinylovanú poly T próbu), do ktorej bola namieaná prvá enzymatická (CIP) reakcia. Pre jej termináciu nebola použitá fenol-chloroformová precipitácia, ale premývanie wash pufrom z kitu RNA Mini Prep. (Zymo Research), tak isto ako aj po alej (TAP) reakcii, a do skúmavky s naviazanou enzymaticky o-trenou mRNA bola namieaná liganá reakcia pod a návodu a znovu nasledovalo premývanie. alej ufl bola naviazaná premytá mRNA s naligovaným adaptérom prepisovaná na cDNA pod a návodu.

3.3.5.3. 3'a 5'RACE

Po príprave cDNA nasledovala nested PCR (tab. 8) s primerami v prílohe pod a návodu kitu, s teplotou annealingu 55-65 °C a s master mixom EmeraltAmp (Clontech). Celkový objem prvej reakcie bol 25 µl, z ktorých bolo odobraných 5 µl do druhej (nested) PCR reakcie. Amplifikovaná DNA z oboch reakcií bola aplikovaná na 1,5% agrózový gél. Bandy boli vyrezané pod modrým svetlom a následne DNA bola purifikovaná ufl spomínaným spôsobom, alej bola zaligovaná do vektoru pGEM-T pomocou kitu pGEM-T Easy Vector System (Promega) pod a návodu. Ligácia prebiehala v 4 °C cez noc (liganá zmes v tab. 9). Transformácia kompetentných buniek *E. coli* alej prebiehala tepelným šokom pod a návodu kitu.

Tab. 9 ó Liganá zmes pre ligáciu DNA do plazmidového vektoru pGEM-T

2 x liganý pufr	5 µl
pGEM-T vektor	1 µl
PCR amplifikovaná DNA	3 µl
T4 DNA ligáza	1 µl
Celkový objem	10 µl

Po transformácii buniek boli vzorky pripravené rovnakým spôsobom ako v 3.3.4., a poslané na sekvenáciu. Po osekvenovaní boli sekvencie poskladané dohromady pomocou programu Geneious 8.1.2. Následne boli vytvorené špecifické primery (u DpCL2 a 3) (tab. 10), ktoré nasadajú na konce kompletných sekvencií poskladaných génov. Dané primery boli použité v PCR, aby boli amplifikované a osekvenované kompletné sekvencie týchto génov, pre overenie správnosti zkompletovania iastých sekvencií a ich koncov.

Tab. 10 6 Primery použité pre overenie sekvencie génov DpCL2 a 3

DpCL2 forward primer	5'- ATG AAG TTC ATA TTC ATA CTA GTT -3'
DpCL2 reverse primer	5'- TTA TTT GAC TAG TGG CAC GCT ACT -3'
DpCL3 forward primer	5'- ATG AAG TTC GTA TTC ATA CTA GTT -3'
DpCL3 reverse primer	5'- GTA TTT GAC TAG TGG CAC GCT ACT -3'

Nukleotidové sekvencie peptidázových génov boli preložené do AK sekvencií pomocou programu ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>). U katepsínov DpCL2 a 3 bola zistená signálna sekvencia pomocou programu SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), odhadnutá molekulárna hmotnosť a pI pomocou Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) a N-glykosylačné miesta pomocou programu NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

3.4. Tvorba rekombinantného katepsínu L v *P. pastoris*

3.4.1. Transformácia kvasiniek *P. pastoris*

Pre prípravu rekombinantného katepsínu L bola použitá cDNA reverzne transkribovaná ufl spomínaným kítom z mRNA vývojových štádií *D. pseudospathaceum* (ako v 3.3.5.1.). Ako expresný systém boli zvolené kvasinky *Pichia pastoris* a rekombinantný proteín bol pripravovaný podľa upraveného manuálu EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

Špecifické primery (tab. 11) boli navrhnuté tak, že reverse primer obsahoval sekvenciu kódujúcu 6 x His (His-tag), na C-konci, aby sa dal afinitne purifikovať, alebo aby bol detekovateľný protilátkou proti His-tag na membráne. Primery boli navrhnuté tak, aby peptidáza bola translatovaná bez signálnej sekvencie. Tiež obsahujú restričné miesta pre Xho I a Not I restričné endonukleázy.

Tab. 11 ó Expresné primery poufíté pri tvorbe rekombinantného DpCL3

forward primer	5'-ATACTCGAGAAAAGATCGCCGAACAACCTCATCCGTTGTGGCAT-3' flttým oznaené restrik né miesto Xho I, tu ným sekven ne -pecifiká as
reverse primer	5'ATGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGATGTTTGACTAGTGGCACGCT-3' flttým oznaené restrik né miesto Not I, erveným His-tag, tu ným sekven ne -pecifiká as , v ráme ku stop kodón

Pre PCR s expresnými primerami bol poufítý EmeraldAmp MAX Master Mix (Takara) (reak ná zmes v tab. 3). DNA amplifikovaná v reakcii (tab. 4, s annealing teplotou 65 °C) bola purifikovaná z vyrezaného agarózového 1,5% gélu, zaligovaná do vektoru pGEM-T a transformovaná do kompetentných buniek *E. coli* ako v 3.3.5.3. Bunky boli vysiate na LB platne s ampicilínom (50µg/ml) a po inkubácii cez noc (37 °C) bolo vybraných 5 kolónií, ktoré boli preo kované na al-íu LB plat u s ampicilínom. Po inkubácii v 37 °C bolo u kolónií overené, i obsahujú daný insert CRACKOM buniek a sekvenáciou, rovnako ako v 3.3.4.

Kolónia, u ktorej bolo overené sekvenáciou, fle obsahuje pGEM-T plazmid s pofadovaným inzertom, bola preo kovaná do tekutého LB média (5 ml) s ampicilínom a po inkubácii cez noc pri 37 °C a trepaní 150 ot/min (Max^Q 4000). Z tejto kultúry bola vyzolovaná plazmidová DNA pomocou kitu High Pure Plazmid Isolation Kit (Roche) a nasledovalo -tiepenie plazmidu v reakcii (tab. 12) s Xho I a Not I restrik nými endonukleázami (Promega). Tiepenie bolo poufíté aj na prázdny expresný plazmid pPICZ B.

Tab. 12 ó Tiepenie plazmidov (pGEM-T a pPICZ B) restrik nými endonukleázami - reak ná zmes a postup

Xho I	1 µl
Not I	1 µl
plazmidová DNA	1 µg
10 x NEB pufr 3.1 (Promega)	5 µl
finálny objem doplnený ddH ₂ O	50 µl
inkubácia	15 min 37 °C
inaktivácia endonukleáz	20 min 60 °C

Obe reakcie -tiepenia boli nanesené s loading dye na 1,5% agarózový gél a ako kontrola bol poufítý tiefl ne-tiepený prázdny pPICZ B plazmid (cca 1 µg). Z gélu boli vyrezané a purifikované vy-tiepený inzert s peptidázovým génom a roz-tiepený prázdny pPICZ B plazmid (vektor). Nasledovala ligácia (tab. 13) a zaligovaný plazmid bol

transformovaný do buniek *E. coli* ufl spomínaným spôsobom (s rozdielnym antibiotikom pre pPICZ B plazmid ó zeocin 25 µg/ml). U narastených kolónií bolo overené, fle obsahujú inzert CRACKom a sekvenáciou (s primerami –pecifickými pre pPICZ B- AOXI 3´a AOXI 5´, Invitrogen)

Tab. 13 ó Ligácia génu do pPICZ B plazmidu (vektor) ó reak ná zmes a postup

vektor (lineárny pPICZ B)	100 ng (4 µl)
inzert (gén)	80 ng (8 µl)
T4 ligáza (Promega)	0,5 µl
10 x liga ný pufr	2 µl
finálny objem doplnený ddH ₂ O	20 µl
ligácia	cez noc 14 °C

Kolónia, u ktorej bolo overené sekvenáciou, fle obsahuje pPICZ B plazmid s pofadovaným inzertom, bola preo kovaná do tekutého LB média (5 ml) s ampicilínom a po inkubácii cez noc pri 37 °C a trepaní 150 ot/min (Max^Q 4000). Táto kultúra bola preo kovaná do vä –ieho množstva tekutého LB (250 ml) bez ampicilínu a proces inkubácie sa opakoval. Následne bol z tejto kolónie vyizolovaný plazmid pomocou kitu Genopure Maxi Plasmid Kit (Roche) (cca 5 µg), ktorý bol linearizovaný potrebným po tom jednotiek (5 µl) restrik nej endonukleázy Sac I (Promega) a elektroporovaný do vopred namnožených a pod a návodu pripravených kvasiniek *P. pastoris* - pod a prednastaveného protokolu prístroja (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad) pre *P. pastoris*. Následné spracovanie je v tab. 14.

Tab. 14 ó Spracovanie buniek *P. pastoris* po elektroporácii - postup

pridaný 1 ml (4 °C) sorbitol, inkubácia	1 hod, 30 °C
centrifugácia	5 min, 1500 x g
k peletu pridaná médium YPD, inkubácia	2 hod, 30 °C
centrifugácia	5 min, 1500 x g

Pelet kvasiniek bol následne rozsuspendovaný v 0,5 ml YPD a vysiaty (100 µl) na YPDS platne s 100µg/ml zeocínom a tie boli inkubované pri 30 °C, kým nevyrastli kolónie (cca 3 dni). Vybrané kolónie boli pouflité k expresii.

Pre overenie toho, či transformované klony *P. Pastoris* obsahujú požadovaný inzert bol použitý nasledujúci postup. Típkou pipety bolo odobrané malé množstvo buniek a rozsuspendované v 10 μ l dH₂O. Po pridaní 5 μ l lytikázy (5 U/ μ l, Sigma) bola zmes inkubovaná 10 min pri 30 °C a následne 10 min pri -80 °C. Následne bola namiešaná PCR reakcia (ako v kapitole 3.2.2.) s 5 μ l lyzátu buniek namiesto cDNA a expresnými primerami pre DpCL3 (tab. 11). Následoval proces ako v kapitole 3.2.2. (s annealing teplotou 60 °C).

3.4.2. Expresia rekombinantného proteínu

Vybrané klony transformovaných kvasiniek boli namnožené v malom množstve média 5ml (YPD alebo BMG so zeocínom 100 μ g/ml) cez noc v 30 °C pri trepaní 250 ot/min. Potom bola kultúra preokovaná do 500 ml YPD alebo BMG média (s ampicilínom, aby sa zabránilo kontaminácii) v 2l kultivačných Erlenmeyerových bankách a inkubovaná cez noc v rovnakých podmienkach. Kultúra bola následne zcentrifugovaná pri 1500 x g, 5 min, 25°C a resuspendovaná v 500ml BMM média, následne pre indukovanie expresie bola kultúra inkubovaná 2-5 dní, pričom bol každých 24 hod pridávaný metanol (10 ml tak aby bol v objeme média 2% metanol) a odoberaný 1ml média pre kontrolu expresie pomocou merania peptidázovej aktivity vo i substrátu Z-Phe-Arg-AMC. Všetky médiá obsahovali ampicilín, aby sa zabránilo prípadnej kontaminácii baktériami.

Po indukcii expresie bola kultúra v médiu centrifugovaná (4000 x g, 4 °C) a ponechaný supernatant bol prefiltrovaný cez 0,22 μ m membránu (Millipore). Pre skoncentrovanie proteínov v supernatante boli použité filtre Amicon Ultra 15 (10 kDa MWCO, Millipore) alebo lyofilizácia. Následne bol exprimovaný proteín purifikovaný afinitnou chromatografiou pomocou His-tagu na kolóne, na ktorú sa viafle (NI-NTA Agarose, Qiagen), proteíny z média po inkubácii s agarózovými guľkami (1h) boli 2 krát premývané pufrom (0,1 M HEPES, pH 8) a následne eluované v 4 frakciách pufrom (0,1 M HEPES, pH 8, 250 μ M imidazol).

Pre otestovanie prítomnosti rekombinantného katepsínu DpCL3 v médiu bola meraná aktivita s fluorogénnym substrátom FR pri pH 6. Následne boli médium po skoncentrovaní a eluované frakcie z chromatografie použité na elektroforézu a následné preblotovanie na membránu (viz 3.2.3.). Membrána po blokovaní bola inkubovaná 1h s protilátkou proti

His-tagu (Mouse Anti-his, Invitrogen) riedenou 1:2000. Po premytí (3 x 5 min) nasledovala inkubácia so sekundárnou protilátkou značenou peroxidázou (goat anti-mouse IgG, Sigma). Nasledovalo premývanie a vyvíjanie membrány pomocou kitu Opti-4CN (Bio-Rad). Prúfky na géle, ktoré boli na membráne označené protilátkami (takže obsahujú His-Tag), boli poslané na analýzu hmotnostnou spektrometriou (viď kapitolu 3.2.4).

3.5.Histologické metódy, imunolokalizácia, TEM

3.5.1. Histologické spracovanie vzoriek

3.5.1.1. Zalievanie tkanivá do parafínu

Fixované vzorky hepatopankreasu boli postupne odvodované vzostupným alkoholovým radom, následne projasnené xylénom, prevedené do nasýtenej zmesi xylén/parafín a neskôr do parafínu, ktorý bol vymieňaný (tab. 15).

Tab. 15 - Príprava tkaniva na zaliatie do parafínu

70% EtOH	3 x 30 min	laboratórna teplota
96% EtOH	3 x 30 min	laboratórna teplota
100% EtOH	3 x 30 min	laboratórna teplota
Xylén I	15 min	laboratórna teplota
Xylén II	15 min	laboratórna teplota
Xylén/Parafín	15 min	laboratórna teplota
Parafín I	1 hod	56 °C termostat
Parafín II	12 hod	56 °C termostat
Parafín III	1 hod	56 °C termostat

Tkanivo presýtené parafínom (Paraplast Plus, Leica Microsystem) bolo zaliate prvým parafínom do bloku v silikónovej forme, ktorý sa nechal zatuhnúť pri laboratórnej teplote. Blok bol rezaný na mikrotome (Shandon Finésse ME) pomocou kovových epelí (Thermo Scientific) na 4-6 µm hrubé rezy. Následne boli rezy napínané na vodnej hladine a po umiestnení na sklíčko boli ponechané na predhriatej platni (40 °C)

3.5.1.2. Zalievanie cercárií do JB-4

Pre zalievanie cercárií do média bol použitý JB-4 Plus Embedding Kit (Polysciences, Inc.), JB-4 je vo vode rozpustná glykolmetakrylátová flivica. Z fixovaných cercárií bola

vymývaná fixácií pomocou 70% EtOH (30 min) a potom boli ponorené do infiltračného roztoku (pod a návodu). Infiltrácia prebiehala pri laboratórnej teplote a infiltračný roztok bol menený po 1 h, 24 h a znovu 1h. Potom boli cerkárie pipetou prenesené do fľelatínovej kapsuly a zaliate polymeračným roztokom (pod a návodu) tak, aby v nej nezostal vzduch. Cerkárie boli centrifugované, aby klesli na dno kapsule (5000 x g, 10 min, niekoľko krát) a polymerácia prebiehala pri laboratórnej teplote 24 hod. Pred rezaním bola odstránená fľelatínová kapsula a pomocou mikrotomu boli rezané 4-5µm hrubé rezy na sklenených nožoch, ktoré boli položené do kvapky vody na Superfrost Plus (Thermo Scientific) pri navésklika.

3.5.1.3. Preh adové farbenie parafínových a JB-4 rezov hematoxylín-eozínom

Pre získanie preh adu v telách cerkárií bolo zvolené základné histologické farbenie preparátov. U parafínových aj JB-4 rezov bol poufítý hematoxylín-eozín (Ehrlichov kyslý hematoxylín) (HE, zlofenie v prílohe). Parafínové rezy pred farbením boli zbavené parafínu a zavodnené (tab. 16). JB-4 rezy boli farbené okamfíte. Následne boli rezy montované do DPX montovacieho média (Sigma).

Tab. 16 ó Proces farbenia HE parafínových a JB-4 rezov

Parafínové rezy					
Odparafínovanie	xylén I	10 min			
	xylén II	10 min			
Zavodnenie	100% EtOH	2 min			
	96% EtOH	2 min			
	75% EtOH	2 min			
Farbenie	hematoxylín	3 min	Farbenie	hematoxylín	15
	odmývanie H ₂ O	-		odmývanie H ₂ O	-
	eozín	1 min		eozín	5 min
	odmývanie ddH ₂ O	-		odmývanie ddH ₂ O	-
Odvodnenie	75% EtOH	2 min	Odvodnenie	75% EtOH	2 min
	96% EtOH	2 min		96% EtOH	2 min
	100% EtOH	2 min		100% EtOH	2 min

3.5.2. Imunolokalizácia katepsínu L v cercáriách

3.5.2.1. Tvorba protilátok

Špecifické protilátky proti purifikovanému katepsínu L boli vyrábané imunizáciou outbredných myšíc ICR (CD-1, Harlan) (samičky) dvoma spôsobmi.

Imunizácia dvoch myšíc prebiehala pomocou TiterMax Gold Adjuvant (Sigma). Adjuvant (300 μ l) bol zmiešaný s antigénom - purifikovaným proteínom z frakcií po FPLC číslo 25 a 26 (viď kapitola 4.1.1.). Celkové množstvo antigénu - proteínu bolo 300 μ g s objemom 300 μ l (takže s požadovanou stratou pri zaobchádzaní bolo použité množstvo antigénu 120 μ g na jednu myš). Adjuvant s antigénom boli sonikované aľ do vytvorenia hustej emulznej hmoty (pre obmädzenie strát rovno v injeknej striekačke). Následne boli aplikované jednej myši subkutánne a druhej intramuskulárne (v jednej dávke bez opakovania).

Ďalší spôsob imunizácie pomocou antigénu z polyakrylamidového gélu bol aplikovaný na dve myši. Ako antigén boli použité proteíny z FPLC frakcie 24. Celkové množstvo použitého proteínu 150 μ g bolo naložované na 2-D 4-12% gradientový polyakrylamidový gél NuPAGE Bis-Tris Precast (Invitrogen), elektroforéza prebiehala uľ spomínaným spôsobom (viď kapitola 3.2.4.). Prúflok poľadovaného proteínu bol vyrezaný a homogenizovaný v 400 μ l sterilného fyziologického roztoku v homogenizátore a injekovaný myšiam intraperitoneálne (celkové množstvo antigénu na jednu myš - bolo cca 50 μ g). Tento proces sa opakoval 2 x v rozmedzí dvoch týždňov, po každom imunizovaní bola myšiam odobraná krv a krvné sérum bolo testované na protilátky pomocou metódy Western blotting.

3.5.2.2. Testovanie špecifity protilátok - Western blotting

Týždeň po každej imunizácii oboma spôsobmi bola myšiam odobraná krv, 20-40 μ l z chvostu. Po centrifugácii v kapilárach 16000 x g, 10 min a 4 °C, bolo odobrané krvné sérum.

Proteínová elektroforéza na 2-D polyakrylamidovom géle, za použitia cercariálneho homogenátu (množstvo proteínu 150 μ g) a preblotovanie proteínov na PVDF membránu

boli prevedené postupom zmieneným v 3.2.3. Membrána bola nafarbená 0,01% Ponceau (Sigma) a narezaná na 0,5 cm široké prúfky.

Jednotlivé prúfky boli v blotovacej miske blokované po dobu 3 hod v PBS-T s 5% mliekom (Non-Fat Dried Milk, Sigma). Následne boli 1 hod za stáleho mieania inkubované so sérom myšou obsahujúcim primárne protilátky zriedeným 1:100 a 1:200 s PBS-T. Potom boli prúfky premyté 3x 5 min v PBS-T a alej inkubované so sekundárnou (goat anti-mouse IgG, Sigma) protilátkou značenou peroxidázou, rozriedenou v PBS-T v pomere 1:1000. Inkubácia trvala 1 hod za stáleho mieania a nasledovalo premytie 3x 5 min v PBS-T. Potom boli prúfky vyvíjané pomocou kitu Opti-4CN (Bio-Rad).

3.5.2.3. Imunohistochemická lokalizácia

Pre imunolokalizáciu katepsínu boli poufíté rezy JB-4 so zaliatymi cercárkami. Rezy na SuperFrost priľnavých sklíkach boli blokované za stáleho mieania 3 hod alebo cez noc v PBS-T s 3% alebo 5% BSA. Následne boli inkubované 1 hod so sérom s primárnymi protilátkami v PBS-T v pomere 1:100 vo vlhenej komore. Po premytí 3 x 5 min v PBS-T boli rezy na sklíkach inkubované v tme so sekundárnymi fluorescenčnými značenými protilátkami goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies) riedenými v PBS-T v pomere 1:500 a 1:1000. Sklíka boli alej premyté ako prvý raz (v tme) a rezy boli zamontované v 50% pufovanom glycerole (v 20 mM Tris-HCl pH 7,8). Rezy, ktoré boli negatívnou kontrolou boli inkubované v sére neimunizovaných myšou. Výsledok bol zdokumentovaný na fluorescenčnom mikroskope Olympus BX 51.

3.4.3. Príprava vzorkov na TEM

Pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu boli spracované cercárie nasledujúcim spôsobom. Pre fixáciu a postfixáciu bol poufítý 2,5% glutaraldehyd (Sigma) a 1% OsO₄ v dvoch rôznych pufoch 0,1M kakodylátovom a 0,4M HEPES pufri (zložené v prílohe) s následným postupom v tab. 17.

Tab. 17 ó Postup prípravy vzorkov pre TEM

fixácia	2,5% glutaraldehyd	12 hod, 4 °C
premývanie	kakodylátový/HEPES	3 x 15 min
postfixácia	1% OsO ₄	1 hod
premývanie	kakodylátový/HEPES	3 x 5 min
odvodnenie	50% EtOH	10 min
	70% EtOH	10 min
	80% EtOH	10 min
	96% EtOH	10 min
	100% EtOH	3 x 5 min
	100% acetón	3 x 5 min
presycovanie vzorkov zmesou acetónu : flivice	3 : 1	2 hod
	1 : 1	4 hod
	1 : 3	12 hod
presýtenie flivicou	flivica	3 x 12 hod

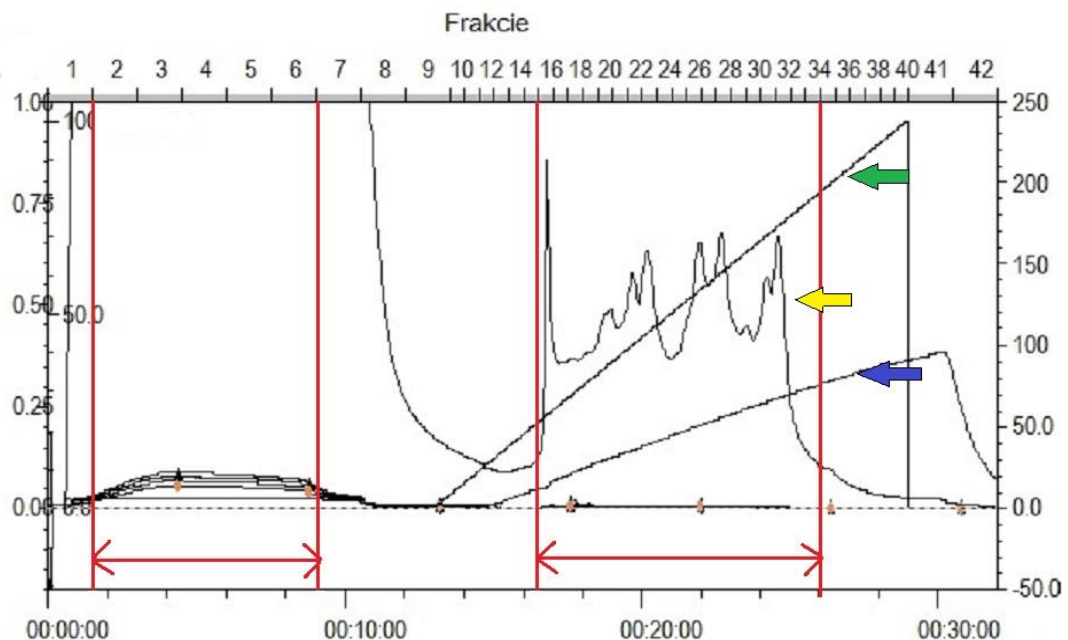
flivica Poly/Bed 812/Araldite 502 (Polysciences, Inc) bola pripravená pod a návodu. Vzorky po presýtení flivicou boli zaliaté istou flivicou do BEEM kapsúl (SPI Supplies) a centrifugované, aby klesli na dno. Následne boli umiestnené do termostatu (60 °C) na 48 hod., aby došlo k polymerácii. Zpolymerované bloky boli poslané do LEM (P F UK), kde boli krájané ultramikrotomom na ultratenké rezy (60 nm). Tie boli kontrastované 20 min. 3% octanom uranylu a citrátom olovnatým. Hotové rezy boli pozorované na transmisnom elektrónovom mikroskope JEOL 1011.

4. VÝSLEDKY

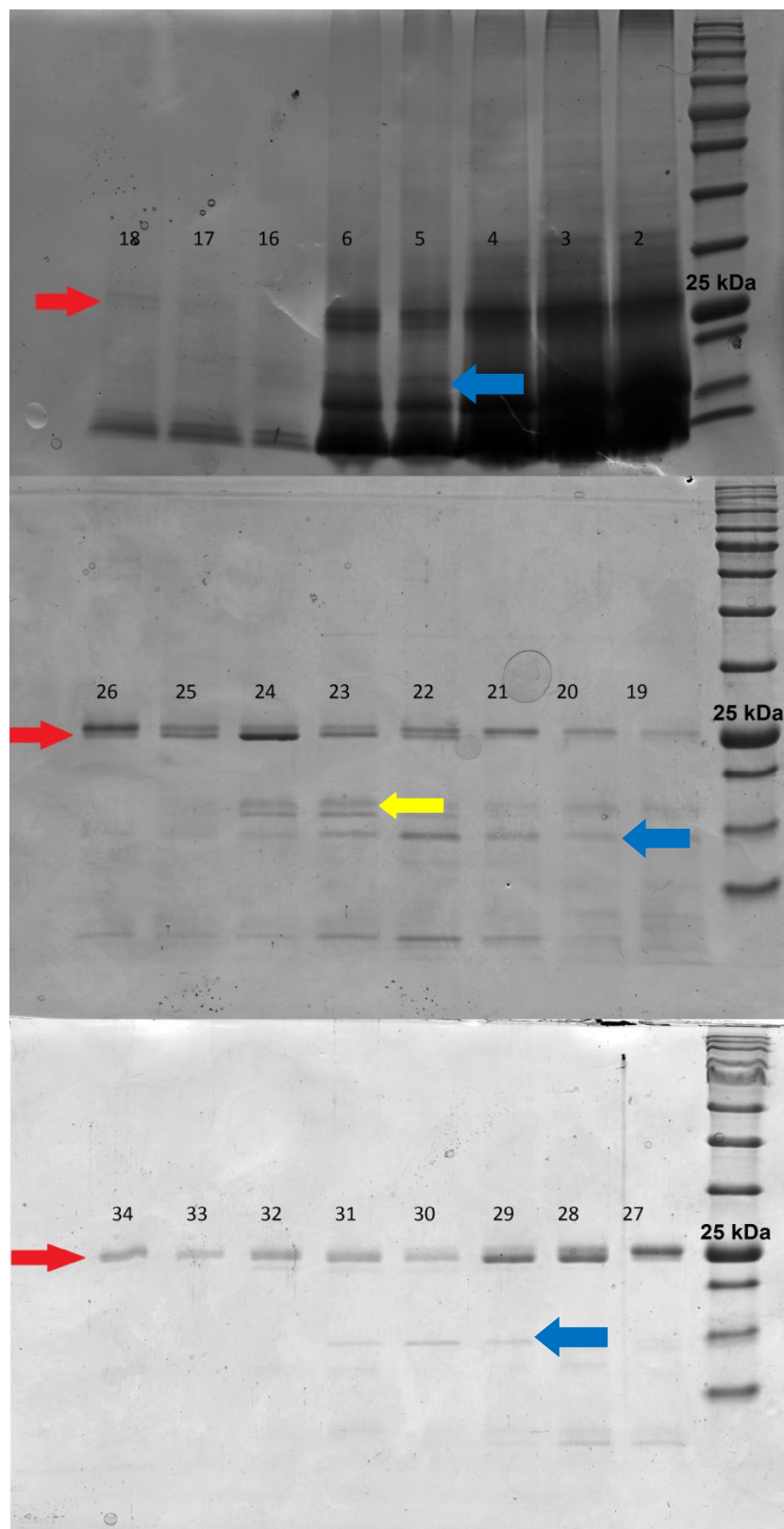
4.1. Biochemické metódy

4.1.1. Chromatografická purifikácia proteínov

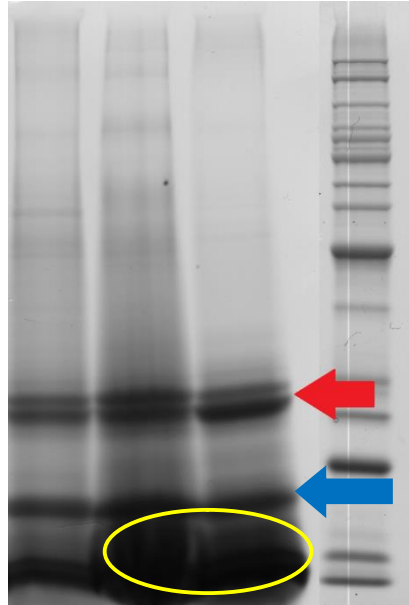
Pri chromatografickej separácii proteínov z cercariálneho homogenátu bolo v elu nej krivke (obr.7) pozorovaných niečo ko vrcholov. Frakcie 16- 34 a 2 - 6 tzv. šflow-throughõ (proteíny, ktoré sa nezachytili na kolóne a pretiekly) boli zbierané a spracované. Frakcie boli separované na 1D SDS PAGE elektroforéze (obr. 8), kde daný proteín migroval ako dvojitý pruh okolo ve kosti 25 kDa, ktorý bol vidite ný aj ako majoritný pruh pri separácií proteínov homogenátu (obr. 8 a 9). V takmer v-etských frakciách a homogenáte boli pravidelne vyidite né bandy vo ve kosti cca 10 kDa (obr.8a 9) a tiefl dvojitý pruh proteínov vo ve kosti 12-14 kDa (vidite ne vo frakciách 23, 24). U týchto prúfkov sme predpokladí, fle by mohlo ís o prosekvenie od-tiepené od zymogénu peptidázy, ale hmotnostnou spektrometriou u dvojitého pruhu vo frakcii 24 (12-14 kDa) sa tento predpoklad nepotvrdil.



Obr. 7 ó Elu ná krivka proteínov z chromatografie FPLC. červené ípky ukazujú frakcie, ktoré boli zachytávané a spracované, krivka (flťá ípka) ukazuje koncentráciu proteínov v danom okamihu, stúpajúca priamka ukazuje zvy-ujúcu sa koncentráciu solí reálnu v ase (modrá ípka) , vypo ítanú (zelená ípka), osi: vodorovná ó as, zvislá vpravo - osmomolarita, zvislá v avo ó koncentrácia proteínov.



Obr. 8 ó SDS PAGE elektroforéza s jednotlivými frakciami po FPLC chromatografií. íslo 2-6 sú flow-through frakcie, 16-34 sú eluované frakcie, červená ípka ukazuje dvojitý pruh purifikovaného proteínu vo ve kosti cca 25 kDa a modrá ípka ukazuje pruh proteínov vyskytujúci sa vo frakciách o ve kosti cca 10 kDa a žltá ípka ukazuje dvojitý pruh (12-14 kDa) proteínov vo frakciách 23, 24.



Obr. 9 - SDS PAGE elektroforéza s cerkariálnym homogenátom (3 rôzne staré vzorky homogenátu). Červená šípka ukazuje dvojité pruhy v oblasti cca 25 kDa a modrá šípka ukazuje pruhy proteínov vyskytujúcich sa vo frakciách o veľkosti cca 10 kDa, v filtru elipsou je označený masívny pruh proteínov degradovaných na malé peptidy (5-10 kDa).

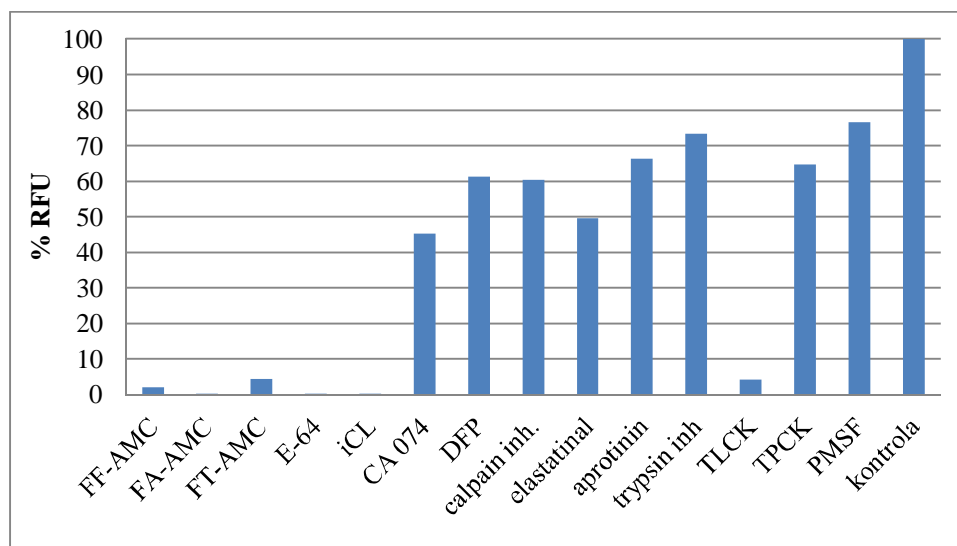
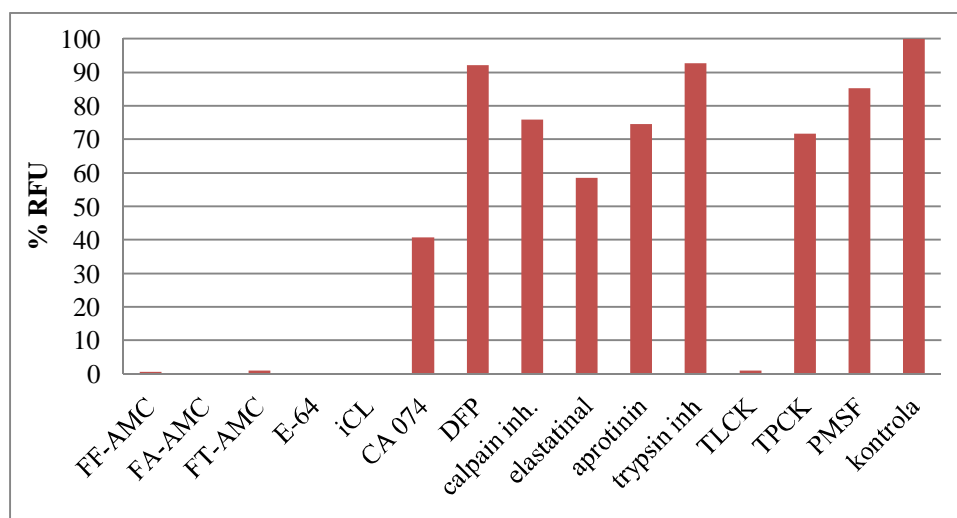
U cerkariálneho homogenátu sa tiež ukazuje, že peptidázy degradujú ostatné proteíny obsiahnuté v homogenáte, pretože na géli nie sú viditeľné žiadne výrazné pruhy väčších proteínov, ale množstvo čepov proteínov v oblasti 5-10 kDa (obr. 9). Na obr. 8 sú tieto degradované proteíny pozorovateľné vo flow-through.

4.1.2. Meranie aktivity enzýmu

Vo väčších frakciách (16-34) a homogenáte bola preukázaná peptidolytická aktivita za použitia fluorogénneho substrátu Z-Phe-Arg-AMC (FR) pri pH 5,5 (vo flow-through frakciách 2-6 len minimálna).

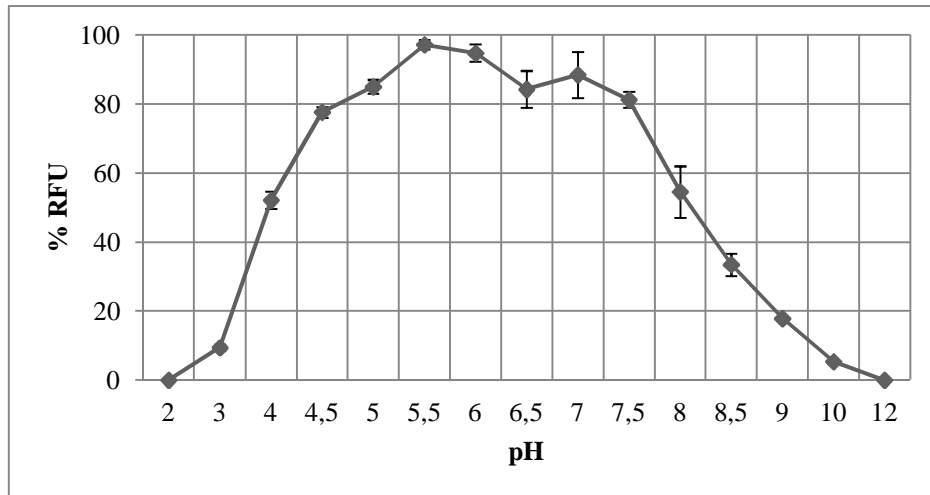
Meranie peptidolytickej aktivity prebiehalo u homogenátu s dvoma rôznymi substrátmi Z-Phe-Arg-AMC (FR) a Z-Arg-Arg-AMC (RR) (pre prípadné oddelenie katepsínov B a L). V homogenáte bola pozorovaná peptidolytická aktivita len so substrátom FR vo väčších prípadoch (pri pH 5, 7 a 9) v redukujúcich aj neredukujúcich podmienkach. V neredukujúcich podmienkach bola peptidolytická aktivita všeobecne nižšia. U jednotlivých frakcií bola aktivita meraná vždy len so FR substrátom v redukujúcich podmienkach pri rôznej koncentrácii pH, pre určenie pH optima.

Testy citlivosti na rôzne inhibítory preukázali, že ide o cysteínové peptidázy. Cercariálny homogenát bol testovaný len s CA-074 a E-64, šírka škála inhibítorov bola testovaná s frakciami 25/26 (zmes) v redukujúcich aj neredukujúcich podmienkach s pH 5,5 (graf 1). Aktivita bola úplne inhibovaná inhibítormi cysteínových peptidáz a inhibítormi iCL špecifickým pre katepsíny L. Inhibítormi CA-074, špecificky inhibujúci katepsíny B inhiboval aktivitu len čiastočne, vzorkám s týmto inhibítormi zostávalo cca 40% aktivity. Inhibítormi serínových peptidáz inhibovali aktivitu len málo, a na TLCK inhibítormi, ktorý nešpecificky môže inhibovať aj cysteínové peptidázy (Wolthers, 1969).



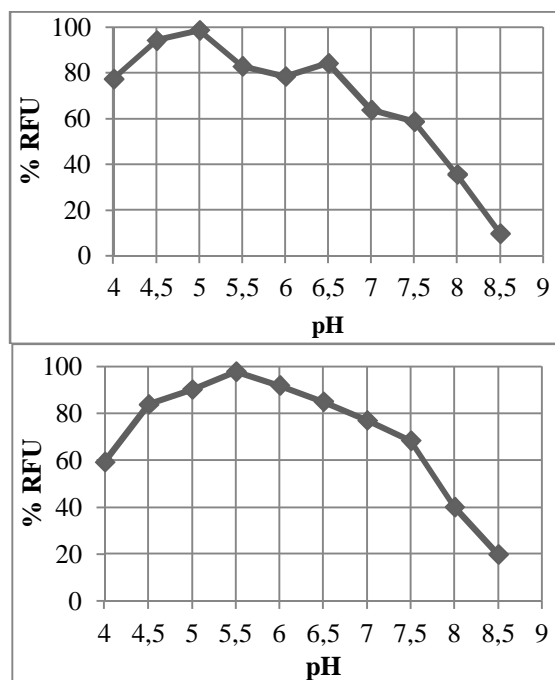
Graf 1 o Testy inhibície peptidolytickej aktivity s frakciou 25/26 a substrátom FR. 1. graf o meranie v redukujúcich podmienkach, 2. graf o neredukujúce podmienky (inhibítormi a ich špecifita sú uvedené v tab. 2)

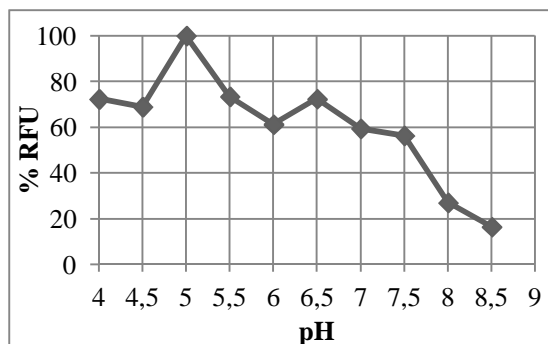
Optimum pH bolo detailnejšie sledované u vybraných frakcií, u frakcie 25/26 (graf 2) bola peptidolytická aktivita meraná v rade pH 2-12, pri čom enzým mal viac ako 50% aktivity v rade pH 4-8 a pH optimum aktivity je u tejto frakcie pH 5,5.



Graf 2 ó Meranie peptidolytickej aktivity v rade pH 2-12 s frakciou 25/26 a substrátom FR. Chybové úseky udávajú hodnotu smerodatnej odchylky

V ďalších vybraných frakciách (16/17, 27, 31) bola aktivita meraná v rade pH 4-8,5 (graf 3). Bolo zistené, že peptidázy v jednotlivých frakciách sa odlišujú profilom aktivity v tejto rade pH, a ich optimum aktivity sa pohybuje v pH 5-5,5. Tým bolo zistené, že v homogenáte cerkárí sa nachádza viac cathepsin L-like peptidáz s odlišnými vlastnosťami, vrátane hodnôt izoelektrických bodov.

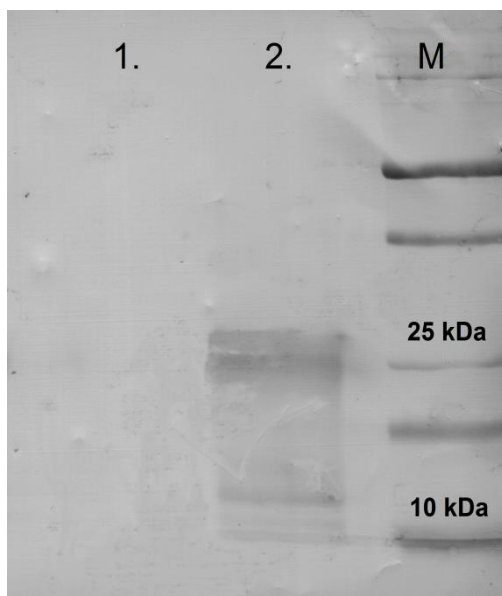




Graf 3 ó Meranie peptidolytickej aktivity vybraných frakcií v -kále pH 4-8,5 so substrátom FR v redukujúcich podmienkach. 1. graf ó frakcia 16/17, 2. graf ó frakcia 27, 3. graf ó frakcia 31

4.1.3. Detekcia cysteínových peptidáz biotinylovanou próbu DCG-04

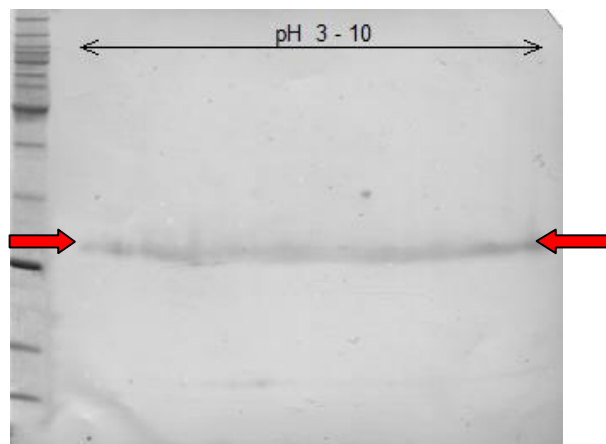
Vo vzorku cercariálneho homogenátu, ktorý bol inkubovaný so samotným DCG-04 bol zaznamenaný pruh vo ve kosti okolo 25 kDa. Pri použití inhibítorov E-64 a iCL bola väzba DCG-04 peptidázami blokováná, takže pruh sa neobjavil (obr. 10). Tiefl sa objavil dvojitý pruh vo ve kosti cca 10 a 12 kDa, o by mohli by roz-tiepené degradované peptidázy, ktoré si ale zachovávajú aktívne miesta a viaflu DCG 04.



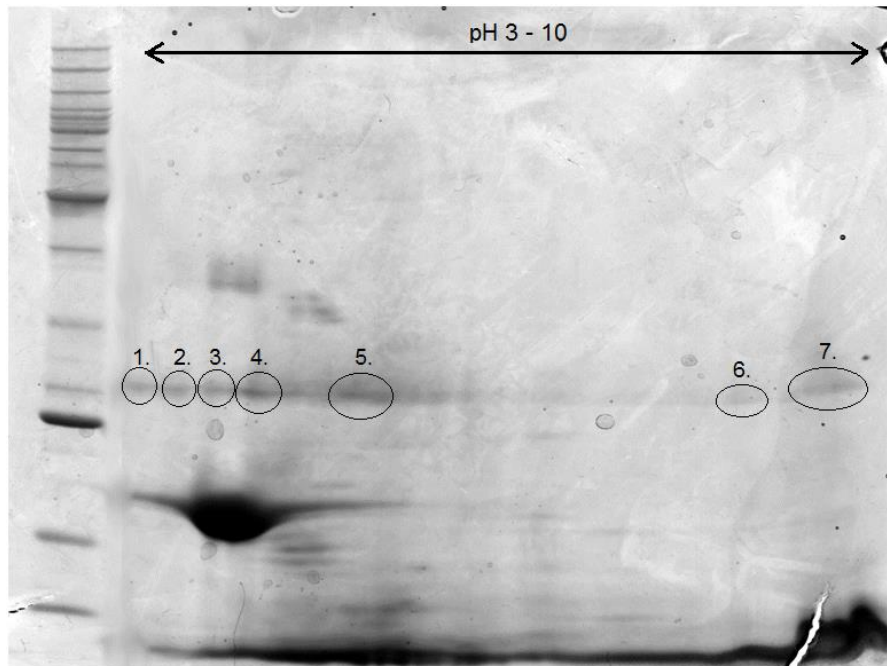
Obr. 10 ó Membrána s preblotovanými proteínmi SDS-PAGE cercariálneho homogenátu s detekovanými pruhmi proteínov s DCG-04. V avo (2) proteíny homogenátu inkubované DCG-04, pomocou ktorej boli detekované 25 Kda dvojitý pruh a tiefl pruhy v oblasti 10 a 12 kDa, vpravo (1) proteíny inkubované s E-64 pred DCG-04 ó väzba DCG-04 je úplne blokováná

4.1.4. 2D elektroforéza

Proteíny cercariálneho homogenátu označené DCG-04 boli separované 2D elektroforézou a preblotované (obr. 11). K separácii podľa pI proteínov (horizontálna os) nedošlo úplne. Takže cysteínové peptidázy boli detekované na blote vo veľkosti cca 25 kDa a v celom rozpätí pH 3-10 ako súvislý pruh. Vo vzorke bez DCG-04, ktorá bola pred fokusáciou precipitovaná, sa podarilo separovať proteíny lepšie do niektorých špotov (jednotlivých proteínových bodov), tieľ v celej šírke pH 3-10 (obr. 12).



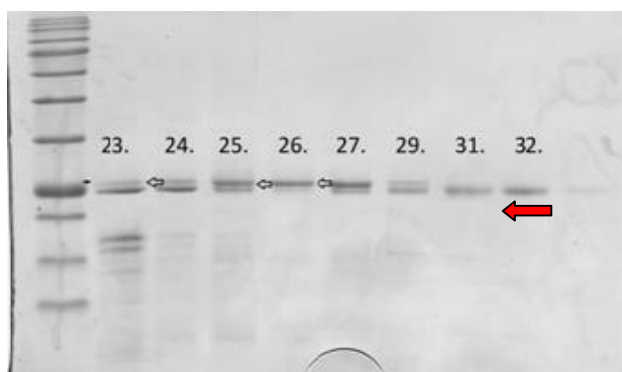
Obr. 11 - Membrána z 2D elektroforézy s proteínmi označenými biotinylovaným DCG-04, nachádzajú sa v oblasti okolo 25 kDa, ale sú málo separované podľa pI, takže nie je vidno jednotlivé špoty



Obr. 12 6 SDS PAGE Gél 2D elektroforézy proteínov cercariálneho homogenátu fokusovaných v rozmedzí pH 3-10. Špoty o veľkosti cca 25 kDa (zľava doprava označené 1-7), u ktorých bol predpoklad, že by mohli byť cysteínové peptidázy, sú označené (v kruhu), a boli vyhodnotené MS

4.1.5. Hmotnostná spektrometria (MS)

Okrem spotov identifikovaných pri 2D elektroforéze boli analyzované hmotnostnou spektrometriou tiež prúfky z 1D elektroforézy vybraných frakcií (obr. 13). Získané data boli analyzované programom MASCOT 2.2 (Matrix Science). Pre porovnanie boli dostupné sekvencie -teпов (tab. 18) zo -túdie týchto peptidáz (Mike- *et* Man, 2003) a sekvencie al-ích génov, ktoré boli získané molekulárnymi metódami (vi -alej). V prúfkoch a spotoch bola identifikovaná zhoda len u dvoch -teпов (3 a 8), ktoré vykazujú podobnos s cysteínovými peptidázami a zároveň ich neobsahuje žiadna porovnávaná kompletná proteínová sekvencia odvodená od získaných génov. Vo frakcii 31 a niektorých spotoch (spoty 3,4,5,7) boli nájdené peptidové -tepy, ktoré patria sekvencii katepsínu DpCL3 (tab. 19).



Obr. 13 - 1D elektroforézaproteínov vybraných frakcií (12% PAA gél)(frakcie íslo 23,24,25, 26, 27, 29, 31, 32).Z gélu boli vyrezané prúfky v-etských frakcií vo ve kosti cca 25 kDa a analyzované hmotnostnou spektrometriou, u frakcií 23-29 boli vyrezané a analyzované zvlá- horný (H) a spodný (S) prúflok, -ípky ukazujú prúfky, v ktorých sa podarilo nie o identifikova (vi - tab. 17)

Tab. 18 ó Peptidové -tepy získané hmotnostnou spektrometriou cysteínových peptidáz v práci Mike- *et* Man (2003) ó fltým pozadím sú ozn -ené -tepy sekven -e identické so sekvenciou získanej peptidázy DpCL3 (vi -alej). Spoty a prúfky ktoré boli analyzované hmotnostnou spektrometriou a boli u nich nájdené dané -tepy sú uvedené v tabulke v riadku daného -tepu

	peptidové -tepy (Mike- <i>et</i> Man, 2003)	prúfky z 1D elektroforézy	spoty z 2D elektroforézy
1.	H2N-XPDDNDSRKEGLVTQVXSQG-		
2.	-ALGNLLYSNK-		
3.	-LPDALDWR-	23H, 25H,26H	spoty 1-7
4.	-NGGLMSTAFE-		
5.	-DGELLEVLKY-		
6.	-VALDVEEDFM-		
7.	-NSWGASWGD-		
8.	-YGALFAR-	23H,23S,25H,26H	spoty 2,4,7

Tab. 19 6 Sekvencia DpCL3 získaná molekulárnymi metódami v tejto práci (viššie kapitoly) s označenými miestami sekvencie ktoré sa zhodujú so sekvenciami nájdenými hmotnostnou spektrometriou vo frakcii 31 (zelenou) a spotoch 3, 4, 5, 7 z 2D elektroforézy (fíltovej zelenej)

sekvencia DpCL3	
M	K F V F I L V A L I V N C V D L G L S S P E Q P H P L W H K W K Q
V	H A K Q Y Q G Q A E E T K R Y E I W H K A V K R I R L H N L K Y N
L	G L V S Y S M G A N Q F T D L T W E E F K Q H Y L S G L I Q L N R
T	N H R E N A E P K F V A T T D I P D N W D W K E Q G R V T K V K N
Q	G S C G S C W A F S A V G A I E G Q M A V K N V K M R S L S P K Q
L	V D C S K E G V N S G C N G G L M S T A F E Y V M K K G I Q T E K
S	Y P Y R P E D G R C K Y K K S K V A F K I N S Y R D V K S A D D G
E	L L E V L Y K V G P V S V A L D V E E D F M N Y R Q G I F K S D A C
S	P D N L N H G V L A T G F G V E N G Q K Y W S V K N S W G A S W
G	D G G Y I K I C R D S P N M C G I S S M S S V P L V K

4.2. Molekulárne metódy

4.2.1. PCR

Pomocou PCR s degenerovanými primerami boli amplifikované iasto né sekvencie ve ké cca 500 bp 3 génov cathepsin L-like cysteínových peptidáz (identifikované pomocou Blastx, NCBI). iasto né sekvencie kódujú cca 170 AK, spolu s Cys, His a Asn aktívneho miesta (obr. 14). Celkom bolo osekvenovaných 24 plazmidových inzertov kolónií (po transformácií *E. coli*) (okrem týchto troch sekvencií boli identifikované iné cysteínové peptidázy slimáka *L. stagnalis*, o sa dá vysvetli kontamináciou RNA z tkaniva hepatopankreasu slimáka).

4.2.2. 3' a 5' RACE PCR

Pomocou RACE PCR boli získané 3' konce v-etských troch DpCL a 5' konce boli získané afl po modifikácií postupu po nested PCR s GSP1 a GSP2 primerami. Podarilo sa získa 5' koniec a teda kompletnú sekvenciu génov len pre DpCL2 a DpCL3 (obr. 14).

attcggcttcaggccagtggtggctd**gtt**gggccttctcatcgacaggagctatcgag
I R L Q G Q C G X **C** W A F S S T G A I E
ggtcagcatttcagaaaaacaaatgtcttgttaaatttgtctgagcaacagcttg**gggat**
G Q H F R R K T N V L L N L S E Q Q L V D
tgagctctgatttcgggaataatgggtgccaagggtggtctaatggataatgatttaag
C S S D F G N N G C Q G G L M D N A F K
tacgtgaaagaatttgggttgaatcggaagataagt**atccctatgtctctggtgataca**
Y V K E F G V E S E D K Y P Y V S G D T
ggagagggcaatgataattgttcttaccgtaaaccttcggttg**ttgcttcggctcactggt**
G E A N D N C S Y R K P S V V A S V T G
ttcgtagacattcagctcgaaaatgaggatgctttacgggaagcagtagctactcggtt
F V D I Q S E N E D A L R E A V A T R G
ccgatatctatagcaatcaatgctggtctggatacattcatgatgtacaaatctggtggt
P I S I A I N A G L D T F M M Y K S G V
tatt**tcagatcccgagtgtatgggttca**gcatcggatctcaat**cat**ggcgtcctacttgtt
Y S D P E C M G S A S D L N **H** G V L L V
ggttattcagaggatcaaggaatcccctactggtcgtcaaa**aac**aggtggaagccgaat
G Y S E D Q G I P Y W I V K **N** R W K P N
tcgggtgaaaaatggctatattcgaatgaagatgggttcaaatatgtgaggatgactact
S G E N G Y I R M K M G S N M C G V A T
gctgcctcttaccactggttag
A A S Y P L V -

atgaagttcatattcatactagttgcactgacagtcaactgcgtcgacttgggtctgtca
M K F I F I L V A L T V N C V D L G L S
tcgcccgaacaacctcatccgttggcataaatggaagcaagtgcatscaacaatac
S P E Q P H P L W H K W K Q V H X K Q Y
cagggccaagccaagagaccaagcgytatgaaatctggcacaaggctgtcgaaacaatt
Q G Q A E E T K X Y E I W H K A V E Q I
cgctacacaatttgaatacagatttgggcttgggtgtcttatagtagtgggtgtgaaccag
R L H N L K Y D L G L V S Y S M G V N Q
tttacggatttgacatgggaagaattcaaacactacctgagtggttggattcaactc
F T D L T W E E F K Q H Y L S G L I Q L
aaccagaccaatcatcaagacaatgccgaatcgaaatctgtggatacagaccggcatacct
N Q T N H Q D N A E S K S V D T T G I P
gacaattgggattggaaggataagggctgagtgaccgaagtcaagaatcagggtagttgc
D N W D W K D K G R V T E V K N Q G S C
ggatct**tgct**ggacattttcggctgctggtgctattgaagggcagtttaagcgaagacc
G S **C** W T F S A A G A I E G Q L S A K T
aataagttgacctgctgtctactcaacaactggttgactgcagtacaaa**tgatgggaac**
N K L T C L S T Q Q L V D C S T N D G N
aatggctgtgatggtggtagtagccttagtgcgttcgaatatgcaatcaagaatggtagt
N G C D G G S M P S A F E Y A I K N G M
ga**actgatcaagcctaccatatacgcgctaagc**gtggctggtgccaatacgtatcaatcg
E T D Q A Y P Y R A K R G R C Q Y D Q S
aaagttgtattcaaaa**tcaagtcctaccgctcgatt**gcaagtgggaatgagaatgagcta
K V V F K I K S Y R S I A S G N E N E L
ttgcaaactttatatagcattggacctgttctgtcgcccttgatgtagaaaaggatttc
L Q T L Y S I G P V S V A L D V E K D F
atgcactacagtcagggagttataaatcgaaatttgtgttccagcaaaa**cgcataaacctat**
M H Y S Q G V Y K S N L C S A K R I N **H**
ggagttctggcaactgggttggagttcaaatggcgtcaagtactggatcgtaaaa**aac**
G V L A T G F G V Q N G V K Y W I V K **N**
agttggaagccgaat**tcgggtgatgggtggttatatcaagatctgtcgagattcacccaac**
S W K P N S G D G G Y I K I C R D S P N
atgtgtggaatctcttcgatgagtagcgtgccactagtcaataa
M C G I S S M S S V P L V K -

```

atgaagttcgtattcatactagttgcactaattgtcaactgcgtcgacttgggtctatca
M K F V F I L V A L I V N C V D L G L S
tcgcccgaacaacctcatccgttgggcataaatggaagcaagtgcacaaacaatac
S P E Q P H P L W H K W K Q V H A K Q Y
caggccaagccgaagagaccaagcgttatgaaatctggcacaaggctgtcaaacgaatt
Q G Q A E E T K R Y E I W H K A V K R I
cgctacacaatttgaatacagatttgggcttgggtcttatagtatgggtgtgaaccag
R L H N L K Y D L G L V S Y S M G V N Q
tttacggatctgacatgggaagaattcaacaacactacctgagtggttggatccaactc
F T D L T W E E F K Q H Y L S G L I Q L
aaccagaccaatcatcgagaaaatgccgaaccgaaatttgggcaacgactgatatacct
N Q T N H R E N A E P K F V A T T D I P
gacaattgggattggaaggagcagggtcgggtaacaaagtcaagaacagggtgattgtg
D N W D W K E Q G R V T K V K N Q G S C
ggatcgtgttgggcattttcggctgttgggtctattgaaggacagatggccgtcaagaat
G S C W A F S A V G A I E G Q M A V K N
gtaagatgaggagcctatcgcccaacaactcgttgattgtagtaagaagggtgtaat
V K M R S L S P K Q L V D C S K E G V N
agtggatgcaatgggtgggctcatgagtagcagctttcgaaatacgtaatgaagaagggtata
S G C N G G L M S T A F E Y V M K K G I
caaactgaaaatcctatcgtatcgccctgaggatggctgtgtaatacaagaatcc
Q T E K S Y P Y R P E D G R C K Y K K S
aaagttgcattcaaaatcaactcctaccgcgatatacaaaagcgcagatgatggtgagcta
K V A F K I N S Y R D I K S A D D G E L
ctagaagtattgtacaaagtggacctgtttctgttgcccttgatgtagaagaagatttc
L E V L Y K V G P V S V A L D V E E D F
atgaactacagacaggggattttcaaatcgcgatgcatgctcccagacaatctgaaccac
M N Y R Q G I F K S D A C S P D N L N H
ggagttctggcaactgggttcggagttgaaaacggccaaaagtactgggtctgtcaagaac
G V L A T G F G V E N G Q K Y W S V K N
agttggggagccagctgggtgatggttatatcaagatctgtcgagattcaccacaac
S W G A S W G D G G Y I K I C R D S P N
atgtgtggaatctcttcgatgagtagcgtgccactagtcaatac
M C G I S S M S S V P L V K -

```

Obr. 14 ó Sekvencie troch katepsínov *L. D. pseudospathaceum* získané PCR s degenerovanými primerami a následne pomocou RACE PCR. Zhora iasto ná sekvencia DpCL1 a kompletne sekvencie DpCL2 a DpCL3. Zvýraznené sú asti sekvencií, ktoré boli získané 3'RACE (flitou) a 5'RACE (modrou), asti sekvencií, ktoré boli získané prvým PCR sú neozna ené v strede. alej sú zvýraznené miesta nasadenia primerov pre RACE PCR- 5'RACE primery (zelené pozadie), 3'RACE primer (fialové pozadie) a tiefl AK aktívneho miesta ó Cys, His, Asn (ervené písmo)

4.2.3. Identifikácia a alignment génov

V-etky tri nájdené gény sú gény pre cathepsin L-like peptidázy s klasickou katalytickou triádou (Cys, His, Asn) (vyzna ená v obr. 15), ich vzájomná podobnos je ukázaná v tab. 20. DpCL2 a 3 sú si navzájom viac podobné ako k DpCL1.

Tab. 20 ó Porovnanie sekvencií DpCL1, 2 a 3 navzájom pomocou percenta identity. Na úrovni nukleotidových sekvencií na avo a podobnos na úrovni proteínov (percento identických AK) napravo.

	DpCL1	DpCL2	DpCL3		DpCL1	DpCL2	DpCL3
DpCL1		53%	51%	DpCL1		46%	42%
DpCL2	53%		84%	DpCL2	46%		76%
DpCL3	51%	84%		DpCL3	42%	76%	

DpCL2	MKFIFILVALTVNCVDLGLSSPEQPHPLWHKWKQVHAKQYQGQAFHTKYEIWHKAVEQL	60
DpCL3	MKFVFIILVALIVNCVDLGLSSPEQPHPLWHKWKQVHAKQYQGQAFHTKYEIWHKAVKRI	60
DpCL1	-----	
DpCL2	RLHNLKYDLGLVSYSMGVNQFTDLTWEEFKQHLYLSGLIQINQTNHQDNAESKSVDTTGIP	120
DpCL3	RLHNLKYDLGLVSYSMGVNQFTDLTWEEFKQHLYLSGLIQINQTNHRENAEPKRVATTDIP	120
DpCL1	-----	
DpCL2	DNWDWKDKGRVTEVKNQGSCGSCWTFSAAGAIEGQLSAKTNKLTCLSTQQLVDCSTNDGN	180
DpCL3	DNWDWKEQGRVTKVKNQGSCGSCWAFSAVGAIEGQMAVKNVKMRSLSPKQLVDCSKEGVN	180
DpCL1	-----IRLQGQCGXCWAFSSGTGAIEGQHFRKTNVLLNLSEQQLVDCSSDFGN	47
	:: **.* **.***.* ***** * . : ** :*****. : *	
DpCL2	NGCDGGSMPSAFEYAIKNGMETDQAYPYRA-----KRGRCQYDQSKVVFKIKSYRSIASG	235
DpCL3	SGCNGGLMSTAFEYVMKKGIQTEKSYPYRP-----EDGRCKYKSKVAFKINSYRDIKSA	235
DpCL1	NGCQGGIMDNAFKYVKEFGVESEDKYPYVSGDTGEANDNCSYRKPSVVASVTGFVDIQSE	107
	***:** * .**.* : * : : : . *** . .**.* :**.* : : : . * *	
DpCL2	NENELLQTLYSIGPVSVALDVEKD-FMHYSQGVYKSNLCS--AKRINHGVLATGFGVQNG	292
DpCL3	DDGELLEVLVKVGPVSVALDVEED-FMNYRQGIFKSDACS--PDNLNHGVLATGFGVENG	292
DpCL1	NEDALREAVATRGPISIAINAGLDTFMMYKSGVYSDPCEMGSASDLNHGVLVGYSEDQG	167
	:: * : : . **.***.* : * * * * . * : : : * . . :***** . * : : *	
DpCL2	VKYWIVKNSWKPNSGDGGYIKICRDSPNMCGISSMSSVPLVK-	334
DpCL3	QKYWSVKNSWGASWGDGGYIKICRDSPNMCGISSMSSVPLVK-	334
DpCL1	IPYWIVKNRWKPNSGENGYIRMKMGS-NMCGVATAASYPLV-	207
	** *** * .. * : .**.* : : . * ***** : : : : * ***	

Obr. 15 6 Porovnanie aminokyselinových sekvencií katepsínov DpCL1, 2 a 3. Vyznaené sú AK aktívneho miesta (flité pozadie), AK S2 kapsy (fialové pozadie), AK ERFNIN-like motívu v prosegmente (zelené pozadie) a miesto -tiepenia prosegmentu od maturovaného enzýmu katepsínov DpCL2 a 3 (oranflová -íпка), tiefl je vyznaené miesto predikovanej N-glykosylácie (modré pozadie)

Katepsíny DpCL2 a 3 majú v prosegmente motív ER(W)FNIN, ktorý je u oboch modifikovaný na sekvenciu ERWAIN (obr. 15). Tiefl bolo nájdené jedno N-glykosylané miesto v prosegmente katepsínov na Asn101.

Aminokyseliny, ktoré ovplyvujú S2 kapsu u týchto troch katepsínov sa ve mi nelí-ia (obr. 15). Oproti DpCL1 a 3 má katepsín DpCL2 Ser187 namiesto Leu187 a Ile286 namiesto Leu 286 (pozície 67 a 157 pri íslovaní pod a holoenzýmu papaínu). Katepsín DpCL1 má Ala327 namiesto Met327 u DpCL2 a 3 (pozícia 205 pod a papaínu).

Miesto -tiepenina proenzýmu bolo predikované a je vyznaené v obr. 15. Katepsíny DpCL2 a 3 sú dlhé 334 AK ako proenzýmy, a predpokladaná ve kos holoenzýmov je 216 AK. Od-tiepený prosegment samostatne by mal ma ve kos okolo 13,5 kDa. Predikcie ve kosti signálneho peptidu sa pre rôzne predikné programy trochu lí-ia, ale SP by mal by dlhý okolo 20 AK.

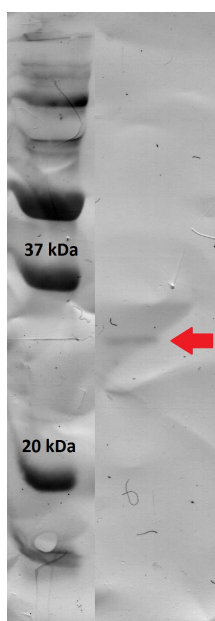
Predikované molekulárne hmotnosti a izoelektrické kon-tanty proenzýmov a maturovaných enzýmov (po od-tiepení prosegmentu, kedy sa stávajú aktívnymi) sú zhrnuté v tab. 21. Tieto katepsíny sa v daných parametroch lí-ia len minimálne.

Tab. 21 ó Porovnanie niektorých teoreticky predikovaných vlastností katepsínov DpCL2 a 3: molekulárnej hmotnosti (M) v Da a izoelektrickej kon-tanty (pI) u proenzýmov bez signálneho peptidu (SP) aj maturovaných enzýmov

	Proenzým bez SP		Maturovaný enzým	
	M	pI	M	pI
DpCL2	37 393 Da	8,22	23 618 Da	8,79
DpCL3	37 706 Da	8,78	23 775 Da	8,69

4.2.4. Tvorba a expresia rekombinantného katepsínu

V rekombinantnej forme bol pripravený katepsín DpCL3 (pretofe jeho kompletná sekvencia bola získaná najskôr). U vybraného klonu *P. pastoris* bolo PCR s expresnými primerami a následnou sekvenáciou overené že obsahuje pofadovaný inzert génu pre DpCL3. Po purifikácii proteínov z média na niklovej kolóne bol na membráne pomocou protilátky proti His-tagu detekovaný prúflok vo ve kosti cca 30 kDa, o vy mohol by DpCL3 s iasto ne od-tiepeným propeptidom.

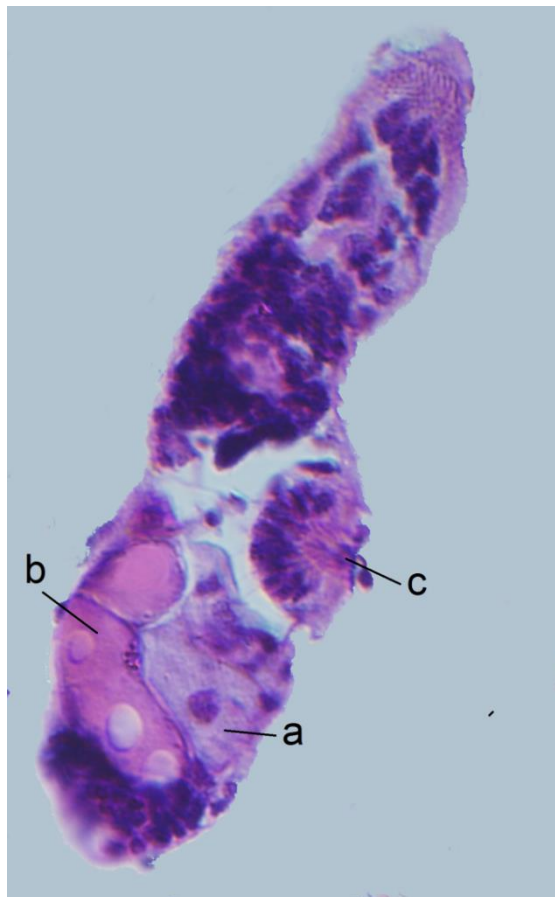


Obr. 16 - Membrána s preblotovanými proteínmi z druhej frakcie eluovanej z niklovej kolóny kvasinkového média s exprimovaným rekombinantným DpCL3. červená šípka ukazuje prúflok proteínov detekovaných protilátkami proti His-tagu vo ve kosti cca 30 kDa.

4.3. Histologické farbenie, TEM a imunolokalizácia katepsínov L

4.3.1. Preh adové mikroskopické pozorovanie anatómie cercárií

Pri pozorovaní anatómie cercárií *D. pseudospathaceum* sme sa zamerali na penetračné flazy a tráviacu sústavu cercárií. Pri farbení hematoxilín-eozínom bola viditeľná granulózná štruktúra 4 penetračných fliaz a objemné rezy cercárií sa farbili na ružovo (obr. 17).

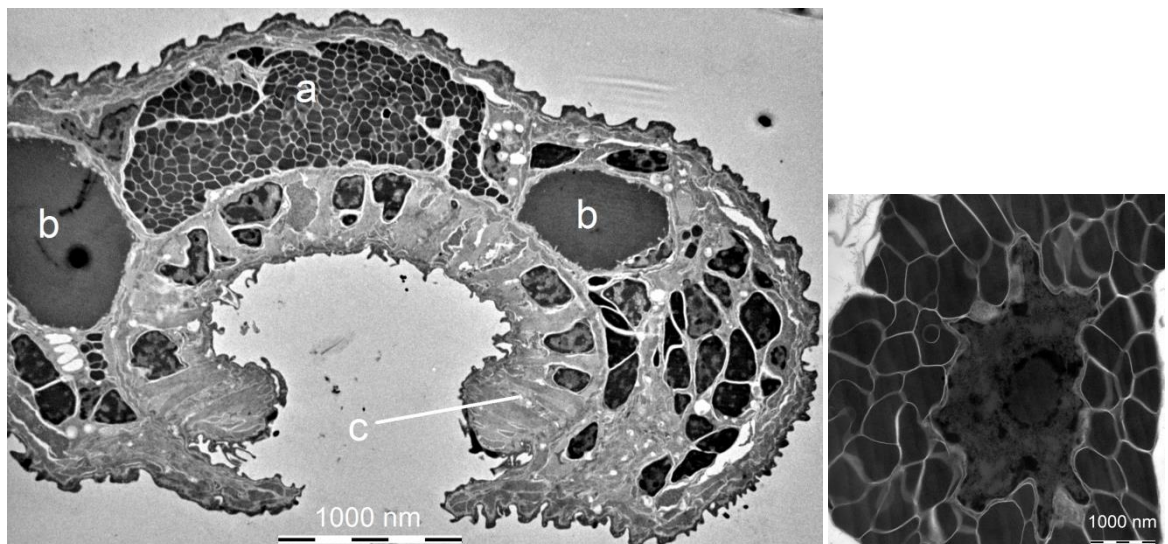


Obr. 17 - Pozdĺžny rez cercáriou hepatopankreasu s prehľadovým histologickým farbením hematoxilín-eozínom. Okolné tkanivo sporocysty a hepatopankreasu bolo odstránené v programe na úpravu obrázkov (Gimp) a - penetračná flaza (bunka s jadrom), b - revo, c - acetábulum

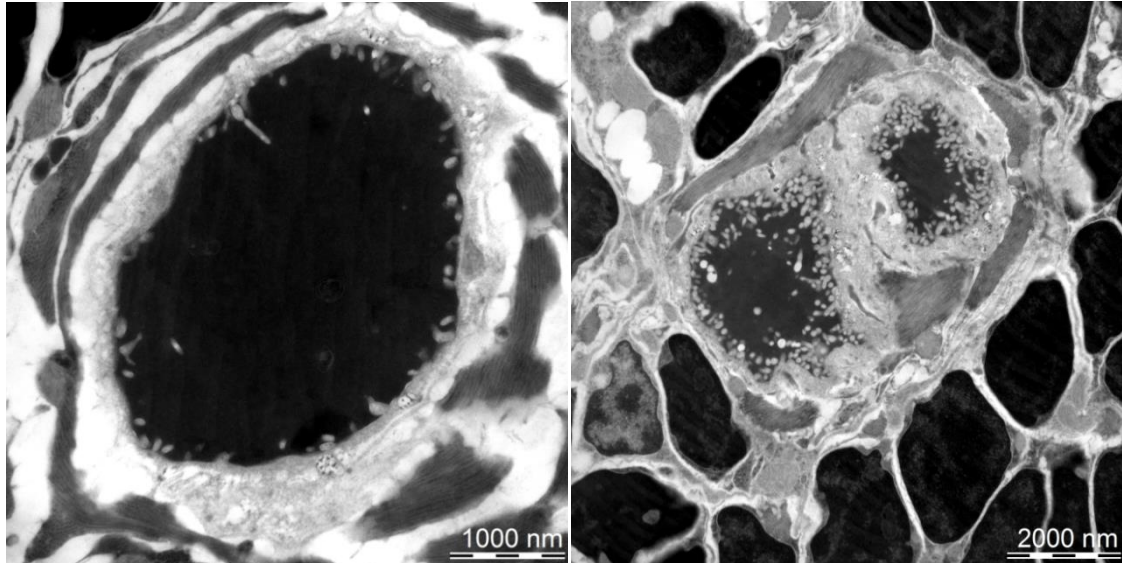
Transmisnou elektrónovou mikroskopiou dospelých cercárií boli pozorované penetračné flazy a ich vývody (cytoplazmatické dukty), ktoré tvoria rozšírené rezervoáry v hlavovej časti cercárie (obr. 18). Obe tieto časti 4 penetračných buniek obsahujú sekretorický materiál - stredne veľké granule (obr. 29). Céčka, ktoré naväzujú na oesofágus boli plné elektrondenzného materiálu, tvorené vo výmky tenkými epiteliálnymi bunkami, ktorých povrch nevytváral záhyby (klky), alebo len veľmi málo (obr. 20).



Obr. 18 ó Pozd fny rez cercáriou (TEM). Zobrazené dilatácie duktov - rezervoáry sekretorického materiálu buniek penetra ných fliaz (a) a samotné dukty vedúce k telu týchto buniek (b)



Obr. 19 ó Prie ny rez cercáriou (TEM) s ultra-ruktúrou penetra ných fliaz. Rez je v mieste acetábula (c), kde je prítomná penetra ná fl aza (a) (ultra-ruktúra granúl spolu s jadrom bunky v obrázku na avo) a tiefl céka (b)

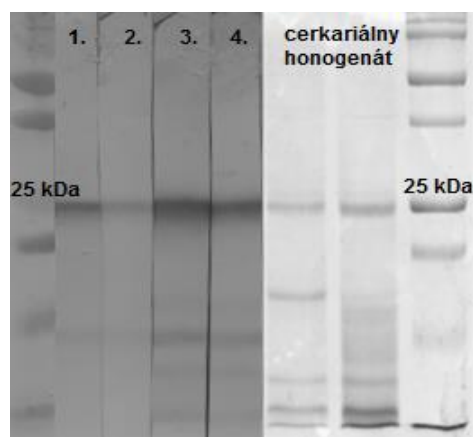


Obr. 20 ó Porovnanie ultra-štruktúry céka (vpravo) cercárie a prednej ásti tráviacej sústavy (vľavo) (TEM). Vľavo je vyplnené veľkým množstvom elektrondenznej hmoty a má málo záhybov (klkov) oproti rezu v prednej ásti tráviacej sústavy

4.3.2. Tvorba protilátok a imunolokalizácia katepsínov L

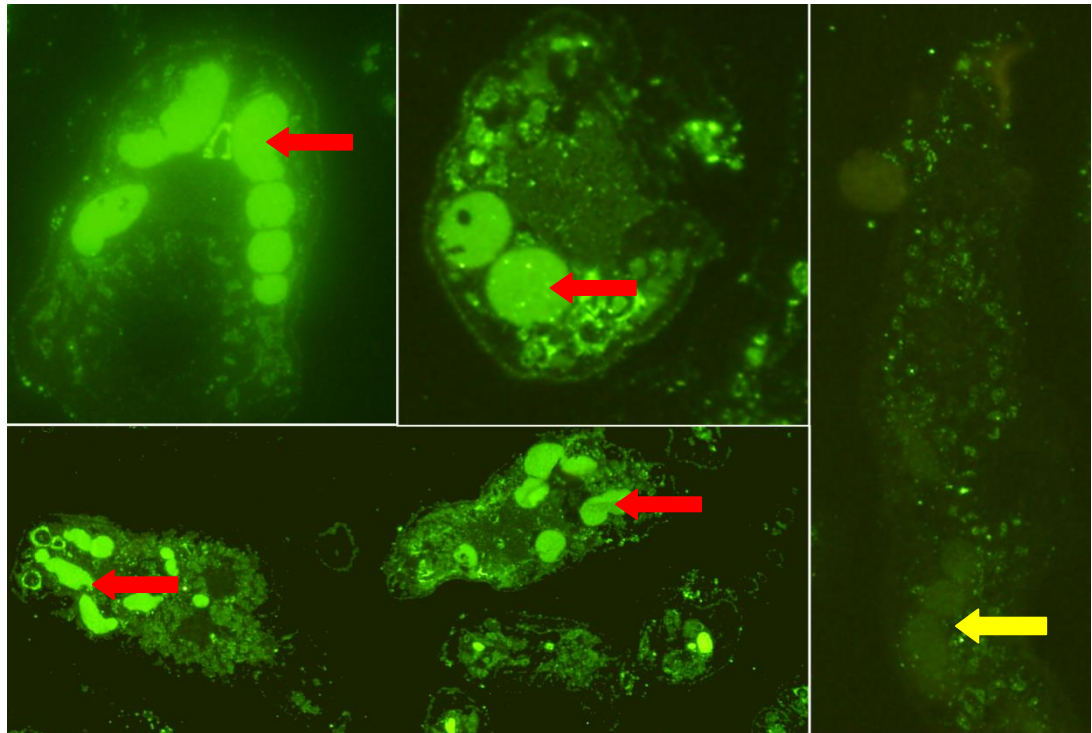
Tvorba protilátok nebola úspešná použitím postupu s adjuvans Titermax Gold. Na membráne sa tieto protilátky zo séra viazali k proteínom z homogenátu s rôznymi veľkosťami (detekovaných cca 10 bandov vo veľkosti 10-50 kDa).

Imunizáciou myši pomocou homogenizovaných bandov z 1D SDS-PAGE elektroforézy sa vytvorili protilátky špecificky reagujúce s proteínmi homogenátu na membráne vo veľkosti cca 25 kDa (teda s katepsínmi L) (obr. 21).



Obr. 21 ó Porovnanie membrány s protilátkami detekovaným antigénom s SDS-PAGE proteínov homogenátu cercáriei. Vľavo membrána inkubovaná s protilátkami, ktoré reagujú s proteínom bandu o veľkosti 25 kDa (vpravo gél po elektroforéze cercariálneho homogenátu ó dva rôzne staré homogenáty), 1. 1. myšie riedenie protilátok 1:100, 2. 1. myšie riedenie protilátok 1:200, 3. 2. myšie riedenie protilátok 1:100, 4. 2. myšie riedenie protilátok 1:200

U preparátov dospelých cekárií (v JB4), ktoré boli inkubované so sérom imunizovaných myší boli označené protilátkami hlavne céka cercárií (obr. 22). Tie neboli označené u negatívnej kontroly inkubovanej v sére neimunizovaných myší. Žiadna reakcia protilátok so flázami ani ich rozšírenými duktami nebola pozorovaná.



Obr. 22 Imunolokalizácia katepsínu L. Protilátkami sú fluorescenčne označené hlavne céka cercárií, na fotkách vľavo červené šípky ukazujú vyznačené revá, hore vľavo pozdĺžny rez cercáriou, vpravo priečny rez. Negatívna kontrola je napravo, žltá šípka ukazuje miesto kde je revo

5. DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo podrobnejšie charakterizovať cysteínovú peptidázu, ktorá bola identifikovaná v cercáriách strigeidnej motolice *Diplostomum pseudospathaceum*. Identifikovaná bola biochemicky na základe peptidolytickej aktivity ufl v predchádzajúcich prácach (Moczon, 1994a) a (Mikeš *et Man*, 2003). V druhej menovanej tiež dokázali prítomnosť cysteínovej peptidázy pomocou hmotnostnej spektrometrie, identifikované typy, a tiež N-koncová sekvencia získaná Edmanovým odbúraním patrili cysteínovej peptidáze. Typy a N-koniec boli identifikované z prúfku proteínov o veľkosti cca 24 kDa značených biotinylovaným DCG-04, čím preukázali príslušnosť k papain-like cysteínovým peptidázam klanu CA.

Predpoklad bol, že ide o jednu majoritnú peptidázu o veľkosti 23,9 kDa (Mikeš *et Man*, 2003). To, že na géle migruje ako dvoj-band, by sa dalo vysvetliť tým, že peptidáza má viac mierne sa líšiacich izoform, alebo rôzne posttranslačné modifikácie (glykozylácia atď.). Predpokladaná funkcia tejto cercariálnej peptidázy bola v procese penetrácie a histolýze tkanív pri invázií cercarií vzhľadom k tomu, že v cercariálnom homogenáte separovanom elektroforézou tvorí masívny band - veľké množstvo proteínu. Lokalizáciu proteínu v rozšírených duktoch penetračných fliaz potvrdila imunohistochemická práca Mikeš *et Horák* (2001).

V mojej práci bol uskutočnený pokus o purifikáciu tejto peptidázy z homogenátu pomocou kvapalnej iontomenej chromatografie. Separovaných bolo 18 frakcií, pričom každá obsahovala (podľa aktivity a elektroforézy) cysteínové papain-like peptidázy. Niektoré frakcie sa ukázali ako dobre purifikované - po elektroforéze bol viditeľný na géle len odpovedajúci dvojitý prúfok proteínov.

Pri biochemických pokusoch v tejto práci bolo zistené, že cercariálny homogenát má peptidolytickú aktivitu patriacu cathepsin L-like peptidázam. U cercariálneho homogenátu, bola nameraná peptidolytická aktivita so substrátom FR (typickým pre cysteínové peptidázy v kyslom pH, teda aj pre katepsíny L), ale fliadna aktivita nebola zistená so substrátom RR, ktorý môže byť špecificky štiepený katepsínom B (katepsín L ho neštiepi). Katepsín B je schopný na P2 mieste viazať Arg narozdiel od katepsínu L, ktorého S2 kapsa je hlboká a hydrofóbná (na jej dne je Ala205 u ľudského CL). Na dne S2 katepsínov B je

najastej – Glu205, čo má za následok možnosť viazať Arg na tejto pozícii (úslovanie pod a papainu) (Brömme *et al.*, 1994). Rovnako test inhibície aktivity rôznymi inhibítormi potvrdil, že ide o cysteínovú peptidázu. Aktivita bola kompletne inhibovaná E-64 a inhibítorom katepsínov L v redukujúcom aj neredukujúcom prostredí. Inhibítor CA-074, udávaný bežne ako špecifický pre katepsíny B, inhiboval peptidolytickú aktivitu len čiastočne (približne z polovice). To by mohlo znamenať, že vo vzorke sú obsiahnuté tiež katepsíny B, ale keďže nebola detekovaná žiadna aktivita s RR substrátom a tiež aktivita bola úplne inhibovaná inhibítorom CL. Je pravdepodobnejšie, že CA-074 čiastočne môže inhibovať aj aktivitu katepsínov L ako zistili napr. v práci Steverding (2011).

Optimum pH peptidolytickej aktivity bolo analyzované u vybraných frakcií. Aktivita v homogenáte cercarií mala široké spektrum pH (cca pH 3-9). To naznačuje, že by sa mohlo jednať o komplexnú vzorku s viacerými peptidázami, ktoré sa podieľajú na peptidolytickej aktivite v homogenáte. Potvrdil to tiež test aktivity v širokom pH u vybraných jednotlivých frakcií. Každá z týchto frakcií mala odlišnú krivku aktivity v spektre pH. Preto sme predpokladali, že cercariálny homogenát obsahuje viac rôznych izoform katepsínu L. Tento predpoklad bol následne potvrdený hmotnostnou spektrometriou a nájdením viacerých génov pre katepsíny L exprimovaných u cercarií.

Pri meraní peptidolytickej aktivity bolo zistené, že jednotlivé frakcie majú dosť široké spektrum pH, v ktorom sú aktívne. Vo všeobecnosti sa to spektrum pohybuje v mierne kyslom až neutrálnom prostredí s optimom aktivity pri pH 5 až 5,5. Napríklad u frakcie 25/26 bola pH závislá, v ktorej majú peptidázy cca 80-100% aktivity, od pH 4,5 do pH 7,5. Peptidázy sú väčšinou prispôbené funkcii, ktorú majú v prostredí, v ktorom sa nachádzajú pri optimom peptidolytickej aktivite. Tie, ktoré sa nachádzajú v revách motolíc, sú prispôbené kyslému prostrediu, v ktorom sú aktívne. Katepsín *F. hepatica* FhCL1 má optimum aktivity pri pH 4,5 (Lowther *et al.*, 2009). Peptidázy, ktoré sú sekretované do vonkajšieho prostredia, sú aktívne skôr v neutrálnom prostredí. Napr. FhCL3 u juvenilných štádií *F. hepatica* je vysoko aktívny aj pri neutrálnom pH s optimom aktivity pH 5,5 (Corvo *et al.*, 2009). Ale zároveň existujú peptidázy s aktivitou v širokom spektre pH, a teda zastupujú obe spomínané funkcie (napr. FhCL2 je aktívny v širokom spektre pH 3-9) (Dalton *et al.*, 2004, Lowther *et al.* 2009), čo by mohol byť hypotetický prípad katepsínov L u *D. pseudospathaceum*.

V jednotlivých izolovaných frakciách peptidáz nie je jasné, či obsahujú jedinú peptidázu, pravdepodobnejšie je, že sa stále jedná o iasto n zmäsné vzorky viacerých peptidáz. Doteraz nájdené kompletne gény pre katepsíny L kódujú peptidázy s DpCL2 a 3 majú takmer rovnaké izoelektrické kon-tanty, takže ak sa nachádzajú oba v cerk. homogenáte, na iontomeni ovej chromatografii sa nedajú separova . Teda týmto môfle by tiefl ovplyvnené pH optimum aktivity zmerané u týchto frakcií (asto aktivita v -irokom spektre pH) tým fle kaflký z komplexu cerkariálnych CL má trochu iné pH optimum aktivity. Na základe na-ích doteraj-ích výsledkov ale nemôfleme vylú i , fle jednotlivé enzýmy majú naozaj -iroké spektrum pH, v ktorom sú aktívne. Z asových dôvodov nebolo zatia moflné testova rekombinantné enzýmy. Tiefl sa zo získaných výsledkov nedá jasne odhadnú funkcia daných enzýmov. Ke fle sú aktívne hlavne pri slabom kyslom afl neutrálnom pH, mohlo by ís o katepsíny s funkciou degradácie tkanív pri penetrácii hostite a, ale tiefl by sa mohlo jedna aj o tráviace enzýmy, ktoré by cerkáriae mali predsyntetizované v revách. Podobná situácia bola popísaná u tráviacich enzýmov schistosom, ktoré sú v revách predsyntetizované ufl predtým, nefl schistosomulum (juvenilné migrujúce -tádium schistosom) za ne prijíma potravu (Dalton *et al.*, 2006).

Pre dôkaz a detekciu cysteínových peptidáz v cerkariálnom homogenáte separovanom 1D elektroforézou bol pouflitý inhibítor cysteínových peptidáz E-64 a biotinylovaná alebo fluorescen ne zna ená próba DCG-04 (Greenbaum *et al.*, 2000). Pri pouflití biotinylovaného DCG-04 boli zaznamenané príflky o ve kosti cca 25kDa a príflok vo ve kosti cca 10 kDa. Nifl-í z nich sa teoreticky mohol vyskytnú v aka autogénnej degradácii peptidáz vo vzorke v podobe na-tiepených zbytkov peptidáz, ktoré boli e-te schopné viaza do aktívneho miesta zna enú próbu. Pri inkubácií peptidáz z homogenátu s inhibítorom E-64, bola bloková väzba próby a príflky vo ve kostiach cca 25 a 10 kDa sa neobjavili. Tým sa potvrdilo fle ide o cysteínovú peptidázu, vo ve kosti cca 25 kDa. Pokusy (opakované) s fluorescen ne zna eným DCG-04 neboli úspe- né bez jasného dôvodu, na géle sa neobjavili fliadne pruhy.

Po zistení, fle katepsínov L je v homogenáte zrejme viac, bol uskuto nený pokus separova ich 2D elektroforézou. Homogenát bol lep-šie separovate ný, pretofle po precipitácií proteínov acetónom, boli zo vzorky proteínov odstránené soli, sacharidy a nukleové kyseliny, ktoré bránia správnej izoelektrickej fokusácií. Bohuffial peptidázy inkubované s DCG-04 po precipitácií neudrflali naviazanú próbu v aktívnom mieste (po

strate terciárnej –truktúry pri precipitácií). Preto separácia proteínov pod a izoelektrického bodu nebola tak ú inná a v kombinácií s vysokou citlivos ou pri detekcii biotinylovanej próby bol na membráne s preblotovanými separovanými proteínmi vidite ný len jednoliaty pruh proteínov o ve kosti 25 kDa v celej –kále pI 3-10 (namiesto konkrétnych separovaných spotov). Takfle v–etky spoty, ktoré sa objavili na géle po 2D separácií (bez DCG-04) vo ve kosti 25 kDa v celej –kále pI boli považované za mofné cysteínové peptidázy a alej boli analyzované hmotnostnou spektrometriou.

Okrem spotov z 2D elektroforézy boli hmotnostnou spektrometriou analyzované tiefl prífky 1D elektroforézy vybraných frakcií. Podkladom pre porovnávanie –tepv identifikovaných hmotnostnou spektrometriou boli sekvencie získané transláciou nájdených génov a tiefl –tepy nájdené MS v ufl spomínanej práci (Mike– et Man, 2003), ktoré patria cysteínovým peptidázam. Identifikova a teda priamo dokáza prítomnos sa podarilo len u katepsínu DpCL3 v niektorých spotoch zo skôr zásaditého prostredia pri 2D elektroforéze a tiefl vo frakcii 31. Tento katepsín je pravdepodobne najviac abundantný a jeho predpokladané pI (zásadité, cca 10) odpovedá priblifne jednému spotu, v ktorom bol identifikovaný (spot . 7, pI cca 10). alej boli vo viacerých spotoch a bandoch identifikované tiefl 2 –tepy so sekvenciou, ktorá patrí cysteínovým peptidázam, ale nieje sú as ou ani jednej sekvencie získanej molekulárnymi metódami. Tieto –tepy sa nachádzali vo viacerých frakciách a v takmer v–etkých spotoch z 2D elektroforézy, takfle je predpoklad, fle je v homogenáte obsiahnutá al–ia abundantná cysteínová peptidáza, pod a aktivity taktiefl katepsín L, ktorého gén sa nám nepodarilo získa . Tiefl pomocou MS neboli identifikované fliadne –tepy zhodujúce sa so sekvenciami DpCL1 a DpCL2. Teda z troch nájdených génov pre katepsíny L, bola priamo dokázaná prítomnos v cercáriách len u katepsínu DpCL3. Dôvody môflu by rôzne. DpCL1 a 2 by mohli by menej abundantné v cercariálnom homogenáte a teda neboli zachytené pri 2D analýze, ktorá je vhodná skôr pre detekovanie vysoko exprimovaných proteínov. Tiefl to môfle by spôsobené tým, fle MS boli analyzované prífky z 1D elektroforézy len niektorých vybraných frakcií.

Z biologického h adiska je tiefl mofné, fle sme PCR zachytili aj DNA z mRNA zreých cercárií, ktoré daný proteín exprimujú afl neskôr, v –tádiu diplostomula (napr. katepsíny pre trávenie). Alebo naopak by to mohli by gény pre katepsíny exprimované

sporocystami, v ktorých sa cercárie vyvíjajú, pretože mRNA bola izolovaná nasledujúcim spôsobom.

Gény pre cercariálne cysteínové peptidázy boli získavané z cDNA, ktorá pochádzala z mRNA vyizolovanej zo sporocyst, ktoré obsahovali cercárie v rôznom štádiu vývoja. Predpokladáme, že cercárie sú synteticky málo aktívne, a že počas vývoja v sporocystách v medzihostite ovi si nasyntetizujú zásoby peptidáz, ktoré potrebujú pre penetráciu a ďalšie fungovanie. Preto boli pre získanie mRNA použité sporocysty obsahujúce zárodok nevyvíjajúcich sa cercárií. S použitím degenerovaných primerov, založených na alignmentu sekvencií aktívnych miest cysteínových peptidáz boli získané tri ďalšie gény cathepsin L-like peptidáz, ktoré boli zkompletované metódou RACE PCR.

Týmto spôsobom boli získané kompletne sekvencie katepsínov nazvaných DpCL2 a DpCL3 a ďalšia sekvencia (bez 5'konca) DpCL1. Katepsíny DpCL2 a 3 sú si navzájom viac podobné než DpCL1, po alignmentu sú najviac podobné CL1 u *Fasciola hepatica* (50% identických AA) a katepsín DpCL1 zdieľa najvyššiu sekvenciálnu podobnosť AA (63%) s CL *Echinococcus granulosus*. Odhadovaná veľkosť holoenzýmov DpCL2 a 3 je okolo 24 kDa (216 AA), čo teoreticky odpovedá detekovaným bandom na géloch a membránach, ktoré sa pohybovali v tejto veľkosti.

Tieto katepsíny by sa mali vyskytovať v homogenáte a jednotlivých frakciách po chromatografii predovšetkým ako aktívne enzýmy s odštiepeným prosegmentom. Vzhľadom k tomu, že na elektroforetických géloch majú príflky vo veľkosti cca 25 kDa, čo odpovedá teoretickej veľkosti holoenzýmu a tiež pre to, že sú aktívne. Pravdepodobne sa dokážu sami autokatalyticky aktivovať. Teoretická veľkosť týchto katepsínov ako neaktívnych proenzýmov je okolo 37-38 kDa a tiež uľahčujú spomínaná veľkosť holoenzýmov sú veľmi podobné katepsínu CL1 *Fasciola hepatica* (37 kDa a 24,5 kDa) (Robinson *et al.*, 2011). V porovnaní s existujúcimi štádiami cysteínových peptidáz cercárií *D. pseudospathaceum*, veľkosť holoenzýmu (24 kDa) odpovedá cysteínovej peptidáze označenej DCG-04 v štádiu Mike a Man (2003) a ich identifikácií vo veľkosti tohto proteínu pomocou MS (23,9 kDa). V štádiu Moczon (1994a) bola detekovaná peptidolytická aktivita pri zymografickej analýze cercariálneho homogenátu v oblasti okolo 40 kDa, čo nekoreluje s našimi výsledkami. Táto veľkosť peptidázy by približne odpovedala teoretickej veľkosti proenzýmov, ktoré by ale nemali byť aktívne a teda nedetekovateľné zymografiou. Je ale

diskutabilné, i v podmienkach tohto pokusu nemohlo dôjsť k iasto nej denaturácii týchto peptidáz a teda odkrytiu aktívneho miesta proenzýmov.

Konzervovaný motív ER(W)FNIN z prosegmentu cathepsin L-like peptidáz sa u týchto dvoch katepsínov vyskytuje v trochu modifikovanej forme ERWAIN. Aktívne miesto u DpCL2 a 3 je tvorené katalytickou triádou charakteristickou pre cysteínové peptidázy Cys143, His288 a Asn308 (íslovanie AK je pod a týchto konkrétnych katepsínov). Nekompletná sekvencia DpCL1 tiež obsahuje celú katalytickú triádu (provizorne označenú ako Cys10/His155/Asn175). Oba katepsíny DpCL2 a 3 majú jediné N-glykosylačné miesto na Asn101, ktoré je v prosegmente. Dĺžka proenzýmu DpCL2 a 3 je približne 100 AK, čo je štandardné pre katepsíny L.

Špecifita cysteínových papain-like peptidáz k substrátu je významne determinovaná interakciou substrátu s S2 kapsou. S2 kapsa týchto peptidáz je definovaná AK 67, 68, 133, 157, 158, 160, 205, pričom AK 205 je na dne a 133 a 157 tvoria stenu S2 kapsy (Brömme *et al.*, 1994, Stack *et al.*, 2008). AK S2 kapsy u katepsínov DpCL1,2 a 3 sa príliš nelíšia. Rozdiel je v pozícii 205, kde DpCL2 a 3 majú Met (najviac podobný FhCL1 a má na tomto mieste Leu205) a DpCL1 má Ala (ako ľudský katepsín L). Na pozícii 67 má DpCL2 Ser narozdiel od Leu u DpCL1 a 3 a líši sa tiež Ile157 od Leu157 u DpCL1 a 3. Malé rozdiely v AK S2 kapsy katepsínov DpCL1,2 a 3 sú ale na dôležitých pozíciách a teda bude potrebné bližšie otestovať substrátovú špecifitu týchto peptidáz.

Pre odhad funkcie katepsínov L exprimovaných v cercáriach bol uskutočnený pokus imunohistochemicky lokalizovať tieto katepsíny v tele cercárie *Diplostomum pseudospathaceum*. Predpoklad bol, že sa budú nachádzať v penetračných flázách. V práci (Mikeš *et al.*, 2001) tento proteín lokalizovali pomocou špecifických protilátok vytvorených v myšiach imunizáciou pomocou homogenizovaných príslušnej veľkosti z SDS-PAGE elektroforézy (vtedy sa domnievali, že nejde o peptidázu ale o glukon viažúci proteín). Daný proteín sa nachádzal v penetračných flázách, ale len v oblasti rozšírených duktov.

Obdobným postupom sme vytvorili protilátky (v dobe, keď sme ešte nepredpokladali, že v homogenáte je obsiahnutých viac katepsínov L). Po otestovaní špecifity na blote po 1D elektroforéze sa protilátky zdali špecifické. Bol detekovaný

prúflok okolo pofladovanej ve kosti a tiefl e-te jeden slab-í band okolo 10 kDa , ktorý mohol vzniknú autodegradáciou katepsínov, na ktorých -tepy sa viazali tiefl protilátky. Neskôr bolo zistené, fle my-i boli pravdepodobne imunizované komplexom viacerých katepsínov L. Teda predpokladáme fle protilátky v sére niesú -pecifické a nieje jasné, s ktorými katepsínmi L cercárií by reagovali. Napriek tomu boli tieto protilátky aplikované pri imunohistochemických pokusoch. Bolo detekované, fle protilátky sa najviac viaflu k obsahu riev cercárií, ale tento výsledok je aflko interpretovate ný pretofle signál nie je dostato ne silný a má pozadie (okrem riev je vidite ný slab-í signál aj inde v telách cercárií). Slabý signál by mohol by spôsobený tým, fle pri zalievaní do média bol antigén (katepsíny L) z vä -ej asti degradovaný, pretofle polymerácia flivice je silne exotermická reakcia a bola nechladená. Vysoké pozadie by sa dalo vysvetli tým, fle dané protilátky sa ne-pecificky viaflu na al-ie katepsíny L, ktoré sa vyskytujú ubikvitárne v lyzozómoch buniek. Tiefl kvôli ne-pecifickým protilátkam bude potreba venova al-iu pozornos práve lokalizácií jednotlivých katepsínov ktoré sa nám podarilo objavi . Pre vytvorenie -pecifických protilátok proti konkrétnym katepsínom L budú pouflité rekombinantné proteíny. Výh adovo sa budeme pokú-a lokalizova katepsíny aj inými metódami (mikrodisekcia tkaniva spojená s následnou MS analýzou alebo in situ hybridizácia).

Na základe týchto zistení sa domnievame, fle cercárie *Diplostomum pseudospathaceum* exprimujú súbor cathepsin L-like peptidáz, ktoré by sa mohli nachádza aj v penetra ných fl azách aj v revách zárove . Zatia nieje jasné, kde sú lokalizované jednotlivé katepsíny L, ktorých gény sme objavili. Otázkou je, pre o by sa v nefunk ných revách cercárií (neprímajú potravu) nachádzali tieto peptidázy. Je pravdepodobné, a mikroskopické pozorovanie tomu nasväd uje, fle revá u vyspelých cercárií tvoria akési rezervoáry materiálu, ktorého sú as ou by mohli by aj katepsíny L. V -túdií Podvyznaya (2006) sa autorka domnieva, fle tento materiál sa dostáva z riev do vonkaj-íeho prostredia na základe toho, fle preniká hlboko do lumen foregut. To by mohlo znamena , fle peptidázy v om obsiahnuté by sa mohli podie a na procese penetrácie a migrácie cercárií a diplostomúl. Podobná situácia, kedy peptidázy sekretované z reva sa podielajú na degradácií ECM pri migrácií parazita, nastáva u juvenilných jedincov fasciol (vi literárny preh ad). Z iného poh adu by mohlo ís o peptidázy, ktoré sa zú ast ujú na trávení, v momente, ke diplostomulum migrujúce telom druhého hostite a za ne prijíma potravu. V cercariálnych revách by teda boli pedsyntetizované dopredu, podobne ako u schistosom, u ktorých bola táto stratégia popísaná (vi vy-íe).

Nieje vôbec známe, aké enzýmy používa alej diplostomulum *Diplostomum pseudospathaceum* pre trávenie pri migrácii a pobyte v o nej –o–ovke, kde sa fliví okolitým tkanivom. Testovali sme peptidolytickú aktivitu homogenátu diplostomul nazbieraných z o ných –o–oviek kaprovitých rýb (*Diplostomum* spp., morfológicky sa tieto –tádiá nedajú ahko ur i do druhu). V rámci preliminárnych výsledkov bola detekovaná aktivita cysteínových peptidáz (so substrátom FR, inhibovate ná E-64) okolo pH 3-4, pri om zvy–ujúcim sa pH peptidolytická aktivita rýchlo klesala. Vzh adom k nedostatku materiálu nebolo moŕné pokusy opakova , ale dá sa predpoklada , ŕe cysteínové peptidázy v al–ích fázach vývoja *D. pseudospathaceum* tieŕ hrajú rolu.

Po zistení, ŕe peptidázy cercárií nesú jednoducho separovate né, sme sa rozhodli pre detailnej–iu biochemickú charakterizáciu a imunolokalizáciu vytvori rekombinantné katepsíny L, ktorých gény sme získali. Ako expresný systém boli vybrané metylotropné kvasinky *Pichia pastoris*. Podarilo sa nám transformova klon *P. pastoris*, ktorý sekretuje DpCL3. al–ie rekombinantné katepsíny sú v príprave. Bude následova biochemická charakterizácia a imunolokalizácia týchto katepsínov pre determináciu ich funkcie.

6. ZÁVERE NÉ ZHRNUTIE

Cerkárie motolice *Diplostomum pseudospathaceum* exprimujú nieko ko rôznych cysteínových peptidáz. Pod a peptidolytickej aktivity v cercariálnom homogenáte, jednotlivých frakcií homogenátu a alignmentu nájdených génov ide o cathepsin L-like peptidázy.

V homogenáte cercarií bola detekovaná peptidolytická aktivita pri použití FR substrátu inhibovaná inhibítorom katepsínov L (iCL). Aktivita katepsínov B, ktorá môže by za určitých okolností tiež inhibovaná týmto inhibítorom, bola vyvrátená tým, že substrát RR nebol vzorkou –tiepený. Teda majoritná peptidolytická aktivita v homogenáte cercarií patrí katepsínom L.

Bol uskutočnený pokus o purifikáciu týchto peptidáz z homogenátu pomocou FPLC chromatografie. Tento pokus bol úspešný len čiastočne, pretože homogenát cercarií obsahuje viac katepsínov L a jednotlivé frakcie po chromatografii sú pravdepodobne zmesou peptidáz. Charakterizácia pH optima aktivity, ktorá bola tiež predmetom tejto práce, teda nie je 100% relevantná, pretože boli testované vzorky, ktoré neobsahovali jednu konkrétnu peptidázu. Pre dôkladnejšiu biochemickú charakterizáciu budú v ďalších pokusoch použité rekombinantné peptidázy.

Následne sa nám podarilo získať sekvenencie troch génov pre rôzne cathepsin L-like peptidázy u cercarií (nazvané DpCL1, 2 a 3). Hmotnostnou spektrometriou bolo potvrdené, že cercariálny homogenát a niektoré frakcie obsahujú pravdepodobne najviac cercariami exprimovaný katepsín DpCL3. Zároveň bola pomocou hmotnostnej spektrometrie detekovaná prítomnosť peptidov, ktoré patria inej, bližšie neidentifikovanej cysteínovej peptidáze.

Pre overenie predpokladanej funkcie týchto katepsínov (histolýza tkanív pri invázií hostiteľa) bolo potrebné ich lokalizovať. Pokus lokalizovať tieto katepsíny priniesol len preliminárne výsledky, nekorešpondujúce s predchádzajúcimi štúdiami, v ktorých bola cysteínová peptidáza lokalizovaná v penetračných fázach. Pomocou protilátok, ktoré zrejme reagovali s viacerými katepsínmi L (obsiahnutými v homogenáte), boli označené hlavne céčka cercarií.

Predpokladáme že cerkarie *D. pseudospathaceum* exprimujú súbor katepsínov L s rôznymi funkciami. Pravdepodobne sa uplatňujú pri penetrácii cerkárií (v penetračných flázach), ako tráviace enzýmy (v cékach) a tiež ako house-keeping peptidázy, ktoré nehrajú rolu v interakcii s hostiteľom. V ďalších experimentoch bude potreba sa venovať lokalizácii jednotlivých katepsínov L, tak ako aj ich biochemickej charakterizácii. Pretože jednotlivé katepsíny z homogenátu cerkárií sa nedajú dobre separovať, pristúpili sme k expresii rekombinantných katepsínov L, ktorých gény máme k dispozícii.

PRÍLOHA : POUŤITÉ CHEMIKÁLIE, KITY, PRIMERY

Biochemické metódy:

Fluorogenetické substráty a inhibítory peptidáz

Z-Phe-Arg-AMC	Bachem
Z-Arg- Arg- AMC	Bachem
CA-074	L-3-trans-(Propylcarbamyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (Sigma-Aldrich)
Inhibitor Cathepsinu L	Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH ₂ (Sigma-Aldrich)
E-64	L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido (4-guanidino) butan (Sigma-Aldrich)
DFP	Diisopropylfluorofosfát (Sigma-Aldrich)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich)
TPCK	Tolylsulfonylphenylalanyl chloromethyl keton (Sigma-Aldrich)
TLCK	N- -p-tosyl-L-lysine chloromethyl keton (Sigma-Aldrich)
Z-Phe-Arg-FMK	Bachem
Z-Phe-Ala-FMK	Bachem
Z-Phe-Tyr-FMK	Bachem
Elastatinal	Sigma-Aldrich
Calpain inhibitor	N-Acetyl-Leu-Leu-Norleu-al, N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal(Sigma-Aldrich)
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Trypsin inhibitor	Sigma-Aldrich

SDS PAGE, Western blot, 2D elektroforéza

DTT - Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
Tween 20	Bio-Rad
Bovine Serum Albumins (BSA)	Sigma-Aldrich
Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad
5 x vzorkový pufr neredukujúci	2% SDS; 25% glycerol; 0,1 % bromphenol blue; 60 mM Tris/HCl pH 6,8
5 x vzorkový pufr redukujúci	2% SDS; 25% glycerol; 0,1 % bromphenol blue; 60 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% DTT
10 x Tris/Glycine/SDS pufr (TGS)	Bio-Rad
Blotovací pufr	10 ml 10x TGS; 70 ml H ₂ O; 20 ml metanol
PBS-T	0,1M PBS pH 7,2, 0,05% Tween 20
Streptavidin HRP	Sigma
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
Biotínom zna ené DCG 04	Sigma
Poncoeu	1% Poncoeu v H ₂ O, Sigma
Roztok CBBR	1,2 g Coomassie brilliant blue; 300 ml metanol; 240 ml H ₂ O; 60 ml kys. octová
Odfarbovací roztok	250 ml metanol; 100 ml kys. octová; 650 ml H ₂ O
Trypsin inhibitor	Sigma-Aldrich

Rehydratačný pufr - 2D	7M urea; 2M thiourea; 4% CHAPS, 100 mM DTT; 0,5% amfolyty; bromfenol blue
Equilibračný pufr I. - 2D	6M urea; 0,05M Tris-HCl pH 8,8; 2% SDS ; 20% glycerol; 2% DTT
Equilibračný pufr II. - 2D	6M urea; 0,05M Tris-HCl pH 8,8; 2% SDS ; 20% glycerol; 2,5% iodacetamid

Molekulárne metódy a tvorba rekombinantného proteínu:

RNA izolácia, DNA elektroforéza, PCR

TRIzol	Invitrogen
50 x TAE buffer	Invitrogen
Agaróza	Invitrogen
EmeraldAmp MAX PCR MM	Takara ó Bio
EmeraldAmp GT PCR MM	Takara ó Bio
HyperLadder IV	Bioline
Syber green	Invitrogen

Média a i. pre pestovanie baktérií

Low salt LB médium	10 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 10 g chloridu sodného; pH 7,0 v 1l sterilnej H ₂ O
SOC médium	Invitrogen
LB agar	10 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 10 g chloridu sodného; 15 g agaru; pH 7,0 v 1l sterilnej H ₂ O
Kanamycín	Sigma-Aldrich
Ampicilín	Sigma-Aldrich
IPTG	Promega
xGal	Promega

Média a i. pre pestovanie kvasiniek (rekombinantný proteín)

BMG	100mM fosfátový pufr, pH 6, 1,34 % YNB, 4 x 10 ⁻⁵ % Biotin, 1% glycerol
BMM	100mM fosfátový pufr, pH 6, 1,34 % YNB, 4 x 10 ⁻⁵ % Biotin, 0,5% metanol
YPD	1% kvasničného extraktu, 2% pepton, 2% glukóza, 2% agar, 100 g/ml Zeocin
YPDS	1% kvasničného extraktu, 2% pepton, 2% glukóza, 2% agar, 100 g/ml Zeocin, 1M sorbitol
Zeocín	Sigma-Aldrich
Xho I restriktívna endonukleáza	Promega
Not I restriktívna endonukleáza	Promega
Sac I restriktívna endonukleáza	Promega

Histologické metódy, TEM, imunolokalizácia

4% paraformaldehyd	4% paraformaldehyd v 0,1M PBS, pH 7,2
Ehrlichov kyslý hematoxilin	2g hematoxilin, 100 ml EtOH, 10 ml kys. octová, 100 ml glycerín 100 ml ddH ₂ O, 3g KAl (SO ₄) ₂
Kakodylátový pufr (TEM)	0,1M kakodylát sodný, 0,1M HCl, 0,1M sacharóza, 1mM CaCl ₂ v ddH ₂ O
HEPES pufr (TEM)	0,4M HEPES, 0,15M NaCl v ddH ₂ O, pH 7,6

Kity

Opti 4CN substrate kit	Bio-Rad
Quant-IT Protein Assay Kit	Invitrogen
DirectZol RNA Mini Prep	Zymo Research
mRNA Capture Kit	Roche
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen
pGEM - T Easy Vector Systems	Promega
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Genopure Maxi Plasmid Kit	Roche
EasySelect <i>Pichia</i> Expression Kit	Invitrogen
First Choice RML-RACE Kit	Ambion
JB-4 Plus Embedding Kit	Polysciences, Inc.
Poly/Bed812/Araldite 502	Polysciences, Inc.
Rapid library preparation kit	Roche
Rapid library MID adaptors kit	Roche
Agencourt AMPure XP - PCR Purification	Beckman Coulter

Pouflité primery

Degenerované primery (vytvorené na základe aktívnych miest cysteínových peptidáz)	
DP1 forward	5'- CAA GGN CAR TGY GGI TCN TGC TGG - 3'
DP2 forward	5'- CAG GGN CAR TGY GGI TCN TGC TGG - 3'
DP3 forward	5'- CAA GGN CAR TGY GGI TCN TGT TGG - 3'
DP4 forward	5'- CAG GGN CAR TGY GGI TCN TGT TGG - 3'
DP1 reverse	5'- CCA NSA RTT YTT IAC RAT CCA ATA - 3'
DP2 reverse	5'- CCA NST RTT YTT IAC RAT CCA ATA - 3'
DP3 reverse	5'- CCA NSA RTT YTT IAC RAT CCA GTA - 3'
DP4 reverse	5'- CCA NST RTT YTT IAC RAT CCA GTA - 3'
Primery pre RACE PCR	
5'RACE DpCL1 GSP1	5'-GAA ACC AGT GAC CGA AGC AA - 3'
5'RACE DpCL1 GSP2	5'- GGC CTC TCC TGT ATC ACC AGA GAC ATA GGG AT - 3'
5'RACE DpCL1 GSP3	5'- CCG AAA TCA GAG CTG CAA TCC ACA - 3'
5'RACE DpCL2 GSP1	5'- AAT CGA GCG GTA GGA CTT GA - 3'
5'RACE DpCL2 GSP2	5'- GCT TAG CGC GAT ATG GGT AGG CTT GAT CAG TT - 3'
5'RACE DpCL2 GSP3	5'- CCA TCA CAG CCA TTG TTC CCA TCA - 3'
5'RACE DpCL3 GSP1	5'- AGG GCG ATA CGG ATA GGA TT - 3'
5'RACE DpCL3 GSP2	5'- CGA AAG CTG TAC TCA CGA GCC CAC CAT TGC AT - 3'
5'RACE DpCL3 GSP3	5'- AAC GAG TTG TTT GGG CGA TAG GCT - 3'

3'RACE DpCL1	5' - TCA GAT CCC GAG TGT ATG GGT TCA - 3'
3'RACE DpCL2	5' - CGC ATA AAC CAT GGA GTT CTG GCA - 3'
3'RACE DpCL3	5' - CGA TGC ATG CTC CCC AGA CAA TCT - 3'
Expresné primery (pre tvorbu rekombinantného DpCL3)	
EP DpCL3 forward	5' - ATA CTC GAG AAA AGA TCG CCC GAA CAA CCT CAT CCG TTG TGG CAT - 3'
EP DpCL3 reverse	5' - ATG CGG CCG CCT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GTT TGA CTA GTG GCA CGC T - 3'
Primery pre overenie kompletných sekvencií DpCL2 a 3	
DpCL2 forward	5' - ATG AAG TTC ATA TTC ATA CTA GTT - 3'
DpCL2 reverse	5' - TTA TTT GAC TAG TGG CAC GCT ACT - 3'
DpCL3 forward	5' - ATG AAG TTC GTA TTC ATA CTA GTT - 3'
DpCL3 reverse	5' - GTA TTT GAC TAG TGG CAC GCT ACT - 3'
Primery -pecifické pre používané vektory (plazmidy)	
M13 forward	5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'
M13 reverse	5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'
AOXI forward	5' - GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC -3'
AOXI reverse	5' - GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC -3'

Software

Analýza sekvencií

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.expasy.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Kontrola primerov

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzeryzer/default.aspx>

Úprava sekvencií

Geneious 8.1.2.

ZOZNAM POUŤITEJ LITERATÚRY

lánky:

Adisakwattana P., Viyanant V., Chaicumpa W., Vichasri-Grams S., Hofmann A., Korge G., Sobhon P., Grams R. (2007): Comparative molecular analysis of two asparaginyl endopeptidases and encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 156, 1026116.

Bahgat M., Ruppel A. (2002): Biochemical comparison of the serine protease (elastase) activities in cercarial secretions from *Trichobilharzia ocellata* and *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 88(6), 495-500.

Baig S., Damian R. T., Peterson D. S. (2002): A novel cathepsin B active site motif is shared by helminth bloodfeeders. *Experimental Parasitology* 101(2-3), 83-89.

Bogitsh B. J., Dalton J. P., Brady C. P., Brindley P. J. (2001): Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. *The Journal of Parasitology* 87(2), 237-41.

Brady Ciaran P., Brinkworth Ross I., Dalton John P., Dowd Andrew J., Verity Christiana K., Brindley Paul J. (2000): Molecular Modeling and Substrate Specificity of Discrete Cruzipain-like and Cathepsin L-like Cysteine Proteinases of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 380/1, 46655.

Brady C. P., Brindley P. J., Dowd A. J., Dalton J. P. (2000): *Schistosoma mansoni*: Differential Expression of Cathepsins L1 and L2 Suggests Discrete Biological Functions for Each Enzyme. *Experimental Parasitology* 94/2, 75683.

Brindley P. J., Kalinna B. H., Wong J. Y., Bogitsh B. J., King L. T., Smyth D. J., Verity C. K., Abbenante G., Brinkworth R. I., Fairlie D. P., Smythe M. L., Milburn P. J., Bielefeldt-Ohmann H., Zheng Y., McManus D. P. (2001): Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112(1), 103-112.

Brömme D., Bonneau P. R., Lachance P., Storer A. C. (1994): Engineering the S2 subsite specificity of human cathepsin S to a cathepsin L- and cathepsin B-like specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 269(48), 30238-42.

Caffrey C. R., Salter J. P., Lucas K. D., Khiem D., Hsieh I., Lim K., Ruppel A., McKerrow J. H., Sajid M. (2002): SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 121(30), 49-61.

Caffrey C. R., McKerrow J. H., Salter J. P., Sajid M. (2004): Blood and guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends in Parasitology* 20, 2416248.

Cancela M., Acosta D., Rinaldi G., Silva E., Durán R., Roche L., Zaha A., Carmona C., Tort J. F. (2008): A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie* 90, 1461-1475.

Corvo I., Cancela M., Cappetta M., Pi-Denis N., Tort J. F., Roche L. (2009): The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Molecular and Biochemical Parasitology* 167/1, 41-47.

Curwen R. S., Wilson R. A. (2003): Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends in Parasitology* 19(2), 63-66.

Dalton J. P., Skelly P., Halton D. W. (2004): Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Canadian Journal of Zoology* 82, 2116-232.

Dalton J. P., Caffrey C. R., Sajid M., Stack C., Donnelly S., Loukas A., Don T., McKerrow J., Halton D. W., Brindley P. J. (2006): Proteases in trematode biology. Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology.

Delcroix M., Sajid M., Caffrey C.R., Lim K.C., Dvořák J., Hsieh I., Bahgat M., Dissous C., McKerrow J.H. (2006): A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 3931-3939.

Doleková K., Kaňák M., Mikeš L., Cartwright J., Jedelský P., Schneider E.L., Dvořák J., Mountford A.P., Craik C.S., Horák P. (2009): The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *International Journal for Parasitology* 39, 201-211.

Dvořák J., Mashiyama S. T., Braschi S., Sajid M., Knudsen G. M., Hansell E., Lim K. C., Hsieh I., Bahgat M., Mackenzie B., Medzihradsky K. F., Babbitt P. C., Caffrey C. R., McKerrow J. H. (2008): Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* 90(2), 345-58.

Dvořák J., Mashiyama S. T., Sajid M., Braschi S., Delcroix M., Schneider E. L., McKerrow W. H., Bahgat M., Hansell E., Babbitt P. C., Craik C. S., McKerrow J. H., Caffrey C. R. (2009): SmCL3, a Gastrodermal Cysteine Protease of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Disease* 3(6), 449-465.

Fairweather I., Threadgold L.T., Hanna R.E.B. (1999): Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. *CAB International* 1999, 47-111.

Faltýnková A., Načincová V., Kablášková L. (2007): Larval trematodes (Digenea) of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.), (Gastropoda, Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. *Parasite* 14, 39-51.

Fujishima A., Yumi I., Toshiyuki N., Yukio F., Yoshio Y., Tohru S. (1997): Crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. *FEBS Letters*, 476-50.

Greenbaum D., Medzihradzky K. F., Burlingame A., Bogyo, M. (2000): Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chemistry and Biology* 7, 569-581.

Guha S., Padh H. (2008): Cathepsins: Fundamental Effectors of Endolysosomal Proteolysis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 45, 75-90.

Gun ar G., Podobnik M., Pungere J., Trukelj B., Turk V., Turk D. (1998): Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure* 6, 516-521.

Halton D. W. (1997): Nutritional Adaptations to Parasitism within the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* 27, 693-704.

Horák P., Kolářová L., Mikeš L. (2014): Schistosomatoidea and Diplostomoidea. In: *Digenetic Trematodes* (R. Toledo, B. Fried, Eds.). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 766, 331-364.

Horn M., Jílková A., Vondrášek J., Maresová L., Caffrey C. R., Mares M. (2011): Mapping the pro-peptide of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: modulation of inhibition by heparin and design of mimetic inhibitors. *ACS Chemical Biology* 2011/6, 609-17.

Chantree P., Wanichanon Ch., Phatsara M., Meemon K., Sobhon P. (2012): Characterization and expression of cathepsin B2 in *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology* 132/2, 249-256.

Chappell L. H., Hardie L. J., Secombes C. J. (1994): Diplostomiasis: the disease and host parasite interactions. In: Pike AW, Lewis JW (eds) *Parasitic diseases of fish*, Samara publishing Dyfed, 59-86.

Chen W., Wang X., Lv X., Tian Y., Xu Y., Mao Q., Shang M., Li X., Huang Y., Yu X. (2014): Characterization of the secreted cathepsin B cysteine proteases family of the carcinogenic liver fluke *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research* 113/9, 3409.

Chen J. M., Dando P. M., Rawlings N. D., Brown M. A., Young N. E., Stevens R. A., Hewitt E., Watts C., Barrett A. J. (1997): Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* 272(12), 8090-8.

Choe Y., Leonetti F., Greenbaum D. C., Lecaille F., Bogyo M., Bromme D., Ellman J. A., Craik C. S. (2006): Substrate Profiling of Cysteine Proteases Using a Combinatorial Peptide Library Identifies Functionally Unique Specificities. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 12824-12832.

- Ingram J., Knudsen G., Lim K. C., Hansell E., Sakanari J., McKerrow, J (2011):** Proteomic Analysis of Human Skin Treated with Larval Schistosome Peptidases Reveals Distinct Invasion Strategies among Species of Blood Flukes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(9), 1337.
- Ingram J. R., Rafi S. B., Eroy-Reveles A. A., Ray M., Lambeth L., Hsieh I., Ruelas D., Lim K. C., Sakanari J., Craik C. S., Jacobson M. P., McKerrow J. H. (2012):** Investigation of the proteolytic functions of an expanded cercarial elastase gene family in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(4), 1589.
- Jílková A., Horn M., Rezáková P., Marešová L., Fajtová P., Brynda J., Vondráček J., McKerrow J. H., Caffrey C. R., Mareš M. (2014):** Activation route of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: structural map with a glycosaminoglycan switch. *Structure* 22(12), 1786-98.
- Li Y., Huang Y., Hu X., Liu X., Ma C., Zhao J., Wu Z., Xu J., Yu X. (2012):** 41.5-kDa Cathepsin L protease from *Clonorchis sinensis*: expression, characterization, and serological reactivity of one excretory-secretory antigen. *Parasitology Research* 111(2), 673-680.
- Liang P., He L., Xu Y., Chen X., Huang Y., Ren M., Liang C., Li X., Xu J., Lu G., Yu X. (2014):** Identification, immunolocalization, and characterization analyses of an exopeptidase of papain superfamily, (cathepsin C) from *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research* 113(10), 3621-3629.
- Lowther J., Robinson M. W., Donnelly S. M., Xu W., Stack C. M., Matthews J. M., Dalton, J. P. (2009):** The Importance of pH in Regulating the Function of the *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Cysteine Protease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(1), 369.
- Kang J. M., Ju H. L., Ju J. W., Sohn W. M., Kim T. S., Bahk Y. Y., Hong S. J., Na B. K. (2012):** Comparative biochemical and functional properties of two leucine aminopeptidases of *Clonorchis sinensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 182(1-2), 17-26.
- Kaňý M., Mikeš L., Dalton J.P., Mountford A.P., Horák P. (2007):** Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134, 1599-1609.
- Kaňý M., Mikeš L., Hampl V., Dvořák J., Caffrey C. R., Dalton J. P., Horák P. (2009):** Peptidases of Trematodes. *Advances in Parasitology* 69, 205-297.
- Karrer K. M., Pfeiffert S. L., Ditomas M. E. (1993):** Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Biochemistry* 90, 3063-3067.
- McGrath M. (1999):** The lysosomal cysteine proteases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 181-204.
- Mikeš L., Horák P. (2001):** A protein with lectin activity in penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum* cercariae. *International Journal for Parasitology* 31, 245-252.

- Mike-L., Man P. (2003):** Purification and characterization of a saccharide-binding protein from penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum*-a bifunctional molecule with cysteine protease activity. *Parasitology* 127, 69-77.
- Mike-L., Zídková L., Ka-ný M., Dvo ák J., Horák P. (2005):** In vitro stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. *Parasitology Research* 96, 230-241.
- Moczon T. (1994)a:**A cysteine proteinase in the cercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* (trematoda, diplostomatidae). *Parasitology research* 80,680 ó 683.
- Moczon T. (1994)b:**Histochemistry of proteinases in the cercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* (trematoda, diplostomatidae). *Parasitology research* 80,684ó 686.
- Moczon T. (2007):** A cysteine proteinase in the penetration glands of the cercariae of *Tylodelphys excavata* (Trematoda, Diplostomidae). *Parasitology Research* 100(2), 299-304.
- Moczon T. (2011):** A cysteine proteinase in the penetration glands of the cercariae of *Cotylurus cornutus* (Trematoda, Strigeidae). *Parasitology Research* 108(3), 639ó643.
- Musil D., Zucic D., Turk D., Engh R. A., Mayr I., Huber R., Popovici T., Turk V., Towatari T., Katunuma N. and Bode W. (1991):**The refined 2.15 Å Xóray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *The EMBO Journal* 10, 2321ó2330.
- Müntz K., Blattner F. R., Shutov A. D. (2002):**Legumains - a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propolypeptide processing and protein breakdown in plants. *Journal of Plant Physiology* 159 (12), 1281-1293.
- Na B.K., Kim S. H., Lee E. G., Kim T. S., Bae Y. A., Kang I., Yu J. R., Sohn W. M., Cho S. Y., Kong Y. (2006):** Critical roles for excretoryósecretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cellular Microbiology* (2006)8, 1034ó1046.
- Na B. K., Kang J. M., Sohn W. M. (2008):** CsCF-6, a novel cathepsin F-like cysteine protease for nutrient uptake of *Clonorchis sinensis*. *International Journal for Parasitology* (5), 493-502.
- Nägler D. K., Sulea T., Ménard R. (1999):**Full-Length cDNA Of Human Cathepsin F Predicts The Presence Of A Cystatin Domain At The N-Terminus Of The Cysteine Protease Zymogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*257/2, 313ó318.
- Niewiadomska K., Laskowski Z. (2002):**Systematic relationship among six species of *Diplostomum* Nordmann, 1832 (Digenea) based on morphological and molecular data. *Acta Parasitologica* 47, 1230-1237.

- Niewiadomska K. (1984):** Verification of the life cycles of *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) and differentiation of *Diplostomum pseudospathaceum* (Trematoda: Diplostomidae). Systematic Parasitology 6, 81686.
- Niewiadomska K., Valtonen E. T., Siddall R. (1997):** Cercariae from *Lymnaea stagnalis* in lake Kuuhankavesi (central Finland). Acta Parasitologica 42, 1326137.
- Podvyaznaya I. M. (2006):** An ultrastructural study of alimentary tract development in the cercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* (Digenea: Diplostomidae). Parasitological Research 99, 3626367.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. (1993):** Evolutionary families of peptidases. The Biochemical Journal 290, 2056218.
- Rellstab C., Louhi K.R., Karvonen A., Jokela J. (2011):** Analysis of trematode parasite communities in fish eye lenses by pyrosequencing of naturally pooled DNA. Infection, Genetics and Evolution 11, 127661286.
- Robinson M. W., Dalton J. P., Donnelly S. M. (2008)a:** Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. Trends in Biochemical Sciences 33/12, 6016608.
- Robinson M. W., Tort J. F., Lowther J., Donnelly S. M., Wong E., Weibo X., Stack C. M., Padula M., Herbert B., Dalton J. P. (2008)b:** Proteomics and Phylogenetic Analysis of the Cathepsin L Protease Family of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica* Expansion of a Repertoire of Virulence-associated Factors. Molecular & Cellular Proteomics 7(6), 1111-23.
- Robinson M. W., Menon R., Donnelly S. M., Dalton J. P., Ranganathan S. (2009):** An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. Molecular & Cellular Proteomics 8(8): 1891-1907.
- Robinson M. W., Corvo I., Jones P. M., George A. M., Padula M. P., To J., Cancela M., Rinaldi G., Tort J. F., Roche L., Dalton J. P. (2011):** Collagenolytic Activities of the Major Secreted Cathepsin L Peptidases Involved in the Virulence of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*. PLOS Neglected Tropical Diseases 5, 1012.
- Sajid M., McKerrow J. H. (2002):** Cysteine proteases of parasitic organisms. Molecular and Biochemical Parasitology 120, 1621.
- Salter J. P., Choe Y., Albrecht H., Franklin C., Lim K. C., Craik C. S., McKerrow J. H. (2002):** Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes. The Journal of Biological Chemistry 277(27), 24618-24.
- Salter J. P., Lim K. C., Hansell E., Hsieh I., McKerrow J. H. (2000):** Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. The Journal of Biological Chemistry 275(49), 38667-73.

- Sethadavit M., Meemon K., Jardim A., Spithill T. W., Sobhon P. (2009):** Identification, expression and immunolocalization of cathepsin B3, a stage-specific antigen expressed by juvenile *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica* 112(2), 164-173
- Schwarz G., Brandenburg J., Reich M., Burster T., Driessen C., Kalbacher H. (2002):** Characterization of legumain. *Biological Chemistry* 383(11), 1813-6.
- Stack C. M., Caffrey C. R., Donnelly S. M., Sessaadri A., Lowther J., Tort J. F., Collins P. R., Robinson M. W., Xu W., McKerrow J. H., Craik Ch. S., Geiger S. R., Marion R., Brinen L. S., Dalton J. P. (2008):** Structural and Functional Relationships in the Virulence-associated Cathepsin L Proteases of the Parasitic Liver Fluke, *Fasciola hepatica*. *The Journal of Biological Chemistry* 283(15), 9896-908.
- Suttiaprapa S., Mulvenna J., Huong N. T., Pearson M. S., Brindley P. J., Laha T., Wongkham S., Kaewkes S., Sripa B., Loukas A. (2009):** Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: functional expression, immunolocalization and subsite specificity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (5), 1148-1156.
- Turk D., Guncar G., Podobnik M., Turk B. (1998):** Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biological Chemistry* 379, 137-147.
- Turk B., Turk D., Turk V. (2000):** Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 986-111.
- Wex T., Levy B., Wex H., Brömme D. (1999):** Human Cathepsins F and W: A New Subgroup of Cathepsins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 401-407.
- Wolthers B. C. (1969):** Kinetics of inhibition of papain by TLCK and TPCK in the presence of BAEE as substrate. *FEBS Letters* 2(3), 143-145.
- Yang H. J., Chung Y. B., Kang S. Y., Kong Y., Cho S. Y. (2002):** Excretory bladder: the source of cysteine proteases in *Paragonimus westermani* metacercariae. *Korean Journal of Parasitology* 40(2), 89-92.
- Young N. D., Nagarajan N., Lin S. J., Korhonen P. K., Jex A. R., Hall R. S., Safavi-Hemami H., Kaewkong W., Bertrand D., Gao S., Seet Q., Wongkham S., Teh B. T., Wongkham C., Intapan P. M., Maleewong W., Yang X., Hu M., Wang Z., Hofmann A., Sternberg P. W., Tan P., Wang J., Gasser R. B. (2014):** The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. *Nature Communications* 9(5), 4378.

al-je zdroje:

MEROPS databáza : <http://merops.sanger.ac.uk/>