

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra Parazitologie

Hyaluronidáza ve slinách krevsajících členovců

Viktorie Tothová

Bakalářská práce
Praha, letní semestr 2007

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt | 3 |
| 1. Úvod | 4 |
| 2. Literární přehled | 5 |
| 2.1 Glykosaminoglykany | 5 |
| 2.2 Hyaluronan | 6 |
| 2.3 Hyaluronidázy a jejich typy | 8 |
| 2.3.1 Hyaluronidázy | 8 |
| 2.3.2 Hyaluronidázy mikroorganismů | 11 |
| 2.3.3 Hyaluronidázy bezobratlých živočichů | 11 |
| 2.3.4 Hyaluronidázy v jedech hmyzu a pavoukoců | 12 |
| 2.3.5 Hyaluronidázy obratlovců | 12 |
| 2.4 Hyaluronidázy parazitů | 14 |
| 2.4.1 Hyaluronidázy hlístic (Nematoda) | 14 |
| 2.4.2 Hyaluronidázy krevsajících členovců | 15 |
| 3 Závěr | 17 |
| Přehled literatury | 18 |

Abstrakt

Hyaluronidázy jsou významnou skupinou enzymů odpovědných za štěpení kyseliny hyaluronové, která je jednou z hlavních složek extracelulární matrix obratlovců a podílí se na procesech buněčné adheze, hojení ran či embryogenese. Hyaluronidázy byly detekovány z různých tkání a organismů a byly rozpoznány jejich účinky v mnoha biologických procesech. Ve tkáních obratlovců hrají důležitou roli ve spermiích, játrech, sklivci či při nádorovém bujení. Hyaluronidázy jsou také důležitou složkou jedů u rozmanitých druhů organismů včetně blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*), pavouků, štírů, ryb, hadů či ještěřů. Zde působí jako „spreading factor“ umožňující dalším složkám jedu pronikat skrz pojivovou tkáň obratlovců. Důležitou roli mají tyto enzymy u některých hlístic a krevsajících členovců, kterým napomáhají sání krve a také přispívají k šíření patogenů přenášených těmito parazitickými živočichy. Tyto základní poznatky o hyaluronidázách se zaměřením na jejich význam ve slinných žlázách krevsajících členovců shrnuje předkládaná rešerše, čímž se řadí k mnoha současným pracem o těchto po dlouhou dobu přehlížených, ač významných enzymech.

Abstract (in English)

The hyaluronidases are an important group of enzymes responsible for cleaving a hyaluronic acid, which is a major component of the extracellular matrix in vertebrates, and which participates in such basic processes as cell motility, wound healing or embryogenesis. The hyaluronidases were detected in various tissues and organisms and their effect on many biological processes was found. In vertebrate tissues, they are important elements of spermatozoa, liver, vitreous and they are implicated in cancer progression. The hyaluronidases are also component of the venom of a wide variety of organisms, including hymenopteran insect, spiders, scorpions, fishes, snakes and lizards. They are called „spreading factors“ as they facilitate the spreading of toxic compounds by degradation of the connective tissue in vertebrates. The hyaluronidases, which are presented in nematodes and blood-sucking arthropods, play an important role in blood-meal acquisition and moreover, in transmission of pathogens. The review summarizes these basic facts about hyaluronidases with a view to their signigancy in salivary glands of blood-sucking arthropods, thereby takes part in many recent works of these neglected but important enzymes.

1. Úvod

Hyaluronidázy jsou významnou skupinou enzymů odpovědných za štěpení kyseliny hyaluronové, která je jednou z hlavních složek pojivové tkáně obratlovců. Poprvé byly tyto enzymy identifikovány z testikulární tkáně již v první polovině 20. stol. (Chain and Duthie, 1940 in Kreil, 1995). V následujících letech byl opomíjen jejich význam (Kreil, 1995), neboť byly obtížně detekovatelné a práce s nimi byla poměrně komplikovaná kvůli jejich nestabilitě. Teprve počátkem devadesátých let se podařilo vyvinout rychlejší a výkonnější metody detekující hyaluronidázovou aktivitu. Díky tomu byly izolovány a charakterizovány další hyaluronidázy z různých tkání a organismů a byly rozpoznány jejich účinky v mnoha biologických procesech. V současné době probíhají v lékařských i přírodovědných oborech další výzkumy těchto enzymů.

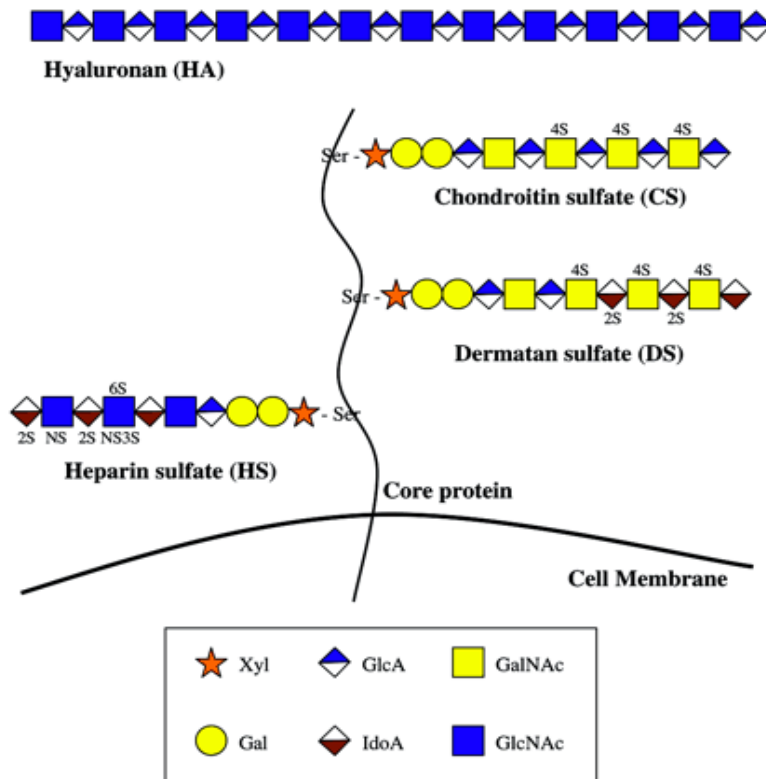
Hyaluronidázy hrají důležitou roli ve tkáních obratlovců, zejména ve spermiích, játrech, sklivci a v pojivech, uplatňují se také při nádorovém bujení. Dále jsou významnou složkou jedů u rozmanitých druhů organismů včetně včel, vos, sršní, čmeláků, pavouků, štírů, ryb, hadů či ještěřů. Zde hyaluronidázy fungují jako „spreading factor“ umožňující dalším složkám jedu pronikat skrz pojivovou tkáň obratlovců. Neméně důležitý význam mají tyto enzymy i u parazitických živočichů. Byly prokázány zejména u některých hlístic a krevsajících členovců, kterým napomáhají sání krve tím, že usnadňují ostatním sekretům slinných žláz průnik do tkání hostitele. U krevsajícího hmyzu byla hyaluronidáza dosud popsána u flebotomů a muchničků, ale tento enzym lze očekávat i u jiných skupin. Právě na hyaluronidázy krevsajících členovců je zaměřena má bakalářská práce. Cílem navazujících pokusů bude ověřit hyaluronidázovou aktivitu u různých zástupců krevsajících členovců, kvantifikovat ji a charakterizovat její základní vlastnosti.

Téma je poměrně obsáhlé, v práci proto shrnu alespoň základní dosavadní znalosti o vlastnostech hyaluronidázy a jejího substrátu, kyselině hyaluronové. Mezi ně bude patřit výskyt a funkce těchto enzymů společně s charakteristikou jejich jednotlivých typů. Také zmíním možné metody, jimiž lze hyaluronidázovou aktivitu detekovat a které budu používat v navazující práci. V další části se zaměřím na hyaluronidázu parazitických živočichů, zejména pak krevsajících členovců, jejich úlohu při sání na hostiteli a jejich možnou souvislost s šířením patogenů.

2. Literární přehled

2.1 Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou skupinou proteinů extracelulární matrix (ECM) zajišťující její gelovou strukturu. Společně s GAG se v matrix nachází další důležité strukturální makromolekuly jako kolagen, tvořící pevná vlákna, fibronectin, zajišťující buněčné spojení a chemotaxi, či laminin, který je hlavní složkou bazálních membrán. Glykosaminoglykany jsou lineární polysacharidy tvořené opakujícími se disacharidovými podjednotkami. Díky sulfatovaným záporně nabitým částem řetězců jsou to velmi stabilní molekuly a vazbou se silně osmoticky aktivními kationty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} zajišťují hydrataci a viskozitu extracelulárního prostoru. Glykosaminoglykany, s výjimkou hyaluronové kyseliny, se vážou kovalentní vazbou na membránový centrální protein a vytvářejí tak proteoglykany (viz obr. 1). Lze je rozdělit do čtyř strukturálně odlišných skupin: heparan sulfát, chondroitin sulfát, dermatan sulfát a hyaluronan (shrnutí viz Raghow, 1994).



Obr. 1. Struktura proteoglykanu. HA není na proteoglykan kovalentně navázána, ale syntetizována přímo do extracelulárního prostoru. Podle Taylor and Gallo (2006).

2.2 Hyaluronan

Hyaluronan (kyselina hyaluronová, HA) je glykosaminoglykan (GAG) přítomný převážně v extracelulární matrix všech tkání obratlovců, přičemž asi polovina jeho celkového množství se nachází v kůži.

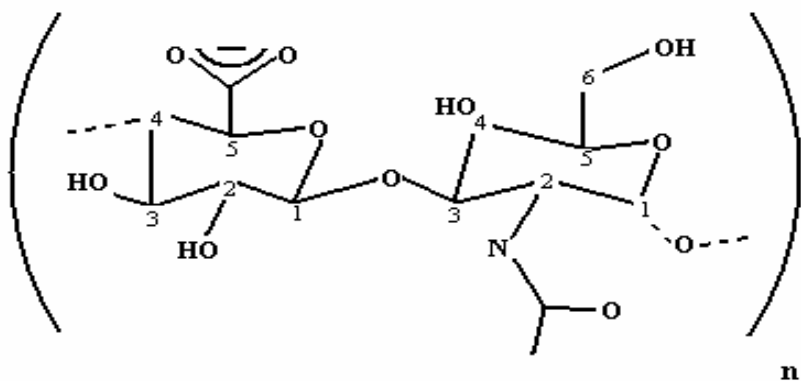
Hyaluronan je jediným GAG, který není kovalentně vázán na centrální proteoglykan a je syntetizován přímo do extracelulárního prostoru. Taktéž nemá na svůj řetězec navázané záporně nabitě sulfátové skupiny. Je tvořen opakujícími se jednotkami N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové (viz obr. 2). Molekulová hmotnost je velmi variabilní, počet disacharidů v jedné molekule může dosáhnout až 30 000, což odpovídá molekulové hmotnosti 100 MDa (Noble, 2002).

Molekuly hyaluronanu jsou syntetizovány pomocí transmembránových polymeráz (HA syntáz, HAS). U savců se vyskytují tři tyto isoenzymy označované jako HAS 1, HAS 2 a HAS 3 (Itano et al., 1999 in Noble 2002, Weigel et al., 1997 in Taylor and Gallo, 1996, Spicer, 1997 in Noble, 2002). Na typu syntetázy závisí velikost molekuly – zatímco HAS 1 a 3 syntetizují řetězce o molekulové hmotnosti od 2×10^5 do 2×10^6 Da, HAS 2 syntetizuje řetězce delší než 2×10^6 Da (Itano et al., 1999).

Rozdílná molekulová hmotnost řetězců hyaluronanu má velký vliv na jejich biologickou funkci (viz dále). V přirozené formě se hyaluronan vyskytuje převážně jako vysokomolekulární polymer, který pomáhá v extracelulární matrix zachovávat její strukturální integritu, viskozitu a distribuci proteinů. Při porušení tkáně hyaluronan depolymerizuje na fragmenty o nízké molekulové hmotnosti. Příčinou depolymerizace může být působení enzymů (hyaluronidáza, hexosaminidáza či chondroitináza, většinou aktivní při vyšším pH) či mechanické poškození (Fraser and Laurent, 1997, Stern and Csoka, 2000). Nízkomolekulární fragmenty vyvolávají zánětlivou reakci (Termeer et al., 2003), buněčnou proliferaci, diferenciaci a masivní migraci buněk (Fraser and Laurent, 1997, Raghow, 1994). Nízkomolekulární štěpy hyaluronanu jsou v místě zánětu také vázány na povrchovou molekulu leukocytů CD44. Výsledkem této vazby je aktivování leukocytů a jejich adheze na epitheliální buňky. Interakcí s CD44 vyvolávají fragmenty také angiogenezi. Vazbou s receptorem TLR4 podporují zranění dendritických buněk a aktivují zánětlivé cytokiny (Taylor and Gallo, 2006). Dlouhé řetězce hyaluronanu mají v mechanismu obrany tkáně odlišnou funkci. Tyto vysokomolekulární řetězce spojené do sítě (cross-linking) jsou mechanickou

ochranou, neboť svým uspořádáním stabilizují porušenou strukturu tkáně a podporují adhezi leukocytů (Day and de la Motte, 2005).

Hyaluronan je proto důležitou složkou v procesu zánětlivé reakce a hojení ran, zároveň i signální molekulou, jejíž výskyt indukuje porušení homeostázy tkáně (Noble, 2002).



Obr. 2. Struktura hyaluronanu. Disacharid tvořený kyselinou glukuronovou (vlevo) a N-acetylglukosaminem (vpravo). Je degradován v místě mezi těmito dvěma podjednotkami. Podle Stern (2004).

2.3 Hyaluronidázy a jejich typy

2.3.1 Hyaluronidázy

Hyaluronidázy jsou širokou a značně komplexní skupinou enzymů (endoglukosaminidáz), které dokáží štěpit kyselinu hyaluronovou (hyaluronan, HA). Hyaluronidázová aktivita byla prvně identifikována jako „spreading faktor“ testikulárního extraktu savců, který usnadňoval difúzi antivirových vakcín či jedů aplikovaných podkožně (Duran and Reynals, 1928 in Stern, 2004). Později bylo zjištěno, že oním faktorem je enzym, a jeho substrátem kyselina hyaluronová (Chain and Duthie, 1937 in Kreil, 1995). Tyto enzymy byly postupně prokázány v mnoha dalších savčích tkáních (v kůži, sklivci či játrech), dále byla jejich přítomnost zjištěna v jedech některých živočichů a také u bakterií, helmintů a členovců (viz dále).

Přestože mají všechny hyaluronidázy společný substrát, liší se mechanismem působení. Právě podle rozdílných mechanismů štěpení hyluronové kyseliny byly rozděleny do třech skupin (Meyer, 1971 in Kreil, 1995). Prvním typem jsou endo- β -acetylhexosaminidázy, které degradují vysokomolekulární substrát především na tetra- a hexasacharidy. Kromě HA jsou schopné štěpit i chondroitin sulfát. Tato skupina zahrnuje savčí testikulární a lyzozomální hyaluronidázy a jim příbuzné hyaluronidázy v živočišných jedech blanokřídlých (*Hymenoptera*), štírů, hadů apod. (shrnutí viz Kreil, 1995).

Druhý typ představují endo- β -glukuronidázy. Jsou schopné pouze štěpení HA, jehož konečným produktem jsou, podobně jako u hyaluronidáz savčího typu, především tetrasacharidy. Tato skupina enzymů byla izolována ze slinných žláz pijavek, hlístic a korýšů (Linker, 1950, Hotéz, 1994).

Třetí typ představují N-acetylhexosaminidázy, což jsou bakteriální hyaluronidázy nazývané občas lyázami. Také pro tento typ je jediným specifickým substrátem HA, kterou ale štěpí na disacharidové fragmenty. Lze říci, že substrátem hyaluronidázy prokaryot a helmintů bývá pouze HA, zatímco hyaluronidáza obratlovců rozkládá i chondroitin sulfát. Jelikož v extracelulární matrix bývají HA a chondroitin sulfát specificky spojeny uhlíkatými řetězci, je možné, že hyaluronidázy tento komplex degradují (Frost et al., 1996).

Ve výše uvedeném rozdělení existují výjimky, jako například naprosto unikátní enzymatický mechanismus u hyaluronidáz *Streptomyces*, či enzym v jedu mořských ryb (*Synanceia horrida*), který má mechanismus srovnatelný s testikulárními hyaluronidázami, ale je absolutně substrátově specifický. Konečné stanovení jednotlivých kategorií se ještě

pravděpodobně v následujících letech upřesní pomocí metod molekulární genetiky a srovnáváním homologií genových sekvencí (Frost et al., 1996).

Aktivní místa hyaluronidáz byla studována jen u testikulárních hyaluronidáz a hyaluronidáz obsažených v jedu včel a sršní. Na základě jejich srovnání se zdá, že umístění katalytického místa je na N-terminální doméně enzymu, která je nejvíce homologická ve všech sledovaných typech. Z celkového počtu 330-340 aminokyselin ve zkoumané oblasti enzymu jich bylo totožných 57. Pro tyto oblasti molekuly jsou také vždy společné čtyři cysteinové zbytky, které stabilizují doménu dvěma disulfidickými můstky a jsou proto důležité pro správné připojení k substrátu. Na samotném aktivním místě se pravděpodobně podílí dvě kyselé aminokyseliny, dále aromatické řetězce tryptofanu a tyrosinu a v neposlední řadě kladně nabitě aminokyseliny, které se silně váží na záporně nabitě glukuronáty. Ve skutečnosti ale není složení aktivního místa příliš prozkoumané a tyto hypotézy jsou navrženy pouze na základě srovnání s jinými enzymy, které štěpí polysacharidy (Kreil, 1995).

2.3.1.1 Metody detekce a kvantifikace hyaluronidázové aktivity

K prokázání a kvantifikaci hyaluronidázové aktivity bylo vytvořeno mnoho různých metod, některé z nich se ale používají už jen vzácně. Původní metody, založené na redukcí turbidity nebo viskozity, byly velice obtížné a často reagovaly s hyaluronidázami, ale i dalšími enzymy, které mohou být ve nečištěných vzorcích tkání často přítomny (Frost et al., 1996). Novější metody jsou založené na principu modifikované ELISA. V této kapitole některé z nejdůležitějších metod pro detekci hyaluronidázové aktivity zmíním.

Spektrofotometrické metody jsou založeny na změně absorbance, který nastává poté, co interagují anionické mukopolysacharidy s karbocyaninovým barvivem Stains-all. Pokud je přítomna hyaluronidáza, rozštěpením HA se výrazně sníží absorbance vzorku. Metoda je vhodná ke kvantifikaci purifikovaných hyaluronidáz, ale není spolehlivá pro samotný průkaz aktivity ze směsí proteinů (Hynes and Ferretti, 1994)

Při radiochemické metodě se vysráží radioaktivně značená HA, která není rozložena hyaluronidázou. U těchto vysrážených míst se změří radioaktivita a porovná se s radioaktivitou pozadí, čímž se určí hyázová aktivita. Výhodou je poměrně vysoká citlivost, neboť se vysráží pouze HA a nikoliv jiné polysacharidy, které jsou hyaluronidázou také

degradovány. Pro detekci hyázové aktivity u měchovců byla vyvinuta alternativní radiochemická metoda. (Hynes and Ferretti, 1994)

Fluorometrická analýza je rychlá a citlivá metoda, která využívá jako substrát HA značenou fluorogenním činidlem, 2-aminopyridinem (Nakamura et al., 1990). Po inkubaci s enzymem se stanovuje fluorescence supernatantu. Zvýšení pyridylaminových produktů v supernatantu je přímo úměrná koncentraci hyaluronidázy (Hynes and Ferretti, 1994).

ELISA-like test s biotinylovanou HA (bHA) využívá tento značený hyaluronan, který je navázán na mikrotitrační destičku a inkubován s enzymy. Důkazem hyázové aktivity je snížení absorbance oproti kontrole. Metoda využívá silnou a vysoce specifickou vazbu avidin-biotin (Frost and Stern, 1997).

U metody využívajících pevná média se naváže HA obvykle na agarózu v mikrotitrační destičce nebo v petriho misce. Po inkubaci s roztokem obsahujícím hyaluronidázu je výsledkem buď nerozložená vysrážená HA nebo naopak čiré zóny degradované HA na zakaleném pozadí. Metody se používají například na prokázání bakteriálních hyáz nebo kvantifikaci velmi malého množství hyaluronidázy (Hynes and Ferretti, 1994).

Turbidimetrické metody měří změnu viskozity roztoku HA inkubovaného s enzymem. Turbidita odpovídá rozdílu energie světelného paprsku, který vstupuje do roztoku a energie paprsku, který se při průchodu roztokem rozptýlí. Zeslabení intenzity paprsku značí menší viskozitu roztoku, potažmo přítomnost hyaluronidázy. Enzym totiž hydrolyzuje HA a tím zvyšuje tekutost a snižuje viskozitu roztoku (Hynes and Ferretti, 1994).

Zymografická analýza je elektroforézou v substrátovém gelu s navázanou HA. Používá se celuloso-acetátová, agarová membrána, agarózová replika nebo polyakrylamidový gel. Po inkubaci s enzymem je substrát, kde nebyla degradována HA, obarven modře, jelikož barvivo (Stains-all) se váže na HA. Neobarvené proužky pak značí přítomnost hyaluronidázy. (Frost et al., 1996).

2.3.2 Hyaluronidázy mikroorganismů

Hyaluronidázy bakterií reprezentují skupinu endo-N-acetylhexosaminidáz, z nichž byly popsány dva typy streptokokálních enzymů, jejichž geny byly po osekvenování z 50% totožné (Berry et al., 1994, in Frost, 1996). Další prokaryotické hyaluronidázy byly zjištěny u *Clostridium perfringens*, *Streptomyces hyalurolyticus*, *Staphylococcus sp.* a též u *Treponema pallidum*, které usnadňují šíření tkání hostitele (Frost et al., 1996).

Přítomnost enzymů byla zjišťována u klinicky významných plísní *Candida sp.*, které jsou nejčastější příčinou infekce člověka houbami. Hyaluronidáza byla prokázána u některých druhů, zatím ovšem nebyla charakterizována a není známa její funkce.

Enzym byl popsán u bakteriofága izolovaného ze *Streptococcus pyogenes*, který pomáhá bakterii v tkáni hostitele s připevněním na kolagenní vlákna a zároveň umožňuje viru proniknout skrz kapsuli z HA do streptokoka (Hynes et al., 1995, in Frost, 1996). Lze předpokládat, že i většina virů, jejichž hostitelem jsou obratlovci, může produkovat široké spektrum hyaluronidáz (Frost et al., 1996).

2.3.3 Hyaluronidázy bezobratlých živočichů

Dosud byly prostudovány hyaluronidázy u helmintů, pijavek, korýšů, blanokřídlého hmyzu a u některých parazitických členovců (viz dále).

Jak již bylo zmíněno na začátku kapitoly 2.3.1, hyaluronidázy pijavek reagují pouze se substrátem HA. U pijavky lékařské (*Hirudo medicinalis*) je molekulová hmotnost enzymu 28,5 kDa s pH optimem kolem 5,3. Předpokládá se, že pijavkám enzym slouží jako „spreading faktor“ (Hotéz, 1994, Hovingh, 1999).

U korýšů byly hyaluronidázy purifikovány z mořského krilu, *Euphausia superba*, kde se podílejí na rychlé degradaci těla korýšů po jejich smrti. Jsou podobné hyaluronidázám pijavic, jejich molekulární hmotnost je 80 kDa a pH optimum 5,3. Zajímavé je teplotní optimum těchto enzymů, které je 37°C, přestože se tyto korýši vyskytují převážně v antarktických mořích (Karlstam and Ljunglow, 1991).

2.3.4 Hyaluronidázy v jedech hmyzu a pavoukvců

Hyaluronidázy byly izolovány z jedů pavouků (Barbaro et al., 2005), štírů (Ramanaiah et al., 1990, Pessini et al., 2001, Morey et al., 2006), včel (Kemeny, 1984), vos (Hoffman, 1984, Pantera 2003, Kolarich, 2005, Skov, 2006, Lu, 1995), sršňů (Hoffman, 1987) a čmeláků (Hoffman, 2001). Hydrolýzou hyaluronanu napomáhají průniku ostatních složek jedu skrz extracelulární matrix, čímž zvyšují účinnost jedu. Také samotná hyaluronidáza výrazně působí na pojivovou tkáň, což potvrzují studie o vyvolání nekrózy tkáně v místě kousnutí kobrou indickou (*Naja naja*), která se objevila i při aplikaci antiséra. Totéž je zdokumentováno u tří druhů australských pavouků (Young and Pincus, 2001).

Enzymy živočišných jedů jsou příbuzné testikulárním hyaluronidázám, ale jsou schopné jako substrát využívat jen HA. Například u vosy *Dolichovespula maculata* (protein Dol m 2) byla určena 27% podobnost enzymů s PH-20, lidským testikulárním proteinem (Lu, 1995).

Velice důležitá je skutečnost, že jedy blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*) často vyvolávají u lidí alergické reakce, které končí u hypersenzitivních osob mnohdy fatálně. Proti alergenům přítomným v jedech se při imunitní reakci tvoří převážně protilátky IgE. Mezi tyto alergeny patří, kromě hyaluronidázy, hlavně fosfolipáza A, B, fosfatáza či antigen 5. Právě hyaluronidáza je ale zodpovědná za zkříženou reakci mezi včelími a vosími jedy (Lu, 1995). Zkřížená alergická reakce se u lidí občas vyskytuje i mezi jedem vosy a slinami komárů a ovádů (shrnutí viz Moffitt, 2003). Ve všech třech těchto typech vzorků je možné prokázat hyaluronidázovou aktivitu (Volfová, osobní sdělení). Je proto možné, že i za tuto zkříženou reakci alergických osob by mohla být zodpovědná hyaluronidáza.

2.3.5 Hyaluronidázy obratlovců

U mořských obratlovců byla izolována hyaluronidáza zatím jen z jedu jediného druhu, odrance *Synanceia horrida* z čeledi ropušnicotvárných (*Scorpaeniformes*). Jedové žlázy těchto ryb se nacházejí ve formě malých zduřenin přímo na jedových paprscích hřbetní a prsních ploutví. Žlázy jsou napojeny na dutý kanálek uvnitř ostnu, který ústí na jeho konci. Enzym má hmotnost 62 kDa s pH optimem 6,0 a jeho hyaluronidázová aktivita je zatím největší známou mezi těmito enzymy (Frost et al., 1996). Mezi suchozemské obratlovce, v jejichž jedech je obsažena hyaluronidáza, lze zařadit zejména hady. Hyaluronidázová aktivita byla prokázána zatím jen u několika málo druhů, například u kobry indické (*Naja*

naja) nebo chřestýše *Agkistrodon contortrix* (Girish et al., 2004, Tu, 1977 in Frost, 1996, Kudo and Tu, 2001). Enzymy jsou naprosto substrátově specifické pro hyaluronan a jsou řazeny mezi endo- β -acetylhexosaminidázy. Molekulová hmotnost enzymu v kobřím jedu je 70 kDa, pH optimum 9,2. Izolována a charakterizována byla hyaluronidáza též v jedu korovce mexického (*Heloderma horridum*) s hmotností 63 kDa a pH optimem 5,0 (Tu and Hendon, 1983 in Frost, 1996).

Hyaluronidázová aktivita byla detekována v mnoha savčích tkáních. Již v první polovině 20. stol. byla známa testikulární hyaluronidáza z plasmatické membrány dobytčích spermií (Duran and Reynals, 1928 in Sterne 1995), ovšem nikdo necharakterizoval tyto enzymy detailněji. Teprve koncem devadesátých let se opět objevily výzkumy, zaměřující se mimo jiné na značnou podobnost hyaluronidáz s proteinem označeným PH-20. Tento protein, prvně izolován z morčete, se nachází na zadní straně hlavičky a akrosomální membráně savčích spermií a hraje důležitou roli při oplození vajíčka (Primakoff et al., 1988 in Kreil, 1995). Srovnání sekvence hyaluronidáz včel a proteinu PH-20 vyšlo najevo, že jsou homologní. Protein disponuje stejnou aktivitou jako hyaluronidázy, neboť má schopnost štěpit HA, která je přítomna ve vrstvě okolo oocyty (zona pellucida), čímž pomáhá spermii při průniku skrz tuto vrstvu a následném oplození. Inhibitory hyaluronidáz by proto mohly bránit oplození a sloužit jako antikoncepce (Kreil, 1995). Proteiny PH-20 byly potvrzeny i u lidí (Gmachl et al., 1993 in Kreil, 1995), opic a myší (Lin et al., 1994).

Mezi další tkáně obsahující hyaluronidázu patří především játra. Je to hlavní orgán, ve kterém dochází k degradaci volně cirkulující HA, která je v játrech zachycována specifickými receptory (Fraser and Laurent, 1997). Játerní hyaluronidázy jsou glykoproteiny s molekulovou hmotností přibližně 55-70 kDa a s nízkým pH optimem (kolem 3,7) (Joy et al., 1985 in Kreil, 1995). Druhým důležitým orgánem, kde je odbourávána HA, jsou ledviny. Zde jsou enzymaticky odbourávány především nejmenší fragmenty HA při pH optimu 3,5. Ovšem největší množství volně kolující HA je v lymfatickém systému a také zde je většina odbourávána pomocí enzymů, dříve, než přejde do krve. Regulací hladiny HA je hyaluronidázová aktivita v lymfě spojena s činností makrofágů a imunomodulací organismu. Pokud je HA navázána i na povrch lymfocytů, znemožňuje jejich účast v signálních drahách imunitních odpovědí. Hyaluronidázová aktivita byla také zjištěna u dalších tkání savců, především v kůži, placentě, sklivci, plicích, mozku, dásních a slinných žlázách. (shrnutí viz Frost et al., 1996).

Hyaluronidázy se vyskytují i v maligních nádorech savčích tkání. Jsou to endo- β -acetylhexosaminidázy schopné štěpit HA i chondroitin sulfát a mohou se uplatňovat i

v rostoucím nádoru. Štěpením hyaluronanu podporují angiogenezi v místě bujení a tím i růst nádoru. Uplatňují se i při metastázi rakovinných buněk, které pomocí těchto enzymů snadněji pronikají pojivovou tkání a cévním systémem do dalších oblastí (Stern and Csoka, 2000). Hyaluronidáza může být i přímo produkována maligními buňkami (Liu et al., 1996).

2.4 Hyaluronidázy parazitů

Hyaluronidázová aktivita byla prokázána u mnoha parazitických druhů živočichů, zejména hlístic a krevsajících členovců. Enzymy jim slouží jako „spreading factor“ napomáhající ostatním složkám slin s průnikem tkáněmi hostitele a snadnějším šířením. Endoparazitům usnadňují přímo pohyb tkáněmi hostitele či průnik z vnějšího prostředí do hostitelského organismu. U některých zástupců hlístic se podílí na přestavbě vývojových stádií parazita během ontogeneze (Frost, 1995).

2.4.1 Hyaluronidázy hlístic (Nematoda)

Hyaluronidázy jsou zaznamenány u zástupců rodů *Ascaris* (Rhoads, 2001), *Haemonchus* (Rhoads, 2000), *Ancylostoma* a *Anisakis* (Hotéz et al., 1994). Enzymy jednotlivých zástupců se od sebe mírně liší, především funkcí. Ta závisí na konkrétní životní strategii parazita (viz dále).

Hyaluronidázy prokázané u larev měchovců rodu *Ancylostoma* jsou řazeny mezi endoglukuronidázy, neboť jsou substrátově specifické, schopné štěpit pouze HA. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 49 nebo 87 kDa s pH optimem 6-8. Tyto vlastnosti enzymů jsou obdobné hyaluronidázám, které se vyskytují u pijavek. Larvy různých druhů mají rozdílnou enzymatickou aktivitu, která koreluje se schopností larvy penetrovat povrchem hostitele. Larvy s nejvyšší aktivitou dokáží proniknout z vnějšího prostředí do hostitele jeho kožní pojivovou tkání, zatímco u jiných je obvyklá cesta nákazy střevním epitelem (Hotéz et al., 1990).

Mírně odlišný typ hyaluronidázy má dospělec těchto měchovců, stejně jako larvální stádia rodu *Anisakis*. Jejich enzymy mají molekulovou hmotnost 65 kDa (*Ancylostoma*) a 40 kDa (*Anisakis*) a různá pH optima (6 a 4), ale oba typy jsou schopny degradovat kromě HA i chondroitin-sulfát. Enzymy pomáhají těmto hlísticím při invazi do hostitele střevní sliznicí.

Navíc slouží jako „spreading factor“ pro další složky sekretované parazitem, například pro imunosupresiva, vasodilatátory či antikoagulanty (Hotéz et al., 1994).

Jinou funkci mají hyaluronidázy zástupců *Haemonchus contortus* a *Ascaris suum*. Zde se enzymy uplatňují v ontogenetickém vývoji parazitů. Degradací pojivové tkáně samotných parazitů dochází k morfologické přestavbě jejich těla během přechodu mezi larválními stádii. Je ale možné, že se enzymy podílí i na průniku tkání hostitele, stejně jako u předchozích parazitů. Tyto enzymy neštěpí chondroitin-sulfát, mají podobnou molekulární hmotnost (kolem 56 kDa) i pH optimum kolem 5 (Rhoads et al., 2000 and 2001).

2.4.2 Hyaluronidázy krevsajících členovců

Hyaluronidáza se také vyskytuje ve slinách některých zástupců krevsajících členovců. Byla dosud prokázána u klíšťat *Amblyomma hebraeum* a *Onithodoros savignyi* (Neitz et al., 1978 and 1987), muchničky *Simulium vittatum* (Ribeiro et al., 2000) a u flebotomů (Diptera: Psychodidae), konkrétně u *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi*, *P. duboscqi*, *P. halepensis*, *P. sergenti* a *P. perniciosus* (Charlab, 1999, Ribeiro et al., 2000; Černá et al., 2002). Je pravděpodobné, že se tento výčet v následujících letech dále rozroste.

Těmto členovcům usnadňuje hyaluronidáza sání krve, neboť zvyšuje permeabilitu tkáně pro další složky slin (antihemostatika apod.). Flebotomové, muchničky a klíšťata při nabodnutí cévy hostitele vytvoří hematoma, ze kterého pak sají. Krevsající hmyz s tímto typem sání se nazývá thelmofágní (anglicky pool-feeders). Naproti tomu většina komárů a ploštic z podčeledi Triatominae sají krev přímo z cévy, nebo ji odsávají z poraněné cévy rychleji, než stačí přitékat (solenofágní typ sání). Hyaluronidázy se zřejmě uplatňují zejména u thelmofágního hmyzu, kde mohou usnadňovat difúzi antihemostatik do tkáně v místě zranění, čímž se zvětší oblast hematoma pro sání. Enzymy také zřejmě modulují imunitní reakce hostitele. Krevsající členovci jsou vektory mnohých patogenů, a proto mají hyaluronidázy pravděpodobně velký význam při šíření parazitických nákaz.

Sliny flebotomů *L. longipalpis* a *P. papatasi* potlačují aktivaci T-lymfocytů a funkci makrofágů (Ribeiro et al., 2000). Jejich imunosupresivní účinek usnadňuje přenos parazitických protozoí rodu *Leishmania* snížením infekční dávky parazita a urychlením nákazy hostitele (Ribeiro et al., 2000). Je možné, že jednou z molekul, které se na tomto procesu podílí, je i hyaluronidáza (Černá et al., 2002). Je také možné, že podobným způsobem enzymy (včetně hyaluronidázy) napomáhají i šíření arbovirů, které se přenáší při společném sání více jedinců klíšťat či muchniček na jednom hostiteli, též co-feeding (Ribeiro et al.,

2000). V literatuře je uváděn jako příklad virus vezikulární stomatitidy (vesicular stomatitis virus, VSV), o kterém se soudilo, že není přenášen členovci. Nenažená muchnička *S. vittatum* se ovšem infikuje, saje-li na obratlovci společně s nakaženými, nebo nasaje-li se do 48 hodin po nich (Mead et al., 2000 in Ribeiro, 2000).

Hyaluronidázy členovců jsou svými vlastnostmi podobné savčím hyaluronidázám a hyaluronidázám v jedech blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*). Spolu s těmito enzymy se řadí do skupiny endo- β -acetylhexosaminidáz. Je zajímavé, že i v rámci jedné skupiny hmyzu se hyaluronidázy mohou lišit svoji strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Hyaluronidázy ve slinných žlázách flebotomů se liší strukturou a citlivostí k redukujícím podmínkám. U *P. papatasi*, *P. duboscqi* a *P. halepensis* je aktivní formou enzymu monomer, který má stejnou molekulovou hmotnost za redukujících i neredukujících podmínek. Oproti tomu enzym *P. sergenti* je homodimer, ale zůstává aktivní i za redukujících podmínek jako podjednotka o 60 kDa. Aktivita u *L. longipalpis* a *P. papatasi* byla změřena jen za neredukujících podmínek. Molekulární hmotnosti hyaluronidáz flebotomů se pohybuje v rozmezí od 60 kDa (*P. sergenti*) do 110 kDa (*P. halepensis*). Jejich aktivita je nejvyšší v rozmezí pH 4-6, ale aktivní zůstávají i ve slabě zásaditých podmínkách (Černá et al., 2002). Poněkud odlišné je pH optimum enzymů muchničky, které se pohybuje okolo 6 a při nižších hodnotách již enzymy aktivní nejsou. (Ribeiro et al., 2000). Optimální podmínky pro hyaluronidázy klíšťat zatím nebyly určeny, vesměs se enzymy ukazují jako málo aktivní (Neitz et al., 1978).

Základním substrátem pro hyaluronidázy členovců je hyaluronan, který hydrolyzují na tetrasacharidy, ale u některých flebotomů byla prokázána schopnost štěpit i chondroitin sulfát A a C, podobně jako je tomu u testikulárních hyáz. U flebotomů mají nejvyšší hyaluronidázovou aktivitu *P. papatasi* a *P. halepensis*. Zkoumané vzorky enzymů prokazovaly vysokou termostabilitu, ta byla detekována i po poškození ve 100°C. Pozoruhodné je, že určitá, i když nízká hyaluronidázová aktivita byla prokázána i u samců *P. duboscqi*, kteří se na rozdíl od krevsajících samic živí jen rotlinnými šťávami (Černá et al., 2002).

3. Závěr

Hyaluronidázová aktivita byla v poslední době prokázána v mnoha různých tkáních živočichů. Charakterizace hyaluronidáz u dalších parazitických druhů členovců by mohla pomoci porozumět způsobu přenosu patogenů a mechanismu jejich infekce v těle hostitele. Dosud byla hyaluronidáza popsána u klíšťat, flebotomů a muchniček, předběžné pokusy v naší laboratoři ukázaly, že vysoké hladiny tohoto enzymu jsou i u jiných krevsajících dvoukřídlých, například ovádů (*Tabanidae*).

Cílem mých následujících pokusů bude ověřit pomocí různých metod přítomnost hyaluronidázové aktivity ve slinách některých krevsajících členovců a kvantifikovat ji. Součástí výzkumu bude charakterizovat základní vlastnosti těchto enzymů, například jejich molekulovou hmotnost, termostabilitu a pH optimum. Některé hmyzí zástupce získám z laboratorních chovů (klíšťata, *Ixodes ricinus*), jiné vlastním odchytom v přírodě (např. ovády). Z mnoha metod detekujících hyaluronidázovou aktivitu budu používat převážně průkaz na mikrotitačních destičkách s navázanou biotinylovanou HA a zymografickou analýzu na substrátovém gelu. Jsou to poměrně citlivé metody, které umožňují detekovat a popřípadě i kvantifikovat enzymatickou aktivitu.

V oblasti výzkumu hyaluronidáz je ještě mnoho nezodpovězených otázek, k jejichž řešení bude potřeba získat velké množství dalších poznatků. Snad k tomu přispějí i tato rešerše a na ní navazující diplomová práce.

Přehled literatury

Barbaro K. C., Knysak I., Martins R., Hogan C., Winkel K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45 (4), 489-499.

Černá P., Mikeš L., Volf, P., (2002); Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae); *Insect biochemistry and molecular biology* 32: 1691 – 1697

Day, A. J., de la Motte, C. A., 2005. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation. *Trends in immunology* 26, 637-643.

Fraser J. R. E., Laurent, T. C., Laurent U. B. G., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal medicine* 242, 27-43.

Frost G. I., Stern R., 1997. A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents. *Analytical Biochemistry* 251, 263-269.

Frost, G. I., Csoka, T., Stern, R., 1996. The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 8, 419-434.

Girish, K. S., Shashidharamurthy, R., Nagaraju, S., Gowda, T. V., Kemparaju, K., 2004. Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie* 86(3), 193-202.

Hoffman, D. R., Wood, C. L., 1984. Allergens in Hymenoptera venom XI. Isolation of protein allergens from *Vespula maculifrons* (yellow jacket) venom. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 74 (1), 93-103.

Hoffman D. R., Jacobson R. S., Zerboni R., 1987. Allergens in hymenoptera venom. XIX. Allergy to *Vespa crabro*, the European hornet. *International Archives of Allergy and Immunology* 84 (1), 25-31.

Hoffman D. R., El-Choufani S. E., Smith M. M., de Groot H., 2001. Occupational allergy to bumblebees: allergens of *Bombus terrestris*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108 (5), 855-60.

Hotez, P., Haggerty, J., Hawdon, J., Milstone, L., Gamble, H. R., Schad, G. A., Richards, F. F., 1990. Metalloproteases of Infective *Ancylostoma* Hookworm Larvae and Their Possible Functions in Tissue Invasion and Ecdysis. *Infection and immunity* 58 (12), 3883-3892.

Hotez, P., Narasimhan, S., Haggerty, J., Milstone, L., Bhopale, V., Schad G. A., Richards, F. F., 1992. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. *Infection and Immunity* 60, 1018-1023.

Hotez, P., Capello, M., Hawdon, J., Beckers, S., Sakanari, J., 1994. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasives nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*. Possible

functions in the pathogenesis of human zoonoses. *The Journal of infection diseases* 170: 918-926.

Hynes, W. L., Ferretti, J. J., 1989. Sequence analysis and expression in *E. coli* of the hyaluronidase gene of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Infection and immunity* 57, 533-539.

Hynes, W. L., Ferretti, J. J., 1994. Assays for hyaluronidase activity. *Methods in enzymology*, 235: 606-616.

Hovingh, P., Linker, A., 1999. Hyaluronidase activity in leeches (*Hirudinea*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 124 (3), 319-326.

Charlab, R., Valenzuela, J. G., Rowton, E. D., Ribeiro, J. M. C., 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15155–15160.

Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., Kimata, K., 1999. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *The Journal of biological chemistry* 274(35), 25085-92.

Imberty, A., Lortat-Jacob, H., Pérez, S., 2006. Structural view of glycosaminoglycan – protein interaction. *Carbohydrate research* 342, 430-439.

Karlstam, B., Ljunglow, A., 1991. Purification and partial characterization of a novel hyaluronic acid-degrading enzyme from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Polar biology* 11 (7), 501-507.

Kemeny, D. M., Dalton, N., Lawrence, A. J., Pearce, F. L., Vernon, Ch. A., 1984. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *European Journal of Biochemistry* 139 (2), 217-223.

Kolarich, D., Léonard, R., Hemmer, W., Altmann, F., 2005. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *The Febs Journal* 272, 5182-5190.

Kreil, G., 1995. Hyaluronidases—a group of neglected enzymes. *Protein Science* 4, 1666–1669.

Kudo, K., Tu, A. T., 2001. Characterisation of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. *Archives of biochemistry and biophysics* 386, 154-162.

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., Primakoff, P. J., 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *The Journal of cell biology* 125 (5), 1157-63.

Linker, A., Meyer, K., Hoffman, P., 1960. The production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. *J Biol Chem.* 1960 Apr;235:924-7

- Liu, D., Pearlman, E., Diaconu, E., Guo, K., Mori, H., Haqqi, T., Markowitz, S., Willson, J., Sy, M., 1996. Expression of Hyaluronidase by Tumor Cells Induces Angiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15), 7832-7837.
- Lu, G., Kochoumian, L., King, T. P., 1995. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 4457-4465.
- Moffitt, J. E., 2003. Allergic reactions to insect stings and bites. *Southern Medical Journal* 96 (11), 1073-1079.
- Morey S. S., Kiran K. M., Gadag J. R., 2006. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47 (2), 188-195.
- Neitz, A. W., Vermeulen, N. M. J., 1987. Biochemical studies on the salivary glands and haemolymph of *Amblyomma hebraeum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 443-450.
- Neitz, A. W., Howel, C. J., Potgieter, D. J., Bezuidenhout, J. D., 1978. Proteins and free amino acids in the salivary secretion and haemolymph of the tick *Amblyomma hebraeum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 45, 235-240.
- Noble, P. W., 2002. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology* 21, 25-29.
- Pantera, B. et al., 2003. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1623, 72-81.
- Pessini A. C., Takao T. T., Cavalheiro E. C., Vichnewski W., Sampaio S. V., Giglio J. R., Arantes E. C., 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39 (10), 1495-1504.
- Raghow, R., 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB Journal* 8, 823-831.
- Ramanaiah M., Parthasarathy, P. R., Venkaiah B., 1990. Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. *Biochemistry international* 20 (2), 301-310.
- Rhoads, M. L., Fetterer, R. H., Romanowski, R. D., 2000. A developmentally regulated hyaluronidase of *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology*, 916-921.
- Rhoads M. L., Fetterer R. H., Urban J. F. Jr., 2001. Release of hyaluronidase during in vitro development of *Ascaris suum* from the third to fourth larval stage. *Parasitology research* 87 (9), 693-697.

Ribeiro, J.M.C., Charlab, R., Rowton, E.D., Cupp, E.W., 2000. *Simulium vittatum* (Diptera:Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *Journal of Medical Entomology* 37, 743–747.

Skov, L. K. et al., 2006. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Å resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallographica D62*, 595-604.

Stern, R., Csoka, A. B., 2000. Mammalian hyaluronidases. *Glycoforum/Science of Hyaluronan Review Series*,
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15/HA15E.html>

Stern R., 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology* 83, 317-325.

Taylor, K. R., Gallo, R. L., 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *The Faseb Journal* 20, 9-22.

Termeer, Ch., Sleeman, J. P., Simon, J. C., 2003. Hyaluronan – magic glue for the regulation of the immune response. *Trends in immunology* 24, 112-114.

Young A. R., Pincus S. J., 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39 (2-3), 391-400.