

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Marina Bakardjieva

Parazitární proteáza SmCB2 jako cílová molekula pro léčbu schistosomózy

Parasitic protease SmCB2 as a target for the treatment of schistosomiasis

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze dne 1.5.2017

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. za ochotu, vstřícnost, cenné rady a čas věnovaný při vypracování diplomové práce. Děkuji Mgr. Martinu Hornovi, CSc. za pomoc, milý přístup a trpělivost při řešení praktické části této práce. Děkuji Mgr. Lence Ulrychové za provedení mikroskopické analýzy a Mgr. Adéle Jílkové, Ph.D. za poskytnutý materiál. Mgr. Martě Chanové, Ph.D. (1. LF UK) děkuji za pomoc s experimenty na myším modelu. Děkuji Dr. Conorovi Caffreyemu (UCSF) za poskytnutí inhibitorů. Za vstřícnost a přínosné rady děkuji RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. (PřF UK). Děkuji všem členům skupiny Dr. Mareše za veškerou pomoc a vytvoření přátelského prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a všem blízkým za podporu během celého studia.

Abstrakt

Krevničky rodu *Schistosoma* jsou parazitické motolice, které způsobují schistosomózu, závažné onemocnění postihující více než 240 mil. lidí. Proteolytický systém krevniček je nezbytný pro jejich životaschopnost; účastní se důležitých procesů při interakci s hostitelem, jako je trávení potravy, invaze a migrace tkáněmi. Proto jsou proteázy krevniček perspektivními cílovými molekulami pro terapeutický zásah při léčbě schistosomózy. Tato práce se zabývá proteázou katepsin B2 (SmCB2) z krevničky střevní (*S. mansoni*), jejíž biochemické vlastnosti a biologická funkce nebyly podrobně studovány. Rekombinantní SmCB2 byl připraven pomocí kvasinkového a bakteriálního expresního systému a chromatograficky purifikován. V aktivním testu *in vitro* byly identifikovány první účinné inhibitory SmCB2 blokující jeho proteolytickou aktivitu v submikromolárních koncentracích. Byly připraveny specifické polyklonální protilátky proti SmCB2, které byly použity pro imunomikroskopickou lokalizaci této proteázy v povrchové vrstvě parazita. Pomocí ELISA analýzy bylo zjištěno, že SmCB2 je rozeznáván jako parazitární antigen imunitním systémem hostitele v myším modelu schistosomózy. Práce přináší významné informace o SmCB2 jako potenciální cílové molekule pro syntetické inhibitory a jako novém antigenu pro vakcinační studie.

Klíčová slova: parazit, krevnička, *Schistosoma*, proteáza, katepsin, inhibitor, imunoanalýza

Abstract

Blood flukes of the genus *Schistosoma* are parasitic trematodes that cause schistosomiasis, a serious disease afflicting more than 240 million people. The proteolytic system of schistosomes is essential for their viability: it participates in important processes during host-parasite interactions such as food digestion, invasion and tissue migration. Thus, schistosomal proteases are promising molecular targets for therapeutic intervention in schistosomiasis treatment. The thesis focuses on the protease cathepsin B2 from *S. mansoni* (SmCB2) which has not been studied in detail so far in terms of biochemical properties and biological function. Recombinant SmCB2 was prepared using yeast and bacterial expression systems and was chromatographically purified. Using an *in vitro* activity assay, the first effective inhibitors of SmCB2 were identified which inhibited its proteolytic activity in submicromolar concentrations. Specific polyclonal antibodies against SmCB2 were prepared and used for immunomicroscopic localization of this protease on the surface of the parasite. ELISA analysis demonstrated that SmCB2 is a parasite antigen recognized by the host immune system in the mouse model of schistosomiasis. The thesis provides valuable information about SmCB2 as a potential target molecule for synthetic inhibitors and a new antigen for vaccination studies.

Key words: parasite, *Schistosoma*, protease, cathepsin, inhibitor, immunoanalysis

Seznam zkratek:

APC	antigen prezentující buňky (z ang. antigen-presenting cell)
AMC	7-amino-4-methylkumarin
APS	peroxodisíran amonný
BMG	minimální glycerolové médium (z ang. buffered minimal glycerol)
BMM	minimální metanolové médium (z ang. buffered minimal methanol)
BSA	hovězí sérový albumin (z ang. bovine serum albumin)
DC	dendritická buňka
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
ELISA	analýza s enzymem navázaným na immunosorbent (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
E/S	exkrečně/sekreční
FPLC	„fast protein liquid chromatography“
HIV	virus lidské imunodeficiency (z ang. Human immunodeficiency virus)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace v polovině maximálního účinku
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani medium
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z ang. major histocompatibility complex)
OD	optická denzita
OVA	ovalbumin
PBS	pufrovací fyziologický roztok (z ang. phosphate buffered saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z ang. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
pI	izoelektrický bod
PVDF	polyvinylidfluorid
RFU	relativní fluorescenční jednotky
SAP	„Shrimp Alkaline Phosphatase“
SDS	dodecylsulfát sodný

SmCB2	katepsin B2 z krevničky střevní
SmCB1	katepsin B1 z krevičky střevní
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SOC	optimalizované Luria Bertani medium (z ang. super optimal broth with catabolite repression)
TCR	T-buněčný receptor (z ang. T cell receptor)
TEMED	N, N, N', N'- tetraethylenmethyldiamin
Th buňky	pomocné T buňky (z ang. T helper cell)
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor (z ang. tumor necrosis factor)
Treg	regulační T buňky
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomehtan
Tween	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
UV	ultra fialové světlo
YNB	kvasinková dusíkatá báze (z ang. yeast nitrogen base)
YPD	kultivační medium pro kvasinky (z ang. yeast extract pepton dextrose)

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	2
2.1. Parazitická krevnička <i>Schistosoma mansoni</i>	2
2.1.1. Výskyt <i>S. mansoni</i>	2
2.1.2. Nákaza a životní cyklus <i>S. mansoni</i>	3
2.2. Onemocnění schistosomóza	5
2.2.1. Akutní schistosomóza	5
2.2.2. Chronická schistosomóza.....	8
2.2.3. Schistosomóza a vztah k jiným onemocněním	9
2.2.4. Léčba schistosomózy a vývoj vakcín.....	10
2.3. Proteázy.....	12
2.3.1. Inhibiční regulace proteáz.....	12
2.3.2. Klasifikace proteáz.....	13
2.3.3. Cysteinové proteázy	14
2.3.3.1. Katepsin B	15
2.4. Proteázy z krevničky <i>S. mansoni</i>	16
2.4.1. Proteázy trávicího traktu <i>S. mansoni</i>	16
2.4.2. Proteázy lokalizované mimo trávicí trakt <i>S. mansoni</i>	18
2.4.3. Izoenzymy katepsinu B ze <i>S. mansoni</i>	19
2.4.3.1. Katepsin B1 ze <i>S. mansoni</i>	19
2.4.3.2. Katepsin B2 ze <i>S. mansoni</i>	20
3. Cíle práce	22
4. Materiál a metody	23
4.1. Materiál.....	23
4.1.1. Buněčný a biologický materiál	23
4.1.2. Chemikálie	23
4.2. Přístroje a vybavení	24
4.3. Metody.....	25
4.3.1. Rekombinantní exprese SmCB2 v <i>P. pastoris</i>	25
4.3.1.1. Příprava buněk <i>P. pastoris</i>	25
4.3.1.2. Transformace buněk <i>P. pastoris</i> elektroporací	25
4.3.1.3. Exprese SmCB2 v buňkách <i>P. pastoris</i>	26
4.3.1.4. Purifikace SmCB2 gelovou chromatografií	26
4.3.1.5. Purifikace SmCB2 ionexovou chromatografií	26
4.3.2. Rekombinantní exprese SmCB2 v <i>E. coli</i>	27
4.3.2.1. Amplifikace DNA inzertu a klonování do plasmidu.....	27
4.3.2.2. Restrikční štěpení enzymy <i>BamHI</i> a <i>NotI</i> a ligace do <i>pHTT2</i> plasmidu	28
4.3.2.3. Transformace buněk <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku.....	28
4.3.2.4. Izolace vektorové DNA.....	29
4.3.2.5. Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	29
4.3.2.6. Stanovení sekvence DNA.....	29
4.3.2.7. Transformace expresních buněk <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku	29
4.3.2.8. Exprese SmCB2 v buňkách <i>E. coli</i>	30
4.3.2.9. Dezintegrace buněk <i>E. coli</i> a separace inkluzí.....	30
4.3.2.10. Purifikace SmCB2 pomocí afinitní chelatační chromatografie	30

4.3.2.11.	Refolding pomocí dialýzy	31
4.3.2.12.	Odštěpení fúzního proteinu TEV proteázou	31
4.3.3.	Analytické metody	32
4.3.3.1.	Horizontální agarózová elektroforéza	32
4.3.3.2.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)...	32
4.3.3.3.	Přenos proteinů z gelu na membránu	33
4.3.3.4.	Imunodetekce proteinů specifickými protilátkami	33
4.3.4.	Měření enzymatické aktivity SmCB2	34
4.3.4.1.	Měření se substrátem Z-Phe-Arg-AMC	34
4.3.4.2.	Určení koncentrace enzymu pomocí titrace	34
4.3.4.3.	Stanovení zbytkové aktivity	34
4.3.4.4.	Stanovení konstanty IC ₅₀	34
4.3.5.	Výroba polyklonální anti-SmCB2 protilátky	35
4.3.6.	Purifikace krevních sér afinitní chromatografií	35
4.3.7.	Testování krevních sér pomocí ELISA	36
4.3.8.	Imunolokalizace SmCB2 v <i>S. mansoni</i>	36
5.	Výsledky	38
5.1.	Rekombinantní exprese SmCB2 v kvasinkách <i>P. pastoris</i>	38
5.1.1.	Transformace buněk <i>P. pastoris</i>	38
5.1.2.	Časový průběh exprese SmCB2 v <i>P. pastoris</i>	38
5.1.3.	Příprava proteinové frakce gelovou chromatografií	40
5.1.4.	Purifikace rekombinantního SmCB2 ionexovou chromatografií	41
5.1.5.	Primární analýza citlivosti SmCB2 k modelovým inhibitorům	43
5.1.6.	Stanovení koncentrace SmCB2 pomocí enzymové titrace	44
5.2.	Analýza inhibiční specificity SmCB2 pomocí vinylsufonových inhibitorů	44
5.3.	Rekombinantní exprese SmCB2 v bakteriích <i>E. coli</i>	47
5.3.1.	Klonování SmCB2 do <i>pHTT2</i> plazmidu	47
5.3.2.	Průběh exprese SmCB2 v <i>E. coli</i>	48
5.3.3.	Purifikace SmCB2 afinitní chelatační chromatografií	48
5.4.	Testování polyklonální protilátky proti SmCB2	51
5.4.1.	Kinetika tvorby protilátky proti SmCB2	51
5.4.1.1.	Titrační analýza imunních sér	51
5.4.2.	Křížová reaktivita anti-SmCB2 a anti-SmCB1 protilátek	55
5.4.3.	Rozpoznání SmCB2 a SmCB1 hostitelem jako antigenů při infekci <i>S. mansoni</i> ..	56
5.4.4.	Analýza interakce anti-SmCB2 protilátky pomocí imunoblotu	57
5.4.5.	Purifikace anti-SmCB2 séra afinitní chromatografií	58
5.4.6.	Imunodetekce nativního SmCB2 v homogenátu z červů <i>S. mansoni</i>	59
5.5.	Imunolokalizace SmCB2 v červech <i>S. mansoni</i>	61
6.	Diskuze	63
7.	Závěr	66
8.	Seznam použité literatury	67

1. Úvod

Schistosomóza je jedním z nejvýznamnějších parazitárních onemocnění, které v současnosti postihuje více než 240 milionů lidí v tropech a subtropích. Jedná se o chronické onemocnění, které představuje závažný zdravotní problém především v chudých oblastech se zhoršenými hygienickými podmínkami (Utzinger et al., 2011). Schistosomóza je způsobena krevničkami rodu *Schistosoma* a mezi medicínsky nejdůležitější druhy infikující lidského hostitele patří krevnička střevní (*Schistosoma mansoni*), krevnička jaterní (*S. japonicum*) a krevnička močová (*S. haematobium*). K nákaze dochází při kontaktu s kontaminovanou sladkou vodou, ve které se nachází infekční larvální stádia cercárie. Dospělé krevničky pak žijí v cévách hostitele, kde dochází k produkci velkého počtu vajíček, která jsou hlavním patogenním agens onemocnění. Vajíčka se hromadí ve tkáních orgánů, což má za následek imunitní odpověď hostitele vedoucí ke vzniku zánětu, granulomů a poškození orgánů (Gryseels et al., 2006).

Pro léčbu schistosomózy se v současné době používá jediné nízkomolekulární léčivo praziquantel a prozatím není komerčně dostupná žádná vakcinační látka. Z důvodu rizika vzniku rezistence a častých reinfekcí u obyvatel v endemických oblastech narůstá potřeba vývoje nových chemoterapeutik a vakcín. Značná pozornost je tedy soustředěna na studium molekulárních procesů krevniček nezbytných pro jejich životaschopnost, jejichž narušení by umožnilo supresi krevniček (Melman et al., 2009).

Zásadní pro přežívání krevniček jsou proteázy, které hrají důležitou roli při invazi, migraci, reprodukci, výživě krevniček a při interakci s hostitelem (McKerrow et al., 2006). Dospělé krevničky se živí krevními proteiny, především hemoglobinem a k jeho trávení využívají sadu proteáz nacházejících se v jejich trávicím traktu. Takto získávají živiny nezbytné pro růst, vývoj a rozmnožování (Caffrey et al., 2004; Delcroix et al., 2006). Proteázy krevniček, které se nachází mimo trávicí trakt se účastní například procesu průniku kůže hostitele či migrace tkáněmi a jedná se o méně prozkoumanou skupinu proteáz (Salter et al., 2000).

Katepsin B2 ze *S. mansoni* (SmCB2), kterým se tato práce zabývá, patří mezi proteázy lokalizované mimo trávicí trakt a jeho biologická funkce není prozatím známa (Caffrey et al., 2002). Cílem této práce je produkce rekombinantního SmCB2, analýza jeho inhibičního a vakcinačního potenciálu a imunolokalizace SmCB2 v krevničce.

2. Literární přehled

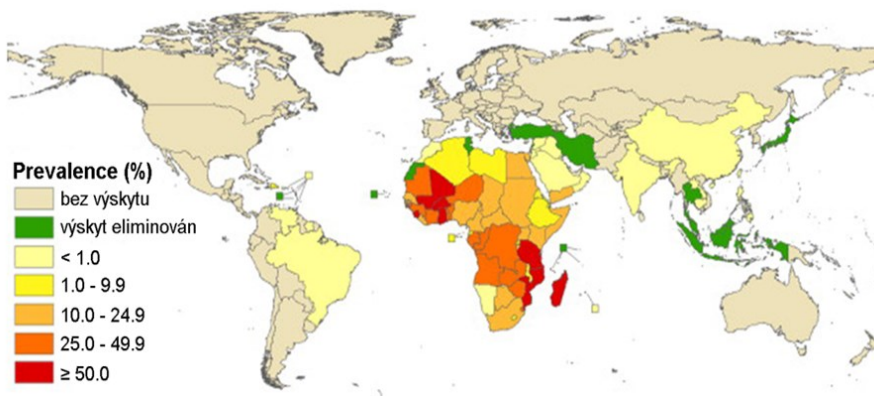
2.1. Parazitická krevnička *Schistosoma mansoni*

Krevničku střevní (*Schistosoma mansoni*) lze taxonomicky zařadit do rodu *Schistosoma* (krevnička), třídy Trematoda, kmene Plathelminthes. Společně s krevničkou jaterní (*S. japonicum*) a krevničkou močovou (*S. haematobium*) představuje nejčastěji parazitující druh krevniček napadající řadu obratlovců včetně člověka, čímž způsobuje rozsáhlé medicínské i ekonomické problémy (Utzinget et al., 2011).

2.1.1. Výskyt *S. mansoni*

S. mansoni se typicky vyskytuje v tropických a subtropických oblastech, které se vyznačují zhoršenými životními podmínkami a nedostatkem nezávadné pitné vody. Krevnička *S. mansoni* se nachází zejména v Africe, na Středním východě, v Jižní Americe a na Karibských ostrovech (Obr. 1).

S distribucí jednotlivých druhů krevniček souvisí výskyt specifických mezihostitelských vodních plžů, kteří jsou nezbytní pro životní cyklus parazita. Mezihostitelem krevničky *S. mansoni* je plž rodu *Biomphalaria*, který přirozeně obývá stojaté vody, jako jsou rybníky a jezera (Gryseels et al., 2006). Dalšími rezervoáry mezihostitelů jsou ale i uměle vytvořené zavlažovací systémy a vodní nádrže, které přispívají k rozšíření krevniček do nových neendemických lokalit (Fenwick, 2006).



Obr. 1. Geografické rozšíření schistosomózy. Upraveno podle Utzinger et al., 2011.

2.1.2. Nákaza a životní cyklus *S. mansoni*

Ohrožení nákazou *S. mansoni* jsou především obyvatelé chudých vesnických a městských oblastí, kdy k infekci dochází během běžných činností spojených se zemědělstvím, rybolovem či domácími pracemi. V endemických oblastech je infekce nejintenzivnější u dětí před pubertou, kdy tito jedinci v sobě také přenášejí největší množství parazitů. Naopak dospělá populace se vyznačuje infekcemi s nižší intenzitou (Butterworth et al., 1994; Gryseels and de Vlas, 1996). U dospělých se na rozdíl od dětí projevuje rezistence k reinfekci. Tento jev zřejmě souvisí s mnoholetým přežíváním krevniček v těle hostitele. Průměrně se dospělé krevničky dožívají 3-5 let, ale jejich věk může dosáhnout až 30 let (Gryseels et al., 2006). Imunitní odpověď člověka zodpovědná za rezistenci k reinfekci se vyvíjí velice pomalu a je patrně závislá na antigenech parazita, které jsou imunitnímu systému vystavovány až po jeho uhynutí (Woolhouse a Hagan, 1999).

K nákaze člověka dochází prostřednictvím kontaminované vody, ve které se nachází infekční larvální stádium krevničky *S. mansoni* zvaná cercárie. Tyto larvy rozpoznávají přítomnost hostitele pomocí látek, jakými jsou volné mastné kyseliny a L-arginin, které jsou obsaženy v jeho kůži (Austin et al., 1972; Haas et al., 2002). Cercárie pronikají kůží člověka díky uvolňování exkrečně/sekrečních (E/S) produktů ze svých žláz. Mezi tyto E/S produkty cercárií patří proteolytické enzymy a muciny, které jsou důležité pro degradaci složek kůže (Knudsen et al., 2005). Dále k nim patří imunogenní glykosylované molekuly, které jsou rozpoznávané manóзовými receptory imunitních buněk přirozené složky imunity (Paveley et al., 2011).

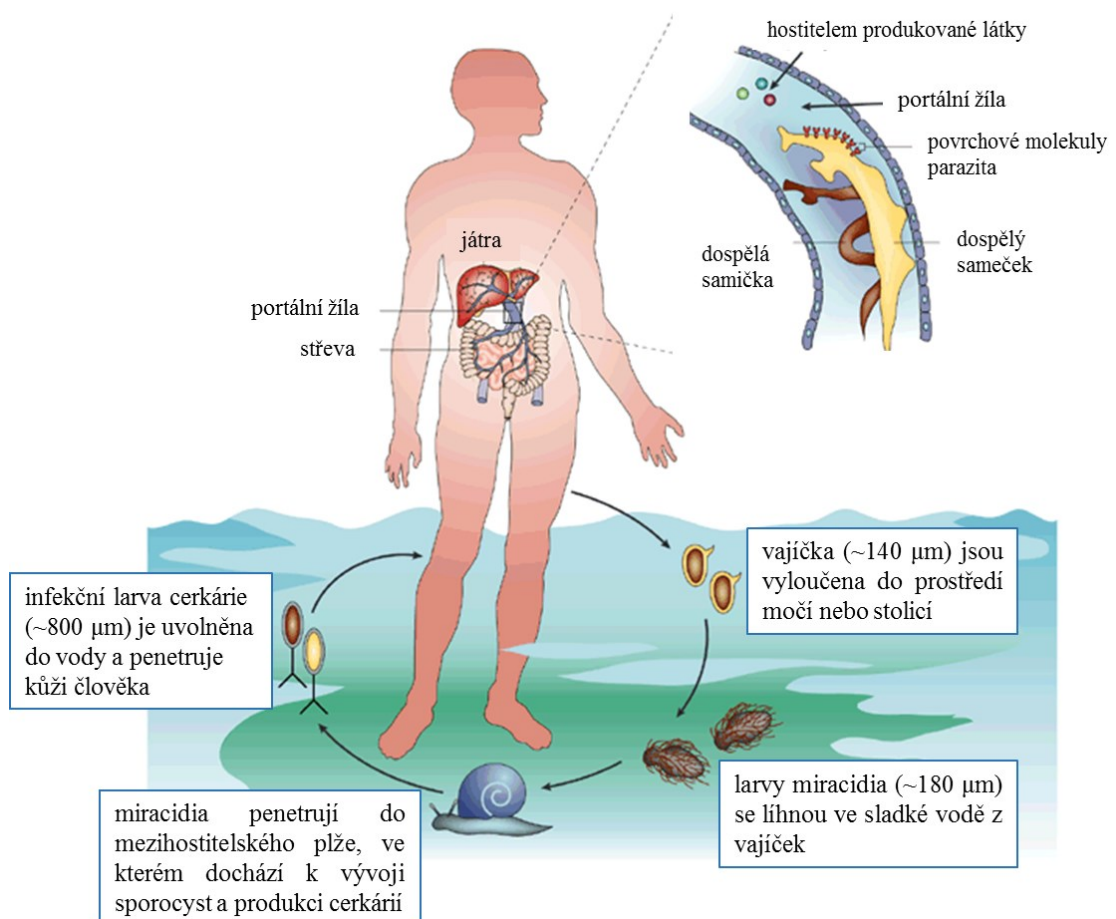
Během penetrace kůže se cercárie krevničky *S. mansoni* mění na další vývojové stádium zvané schistosomula. V průběhu této změny cercárie ztrácí jak svůj rozdvojený ocásek, tak i imunogenní glykokalyx, který se nachází na povrchu larvy (Samuelson a Caulfield, 1985). Migrace larev vrstvami kůže trvá několik dní. U modelu myší i primátů opouštějí larvy krevničky *S. mansoni* kůži během 2-7 dní (Mangold and Dean, 1983; Wilson et al., 1990). Po překonání bazální membrány epidermis, kde může být larva zachycena až 2 dny, se schistosomuly dostávají do dermis a odtud zejména do cév krevního či v malé míře do lymfatického oběhu. Následně jsou oběhovým systémem přeneseny do plic a do jaterní portální žíly, kde dospívají (Wheater and Wilson, 1979) (Obr. 3, str. 6).

Prvních 6 týdnů po infekci dochází k růstu a dospívání krevničky a nevyznačuje se produkcí vajíček. Tato fáze infekce je charakteristická imunitní odpovědí na schistosomuly

a nedospělé červy u imunologicky naivních jedinců, tedy především u turistů a jedinců, u kterých nedochází k opakované infekci (Rabello, 1995).

Krevničky jsou odděleného pohlaví. V období dospívání se párují a následně migrují do cév v oblasti střev, kde samice kladou vajíčka. Ta jsou vyloučena do vnějšího prostředí stolicí, ovšem značná část vajíček zůstává zachycena v tkáni. Schistosomuly a dospělé krevničky se živí krví, především hemoglobinem, kdy k trávení využívají proteolytické enzymy trávicího traktu. Tímto způsobem získávají živiny pro růst, vývoj a rozmnožování (Delcroix et al., 2006).

Vajíčka, která se dostala do sladké vody, se za příznivých podmínek mění v larvy zvané miracidia, které pronikají do mezihostitelského plže. V něm probíhá nepohlavní množení parazita. Do vody je za určitou dobu uvolněno další larvální stádium cercárie, které je infekční pro lidského hostitele (Gryseels et al., 2006).



Obr. 2. Životní cyklus krevničky *S. mansoni*. Upraveno dle Pearce a MacDonald, 2002.

2.2. Onemocnění schistosomóza

Schistosomóza je parazitární onemocnění způsobené krevničkami rodu *Schistosoma*, nejčastěji *S. mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium*. Poprvé byla schistosomóza popsána Theodorem Bilharzem, a proto se někdy též nazývá bilharzióza. Po malárii je schistosomóza druhým nejvýznamnějším parazitárním onemocněním, kdy 120 milionů lidí trpí klinickými příznaky a přes 240 milionů lidí je nakaženo. Přibližně 97% všech nakažených *S. mansoni* se nachází v Africe (Obr. 1, str. 2) (Utzinger et al., 2011).

Jsou známy dvě formy tohoto onemocnění – akutní a chronická schistosomóza. Závažnost obou forem je dána genetickou dispozicí a stavem imunitního systému hostitele. Je také ovlivněna přítomností jiných současně se vyskytujících infekcí (tzv. koinfekcí) v hostiteli či jeho *in utero* sensitizací (King et al., 1998).

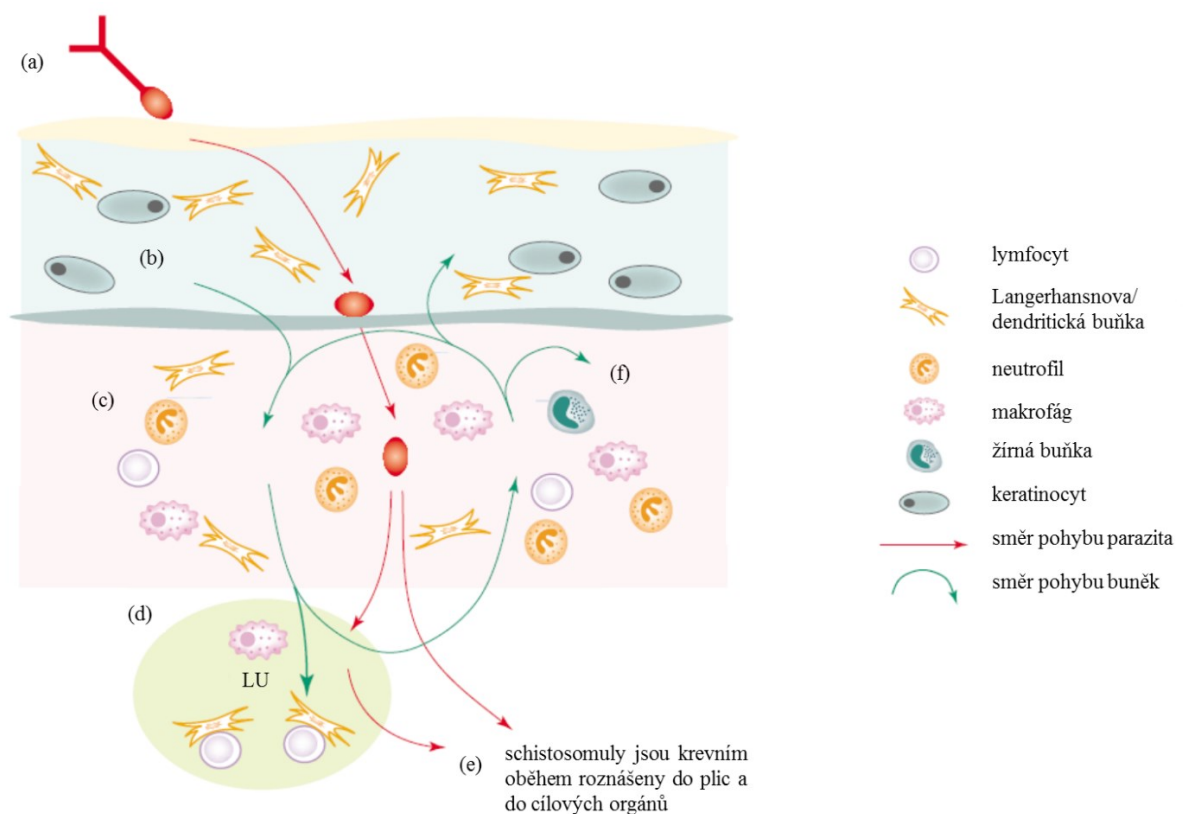
Během infekce *S. mansoni* je hostitel vystaven mnoha typům schistosomálních antigenů, a to z důvodu přítomnosti různých vývojových stádií (cerkárie, schistosomula, dospělí červi, vajíčka) parazita během onemocnění. Nejvýraznější změna nastává přibližně v 6. týdnu infekce, kdy dochází k dospívání *S. mansoni* a kladení vajíček. V této fázi začne docházet k zánětlivým procesům v játrech a střevech a k výrazné změně v polarizaci imunitního systému a vývoji Th2 odpovědi v důsledku reakce na antigeny vajíček (Pearce et al., 2004).

2.2.1. Akutní schistosomóza

Schistosomóza je způsobena průnikem infekčních larválních stádií *S. mansoni* kůží. Kůže je tedy prvním místem, kde dochází k obraně proti parazitovi. Prvním projevem akutní schistosomózy je kožní infekce, která se projevuje lokální vazodilatací, ztlustěním epidermální vrstvy a infiltrací imunitních buněk. Buněčný infiltrát imunologicky naivních myší se vyznačuje zvýšenou přítomností neutrofilů, zatímco u imunních myší, u kterých došlo k opakovanému infikování *S. mansoni*, je charakteristická infiltrace eosinofilů (Inciani a McLaren, 1984).

Důležitou roli v kožní fázi schistosomózy hrají dendritické buňky a makrofágy, kdy fagocytování exkrečně/sekrečních (E/S) produktů cercárií vede k jejich aktivaci. Takto aktivované buňky pak vedou k vývoji Th2 polarizované imunitní odpovědi. Dendritické buňky aktivované E/S produkty cercárií mají totiž za následek produkci IL-4 Th buňkami jak *in vitro* tak *in vivo* (Jenkins et al., 2005; Jenkins and Mountford, 2005). Makrofágy dále internalizují E/S produkty vyloučené *S. mansoni* během transformace z cercárie na

schistosomulu. Jejich funkce spočívá v rozpoznávání glykosylovaných E/S produktů pomocí svých manosových receptorů (MR). Interakce těchto receptorů s antigeny uvolněnými schistosomálními larvami ovlivňuje jak produkci cytokinů, tak i aktivaci adaptivní složky imunity. Makrofágy stimulované cercariíovými antigeny (E/S glykany) mají sníženou schopnost produkce IL-6, IL-12 a INF- γ . Zároveň je MR potřebný pro indukci produkce IL-4 jako odpověď na cercariální E/S produkty. To naznačuje roli MR ve vývoji imunitní odpovědi směrem k Th2 při infekci *S. mansoni* (Paveley et al., 2011). Dalšími buňkami, které se mohou uplatňovat v kožní fázi schistosomózy jsou keratinocyty. Při infekci *S. mansoni* u těchto buněk dochází k diferenciaci, zvýšené proliferaci a zahájení mechanismů spojených s reparací. *In vitro* stimulované prekursory keratinocytů larválními E/S produkty produkují prozánětlivé cytokiny, což ukazuje na jejich možnou schopnost rozeznávat schistosomální antigeny a iniciovat prozánětlivou odpověď (Bourke et al., 2015).



Obr. 3. Migrace larválních stádií *S. mansoni* kůží hostitele. (a) Cercárie se dostávají přes stratum corneum (béžová) do epidermis (modrá). (b) Larvy migrují k bazální membráně (šedá), kde zůstávají zachyceny až 2 dny. (c) Langerhansovy buňky po aktivaci v epidermis putují do dermis (růžová), kde se nacházejí další dendritické buňky a makrofágy. (d) Dendritické buňky se dostávají do lymfatických uzlin (LU), kde dochází k prezentování parazitárních antigenů T lymfocytům. (e) Larvy se krevním oběhem dostávají do cílových

orgánů. (f) V dermální vrstvě se nachází zvýšený počet neutrofilů, makrofágů, dendritických buněk, žírných buněk a lymfocytů. Upraveno podle (Mountford and Trottein, 2004).

V případě silné infekce může dojít k dalšímu projevu akutní schistosomózy, a to k horečnatému onemocnění označovanému jako Katayamský syndrom. Během této fáze je dominantní Th1 odpověď a dochází k ní v prvních týdnech po infekci *S. mansoni* jako následek reakce na nedospělé a migrující parazity. Může se projevovat horečkou, únavou, dýchacími obtížemi, bolestí břicha a eosinofilií. V sérech pacientů trpících akutní schistosomózou byly naměřeny zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1, IL-6 a INF- γ (Jesus et al., 2002). Akutní forma schistosomózy nebyla popsána u jedinců žijících v oblastech, kde je toto onemocnění endemické. Naopak Katayamským syndromem typicky trpí lidé, kteří nebyli infekčním stádiím *S. mansoni* dříve vystaveni (Ross et al., 2007). Tento jev je nejspíše dán *in utero* senzitivací, kdy děti matek, které již byly *S. mansoni* nakaženy vykazují jinou imunologickou odpověď než děti matek nenakažených. Lymfocyty z pupečnickové krve dětí infikovaných matek vykazují podobné vlastnosti jako lymfocyty matek a produkují jak polyklonální IgE, tak IgG specifické pro schistosomiální antigeny. Takto polarizovaná imunitní odpověď má za následek jinou reakci na krevničky a snižuje pravděpodobnost rozvoje akutní schistosomózy v endemických oblastech (King et al., 1998).

Přibližně po 6. týdnu infekce *S. mansoni* dochází k dospívání parazita a k produkci vajíček. Dochází tím ke změně v polarizaci imunitního systému a nastupuje Th2 odpověď. Ta je navozena antigeny vajíček, která jsou zodpovědná za indukci Th2 odpovědi, jsou velmi imunogenní a vykazují adjuvantní vlastnosti. Jak vajíčka samotná, tak extrakt z jejich homogenátu nazývaný SEA (soluble egg antigen), mají schopnost navodit tento typ imunitní odpovědi. Deglykosylované antigeny vajíček ztrácejí tuto schopnost, což ukazuje na jejich zásadní význam v indukci Th2 odpovědi (Okano et al., 1999).

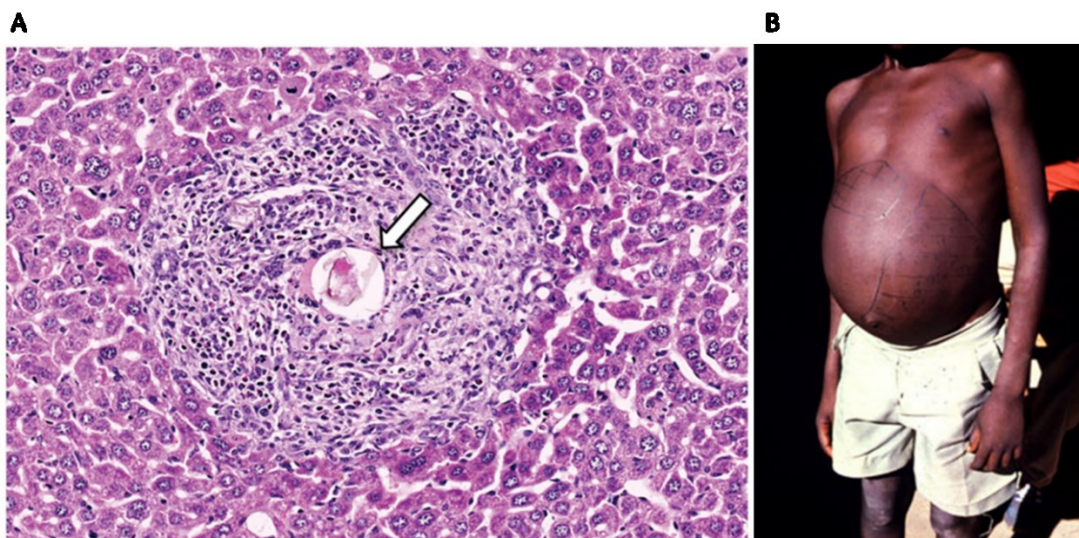
Tato fáze infekce se vyznačuje vysokou produkcí cytokinů IL-4 a IL-5, které jsou typické pro Th2 buňky a cytokinu IL-13, který je spojován s pozdějším vznikem fibrózy. Dále je charakteristická zvýšená produkce protilátek typu IgE a eozinofilie (Fallon et al., 2000). *S. mansoni* a jiní helminti pravděpodobně ovlivňují imunitní odpověď hostitele směrem Th2 také tím, že jejich antigeny neaktivují dendritické buňky klasickou cestou. To má za následek neschopnost produkce IL-12 dendritickými buňkami a snížení exprese jejich povrchových markerů. Předpokládá se, že takto ovlivněné dendritické buňky jsou stimulovány k produkci IL-4, což podporuje vývoj Th2 odpovědi (MacDonald et al., 2001).

Imunitní odpověď polarizovaná směrem Th2 hraje kritickou roli během schistosomální infekce a je nezbytná pro přežívání hostitele. Experimenty na myších ukázaly, že neschopnost produkce cytokinů nezbytných pro vývoj Th2 odpovědi má za následek závažnější průběh infekce a Th1 polarizovaná odpověď je až letální. Zároveň je ale Th2 imunitní odpověď zodpovědná za poškození orgánů v důsledku schistosomální infekce, a proto musí být regulována jinými imunitními mechanismy (Hoffmann et al., 2000).

2.2.2. Chronická schistosomóza

Chronická fáze infekce nastává přibližně po 12. týdnu infekce a na počátku je často bezpříznaková. Postupem času se však vyznačuje výrazným poškozením orgánů v důsledku imunitní odpovědi hostitele na zachycená vajíčka, která jsou hlavním patogenním agens schistosomózy. Při nákaze *S. mansoni* jsou vajíčka vylučována stolicí, ovšem významná část se do lumen střev nedostává. Zůstávají ve sliznici střev nebo jsou krevním řečištěm roznášena především do jaterní tkáně, kde zůstávají uvězněna (Gryseels et al., 2006).

Mezi patologie spojené s chronickou schistosomózou se řadí tvorba granulomů v játrech, fibróza, portální hypertenze a ascites (Obr. 4, str. 9). Granulomy jsou následkem přetrvávající imunitní odpovědi na vajíčka a mohou mít i protektivní funkci. Jsou tvořeny především kolagenními vlákny, CD4⁺ Th2 lymfocyty, eozinofily a alternativně aktivovanými makrofágy. K tomu dochází v důsledku produkovaných okolních cytokinů. Dlouhodobě polarizovaný imunitní systém směrem k Th2 má vliv na rozvoj fibrózy a je spojován s chronickou morbiditou (Cheever et al., 2000). Experimenty prováděné na myších modelech ukázaly, že IL-13 je hlavním cytokinem zodpovědným za vývoj fibrózy (Fallon et al., 2000).



Obr. 4. Tvorba granulomu po infikování *S. mansoni*. A: Histologický řez tkání jater. Šipka ukazuje přítomnost uvězněného vajíčka. B: Patologické změny spojené s chronickou schistosomózou. Převzato z (Hams et al., 2013) a www.edurston.wordpress.com.

Polarizovaná imunitní odpověď směrem Th2 je tedy důležitá pro eliminaci zánětu, zároveň ovšem může vést k patologiím a poškození orgánů hostitele. Je také zásadní pro přežívání hostitele a zvyšuje tím pravděpodobnost přežívání parazita a jeho přenos na další hostitele. Z toho vyplývá, že imunitní odpověď musí být přesně regulována, aby bylo dosaženo rovnováhy mezi Th1 a Th2 odpovědi a tím i co nejmenších patologií. Na myších modelech byla totiž prokázána časná úmrtnost po infekci *S. mansoni* jak v případě nebalancované Th1, tak Th2 odpovědi (Hoffmann et al., 2000).

Mezi mechanismy spojené s regulací imunitní odpovědi patří produkce cytokinů IL-10 a TFG β T regulačními (Treg) buňkami, což má za následek utlumení odpovědi a přispívá k chronické fázi infekce. Počet těchto buněk stoupá přibližně po 4. týdnu po infikování *S. mansoni* (Doetze et al., 2000).

2.2.3. Schistosomóza a vztah k jiným onemocněním

Schistosomóza je onemocnění, které se převážně vyskytuje v rozvojových zemích v tropických a subtropických částech světa. Stejně jako další chronická parazitární onemocnění vyskytující se typicky v těchto oblastech jako jsou askarióza, filarióza nebo leishmanióza, se schistosomóza řadí mezi tzv. opomíjené tropické nemoci ("neglected tropical diseases", NTD). Počet ročních úmrtí v důsledku chronické schistosomózy je v porovnání s ostatními NTD nemocemi nejvyšší (Hotez et al., 2006).

Infekce *S. mansoni* v endemických oblastech vede k dlouhodobému chronickému onemocnění a tudíž i k dlouhodobé polarizaci imunitního systému směrem Th2. Za tohoto stavu se předpokládá, že infikovaní jedinci reagují odlišně a jsou náchylní k onemocněním vyvolanými jinými patogeny. Vzhledem k tomu, že morbidita schistosomózy je závislá právě na kontrolované balancované Th odpovědi, stoupá zájem o vysvětlení vlivu jiných onemocnění na výslednou patologii schistosomózy (Pearce and MacDonald, 2002).

Onemocnění schistosomózou má obecně za následek sníženou schopnost imunitní odpovědi na takové patogeny, na jejichž úspěšné překonání je zapotřebí polarizace směrem Th1. Jedná se tedy o infekce intracelulárními patogeny. Je oslabena imunitní odpověď proti virům a zhoršená odpověď po podání vakcín vyvolávající Th1 polarizaci (Pearce and MacDonald, 2002). Tato pozorování vedla k tvorbě hypotézy, která spojuje vysokou prevalenci AIDS a HIV infekce s infekcemi helminty v Africe. Jedinci trpící schistosomózou jsou více náchylní k HIV infekci. Současné postižení schistosomózou a HIV má za následek zhoršený průběh HIV v důsledku úspěšnějšího přežívání a množení viru a nižšího počtu CD4+ T lymfocytů. Při stávající Th2 polarizaci imunitního systému v důsledku helmintární infekce dochází k rychlejší aktivaci virů, stejně tak k snadnějšímu napadení Th2 polarizovaných T lymfocytů než v případě jejich Th1 polarizace (Secor, 2012).

2.2.4. Léčba schistosomózy a vývoj vakcín

Léčba schistosomózy je odkázána na jediné chemoterapeutikum praziquantel. Jedná se o antihelmintikum, které vykazuje vysokou účinnost proti všem druhům krevniček a má malé vedlejší účinky. Zabíjí pouze dospělé červy, ale jeho efektivita vůči nedospělým formám krevniček a vajíčkům je omezená. Praziquantel účinkuje tak, že narušuje povrchovou buněčnou vrstvu parazita, zvyšuje její permeabilitu a dochází k vystavení antigenů na jeho povrch (Shuhua et al., 2000). Vzhledem k tomu, že praziquantel je jediný lék proti schistosomóze, který se již používá mnoho let, stoupá riziko vzniku rezistence. Již byly zaznamenány případy pacientů, kteří vykazovali sníženou citlivost vůči praziquantelu. Je proto nutné zaměřit pozornost na vývoj nových léčiv a vakcín proti schistosomóze (Melman et al., 2009). Léčba praziquantem totiž neposkytuje prevenci proti reinfekci krevničkami. V endemických oblastech dochází k opětovné infekci po 6 až 8 týdnech po proběhlé léčbě. Vývoj vhodné vakcíny je také zásadní kvůli obtížné diagnóze onemocnění v jeho počátečních fázích a riziku nasazení léčby až po rozvoji patologických změn v hostiteli. Vakcíny proti schistosomóze mohou být cíleny jak na prevenci infekce

krevničkami, tak i na redukcii produkce vajíček. Vajíčka představují hlavní patogenní agens onemocnění a jsou také zodpovědná za jeho přenos (McManus and Loukas, 2008).

V posledních letech byla věnována značná pozornost vývoji vakcín. Bylo objeveno několik slibných antigenů, které byly testovány jako potenciální cíle pro vývoj vakcín proti schistosomóze, ovšem pouze jeden z nich vstoupil do klinických testů. Jedná se o vakcínu proti nákaze *S. haematobium* s názvem Bilhvax. Antigenem je rekombinantní glutathion-S-transferáza označovaná jako 28 kDa GST ze *S. haematobium*. Použití tohoto rekombinantního proteinu má za následek sníženou produkci vajíček a výrobu protilátek neutralizujících jeho enzymatickou aktivitu (Riveau et al., 2012). Glutathion-S-transferáza je exprimována v subtegumentální vrstvě parazita v téměř všech vývojových stádiích (Xu et al., 1997). Další potenciální vakcína, díky které bylo dosaženo protektivní imunitní odpovědi založené na CD4+ T lymfocytech, je označována jako Smp80 calpain. Jedná se o cysteinovou proteázu, která byla lokalizována v tegumentu *S. mansoni*. Je to první vakcína proti schistosomóze, která je založená na Th1 buněčné reaktivitě (Jankovic et al., 1996). Mezi další potenciální tegumentální antigeny parazita, díky kterým byla navozena protekce, patří například tetraspaniny nebo paramyosin (McManus and Loukas, 2008).

Velký důraz je dnes kladen i na vývoj nových chemoterapeutik, která by se odlišovala od doposud používaných léků a byla cílena na konkrétní molekulární dráhy nezbytné pro životaschopnost parazita. Úspěšným přístupem pro hodnocení účinnosti nových potenciálních léčiv proti schistosomóze je fenotypový screening larválních stádií krevniček *in vitro*. Tato metoda umožňuje automatizované testování řady látek (Abdulla et al., 2009). Do této kategorie nových chemoterapeutik se mohou zařadit inhibitory proteáz krevniček, které jsou zásadní pro trávení či jiné biologické funkce parazita. Jako cílová molekula pro léčbu schistosomózy byla identifikována proteáza SmCB1 ze *S. mansoni*, která se nachází ve střevě parazita a je klíčová pro trávení hemoglobinu (Delcroix et al., 2006). Za použití vinylsulfonového inhibitoru označovaného K11777, který blokuje proteolytickou aktivitu cysteinových proteáz, bylo dosaženo redukce patologických projevů na myších infikovaných *S. mansoni* (Abdulla et al., 2007). Cílovou molekulou pro inhibitor K11777 byl identifikován SmCB1. Úspěšné testování dalších vinylsulfonových inhibitorů jako potenciálních chemoterapeutik bylo provedeno v *in vitro* testech s rekombinantním SmCB1 i na kultivovaných dospělých krevničkách (Jílková et al., 2011).

2.3. Proteázy

Proteázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu peptidové vazby proteinů a peptidů. Hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech ve všech živých organismech a virech. Proteázy se účastní řady biologických procesů od degradace proteinů v lysosomech a trávení potravy až po přesně regulované děje jako je kontrola buněčného cyklu, buněčná proliferace a apoptóza, přestavba tkání či srážení krve (Barrett and McDonald, 1986).

2.3.1. Inhibiční regulace proteáz

Protože se proteázy uplatňují ve fyziologicky klíčových dějích, jejich aktivita musí být přesně regulována. Tím je zabráněno vzniku řady patologií, které jsou spojovány s chybami v kontrolních mechanismech.

Regulace aktivity proteáz je řízena na více úrovních, kdy se jako první uplatňuje regulace genové exprese a kontrolovaný transport do cílových kompartmentů v buňce. Dalším mechanismem regulace je syntéza proteáz v jejich neaktivní formě v podobě prekurzorů - zymogenů. Katalytickou aktivitu nabývají až po odštěpení N-koncového propeptidu, který ve struktuře zymogenu blokuje aktivní místo a má funkci přirozeného inhibitoru. Propeptid je odštěpen buď autokalyticky nebo za pomoci jiného enzymu poté, co je proteáza dopravena na místo svého působení. Proteolytická aktivita proteáz je dále regulována hodnotou pH či různými typy endogenních či exogenních inhibitorů (Shinde and Inouye, 2000).

Proteázové inhibitory mohou být klasifikovány dle molekulové hmotnosti na nízkomolekulární inhibitory a vysokomolekulární (proteinové) inhibitory. Mezi nízkomolekulární inhibitory odvozené z přírodních zdrojů patří například leupeptin (peptidyl aldehyd Ac-Leu-Leu-Arg-H) z bakterií rodu *Streptomyces* (Hozumi et al., 1972) nebo peptidyl epoxysukcinát nazývaný E-64 (trans-epoxysukcinylnyl-L-leucylamido-4-guanidinobutan) z plísní rodu *Aspergillus*. E-64 se kovalentně váže do aktivního místa cysteinových proteáz a ireverzibilně blokuje jejich proteolytickou aktivitu; je široce používán pro identifikaci a regulaci tohoto typu proteáz (Hashida et al., 1980).

Jedním z přístupů při vývoji nových syntetických inhibitorů proteáz může být odvození ze sekvence přirozených inhibitorů, kdy se systematicky modifikují jednotlivé aminokyseliny z peptidové struktury inhibitoru nebo reaktivní chemické skupiny. Takto připravené vysoce reaktivní a specifické inhibitory jsou využívány při analýze aktivního centra proteáz nebo jako terapeutické látky. Tímto způsobem byla vyvinuta řada inhibitorů

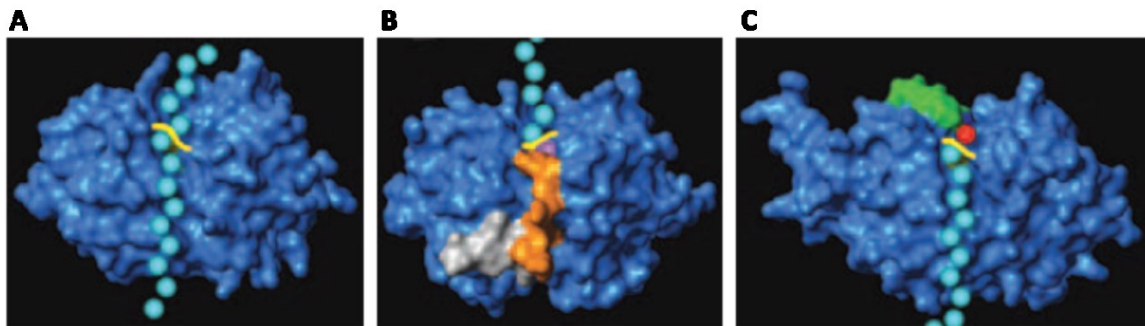
cysteinových proteáz na bázi peptidyl aldehydů, nitrilů, epoxysukcinyků nebo vinylsulfonů (Powers et al., 2002).

Skupina proteinových inhibitorů proteáz je velmi rozšířená a uplatňuje se v řadě fyziologických a patologických dějů ve všech živých organismech. Proteinové inhibitory cysteinových proteáz hrají u živočichů důležitou roli například v regulaci funkce endogenních lysosomálních katepsinů a u rostlin jsou využívány v obraně proti hmyzím herbivorům a patogenům. Patří sem proteinové rodiny inhibitorů jako jsou cystatiny, serpiny, tyropiny nebo inhibitory Kunitzova typu (Dubin, 2005).

2.3.2. Klasifikace proteáz

Proteázy mohou být klasifikovány podle vzájemné příbuznosti do rodin a klanů. Na základě homologie aminokyselinové sekvence jsou proteázy rozděleny do příslušných rodin. Rodiny, které patří do jednoho klanu, se vyznačují podobností 3D struktur. Dále lze proteázy dělit podle štěpení substrátu. Exopeptidázy odštěpují jednotlivé aminokyseliny buď z N-konce (aminopeptidázy) nebo z C-konce (karboxypeptidázy) peptidového řetězce substrátu. Endopeptidázy štěpí substrát uvnitř peptidového řetězce (Obr. 5, str. 14). V závislosti na katalytickém mechanismu a aktivním místě jsou proteázy klasifikovány do tříd na aspartátové, serinové, threoninové, cysteinové, glutamátové a metaloproteázy (Rawlings et al., 2012).

Katepsiny jsou proteázy, které byly původně popsány v lysosomech savčích buněk jako enzymy, které zajišťují nespecifickou degradaci vnitrobuněčných proteinů, a to jak intracelulárních tak i endocytovaných extracelulárních proteinů (Zhou et al., 2015). V současnosti bylo prokázáno, že proteázy katepsinového typu jsou široce rozšířené a nacházejí i u jiných organismů než u savců a byly také nalezeny v dalších buněčných kompartmentech i uvolňované do extracelulárního prostředí. Mezi katepsiny jsou historicky zařazeny vybrané proteázy ze třídy cysteinových, aspartátových a serinových proteáz. Katepsiny se účastní mnoha fyziologických a patologických procesů (Brix et al., 2008). Důležitou skupinou katepsinů, kterým je věnována značná pozornost, jsou katepsiny parazitů, které hrají důležitou roli při interakci s hostitelem a představují cílové molekuly pro antiparazitární terapii.



Obr. 5. *Módy štěpení substrátu různými typy proteáz. A: Endopeptidáza katepsin L, B: aminopeptidáza katepsin H, C: karboxypeptidáza katepsin X. Štěpený peptidový substrát je vyznačen světle modře, žlutě je označena štěpená peptidová vazba. Vyznačené strukturní domény (šedá, oranžová, zelená) regulují funkci aktivního místa a zodpovídají za exopeptidázovou aktivitu proteáz. Fialově je znázorněna odštěpovaná N-koncová aminokyselina, červeně C-koncová aminokyselina.*

2.3.3. Cysteinové proteázy

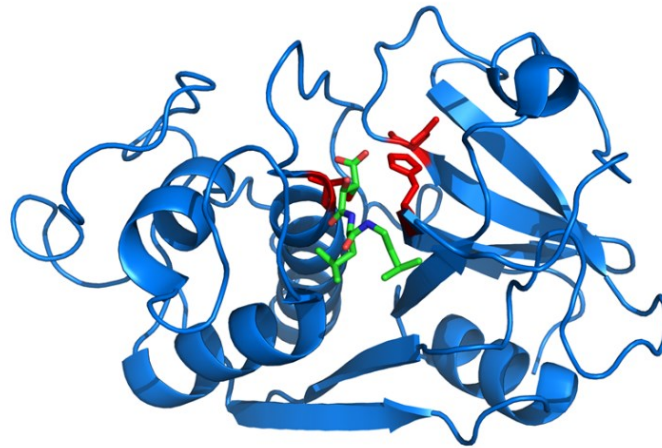
Cysteinové proteázy jsou charakteristické přítomností katalytického cysteinu s nukleofilní thiolovou skupinou v aktivním místě, který je nezbytný pro proteolytickou aktivitu. V závislosti na jejich sekvenční homologii lze cysteinové proteázy rozdělit do rodin, kdy nejpočetnější a nejlépe popsanou je rodina C1 také nazývaná rodina papainu (Obr. 6, str. 15). Tato rodina je široce rozšířena v živých organismech i virech (Chapman et al., 1997).

Významnou skupinou proteáz C1 rodiny jsou cysteinové katepsiny. Početnou část z nich tvoří savčí katepsiny, ale patří sem i proteázy katepsinového typu z řady dalších obratlovců, bezobratlých i rostlin. V rostlinách se účastní programované buněčné smrti a v procesech spojených s obranyschopností proti patogenům. U parazitů jsou využívány během invaze do hostitele a při přijímání potravy a představují potenciální cílové molekuly pro vývoj nových chemoterapeutik (Vasiljeva et al., 2007).

V savčím genomu bylo identifikováno 11 cysteinových katepsinů s mnoha rozličnými funkcemi v řadě biologických procesů. Účastní se proteolytické degradace lysosomálních proteinů, přestavby extracelulární matrix, zpracování hormonů a prezentace antigenů. V případě jejich nesprávné regulace se pak mohou uplatňovat v patologických procesech jako je ateroskleróza, revmatická artritida, osteoporóza a dějích spojených s rakovinným bujením (Novinec and Lenarčič, 2013).

Cysteinové katepsiny jsou biosyntetizovány ve formě neaktivních prekurzorů, které jsou tvořeny ze zralého enzymu, propeptidu a N-koncové signální sekvence. Tyto proteiny

mohou být transportovány přes endoplasmatickou membránu díky signálnímu peptidu, který je poté odštěpován. Propeptid zajišťuje inhibici proteolytické aktivity enzymu do doby, než je enzym správně lokalizován v buňce. Především se jedná o lokalizaci v lysosomech a endosomech, kde dochází k odštěpení propeptidu ze zymogenu autokatalyticky nebo pomocí jiných enzymů. Optimální aktivita zralých proteáz je v mírně kyselém pH (Turk et al., 2012).



*Obr. 6. Krystalová struktura papainu (z *Carica papaya*) s navázaným inhibítozem E-64. Katalytické zbytky jsou zobrazeny červeně (Cys25, His159, Asn175). E-64 (zeleně s barevně kódovanými heteroatomy) se kovalentně váže na Cys25. PDB kód: 1PPP. Obrázek byl připraven pomocí programu Pymol.*

2.3.3.1. Katepsin B

Katepsin B je dobře prostudovaná a široce rozšířená cysteinová proteáza z rodiny C1. Je produkován v tkáních a orgánech savců, ale i u řady dalších organismů. Účastní se degradace proteinů v lysosomu, kde byl nalezen ve vysokých koncentracích. Jeho únik z lysosomů do cytosolu hraje roli při spouštění apoptózy T lymfocytů (Michallet et al., 2003). Katepsin B se také například podílí na zpracovávání antigenů vystavovaných na MHC II glykoproteinech (Matsunaga et al., 1993).

Katepsiny B jsou intenzivně studovány, protože se účastní řady patologických procesů. Příkladem je revmatoidní artritida (Baici et al., 1995) nebo metastáze u rakoviny prsu či tlustého střeva, kdy se uplatňuje jeho schopnost proteolytického štěpení extracelulární matrix (Jedezsko and Sloane, 2004). Homology katepsinů B byly objeveny i u rostlin a řady parazitů, ve kterých jsou využívány v rámci fyziologických procesů a jsou zásadní pro

interakci s hostitelem. Jedná se tedy o medicínálně významné molekulární cíle (McKerrow et al., 2006).

Katepsiny B se vyznačují jak endopeptidázovou aktivitou, kdy štěpí uprostřed peptidového řetězce, tak i exopeptidázovou aktivitou, díky které odštěpují dipeptidy z C-konce substrátu. Exopeptidázová aktivita je dána přítomností unikátní smyčky ve struktuře katepsinů B, která je označována jako „occluding loop“. Tato smyčka je tvořena 20-30 aminokyselinami a obsahuje dva histidinové zbytky, které jsou důležité pro interakci s C-koncem substrátu. Pozice smyčky a tím i mód štěpení je ovlivněn hodnotou pH (Quraishi et al., 1999). Při nízkém pH jsou histidinové zbytky protonované a smyčka se váže do aktivního místa; při vyšším pH je uvolněna a katepsin B posiluje endopeptidázovou aktivitu (Musil et al., 1991).

Molekulová hmotnost katepsinů B v maturovaném stavu je 24-27 kDa a jsou stejně jako ostatní katepsiny syntetizovány ve formě neaktivního prekurzoru (Nishimura and Kato, 1987). Katepsiny B jsou aktivní v mírně kyselém pH 5-6 a jako syntetické substráty *in vitro* podmínkách jsou používány Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC. Selektivní ireverzibilní inhibice katepsinu B je dosaženo inhibitorem s označením CA074 (N-(L-3-transkarboxyoxiran-2-karbonyl)-L-isoleucyl-L-prolin). Jedná se o derivát přirozeného inhibitoru E-64. Katepsiny B jsou taktéž inhibovány proteinovými inhibitory, např. cystatiny (Yamamoto et al., 1997).

2.4. Proteázy z krevničky *S. mansoni*

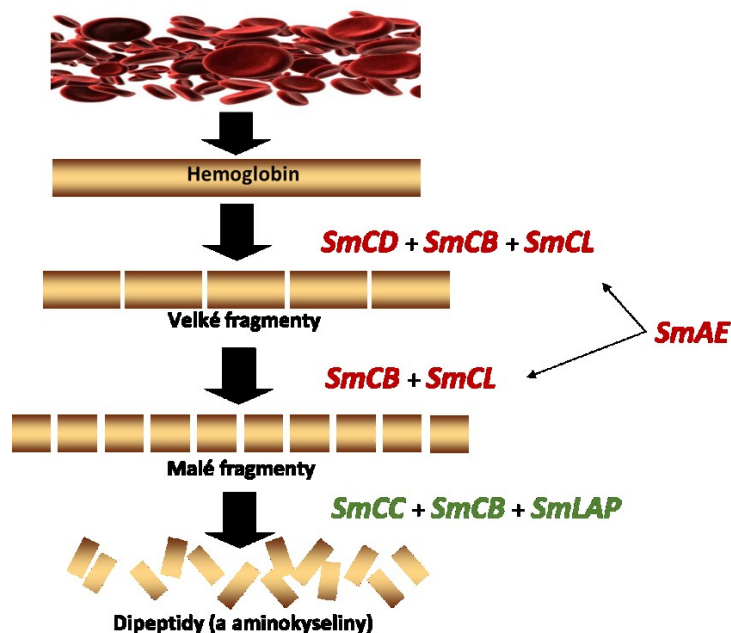
Jaderný genom *Schistosoma mansoni* byl plně osekvenován v roce 2009 a je tvořen 363 Mb. V genomu byly nalezeny sekvence enzymů ze třídy asparátových, cysteinových, serinových, threoninových proteáz a metaloproteáz, které celkově tvoří asi 2,5 % genomu *S. mansoni*. V porovnání s procentuálním zastoupením proteáz v lidském genomu je v genomu *S. mansoni* větší podíl cysteinových proteáz rodiny C1. Jedná se o významnou skupinu proteáz, která se z velké části účastní trávení tohoto parazita a je tedy významná pro jeho životaschopnost (Berriman et al., 2009).

2.4.1. Proteázy trávicího traktu *S. mansoni*

Dospělé krevničky *S. mansoni* a jejich larvální stádia schistosomuly se živí krví člověka a živiny pro svůj růst, vývoj a rozmnožování získávají degradací krevních proteinů. K rozkladu hemoglobinu na dipeptidy a aminokyseliny využívají trávicí proteázy, které jsou

lokalizované v jejich střevě. Jedná se o sadu aspartátových, cysteinových proteáz a metaloproteáz, jejichž proteolytické aktivity se vzájemně doplňují (Lawrence, 1973).

Trávení krevniček začíná hemolýzou červených krvinek, kdy se uvolněný hemoglobin a další krevní proteiny dostávají do trávicího traktu. Hemoglobin je zde rozštěpen na fragmenty pomocí cysteinových katepsinů B1 (SmCB1), L1 a L3 (SmCL1, SmCL3) a pomocí aspartátového katepsinu D (SmCD), které mají endopeptidázovou aktivitu. Vzniklé produkty jsou dále degradovány pomocí exopeptidáz: cysteinového katepsinu C (SmCC) a metaloproteázy leucylaminopeptidázy (SmLAP). Finální degradace se účastní i SmCB1 svou exopeptidázovou aktivitou. Výsledkem tohoto kooperativního štěpení hemoglobinu jsou absorbovatelné krátké peptidy a aminokyseliny (Obr. 7). Uvedené katepsinové proteázy se stávají aktivními zralými enzymy autoaktivací v kyselém pH nebo působením jiných proteáz. Příkladem je aktivace SmCB1 pomocí proteázy legumainu (asparaginylendopeptidáza, SmAE) (Delcroix et al., 2006).



Obr. 7. Schéma trávení hemoglobinu proteázami *S. mansoni*. Hemoglobin je postupně degradován pomocí sady trávicích proteáz na dipeptidy a aminokyseliny. Červeně jsou zvýrazněny endopeptidázy, zeleně exopeptidázy. Názvy konkrétních izoenzymů jsou uvedeny v textu. SmAE se podílí na degradaci hemoglobinu a aktivuje SmCB. Upraveno podle (Delcroix et al., 2006).

Proteolytickým štěpením hemoglobinu dochází k uvolnění jeho prostetické skupiny hemu. Jedná se o toxickou molekulu, která je krevničkou detoxifikována přeměnou na hemozoin. Tento nerozpustný tmavě hnědý pigment je hromaděn ve střevě krevničky a

průběžně vyvrhován (Skelly et al., 2014). Detoxifikace hemu na krystalickou formu je charakteristická i pro jiné hematofágní parazity. Hemozoin z parazita *Plasmodium falciparum*, původce malárie, byl popsán jako ligand Toll like receptoru 9 (TLR9), což naznačuje jeho roli v aktivaci vrozených mechanismů imunitního systému (Coban et al., 2005).

2.4.2. Proteázy lokalizované mimo trávicí trakt *S. mansoni*

Proteázy hrají zásadní roli ve všech vývojových stádiích krevniček a kromě trávení se podílejí na řadě dalších biologických procesů, které jsou důležité pro jejich životaschopnost a úspěšnou invazi hostitele. Proteázy lokalizované mimo trávicí trakt *S. mansoni* jsou obecně méně prozkoumané a jedná se zejména o proteázy serinové a cysteinové.

Významnou serinovou proteázou chymotrypsinové rodiny je cercáriová elastáza ze *S. mansoni* (SmCE). Jedná se o dobře prostudovanou proteázu, která se účastní penetrace kůže hostitele. Je produkována v acetabulárních žlázách cercárií, jejíž sekrety jsou nezbytné pro degradaci složek kůže. Substrátem SmCE je především elastin, ale štěpí i další komponenty kůže jako je kolagen, keratin, fibronektin nebo laminin (Salter et al., 2000). Mezi další serinové proteázy chymotrypsinové rodiny ze *S. mansoni* patří proteázy označované jako SmSP. Jedná se o 5 enzymů (SmSP1-SmSP5) produkováných v různých stádiích vývoje parazita, jejichž přesné role v biologických procesech nejsou zatím známe (Horn et al., 2014).

Z cysteinových proteáz *S. mansoni*, které byly nalezeny jak v trávicím traktu krevniček tak i mimo něj, lze uvést katepsiny SmCL1 a SmCL2. SmCL1 byl lokalizován v tegumentu krevniček (Bogitsh et al., 2001) a SmCL2 v reprodukčních orgánech samiček a v acetabulárních žlázách cercárií (Michel et al., 1995). Kromě jejich funkce v trávení lze předpokládat, že tyto proteázy se účastní i dalších dějů spojených s interakcí s hostitelem. Dle Caffrey et al., cysteinová proteáza katepsin B2 ze *S. mansoni* (SmCB2) se neúčastní trávení, byla imunolokalizována pouze v tegumentu a parenchymu dospělých červů a blíže o ní pojednává kapitola 2.4.3.2..

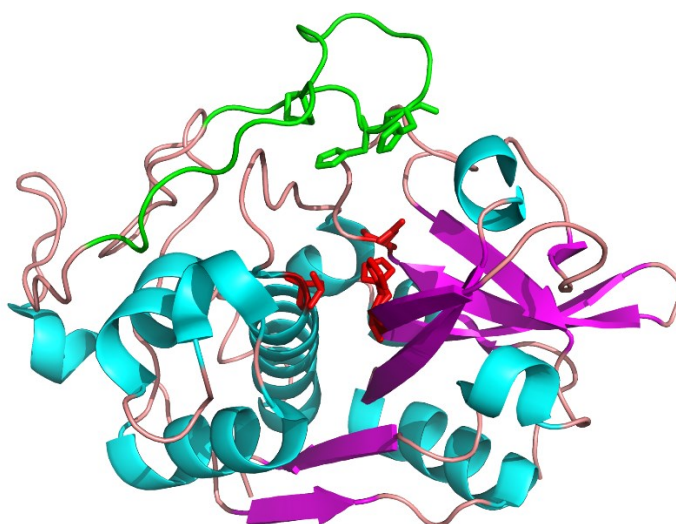
2.4.3. Izoenzymy katepsinu B ze *S. mansoni*

2.4.3.1. Katepsin B1 ze *S. mansoni*

Katepsin B1 ze *S. mansoni* (SmCB1) (Obr. 8, str. 20) je nevíce zastoupenou proteázou ve střevě krevničky. Nachází se jak v lumen střeva, tak v buňkách gastrodermis a je zásadní pro trávení hemoglobinu. SmCB1 je charakteristický svojí vysokou imunogenní schopností v myších i lidských hostitelích a představuje potenciální diagnostický marker schistosomózy. Tato proteáza je kódována dvěma geny, *SmCB1.1* a *SmCB1.2*. Aminokyselinové sekvence obou proteinů jsou z 95% identické (Caffrey et al., 2004).

SmCB1 je produkován ve formě neaktivního zymogenu a v *in vitro* podmínkách bylo dosaženo aktivace SmCB1 za pomoci asparaginylendopeptidázy SmAE. Tato proteáza se za normálních podmínek vyskytuje v trávicím traktu parazita a předpokládá se, že se účastní aktivace SmCB1 *in vivo* (Sajid et al., 2003). Dalším způsobem aktivace zymogenu SmCB1 je autoaktivace v přítomnosti glykosaminoglykanů (Jílková et al., 2014). V aktivním stavu je teoretická molekulová hmotnost SmCB1 28 kDa, resp. 31 kDa v glykosylovaném stavu. Proto je SmCB1 znám také pod původním označením Sm31. Hodnota pH optima enzymové aktivity je cca 5 (Felleisen and Klinkert, 1990).

SmCB1 byl prokázán jako vhodný molekulární cíl pro vývoj nových chemoterapeutik k léčbě schistosomózy. Důkazem je úspěšné testování vinylsulfonového derivátu s označením K11777, který inhibuje proteolytickou aktivitu SmCB1. Tento inhibitor byl testován na myších infikovaných *S. mansoni* a po jeho opakované aplikaci došlo ke snížení orgánových patologií spojovaných se schistosomózou. Byl redukován počet červů, vajíček i postižení jater a sleziny (Abdulla et al., 2007). Vinylsulfonové inhibitory byly dále úspěšně použity při *in vitro* analýze inhibiční specifity rekombinantního SmCB1 a jako antischistosomální molekuly v *ex vivo* testech na krevničkách v kultuře. Byla vyřešena krystalová struktura různých aktivačních forem SmCB1 (Jílková et al., 2014) i komplexů SmCB1 s vinylsulfonovými inhibitory (Jílková et al., 2011).



Obr. 8. Krystalová struktura katepsinu B1 ze *S. mansoni* (SmCB1). Katalytické zbytky Cys, His, Asn jsou zvýrazněny červeně. Zeleně zobrazená smyčka zvaná „occluding loop“, která je charakteristická pro katepsiny B je zodpovědná za exopeptidázovou aktivitu a obsahuje dva zbytky His důležité pro interakci se substrátem. PDB kód: 4I07. Obrázek byl připraven pomocí programu Pymol.

2.4.3.2. Katepsin B2 ze *S. mansoni*

Katepsin B2 ze *S. mansoni* (SmCB2) vykazuje přibližně 50% sekvenční homologii s izoenzymem SmCB1. Na rozdíl od SmCB1 se nenachází v trávicím traktu krevniček, ale byl lokalizován v tegumentu a parenchymu dospělců (Caffrey et al., 2002). Sekvence propeptidu SmCB2 postrádá sekvenční motiv, tzv. HB („heparin-binding“) motiv XBBXBBX (kde B je bazická aminokyselina a X je hydrofobická aminokyselina) pro interakci s glykosaminoglykany. Tento motiv byl identifikován v SmCB1 a jeho přítomnost je spojována s katepsiny B parazitických motolic, které se účastní trávení krve (Horn et al., 2011). Vzhledem k lokalizaci není SmCB2 trávicí proteáza, ale přesná biologická funkce není zatím známa. Předpokládá se, že SmCB2 se může podílet na zpracování tegumentálních proteinů, odbourávání endocytovaných proteinů a procesech spojených s obranou krevničky (Caffrey et al., 2002).

Katalytická doména SmCB2 vykazuje přibližně 50% sekvenční homologii se savčími katepsiny B a katepsiny B1 z krevniček. V sekvenci SmCB2 jsou konzervativní katalytické zbytky Cys, His a Asn rodiny papainu a rovněž segment tvořící smyčku „occluding loop“ (Obr. 8) charakteristickou pro katepsiny B, která umožňuje jejich exopeptidázovou aktivitu. Nativní SmCB2 byl izolován z extraktu dospělých červů za použití afinitní chromatografie a rekombinantní SmCB2 byl připraven v expresním systému *Pichia pastoris*. Obě formy

proteinu mají molekulovou hmotnost 33 kDa (v glykosylovaném stavu) a hydrolyzují syntetické substráty specifické pro katepsin B (Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC) s pH optimem aktivity cca 5 (Caffrey et al., 2002).

3. Cíle práce

Diplomová práce se zabývá katepsinem B2 (SmCB2) z krevničky střešní (*S. mansoni*). Jedná se o cysteinovou proteázu, jejíž biochemické vlastnosti a biologická funkce nebyly podrobně studovány. Krevničky jsou původcem schistosomózy, významného parazitárního onemocnění, jež postihuje více než 240 mil. lidí. Proteázy krevniček jsou perspektivními molekulárními cíli pro vývoj nových chemoterapeutik a vakcín proti schistosomóze.

Dílčí cíle práce jsou následující:

- a) Připravit SmCB2 rekombinantní expresí v kvasinkách *P. pastoris* a v bakteriích *E. coli*.
- b) Purifikovat rekombinantní SmCB2 pomocí chromatografických metod.
- c) Identifikovat pomocí *in vitro* testů nové účinné inhibitory SmCB2 na bázi syntetických peptidomimetik.
- d) Připravit polyklonální protilátku proti SmCB2 v myších, testovat její specifitu a použít ji pro imunolokalizaci SmCB2 v tkáních parazita pomocí konfokální mikroskopie.
- e) Zjistit, zda-li je SmCB2 rozpoznáván jako parazitární antigen imunitním systémem hostitele pomocí ELISA analýzy séra myší, které byly infikovány *S. mansoni*.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Buněčný a biologický materiál

Parafinové řezy dospělé *S. mansoni*
(poskytla Mgr. Lenka Ulrychová, ÚOCHB AV ČR)

Séra myši imunizovaných SmCB1 (kmen ICR)
(poskytla Mgr. Lenka Ulrychová, ÚOCHB AV ČR)

Séra myši infikovaných *S. mansoni* (kmen ICR)
(poskytla Dr. Marta Chanová, 1. LF UK)

Bakteriální buňky TOP10 *Escherichia coli*
(Invitrogen, USA)

Bakteriální buňky SHuffle® T7 Express *lysY* Competent *Escherichia coli*
(New England Biolabs, USA)

Kvasinkové buňky *Pichia pastoris* (kmen X-33)
(Invitrogen, USA)

Vektor pPICZ α obsahující úsek DNA kódující SmCB2
(poskytl Dr. Conor Caffrey, University of California of San Francisco, USA)

Plazmid pHTT2
(poskytl Dr. Evžen Bouřa, ÚOCHB AV ČR)

4.1.2. Chemikálie

Inhibitory a substráty:

Peptidomimetické vinylsulfonové inhibitory
(poskytl Dr. Conor Caffrey, University of California of San Francisco, USA)
Sigma-Aldrich, USA: E64, CA-074, PMSF

Bachem, Švýcarsko: Z-Phe-Arg-AMC
Millipore, USA: Luminata Crescendo Western HRP Substrate, Luminata Crescendo ELISA HRP Substrate

Protilátky:

Sigma-Aldrich, USA: koží protilátka proti myším IgG s konjugovanou HRP
Thermo Fisher, USA: fluorescenčně značená koží protilátka proti myším IgG

Ostatní chemikálie:

Bio-Rad, USA: agaróza
Biotinum, USA: GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain

New England Biolabs: T4 DNA ligáza

Fermentas, Lotyšsko: O'GeneRuler 1kb DNA ladder, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 6x Orange Loading Dye Solution, Zip Ruler Express, DNA Ladder 1 a 2

Fluka, SRN: DMSO, N,N-methylenbisakrylamid

Invitrogen, USA: zeocin, kanamycin, SOC médium, T7 reverse primer

Lachema, ČR: amoniak, chlorid sodný, ethanol, hydroxid sodný, hydroxid draselný, isopropanol, kyselina octová, kyselina chlorovodíková, methanol, hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný

Finnzyme, Finsko: DNA polymerasa *Phusion*

Qiagen, SRN: Qiagen Plasmid mini Kit, QIAquick Gel Extraction Kit

Serva, SRN: APS

Sigma-Aldrich, USA: azid sodný, biotin, BSA, DTT, EDTA, glycin, IPTG, LB agar, LB médium, SDS, sorbitol, TEMED, Tween 20, Tris báze, Triton X-100, akrylamid

4.2. Přístroje a vybavení

Analytické váhy 82/220/2X

Radwag, Polsko

Autokláv Labo Auoclave

Sanyo, Japonsko

Blotovací zařízení Power Pac HC™

BioRad, USA

Centrifuga Allegra® X-15R

Beckman Coulter, USA

Centrifuga Eppendorf 5424R

Eppendorf, Německo

Centrifuga Sorvall Evolution RC

Thermo Fisher Scientific, USA

Fluorescenční/absorbanční Infinite® M1000

Tecan, Rakousko

FPLC ÄKTA Explorer

GE Healthcare Life Sciences, Švédsko

Lyofilizátor Freezone 6 liter

Labconco, USA

NanoDrop 2000 spektrofotometr

Thermo Fisher Scientific, USA

Orbitální třepačka Innova® 44

New Brunswick Scientific, USA

Orbitální třepačka PSU-20i

Biosan, Lotyšsko

pH metr Orion 3 Star

Thermo Fisher Scientific, USA

Sonikátor Soniprep 150 MSE

Hielscher, Německo

Termoblok QBH2 Grant

P-lab, Česká republika

Vertikální elektroforéza Power Pac Basic

BioRad, USA

Vakuová odparka Speed Vac Concentrator

Thermosavant, USA

Chromatografické kolony a nosiče:

GE Healthcare Life Sciences, Švédsko: Hi-Trap IMAC FF, MonoS HR 5/5, Sephadex G 25, Protein A Sepharose

Ostatní vybavení

PVDF membrána

Millipore, USA

Mikrotitrační destičky

Thermo Fisher Scientific, USA

Rotilabo®-syringe filtr

Carl Roth, Německo

4.3. Metody

4.3.1. Rekombinantní exprese SmCB2 v *P. pastoris*

4.3.1.1. Příprava buněk *P. pastoris*

Kvasinky *P. pastoris* (kmen X-33) byly zaočkovány z ploten s YPD agarem do 25 ml YPD média a inkubovány při 30°C přes noc za třepání (230 ot./min). Z narostlé kultury bylo převedeno 100-200 µl do 500 ml nového YPD média a buňky se nechaly růst přes noc do dosažení hodnoty OD₆₀₀ 1,3-1,5. Po odstředění (5 min, 1500 g, 4°C) byla peleta resuspendována v 500 ml vychlazené sterilní vody, odstředěna za stejných podmínek a opět resuspendována v 250 ml vychlazené sterilní vody. Po odstředění (5 min, 1500 g, 4°C) byla získaná peleta resuspendována v 20 ml vychlazeného 1 M sorbitolu, směs byla odstředěna (5 min, 1500 g, 4°C) a k výsledné peletě přidán 1 ml vychlazeného 1 M sorbitolu.

YPD médium: 1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% dextróza

4.3.1.2. Transformace buněk *P. pastoris* elektroporací

Vektor *pPICZα* obsahující gen pro SmCB2, který byl získán od Dr. C. Caffrey, byl linearizován restriční endonukleázou *SacI*. Složení reakční směsi bylo 10 µg vektorové DNA, 5 µl *SacI*, 10 µl NEB pufru č. 1, 1 µl BSA (10 mg/ml). Reakční směs byla doplněna vodou do celkového objemu 100 µl. Reakce probíhala přes noc při 37°C. Linearizovaná DNA byla přečištěna za použití komerční soupravy QIAquick Gel Extraction.

5-10 µg linearizované plazmidové DNA bylo smícháno s 80 µl buněk *P. pastoris* (kap. 4.3.1.1.). Směs byla v elektroporační kyvetě inkubována na ledu 5 min. Následovala elektroporace při 200 V po dobu 5 ms a okamžité přidání 1 ml vychlazeného 1 M sorbitolu. Směs byla inkubována po dobu 1-2 h při 30°C bez třepání. Transformované buňky byly poté přeneseny a rozetřeny na Petriho misky s YPDS/Z agarem a inkubovány při 30°C do nárůstu kolonií (2-3 dny). Vybrané kolonie byly přečárkovány na nové misky s YPD/Z agarem.

NEB pufr č. 1: 10 mM Bis Tris Propan-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

YPD/Z agar: YPD médium, zeocin (100 µg/ml), 2% agar

YPDS/Z agar: YPD médium, zeocin (100 µg/ml), 2% agar, 1 M sorbitol

4.3.1.3. Exprese SmCB2 v buňkách *P. pastoris*

Z misek s YPD/Z agarem se vybraly 3 kolonie kvasinek *P. pastoris* obsahující vektor *pPICZa* se zaklonovaným genem pro SmCB2 (kap. 4.3.1.1.) a zaočkowały se do 25 ml BMG média. Buňky byly kultivovány 16-18 h při 30°C za třepání (250 ot./min) do dosažení $OD_{600} = 2-6$. Tato kultura byla použita k zaočkování 500 ml BMG média a poté probíhala inkubace při 30°C za třepání (250 ot./min) do $OD_{600} = 2-6$. Narostlá kultura byla odstředěna (5 min, 2500 g, 4°C), supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována v BMM médiu na konečné $OD_{600} = 1$. Buňky se v BMM médiu kultivovaly při 30°C za třepání (250 ot./min) a každých 12 h byl do suspenze přidán methanol (celková koncentrace methanolu v médiu byla 0,5%). V průběhu byly pravidelně odebírány vzorky kultivačního media (1 ml), které byly odstředěny (5 min, 2500 g, 4°C) a supernatant byl použit na analýzu časového průběhu produkce rekombinantního SmCB2. Po 5 dnech indukce byla kultura centrifugována (10 min, 2500 g, 4°C), médium po expresi bylo zamraženo a poté lyofilizováno.

BMG: 0,1 M K-fosfát, pH 6,0, 10% YNB, 0,2% biotin, 1% glycerol

BMM: 0,1 M K-fosfát, pH 6,0, 1,34% YNB, 0,2% biotin, 1% methanol

4.3.1.4. Purifikace SmCB2 gelovou chromatografií

Médium po expresi v *P. pastoris* (kap.4.3.1.3.) bylo zahuštěno lyofilizací (z 500 ml na 100 ml) a nanášeno na kolonu s nosičem Sephadex G-25 (3,2 cm x 60 cm) ekvilibrovanou destilovanou vodou. Průtok kolonou byl 2 ml/min a sbíraly se frakce o objemu 10 ml. U jednotlivých frakcí byla proměřena absorbance při vlnové délce 280 nm (detekce proteinů) a konduktivita (detekce solí). Frakce obsahující proteiny byly spojeny a použity v dalším purifikačním kroku.

4.3.1.5. Purifikace SmCB2 ionexovou chromatografií

Proteinová frakce získaná pomocí gelové chromatografie (kap. 4.3.1.4.) byla dále purifikována pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S HR 5/5 na FPLC systému ÄKTA purifier. Vzorek byl po úpravě pH přidáním 10x koncentrovaného nanášecího pufru nanášen na kolonu. Kolona byla následně promyta dalšími 5 ml nanášecího pufru. Průtok kolonou byl při všech krocích 1 ml/min. Eluce probíhala lineárním gradientem 0-1 M NaCl (100 min). Sbíraly se frakce o objemu 2 ml. Průběh purifikace byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Ve vybraných frakcích byla změřena

proteolytická aktivita SmCB1 pomocí aktivitního testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (kap. 4.3.4.1.). Frakce byly také analyzovány pomocí SDS-PAGE. Podmínky pro chromatografii byly určeny na základě teoretické hodnoty izoelektrického bodu SmCB2 (pI = 5,7), která byla vypočtena z aminokyselinové sekvence.

Nanášecí pufr: 0,05 M Na-acetát, pH 4,5

Eluční pufr: 0,05 M Na-acetát, pH 4,5, 1 M NaCl

4.3.2. Rekombinantní exprese SmCB2 v *E. coli*

4.3.2.1. Amplifikace DNA inzertu a klonování do plasmidu

Požadovaný úsek cDNA kódující SmCB2 byl amplifikován pomocí metody PCR. Jako templát byl použit vektor *pPICZα* obsahující sekvenci SmCB2 (kap. 4.3.1.2). Reakční PCR směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

0,5 µl cDNA

2,5 µl přímého primeru (10 mM)

2,5 µl reverzního primeru (10 mM)

1 µl směsi dNTP (10 mM každý dNTP)

0,5 µl *Phusion* DNA polymerázy

10 µl komerčního pufru pro *Phusion* polymerázu (5x koncentrovaný)

33 µl sterilní vody

Primery:

SmCB2 přímý primer: 5'-GATGCTAGACGACATAAACGTATG-3'

SmCB2 reverzní primer: 5'-ATGCTGGAATACCAAAAATAAAAAAC-3'

DNA byla v PCR termocykléru amplifikována následujícím postupem:

- | | | |
|--------------------------------------|-------------|---------------|
| 1. Počáteční denaturace DNA templátu | 98°C, 30 s | |
| 2. Denaturace DNA templátu | 98°C, 10 s | ←
35x
— |
| 3. Nasednutí primerů | 60°C, 30 s | |
| 4. Polymerace | 72°C, 20 s | |
| 5. Závěrečná polymerace | 72°C, 5 min | |

Velikost DNA produktů PCR reakce byla analyzována horizontální agarózovou elektroforézou (kap. 4.3.3.1.). Oblasti gelu obsahující amplifikované DNA úseky o

odpovídající velikosti byly vyříznuty a byla provedena extrakce a purifikace DNA z gelu za použití komerční soupravy QIAquick Gel Extraction.

4.3.2.2. Restrikční štěpení enzymy *BamH I* a *Not I* a ligace do *pHTT2* plazmidu

Inzert byl klonován do plazmidu *pHTT2*, který poskytl Dr. E. Bouřa z ÚOCHB. Plazmid a inzert (kap. 4.3.2.1.) byly štěpeny restrikčními endonukleázami *BamH I* a *Not I* v reakčním NEB pufru č. 3.1. Poměry reakčních komponent byly určeny dle aktivity restrikčních endonukleáz, kdy 1 U enzymu štěpí 1 µg DNA za 1 h za optimálních reakčních podmínek. Reakce probíhala při 37°C přes noc. K naštěpenému vektoru byl poté přidán 1 µl enzymu SAP a vektor byl přečištěn pomocí horizontální agarózové elektroforézy a následně extrahován pomocí komerční soupravy Gen Elute Gel Extraction Kit. Produkty PCR byly přečištěny pomocí komerční extrakční sady Gen Elute PCR Clean-Up Kit.

Ligace DNA inzertu do plazmidu *pHTT2* byla provedena pomocí T4 DNA ligázy. Byla připravena reakční směs, která obsahovala 10 µl DNA inzertu, 15 µl plazmidu, 1 µl T4 DNA ligázy, 4 µl ligačního pufru a 10 µl sterilní vody. Reakce probíhala při 15°C přes noc.

Ligační pufr: 250 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% polyethylenglykol 8000

NEB pufr č. 3.1.: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, pH 7.9

4.3.2.3. Transformace buněk *E. coli* metodou teplotního šoku

Kompetentní buňky *E. coli One Shot TOP10* byly transformovány metodou teplotního šoku. 50 µl buněk bylo rozmrazeno na ledu a byl k nim přidán 1 µl ligační směsi (připravena v kap. 4.3.2.2.). Směs se inkubovala 30 min na ledu a následně byl proveden 30 s teplotní šok při 42°C. Poté byly buňky umístěny na led, bylo k nim přidáno 250 µl SOC média a směs byla inkubována po dobu 60 min při 37°C v třepačce (225 ot./min). Suspenze buněk byla nanášena na misku s LB agarem obsahujícím antibiotikum kanamycin v koncentraci 50 µg/ml a inkubována přes noc při 37°C.

SOC médium: 2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM glukóza

LB agar: 10 g/l trypton, 5 g/l kvasinkový extrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar

4.3.2.4. Izolace vektorové DNA

Buňky *E. coli One Shot TOP10* transformované vektorem *pHTT2* s SmCB2 inzertem, které vytvořily na plotně s LB agarem samostatnou kolonii (kap. 4.3.2.3.), byly použity k zaočkování 5 ml LB média obsahujícího kanamycin. Kultivace probíhala přes noc při 37°C za třepání (225 ot./min). Narostlá bakteriální kultura byla odstředěna (15 min, 4 000 g, 4°C) a supernatant byl odebrán. Z bakteriální pelety byla izolována DNA za použití komerční soupravy QIAGEN Plasmid Mini.

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0

4.3.2.5. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byly stanoveny měřením absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm na přístroji NanoDrop. Kontaminace proteiny byla určena z podílu A_{260}/A_{280} . Rozmezí 1,8 – 2,0 udává přijatelnou čistotu DNA.

4.3.2.6. Stanovení sekvence DNA

Sekvence DNA byly určeny firmou GATC Biotech AG. Sekvence byly vyhodnoceny porovnáním sekvenované DNA s originální sekvencí v programu DNASTar Laser Gene. Pro sekvenování byly použity následující primery:

SmCB2 přímý primer: 5'-GGATCCGATGCTAGACGACATAAACGTATGT-3'

SmCB2 reverzní primer: 5'-GCGGCCGC CTAGTTTTTTATTTTTTGGTATTCCAGC-3'

4.3.2.7. Transformace expresních buněk *E. coli* metodou teplotního šoku

50 µl buněk *E. coli SHuffle® T7 Express lysY Competent* bylo smícháno s 70 ng přečištěné vektorové DNA (plazmid *pHTT2* s inzertem SmCB2, kap. 4.3.2.4.). Směs byla inkubována 30 min na ledu a poté byl proveden teplotní šok při 42°C po dobu 30 s. Poté se přidalo 250 µl SOC média a směs se inkubovala 1 h při 30°C za třepání (250 ot./min). Narostlá bakteriální kultura byla nanášena na misky s LB agarem obsahující antibiotikum kanamycin ve výsledné koncentraci 50 µg/ml. Buňky byly inkubovány přes noc při 30°C.

LB/K agar: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0, 15 g/l agar, 50 µg/ml kanamycin, 1% glukóza

4.3.2.8. Exprese SmCB2 v buňkách *E. coli*

Narostlé kolonie buněk *E. coli* *SHuffle® T7 Express lysY Competent* transformované vektorem *pHTT2* s SmCB2 inzertem (kap.4.3.2.7.) byly z misky s LB agarem zaočkovány do 50 ml LB/K média. Buňky byly kultivovány přes noc při 30°C za třepání (220 ot./min). Následující den bylo 10 ml narostlých buněk přeneseno do 500 ml LB/K média a buňky byly dále kultivovány při 30°C do hodnoty OD₆₀₀ 0,6. Exprese byla indukována přidáním IPTG ve výsledné koncentraci 1 mM. Exprese probíhala 16 h při 16°C. Poté byla kultura odstředěna (3000 g, 10 min, 4°C), supernatant odstraněn a peleta byla zmrazena.

LB/K médium: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0,
50 µg/ml kanamycin, 1% glukóza

4.3.2.9. Dezintegrace buněk *E. coli* a separace inkluzí

K 1 g bakteriální pelety (v kap.4.3.2.8.) bylo přidáno 10 ml pufru A. Po resuspendaci byl přidán 1 mg lysozymu, PMSF (výsledně 1 mM) a merkaptoethanol (výsledně 0,1%). Směs se inkubovala při laboratorní teplotě 30 min. Vzniklý lyzát byl homogenizován tyčovým sonikátorem a poté inkubován v přítomnosti DOC (výsledně 0,1%) po dobu 30 min na ledu. Po centrifugaci (10 000 g, 10 min, 4°C) byl získán supernatant (S1), který byl zmražen. Peleta obsahující inkluzní tělíčka byla resuspendována v 10 ml pufru B a centrifugována (10 000 g, 10 min, 4°C). Vzniklý supernatant (S2) byl zamražen a peleta resuspendována v 10 ml pufru C. Po centrifugaci (10 000 g, 10 min, 4°C) byl supernatant (S3) zmražen a inkluzní tělíčka obsažená v peletě byla rozpuštěna v 10 ml rozpouštěcího pufru a inkubována při laboratorní teplotě přes noc za míchání. Nerozpuštěné buněčné části byly odstředěny (10 000 g, 15 min).

Pufř A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Pufř B: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100

Pufř C: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,1% merkaptoethanol

Rozpouštěcí pufř: 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM NaH₂PO₄, 8 M močovina

4.3.2.10. Purifikace SmCB2 pomocí afinitní chelatační chromatografie

Na kolonu s afinitním nosičem Hi-Trap IMAC FF (GE Healthcare) s immobilizovanými ionty Ni²⁺ bylo naneseno 4 ml směsi rozpuštěných inkluzí (kap. 4.3.2.9.). Kolona byla následně promyta 15 ml ekvilibračního pufru a 15 ml promývacího pufru. Poté byla provedena eluce

elučním pufrem a byly sbírány frakce po 5 ml. Rychlost průtoku byla 2 ml/min. Průběh purifikace byl vyhodnocen kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a pomocí SDS-PAGE.

<i>Ekvilibrační pufr:</i>	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 8 M močovina
<i>Promývací pufr:</i>	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 8 M močovina, 20 mM imidazol
<i>Eluční pufr:</i>	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 8 M močovina, 250 mM imidazol

4.3.2.11. Refolding pomocí dialýzy

SmCB2 byl exprimován v denaturované formě a byl následně převeden do nativní konformace (procesem zvaným „refolding“) pomocí dialýzy. Roztok SmCB2 po purifikaci afinitní chromatografií (kap.4.3.2.10.) byl postupně dialyzován proti pufru A, B, C a nakonec proti PBS. Každá dialýza probíhala 24 h při teplotě 4°C. Průchodnost dialyzační membrány byla 10 kDa. Po dialýze byl protein koncentrován pomocí centrifugačního koncentrátoru Amicon Ultra a výsledný protein byl použit pro výrobu polyklonální anti-SmCB2 protilátky (kap.4.3.5.).

<i>Pufr A:</i>	25 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 4 M močovina, 10% glycerol, 1 mM merkaptoethanol
<i>Pufr B:</i>	25 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2 M močovina, 10% glycerol, 1 mM merkaptoethanol
<i>Pufr C:</i>	25 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM merkaptoethanol

4.3.2.12. Odštěpení fúzního proteinu TEV proteázou

Rekombinantní SmCB2 (kap. 4.3.2.) byl z fúzního proteinu vyštěpen Tobacco Etch Virus (TEV) proteázou. Reakční směs obsahovala 5 µg SmCB2*, 0,15 µg TEV proteázy a 15 µl 10x koncentrovaného reakčního pufru. Objem byl doplněn do 150 µl vodou. Směs byla inkubována přes noc v laboratorní teplotě. Odštěpení bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3.3.2.) a přenosem proteinů z gelu na membránu (kap.4.3.3.3.).

<i>Reakční pufr:</i>	50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT
----------------------	---

4.3.3. Analytické metody

4.3.3.1. Horizontální agarózová elektroforéza

V TAE pufru byla rozpuštěna zahřátím agaróza ve výsledné koncentraci 1% a po ochlazení přibližně na 50°C bylo přidáno interkalační činidlo GelRED ve výsledné koncentraci 0,5 µg/ml. Směs byla nalita do elektroforetické vaničky s vloženým hřebenem. Po ztuhnutí agarózy (30 min) byly do jamek po hřebenu nanášeny vzorky smíchané s vzorkovým pufrům a standard molekulových vah. Elektroforetické dělení probíhalo při 120 V po dobu 15-20 min. Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí UV lampy při vlnové délce 302 nm.

<i>Vzorkový pufr:</i>	6x Orange Loading Dye Solution
<i>TAE pufr:</i>	40 mM Tris-acetát, pH 8,0, 2 mM EDTA
<i>Standardy molekulových vah:</i>	100 bp DNA Ladder O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder
<i>Interkalační činidlo:</i>	GelRed Nucleic Acid Gel Stain

4.3.3.2. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Polyakrylamidová elektroforéza byla prováděna v přítomnosti 0,1% SDS a vycházela z postup podle Laemmliho (Laemmli, 1970). Vertikální elektroforéza byla prováděna na přístroji Bio-Rad Mini Protean II, používány byly 15% polyakrylamidové gely o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm.

Proteinové frakce vzorků určené k analýze pomocí SDS-PAGE byly vysráženy pomocí acetonu. Ke vzorku byl přidán ledově vychlazený aceton na výslednou koncentraci 80%. Vzorky byly inkubovány přes noc v -20°C a následně odstředěny (15 min, 4°C, 10000 g). Supernatant byl odebrán a peleta vysušena na vakuové odparce Thermosavant při teplotě 60°C. Peleta byla rozpuštěna v 15 µl vzorkového pufru. Vzorky byly denaturovány 10 min zahříváním při 100°C a poté nanášeny na gel. Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 80 V a poté 40 min při 120 V. Pokud nebyly gely použity pro přenos na membránu, byly po skončení elektroforézy fixovány po dobu 15 min v roztoku s 50% ethanolem a 12% kyselinou octovou. Proteiny byly detekovány pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250.

Vzorkový pufr: 100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 4% β -merkaptoethanol, 0,1% bromfenolová modř, 24% glycerol

Coomassie Brilliant Blue R-250: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

4.3.3.3. Přenos proteinů z gelu na membránu

Nezafixovaný gel po SDS-PAGE (kap. 4.3.3.2.) byl použit na přenos proteinů na PVDF membránu elektroblotováním pomocí přístroje Mini Trans-Blot. PVDF membrána byla inkubována 10 min v methanolu a poté byla společně s gelem a filtračními papíry inkubovány po dobu 15 min v transferovém pufru. Po inkubaci byly navrstveny do blotovacího zařízení v pořadí: katoda, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, anoda. Přenos probíhal 60 min při konstantním napětí 100 V a za chlazení. Detekce proteinů byla provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo pomocí imunodetekce (kap. 4.3.3.4.).

Transferový pufr: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glycin, 20% methanol

4.3.3.4. Imunodetekce proteinů specifickými protilátkami

Membrána s navázanými proteiny byla nejprve pro zablokování nespecifických interakcí inkubována v TTBS roztoku obsahujícím 10% odtučněné mléko a 1% PVP přes noc při 4°C. Poté byla opláchnuta TTBS (3x 20 min) a inkubována se směsí myších sér (4.3.5.) proti rekombinantnímu SmCB2 (kap. 4.3.2.) v roztoku TTBS (ředění protilátky 1:1000, 1:2500, 1:5000) 1 h při laboratorní teplotě. Poté byla opláchnuta TTBS (3x 20 min) a inkubována 30 min při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou (komerční kozí protilátka proti myším IgG s navázanou křenovou peroxidásou (HRP)) v roztoku TTBS (ředění 1:10000). Po promytí membrány TTBS (3x 20 min) byla membrána inkubována s komerčním chemiluminiscenčním substrátem Luminata Crescendo Western HRP substrate a vizualizována pomocí CCD kamery.

TTBS roztok: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Tween

4.3.4. Měření enzymatické aktivity SmCB2

4.3.4.1. Měření se substrátem Z-Phe-Arg-AMC

Enzymová aktivita SmCB2 byla stanovena měřením fluorescence vznikající při štěpení fluorogenního substrátu Z-Phe-Arg-AMC. Uvolňování AMC (7-amido-4-methylkumarin) bylo monitorováno při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm pomocí fluorescenční čtečky Tecan Infinite M1000 při 37°C. Do jamek mikroděstičky byl napipetován testovaný vzorek (10 µl frakce po chromatografii nebo 2,5 µl vzorku odebraného při expresi) a 70 µl aktivační směsi. Směs byla protřepána a inkubována po dobu 5 min při 37°C. Následně se přidalo 20 µl substrátové směsi a bylo spuštěno měření fluorescence.

Aktivační směs: 0,1 M Na-acetát, pH 5,5, 2,5 mM DTT, 0,1% PEG 1500

Substrátová směs: 0,1 M Na-acetát, pH 5,5, 25 µM Z-Phe-Arg-AMC

4.3.4.2. Určení koncentrace enzymu pomocí titrace

Pro zjištění koncentrace aktivního SmCB2 v zásobním roztoku byl použit inhibitor CA-074 a postupovalo se obdobně jako v kap. 4.3.4.4.. Inhibitor o koncentraci 0-100 nM byl inkubován 30 min při 37 °C s enzymovou směsí, která obsahovala 50 × více enzymu než bylo použito pro analýzu enzymologických parametrů v kap. 4.3.4.4.. Následně se přidalo 20 µl substrátové směsi a bylo provedeno měření zbytkové aktivity (kap. 4.3.4.3.). Byla stanovena hodnota IC₅₀, která odpovídá polovině koncentrace aktivního enzymu v testu.

4.3.4.3. Stanovení zbytkové aktivity

Při stanovení zbytkové aktivity byl nejprve SmCB2 inkubován 30 min s příslušným inhibitorem přidaným do aktivační směsi, poté byla změřena aktivita podle kap. 4.3.4.1.. Zbytková aktivita inhibovaného enzymu byla vypočítaná ze vzorce $v = v_i/v_0$, kde v_i je počáteční rychlost reakce s inhibitorem a v_0 je počáteční rychlost reakce bez inhibitoru.

4.3.4.4. Stanovení konstanty IC₅₀

Pro stanovení IC₅₀ (koncentrace inhibitoru způsobující 50% inhibici enzymu) byla změřena zbytková aktivita enzymu s inhibitorem o různých koncentracích. 70 µl enzymové směsi bylo inkubováno s 10 µl příslušného inhibitoru o různých koncentracích (0-100 µM) po dobu 5 min při 37°C. Zbytková aktivita inhibovaného enzymu byla změřena podle kap. 4.3.4.1.. Hodnota

IC₅₀ byla stanovena pomocí nelineární regrese z grafu závislosti zbytkové aktivity enzymu na použité koncentraci inhibitoru za použití programu Grafit. Všechna kinetická měření byla prováděna v duplikátech.

Enzymová směs: 0,5 µl SmCB2 (kap. 4.3.1.5.), 0,1 M Na-acetát, pH 5,5, 2,5 mM DTT, 0,1% PEG 1500

4.3.5. Výroba polyklonální anti-SmCB2 protilátky

Purifikovaný rekombinantní SmCB2 připravený expresí v *E. coli* (kap. 4.3.2.8.) byl použit k imunizaci 10 myší kmene ICR. Zvířata byla imunizována subkutánně 4 dávkami v intervalech 10 dní, kdy první dávka byla v kombinaci s kompletním Freundovo adjuvans (CFA). V ostatních dávkách bylo použito nekompletní Freundovo adjuvans (FA) (Tab. 1). Před každou imunizací byla myším z ocasní cévy odebrána krev, která byla odstředěna (10 min, 2500 g, laboratorní teplota). Získané krevní sérum bylo analyzováno pomocí ELISA (kap. 4.3.7.). Celkové sérum bylo získáno 14 dní po poslední imunizační dávce a byla z něj izolována frakce IgG za použití afinitní chromatografie na koloně Protein A Sepharose CL-4B (GE Healthcare). IgG frakce byla použita na imunolokalizaci SmCB2 na řezech parazita (kap. 4.3.8.).

Tab.1. Schéma imunizace pomocí SmCB2.

imunizační dávka	myš	antigen	adjuvans
1.	1-4	10 µg SmCB2	CFA
	5-8	25 µg SmCB2	CFA
	9-10	0 µg SmCB2	CFA
2.-4.	1-4	10 µg SmCB2	FA
	5-8	25 µg SmCB2	FA
	9-10	0 µg SmCB2	FA

4.3.6. Purifikace krevních sér afinitní chromatografií

Na kolonu s afinitním nosičem Protein A Sepharose CL-45 s imobilizovaným proteinem A byly naneseny 2 ml anti-SmCB2 séra (kap. 4.3.5.). Kolona byla následně promyta 15 ml navazovacího pufru. Poté byla provedena eluce elučním pufrům a byly sbírány frakce po 1 ml. pH sbíraných elučních frakcí obsahujících IgG bylo ihned upraveno neutralizačním pufrům.

Navazovací pufr: 20 mM Na-fosfát, pH 7,0

Eluční pufr: 100 mM Na-citrát, pH 3,0

Neutralizační pufr:

1 M Tris-HCl pH 8,0

4.3.7. Testování krevních sér pomocí ELISA

Do jamek mikrotitrační destičky byl nanesen antigen, 2 µg proteinu (SmCB2, kap. 4.3.2. nebo SmCB1 připravený Mrg. Adélou Jílkovou, Ph.D. na ÚOCHB AV ČR) v 20 µl navazovacího pufru. Takto připravená destička byla inkubována přes noc při 4°C a následně byly jamky vymyty TPBS roztokem. Nespecifická vazebná místa byla blokována pomocí 1% BSA v TPBS roztoku za laboratorní teploty 1 h. Do vymytých jamek TPBS roztokem byla nanesena (1) směs sér z osmi myší imunizovaných pomocí SmCB2 (kap. 4.3.5.), (2) směs sér ze dvou myší imunizovaných pomocí SmCB1 (připraveno Mgr. Lenkou Ulrychovou), (3) směs sér z pěti myší infikovaných *S. mansoni* (připraveno Mgr. Martou Chanovou, Ph.D.), (4) směs sér dvou kontrolních myší, u kterých bylo aplikováno pouze adjuvans (kap. 4.3.5.), v různých koncentracích (Tab. 2) a destička byla inkubována přes noc při 4°C. Po vymytí jamek TPBS roztokem byla přidána komerční sekundární protilátka (kozí proti myším IgG s konjugovanou HRP) v roztoku TPBS (ředění 1:10000) a destička se inkubovala 1 h při laboratorní teplotě. Jamky byly vymyty TPBS roztokem a byl přidán chemiluminiscenční substrát Luminata Crescendo ELISA, Millipore. Směs byla inkubována 5 min za laboratorní teploty a byla proměřena chemiluminiscence na přístroji Tecan Infinite M1000.

Tab. 2. Použitá ředění sér v ELISA reakci.

sérum	ředění
anti-SmCB2 sérum	1:500, 1:1000, 1:5000
anti-SmCB1 sérum	1:100, 1:250, 1:500
infekční sérum	1:50, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000

Navazovací pufr: Uhličitanový pufr 100 mM, pH 9,6

TPBS: PBS, 0,01% Tween20

4.3.8. Imunolokalizace SmCB2 v *S. mansoni*

Parafinové řezy parazitů byly permeabilizovány v roztoku TPBS 20 min. Nespecifická vazebná místa byla blokována pomocí 2% BSA v TPBS roztoku přes noc při 4°C. Po promytí roztokem TPBS (3x 20 min) byly řezy inkubovány se séry myší imunizovaných proti SmCB2 (kap. 4.3.6.) v roztoku TPBS (ředění 1:100) přes noc při 4°C. Řezy byly opláchnuty roztokem TPBS (3x 20 min) a inkubovány 30 min při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou

(komerční kozi protilátka proti myším IgG s navázanou HRP) v roztoku TPBS (ředění 1:500). Po opláchnutí roztokem TPBS (3x 20 min) byly řezy inkubovány s DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) fluorescenčním barvivem. Řezy byly vizualizovány fluorescenčním mikroskopem Olympus IX83 na kameře PCO edge 5.5.

TPBS: PBS, 0,25% TritonX-100

5. Výsledky

5.1. Rekombinantní exprese SmCB2 v kvasinkách *P. pastoris*

Pro produkci SmCB2 byl zvolen kvasinkový expresní systém *P. pastoris*. Jedná se o eukaryotní systém, který zajišťuje účinnou biosyntézu rekombinantního proteinu včetně sbalování a posttranslačních modifikací. S využitím tohoto systému se podařilo získat dostatečné množství aktivního enzymu pro studium inhibiční specifity SmCB2.

Pro expresi byl použit plazmid *pPICZα*, který obsahoval úsek cDNA odpovídající zymogenu SmCB2 (*pPICZα/SmCB2*). Tento úsek byl do plazmidu *pPICZα* vložen za signální sekvenci kvasinkového α -faktoru, jenž zajišťuje sekreci syntetizovaného proteinu přímo do média a který je při expresi odštěpován kvasinkovou proteázou KexII.

5.1.1. Transformace buněk *P. pastoris*

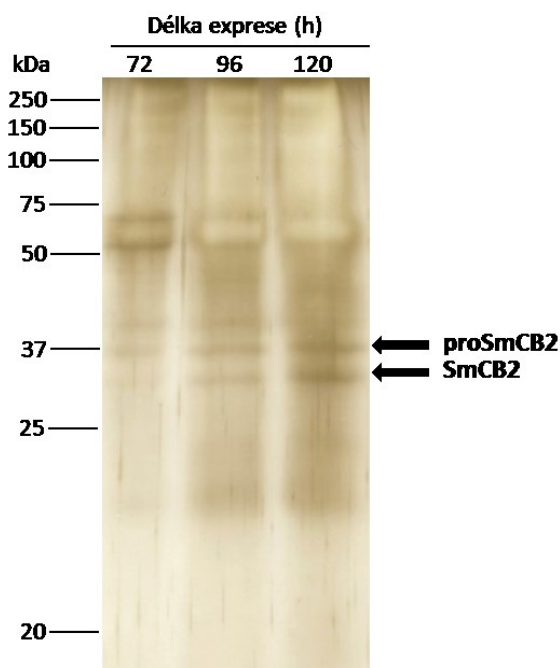
Vektor *pPICZα* zajišťuje stabilní integraci vkládané DNA do kvasinkového chromosomu homologní rekombinací. K integraci vektorové DNA do chromozomální DNA kvasinky dochází mezi 5' AOX1 oblastí promotoru nebo terminátorovou oblastí AOX1 genu, který kóduje alkoholoxidázu vektoru, a homologními sekvencemi v chromozomu kvasinek. Kompetentní buňky *P. pastoris* byly transformovány linearizovaným vektorem *pPICZα/SmCB2* metodou elektroporace. Elektroporované buňky byly nanášeny na misky s YPD agarem obsahující antibiotikum zeocin, proti kterému jsou kvasinky transformované vektorem *pPICZα* rezistentní a byly inkubovány při 30°C. Díky přítomnosti zeocinu došlo k selekci buněk pro expresi SmCB2.

5.1.2. Časový průběh exprese SmCB2 v *P. pastoris*

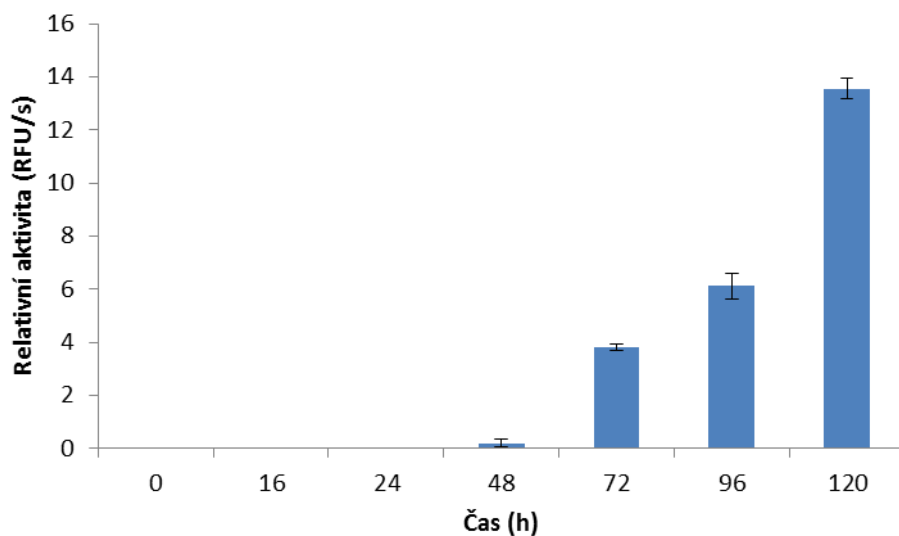
Transformované buňky byly zaočkovány do BMG média a nechaly se kultivovat při 30°C do dosažení hodnoty $OD_{600} = 2-6$. Buňky byly převedeny do BMM média a indukce exprese byla zahájena přidáním methanolu do výsledné koncentrace 0,5 %. Methanol se dále přidával každých 12 h. *P. pastoris* je methylotrófní kvasinka využívající methanol jako jediný zdroj uhlíku.

Během exprese byly pravidelně odebírány vzorky média a analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 9, str. 39). Pro analýzu bylo použito médium, protože exprimovaný SmCB2 by měl být vzhledem k použití vektoru *pPICZα/SmCB2* sekretován do média. Teoretická molekulová hmotnost SmCB2 vypočtená z aminokyselinové sekvence je cca 36 kDa pro proenzym a cca

28 kDa pro zralý enzym. Produkty o těchto molekulových hmotnostech jsou viditelné na SDS-PAGE, což značí, že již během exprese dochází k autokatalytické aktivaci enzymu. Časový průběh exprese SmCB2 byl také studován měřením enzymatické aktivity biosyntetizovaného enzymu pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (Obr. 10, str. 40). Jak z SDS-PAGE, tak z měření aktivity je patrné, že k nejvyšší produkci dochází během pátého dne od počáteční indukce exprese methanolem (Obr. 9 a Obr. 10, str. 40). Exprese byla proto ukončena po pěti dnech indukce, kultivační médium bylo zahuštěno lyofilizací a odsoleno pomocí gelové chromatografie (kap. 5.1.3.).



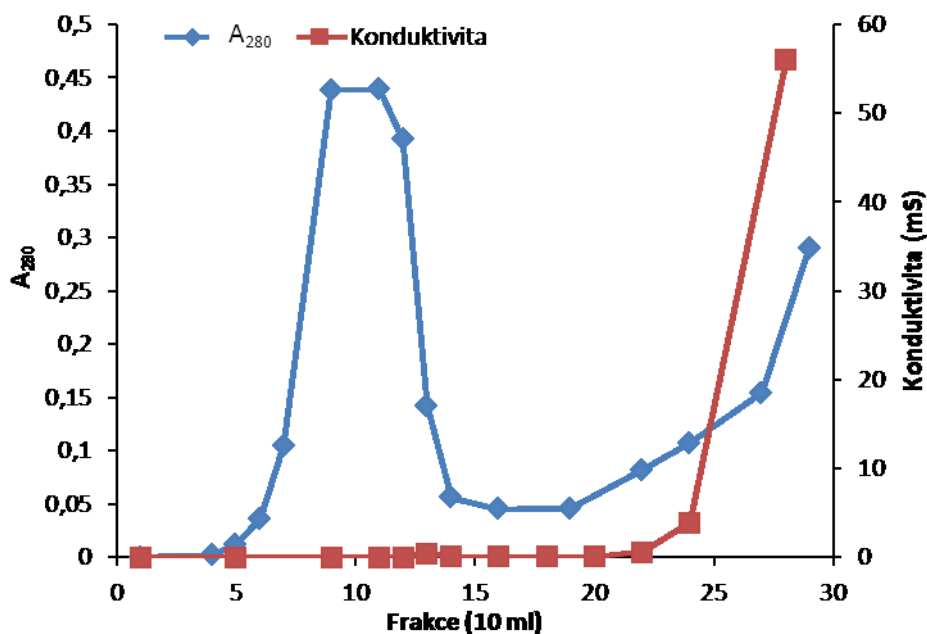
Obr. 9. Časový průběh exprese SmCB2 analyzovaný na SDS-PAGE. Vzorky média byly odebrány v průběhu exprese v *P. pastoris* v uvedených časech od počáteční indukce exprese methanolem. Gel byl obarven stříbrem. Šipkami jsou označeny pozice proenzymu SmCB2 (proSmCB2) a zralého enzymu (SmCB2).



Obr. 10. Časový průběh exprese SmCB2 analyzovaný stanovením aktivity rekombinantního SmCB2. Vzorky média byly odebírány v průběhu exprese v *P. pastoris* v uvedených časech od počáteční indukce methanolem (čas 0), buňky byly odstředěny a aktivita SmCB2 v supernatantu byla změřena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (RFU – relativní fluorescenční jednotky).

5.1.3. Příprava proteinové frakce gelovou chromatografií

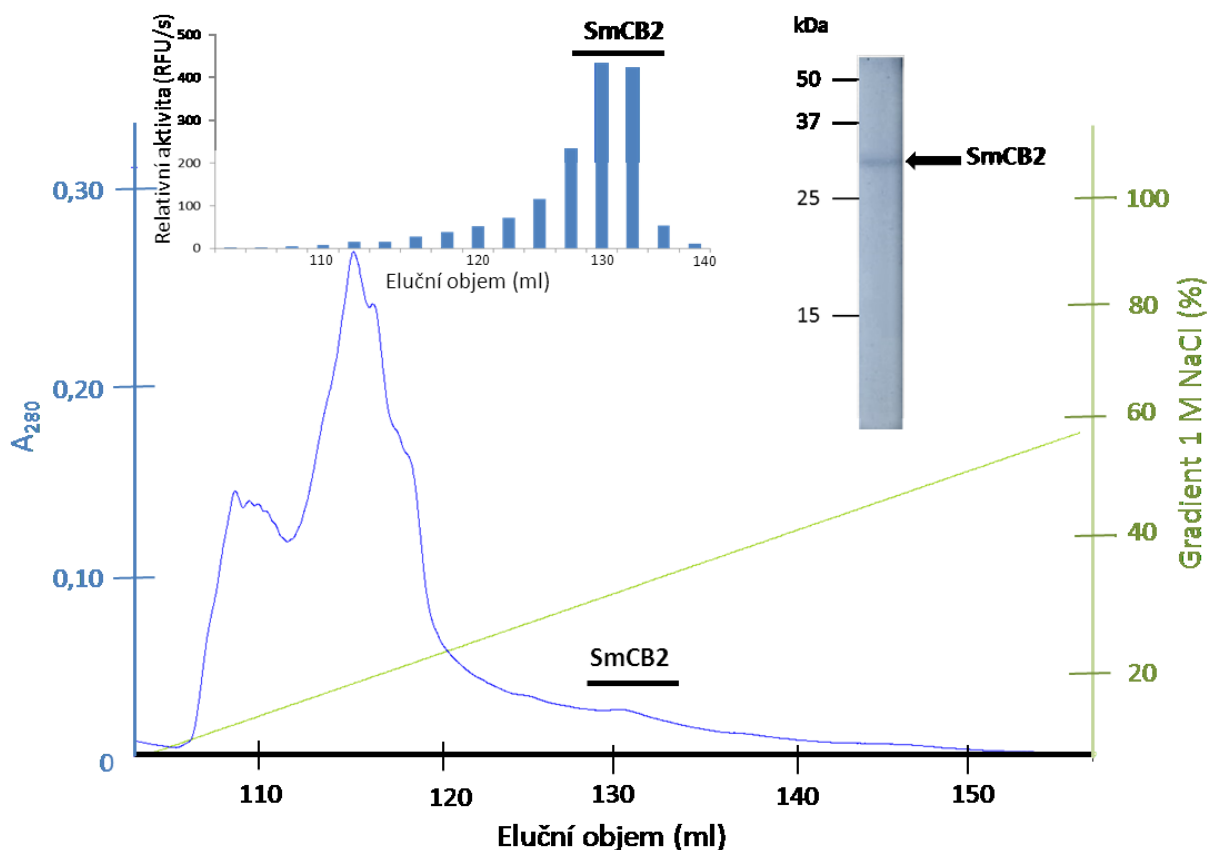
Kultivační médium bylo separováno gelovou chromatografií na koloně s nosičem Sephadex G-25 ekvilibrované destilovanou vodou. Průběh chromatografie byl analyzován měřením absorbance při 280 nm a konduktivity. Výsledkem chromatografie bylo oddělení proteinových složek od nízkomolekulárních složek a solí kultivačního média (Obr. 11, str. 41). Frakce obsahující proteiny byly spojeny a dále purifikovány ionexovou chromatografií.



Obr. 11. Purifikace rekombinantního SmCB2 gelovou chromatografií na koloně Sephadex-G25 (objem 470 ml). Rychlost průtoku kolonou byla 2 ml/min. Byly jímány frakce o objemu 10 ml a měřena jejich absorbance při vlnové délce 280 nm (A_{280} , modrá křivka) a konduktivita (červená křivka). Frakce 7-15 obsahující proteiny byly spojeny.

5.1.4. Purifikace rekombinantního SmCB2 ionexovou chromatografií

Proteinové frakce z gelové chromatografie (kap. 5.1.3) byly purifikovány ionexovou chromatografií na koloně Mono S s využitím FPLC systému. Tato kolona a podmínky chromatografie byly určeny podle teoreticky vypočítané hodnoty izoelektrického bodu SmCB2 ($pI = 5,7$). pH nanášeného vzorku bylo upraveno na pH 4,5, které umožní vazbu SmCB2 na nosič. Eluce probíhala lineárním gradientem NaCl. Záznam chromatografie je na Obr. 12, str. 42. Měření aktivity SmCB2 v elučních frakcích pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC prokázalo přítomnost SmCB2 v oblasti kolem elučního objemu 130 ml vyznačeném na Obr 12. Frakce obsahující SmCB2 byly spojeny a analyzovány na SDS-PAGE. Z ní je patrná přítomnost SmCB2, a to ve formě zralého enzymu (28 kDa).



Obr. 12. Purifikace rekombinantního SmCB2 pomocí ionexové chromatografie s využitím FPLC. Na kolonu Mono S HR 5/5 ekvilibrovanou 0,05 M Na-acetátovým pufrům, pH 4,5 byl nanesen SmCB2 po gelové chromatografii. Eluce probíhala lineárním gradientem NaCl (0-1 M/100 min). Rychlost průtoku kolonou byla 1 ml/min a objem sbíraných frakcí byl 2 ml. Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm (modrá křivka). Aktivita SmCB2 byla změřena v sebraných frakcích pomocí kinetického testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC (vložený graf). Frakce obsahující SmCB2 (černá čára) byly spojeny a analyzovány na SDS-PAGE (vložený obrázek gelu, který byl obarven Coomasie Brilliant Blue R-250).

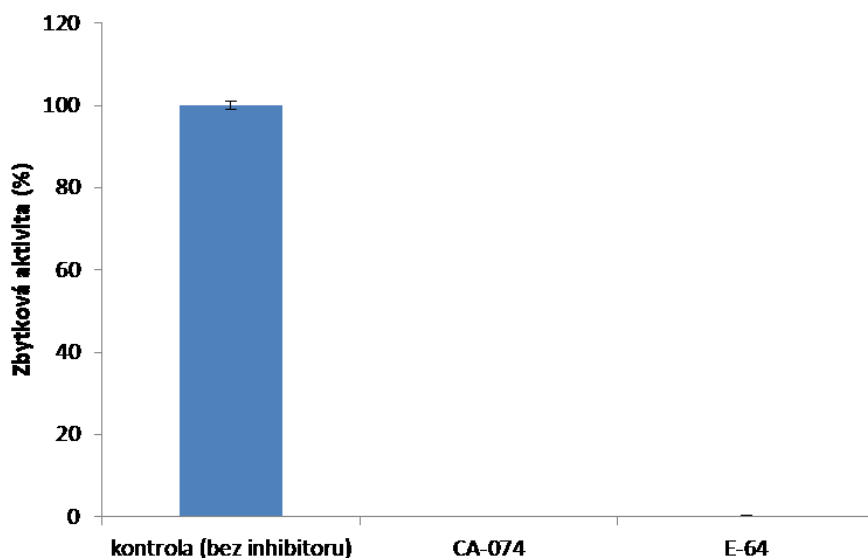
LPKSF¹DAR²VEWPH³CPSI⁴SEIRD⁵QSSCG⁶SCWAF⁷GAVEA⁸MSDR⁹ICIK¹⁰SKGK¹¹HKP¹²FLSA¹³ENLV¹⁴SCCS¹⁵SCGM¹⁶GCNG¹⁷GF¹⁸
 HSAW¹⁹LYWKN²⁰QGI²¹VTGD²²LYNT²³TNGC²⁴QPYEF²⁵PPCE²⁶HHVI²⁷IGPL²⁸PSCD²⁹GDVET³⁰PSCK³¹TNC³²QPGY³³NI³⁴PYEK³⁵DKWY³⁶GEKVY³⁷
 RI³⁸HNS³⁹PEA⁴⁰IMLE⁴¹MRNG⁴²PVEVD⁴³FEVY⁴⁴ADFP⁴⁵NYK⁴⁶SGVY⁴⁷QHV⁴⁸SGALL⁴⁹GGHAV⁵⁰RLL⁵¹GWGE⁵²ENNV⁵³YWLI⁵⁴ANS⁵⁵WNS⁵⁶DWG⁵⁷
 DKGY⁵⁸FKIV⁵⁹RGK⁶⁰NECGI⁶¹ESDV⁶²NAGI⁶³PK⁶⁴IKN⁶⁵

Obr. 13. Analýza rekombinantního SmCB2 po purifikaci ionexovou chromatografií a SDS-PAGE hmotnostní spektroskopií. Zobrazena je LC-MS/MS analýza peptidových fragmentů odvozených z aminokyselinové sekvence SmCB2. Zeleně jsou zobrazeny oblasti sekvence pokryté identifikovanými peptidovými fragmenty (73% pokrytí teoretické sekvence SmCB2).

Identita purifikovaného SmCB2 byla potvrzena hmotnostní spektrometrií (MS), při které bylo dosaženo 73% pokrytí teoretické sekvence SmCB2 (Obr. 13, str. 42). MS dále potvrdila, že byla získána molekulární forma aktivního enzymu. Při expresi a následné purifikaci tedy dochází k autokatalytické aktivaci proenzymu SmCB2. Použitým postupem pro přípravu rekombinantního proteinu bylo připraveno cca 50 µg čistého SmCB2 z 1 litru expresního media. Tento materiál byl použit pro analýzu inhibiční specifity SmCB2.

5.1.5. Primární analýza citlivosti SmCB2 k modelovým inhibitorům

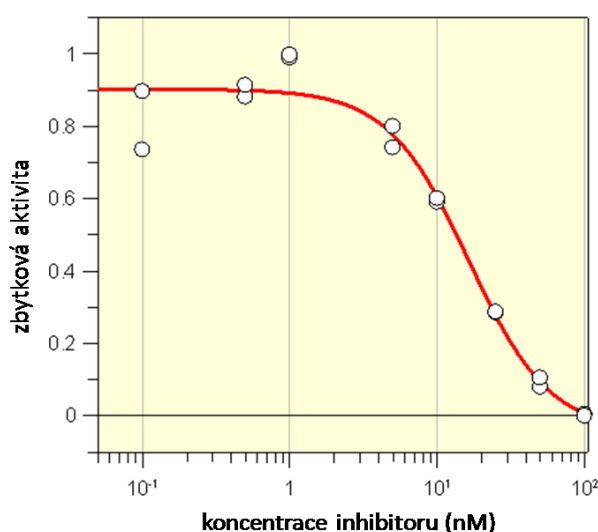
Byl proveden úvodní test inhibiční specifity SmCB2 se skupinově selektivním inhibitorem proteáz papainové rodiny (E-64) a specifickým inhibitorem proteáz typu katepsinu B (CA-074). SmCB2 byl inkubován s jednotlivými inhibitory v koncentraci 1 µM po dobu 30 min a poté byla měřena zbytková aktivita SmCB2 s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC. Tato inhibiční analýza ukázala, že aktivita SmCB2 byla při 1 µM koncentraci inhibitoru kompletně inhibována oběma inhibitory (Obr. 14). To dokazuje, že získaný enzym patří svým funkčním chováním mezi proteázy papainové rodiny typu katepsin B.



Obr. 14. Inhibiční specifita SmCB2 se skupinově selektivním inhibitorem proteáz papainové rodiny (E-64) a inhibitorem proteáz typu katepsinu B (CA-074). Aktivita SmCB2 byla měřena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC v přítomnosti inhibitorů (osa x) aplikovaných v 1 µM koncentraci. Hodnoty zbytkové aktivity jsou vyjádřeny v procentech jednotek RFU/s normalizovaných na kontrolní hodnotu aktivity naměřenou bez inhibitoru (100 %).

5.1.6. Stanovení koncentrace SmCB2 pomocí enzymové titrace

Koncentrace aktivní formy SmCB2 v zásobním roztoku byla stanovena titrací pomocí inhibitoru CA-074, který se kovalentně váže do aktivního místa enzymu v poměru 1:1. Enzym byl inkubován s inhibitorem v koncentraci 0-100 nM po dobu 30 min a poté byla měřena zbytková aktivita SmCB2 se substrátem Z-Phe-Arg-AMC. Hodnota IC_{50} byla stanovena nelineární regresí z grafu závislosti zbytkové aktivity na koncentraci inhibitoru v programu Grafit. Získaná hodnota $IC_{50} = 16$ nM odpovídá poloviční koncentraci aktivního SmCB2 v testu (Obr. 15). Koncentrace SmCB2 v titračním testu byla tedy 32 nM a koncentrace zásobního roztoku enzymu byla 320 nM.



Obr. 15. Titrace SmCB2 pomocí inhibitoru CA-074 použitého v koncentraci 0-100 nM. Hodnota IC_{50} byla stanovena nelineární regresí z grafu závislosti zbytkové aktivity SmCB2 na koncentraci inhibitoru v programu Grafit. Zbytková aktivita SmCB2 byla změřena v kinetickém testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC.

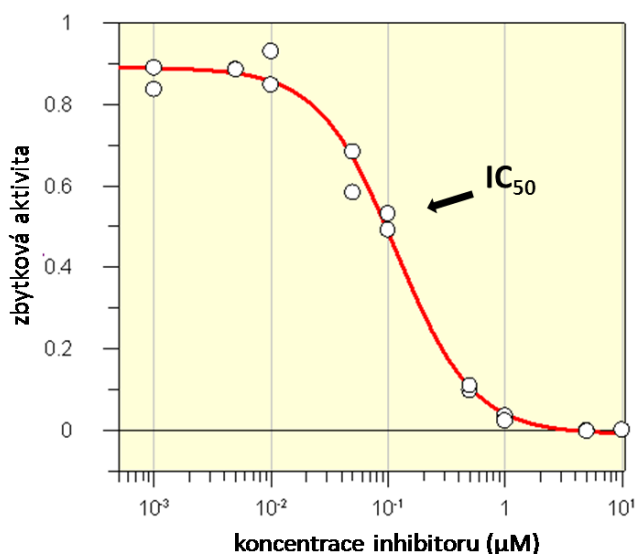
5.2. Analýza inhibiční specifity SmCB2 pomocí vinylsulfonových inhibitorů

Inhibiční specifita rekombinantního SmCB2 byla zkoumána pomocí sady 20 syntetických peptidomimetických inhibitorů s reaktivní vinylsulfonovou skupinou, které se kovalentně váží do katalytického centra cysteinových proteáz a blokují jejich proteolytickou aktivitu. Inhibitory se lišily různými substituenty R3-R1' v jednotlivých pozicích P3, P2, P1 a P1', kterými se inhibitor váže do odpovídajících vazebných podmíst S3, S2, S1 a S1' aktivního centra SmCB2.

Pro sadu inhibitorů byla určena v kinetickém aktivním testu s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC hodnota IC_{50} , tj. koncentrace inhibitoru, při které dochází k 50% inhibici

enzymu. Koncentrace aktivního enzymu v testu (0,08 nM) byla stanovena enzymovou titrací (kap. 5.1.6.).

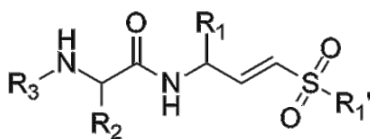
Jako příklad je uvedeno stanovení hodnoty IC_{50} pro inhibitor AR-198048 (Obr. 16). SmCB2 byl preinkubován s inhibitorem v rozsahu koncentrací 0-10 μ M (10 koncentrací). Poté byla změřena pomocí fluorescenčního substrátu Z-Phe-Arg-AMC zbytková aktivita SmCB2. Hodnoty IC_{50} byly určeny pomocí nelineární regrese ze závislosti zbytkové aktivity (poměru aktivity SmCB2 v přítomnosti inhibitoru o dané koncentraci a aktivity neinhibovaného SmCB2) na koncentraci inhibitoru v programu Grafit. V místě inflexního bodu křivky byla odečtena hodnota $IC_{50} = 117$ nM (Obr. 16).



Obr. 16. Určení hodnoty IC_{50} pro inhibici SmCB2 inhibitorem AR-198048. Hodnota IC_{50} byla stanovena nelineární regresí z grafu závislosti zbytkové aktivity SmCB2 (tj. poměru aktivity SmCB2 změřené v přítomnosti a absenci inhibitoru o dané koncentraci) (osa y) na použité koncentraci inhibitoru (osa x) v programu Grafit. Vypočtena byla hodnota $IC_{50} = 117 \pm 0,01$ nM.

A

Inhibitor	IC ₅₀ (nM)
K11006	34,7
K11747	50,6
WRR-286	65,2
K11002	91,3
AR-198048	117
WRR-282	117
WRR-285	162
AR-198049	543
K11777	582
WRR-284	864
K11017	1260
WRR-359	4348
WRR-145	6134
WRR-483	NI
WRR-200	NI
WRR-499	NI
WRR-185	NI
WRR-283	NI
WRR-347	NI
WRR-453	NI

B

Obr. 17. Inhibice SmCB2 pomocí vinylsulfonových inhibitorů. **A:** Naměřené hodnoty IC₅₀ pro sadu 20 vinylsulfonových inhibitorů byly stanoveny postupem uvedeným v textu. NI - inhibitor neinhibuje SmCB2 při koncentraci 10 μM. Směrodatné odchylky nepřekročily 5%. **B:** Struktura kostry vinylsulfonových inhibitorů, jednotlivé inhibitory se navzájem liší rozdílnými substituenty v pozicích R3, R2, R1, a R1'. Substituenty nejsou uvedeny z důvodu ochrany duševního vlastnictví.

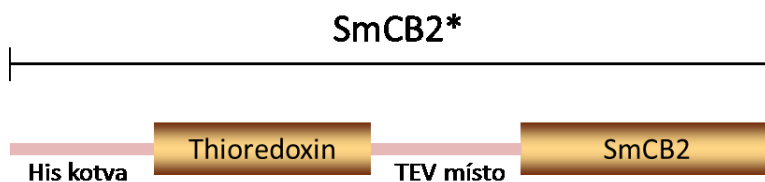
Uvedeným postupem byly změřeny hodnoty IC₅₀ pro vinylsulfonové inhibitory seřazené v tabulce na Obr. 17A podle své inhibiční schopnosti. Z analýzy vyplývá, že nejúčinnější čtyři inhibitory z testované sady vykazovaly hodnoty IC₅₀ do 100 nM. Hodnoty šesti IC₅₀ méně účinných inhibitorů se pohybovaly v rozmezí 100-1000 nM. Zbylá část sady inhibitorů inhibovala SmCB2 v mikromolárních koncentracích, případně neinhibovala vůbec.

5.3. Rekombinantní exprese SmCB2 v bakteriích *E. coli*

Hlavním cílem přípravy SmCB2 v bakteriálním expresním systému *E. coli* bylo získání dostatečného množství proteinu pro výrobu anti-SmCB2 protilátky imunizováním myší. Jedná se o prokaryotní expresní systém, ve kterém na rozdíl od eukaryotního systému *P. pastoris* neprobíhá glykosylace proteinů. To může přispívat k potlačení tvorby nespecifických protilátek v imunizovaném zvířeti. Protein produkovaný v *E. coli* je často získán v denaturované formě inkluzních tělísek. Takový protein není správně sbalený a nevykazuje biologickou aktivitu, což pro imunizaci může být výhodné.

5.3.1. Klonování SmCB2 do *pHTT2* plazmidu

Pro expresi SmCB2 v *E. coli* byl použit plazmid *pHTT2*. Plazmid *pHTT2* umožňuje připojit histidinový hexapeptid (histidinová kotva) na konec řetězce rekombinantního proteinu. Pomocí této značky lze protein purifikovat za použití chelatační afinitní chromatografie. Tento plazmid také umožňuje produkci proteinu ve formě fúzního konstruktů s thioredoxinem (fúzní protein SmCB2 a thioredoxinu je označován jako SmCB2*), čímž je dosaženo lepší rozpustnosti. Mezi vkládaným inzertem a nukleotidovou sekvencí pro thioredoxin se nachází tzv. TEV místo. Jedná se o sekvenci rozpoznávanou a štěpenou TEV proteázou. Použitím TEV proteázy dochází k vyštěpení SmCB2 z fúzního konstruktů (Obr. 18) (kap. 4.3.2.12.).



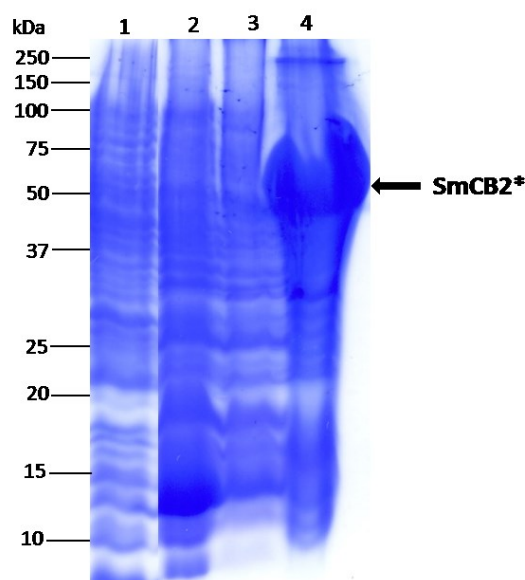
Obr. 18. Schématické znázornění fúzního konstruktů SmCB2* obsahujícího SmCB2 a thioredoxin.

Podle cDNA sekvence SmCB2 byly navrženy primery pro amplifikaci PCR, které obsahovaly restrikční místa pro endonukleázy. Pomocí primerů byla metodou PCR amplifikována DNA SmCB2. PCR produkt byl analyzován na horizontální agarózové elektroforéze, která potvrdila správnou velikost PCR produktů. Získaný úsek DNA byl vyříznut z gelu a extrahován. Poté byl štěpen odpovídajícími restrikčními endonukleázami a klonován do analogicky štěpeného plazmidu *pHTT2* pomocí T4 DNA ligázy (kap. 4.3.2.2.). Vzniklým konstruktem byly transformovány buňky *E. coli* metodou teplotního šoku. Buňky se nechaly růst na miskách s LB agarem obsahujícím antibiotikum kanamycin, proti kterému nese plazmid

pHTT2 rezistenci. Vybrané narostlé kolonie byly použity pro přípravu plasmidové DNA (kap. 4.3.2.) a následně bylo správné začlenění DNA úseku kódujícího SmCB2 do plazmidu zkontrolováno pomocí sekvenování.

5.3.2. Průběh exprese SmCB2 v *E. coli*

Expres SmCB2* proběhla v buňkách *E. coli* *SHuffle*® *T7 Express lysY*, které byly transformovány vektorem *pHTT2* obsahujícím sekvenci kódující SmCB2* metodou teplotního šoku. Rekombinantní protein byl exprimován při 16°C za aerace v LB/K médiu. Indukce exprese byla provedena přidáním IPTG. Po ukončení kultivace byly buňky odstředěny, lyzovány a byla provedena izolace inkluzních tělísek (Obr. 19). Z výsledků vyplývá, že SmCB2* byl akumulován v inkluzních tělískách.



Obr. 19. Příprava cytosolárních frakcí a inkluzních tělísek z exprese SmCB2* v *E. coli*. Jednotlivé frakce byly po dezintegraci buněk analyzovány pomocí SDS-PAGE. Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250. Šipka označuje pozici SmCB2*.

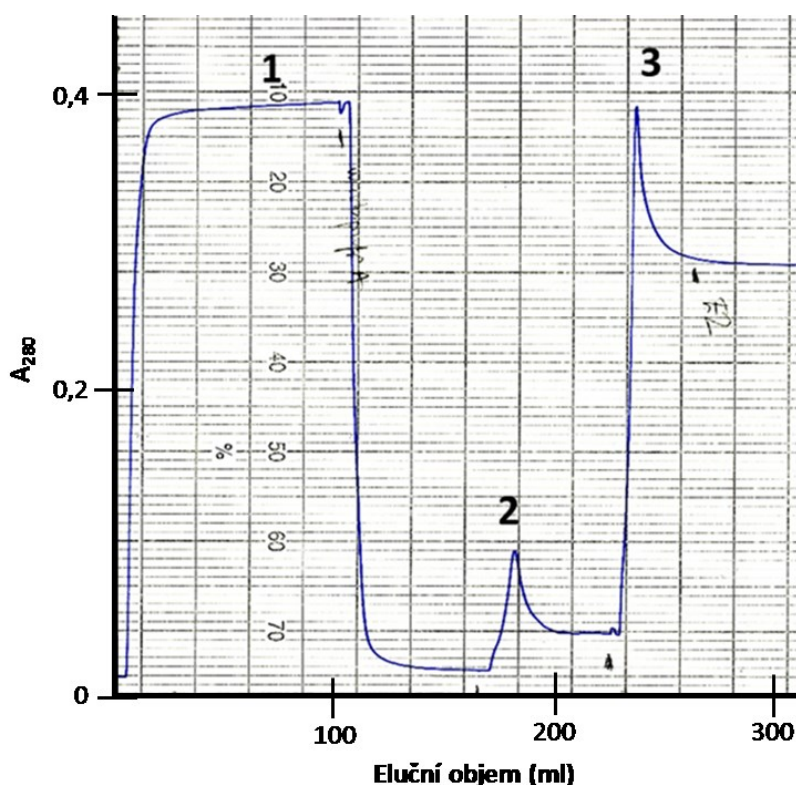
- 1-3 Frakce cytosolárních supernatantů S1-S3 (kap. 4.3.2.9.)
- 4 Inkluzní tělíska

5.3.3. Purifikace SmCB2 afinitní chelatační chromatografií

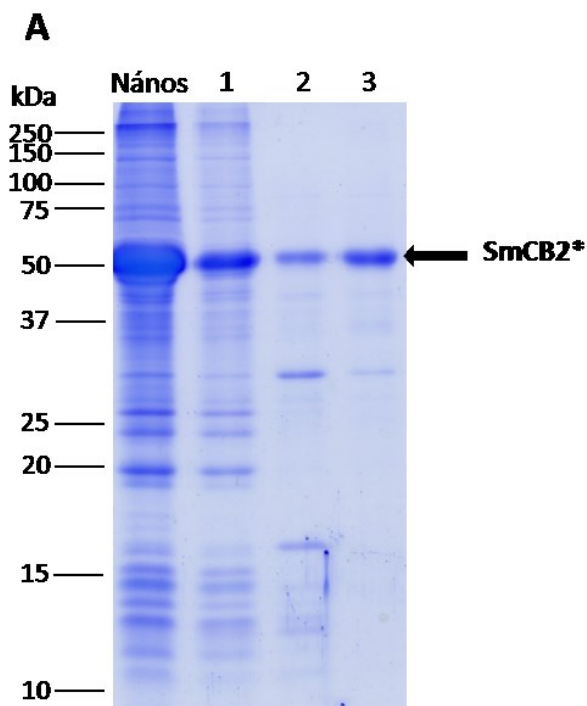
SmCB2* byl z rozpuštěných inkluzních tělísek izolován afinitní chelatační chromatografií na nosiči Hi-Trap IMAC FF (GE Healthcare) s imobilizovanými ionty Ni²⁺. Při této afinitní chromatografii dochází ke specifické vazbě mezi Ni²⁺ imobilizovaným na koloně a histidinovou kotvou připojenou na N-konci exprimovaného proteinu. Uvolnění SmCB2* z nosiče bylo provedeno elucí pomocí 250 mM imidazolu, který kompetuje o vazbu na Ni²⁺ ionty

s histidinovou kotvou rekombinantního proteinu. Záznam chromatografie je uveden na Obr. 20. Jednotlivé frakce získané během purifikace byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 21 A, str. 50). Z SDS-PAGE je patrné, že při promývání kolony (vrchol 2 na Obr. 20) došlo k uvolnění proteinů navázaných na koloně nespecifickými interakcemi a částečné eluci SmCB2. Část vzorku, která se na kolonu nenařadila (vrchol 1 na Obr. 20) byla znovu použita k opakované chromatografii. Eluční frakce (vrchol 3 na Obr. 20) pak obsahovala převážně čistý protein SmCB2*, jehož molární hmotnost odpovídá 50 kDa (Obr. 21A, str. 50). Ta odpovídá teoretické molární hmotnosti vypočítané ze sekvence fúzního SmCB2*.

Identita purifikovaného SmCB2* (vrchol 3) byla provedena LC-MS/MS analýzou, při které bylo dosaženo 96% pokrytí teoretické sekvence SmCB2* (Obr. 21 B, str. 50). Z 1 g rozpuštěných inkluzí se podařilo získat chelatační chromatografií 0,5 mg purifikovaného SmCB2*.



Obr. 20. Purifikace rekombinantního SmCB2* z inkluzních tělísek pomocí afinitní chromatografie na koloně s afinitním nosičem Hi-Trap IMAC FF. Na kolonu (5 ml) ekvilibrovanou pufrům o složení 10 mM Tris-HCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 8 M močovina byly nanášeny 4 ml směsi rozpuštěných inkluzí *E. coli* obsahující SmCB2*. Vrchol 1 je materiál, který nebyl navázan na nosič. Pro vymytí nespecificky navázaných proteinů byla kolona promyta ekvilibračním pufrům s 20 mM imidazolem (vrchol 2). Eluce probíhala elučním pufrům obsahujícím 250 mM imidazol (vrchol 3). Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením při vlnové délce 280 nm.



B

MNSSHHHHHHGSGMSDKI IHLTDDSEFDTDVLRKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIAD
EYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA
 NNNNNNNNNNNENLYFQAMGSDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWKAAPTTRFRTVVS
 DIRRMILGALPDPNGEQLETLCYI SDELPKSFDARVEWPHCPSTSEIRDQSSCGSCWAFG
 AVEAMSDR ICIKSKGKHKPFLSAENLVSCSSCGMCGNGGFPHSAWLYWKNQGIVTGDLYN
 TTNGCQPYEFPPCEHHVI GPLPSCDGDVETPSCKTNCQPGYNI PYEKDKWYGEKVYRIHSN
 PEATMLELMRNGPVEVDFFVYADFPNYKSGVYQHVSGALLGCHAVRLLGWGEENNVPYWLI
 ANSWNSDWGDKGYFKIVRGKNECGIESDVNAGIPKIKN

Obr. 21. **A:** SDS-PAGE analýza purifikace SmCB2* z inkluzních tělísek na koloně Hi-Trap IMAC FF. Jednotlivé dráhy obsahují materiál odpovídající absorbním vrcholům 1-3 (Obr. 20, str. 49) a materiál nanášený na kolonu (Nános). Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250. **B:** Identita purifikovaného SmCB2* byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS analýzou. Zeleně jsou zobrazeny oblasti sekvence pokryté identifikovanými peptidovými fragmenty. Sekvence thioredoxinu je podtržena.

5.4. Testování polyklonální protilátky proti SmCB2

K přípravě anti-SmCB2 polyklonální protilátky byl jako antigen použit rekombinantní protein ve formě fúzního konstruktů s thioredoxinem (SmCB2*). Protein byl připraven v expresním systému *E. coli* a purifikován afinitní chromatografií (kap. 5.3.3.). Polyklonální protilátka byla získána imunizací myši (kap. 4.3.5.) a testována metodou ELISA a pomocí imunoblotu.

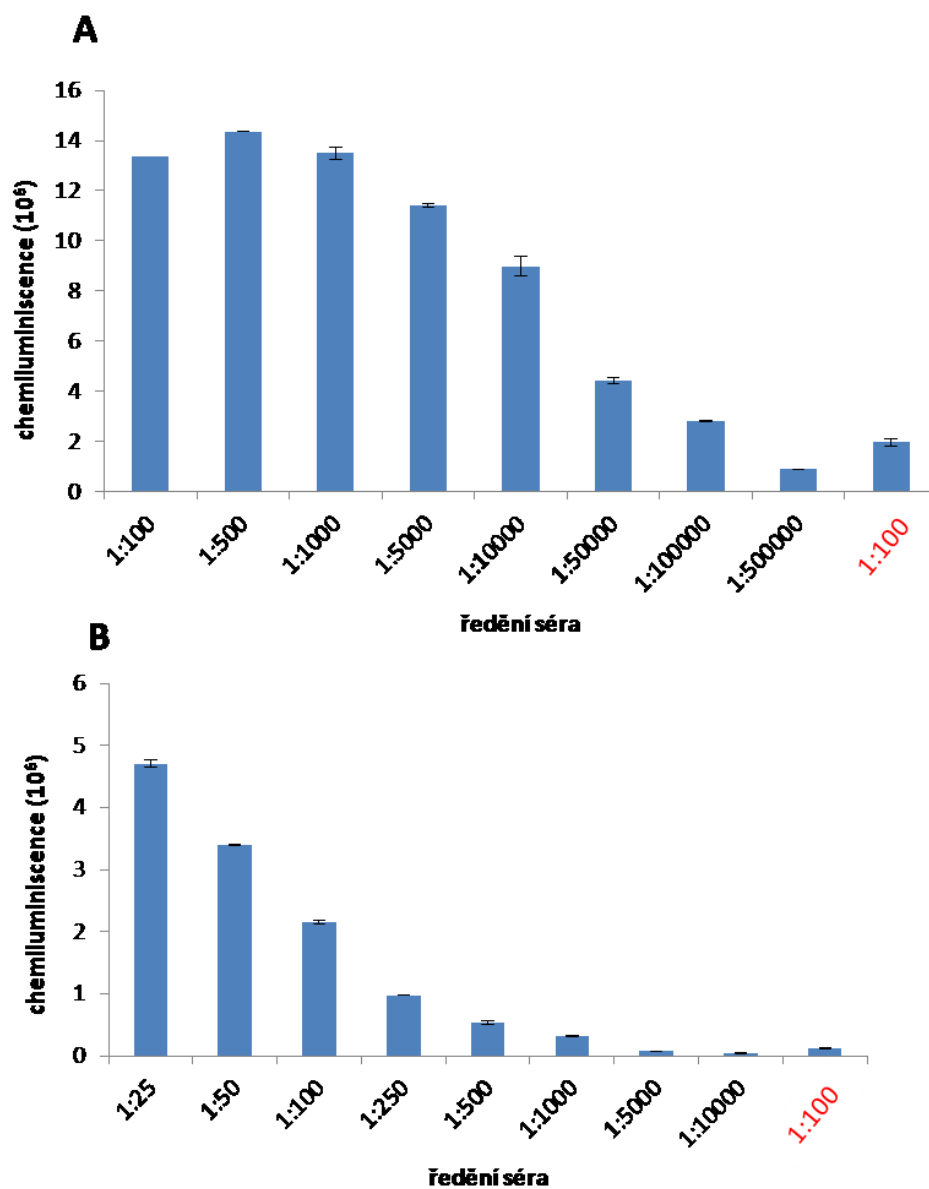
5.4.1. Kinetika tvorby protilátky proti SmCB2

Bylo imunizováno 10 myši (samci) kmene ICR. Každé zvíře bylo vakcinováno 4 dávkami v intervalech 10 dní. První imunizační dávka byla tvořena antigenem s kompletním Freundovým adjuvans, zbylé tři dávky s nekompletním Freundovým adjuvans, kdy 4 myši dostávali vyšší dávku antigenu (25 µg SmCB2*), 4 myši nižší dávku antigenu (10 µg SmCB2*). Zbylé 2 myši byly kontrolní a bylo u nich aplikováno pouze adjuvans bez antigenu.

5.4.1.1. Titrační analýza imunních sér

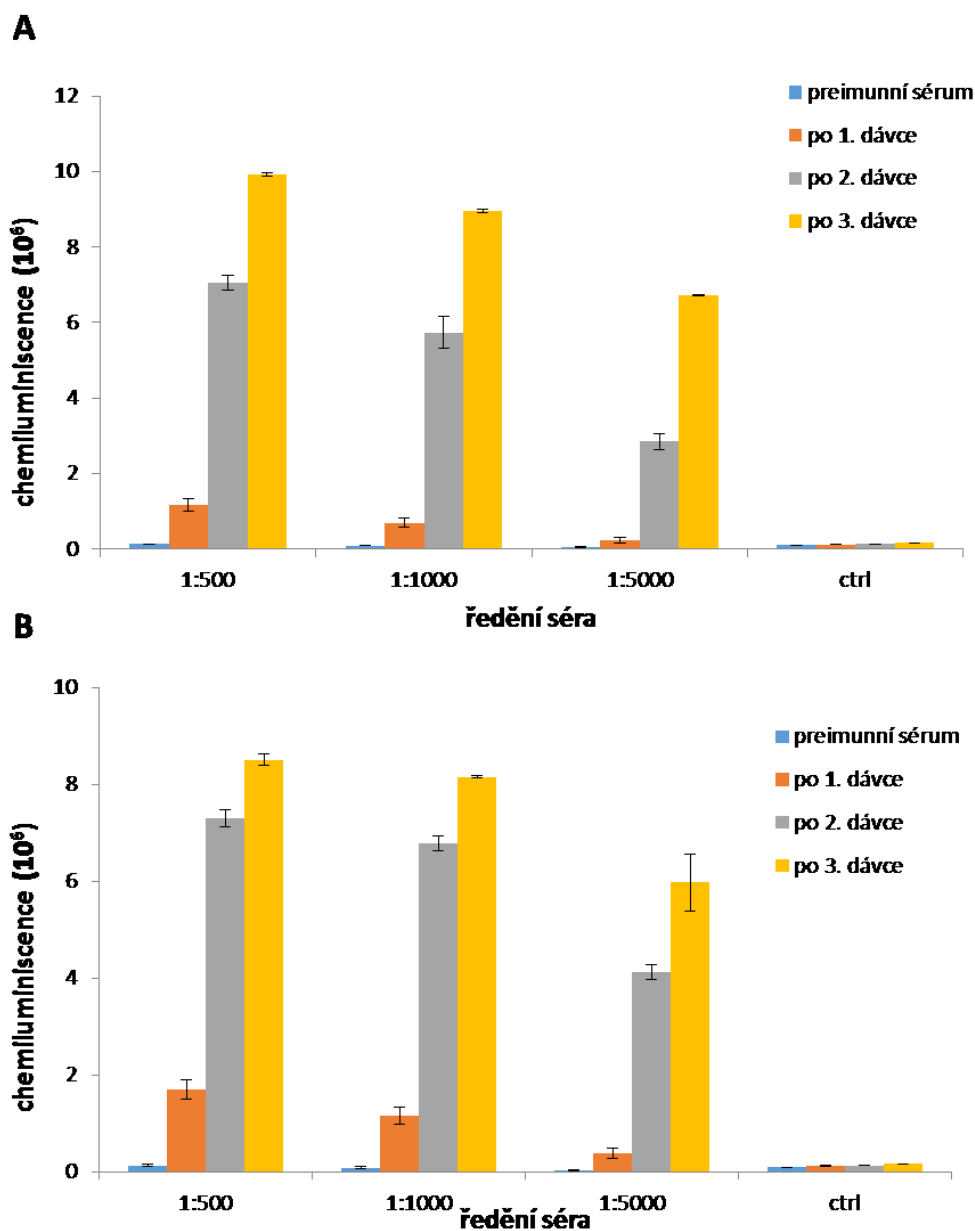
Krevní séra z osmi myši imunizovaných SmCB2* antigenem byla po skončení imunizace spojena a byly určeny titrační křivky za účelem stanovení vhodné koncentrace těchto sér pro další měření. Testování bylo provedeno metodou ELISA v mikrotitrační destičce a adsorbovaný antigen SmCB2* byl v těchto experimentech použit v množství 2 µg. Destička byla následně inkubována s anti-SmCB2* krevním sérem použitým v sériovém ředění. Po promytí a inkubaci se sekundární protilátkou proti myším IgG s konjugovanou HRP byl pro detekci odezvy použit chemiluminiscenční substrát. Jako negativní kontrola byla použita směs sér ze 2 kontrolních myši. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 22A, str. 52. Koncentrace anti-SmCB2* séra (určená jako stupeň zředění) používaná v dalších ELISA měřeních byla odečtena z lineární oblasti titrační křivky a pohybovala se v rozmezí 1:1000 až 1:5000 (Obr. 22A, str. 52). Titrační křivka umožnila odečíst titer anti-SmCB2* protilátky 1:100000 (tj. největší zředění protilátky umožňující detekci antigenu).

Stejným postupem byla stanovena titrační křivka pro krevní sérum z myši imunizovaných SmCB1 (protein poskytl Mgr. Adéla Jílková, Ph.D, séra poskytl Mgr. Lenka Ulrychová), (Obr. 22B, str. 52). Byla určena hodnota titru anti-SmCB1 séra 1:1000 a koncentrace séra používaná v dalších měřeních byla 1:100 až 1:500 (Obr. 22B, str. 52).



Obr. 22. Titrační křivky sér myši imunizovaných rekombinantním SmCB2* (A) a SmCB1 (B) změřené metodou ELISA s chemiluminiscenčním substrátem. V experimentu byl antigen adsorbován v množství 2 μ g a séra (anti-SmCB2* nebo anti-SmCB1) byla použita v uvedených ředěních (osa x). Séra myši, u kterých byl aplikován vakcinační protokol bez antigenu, jsou analyzována jako kontrolní (červeně).

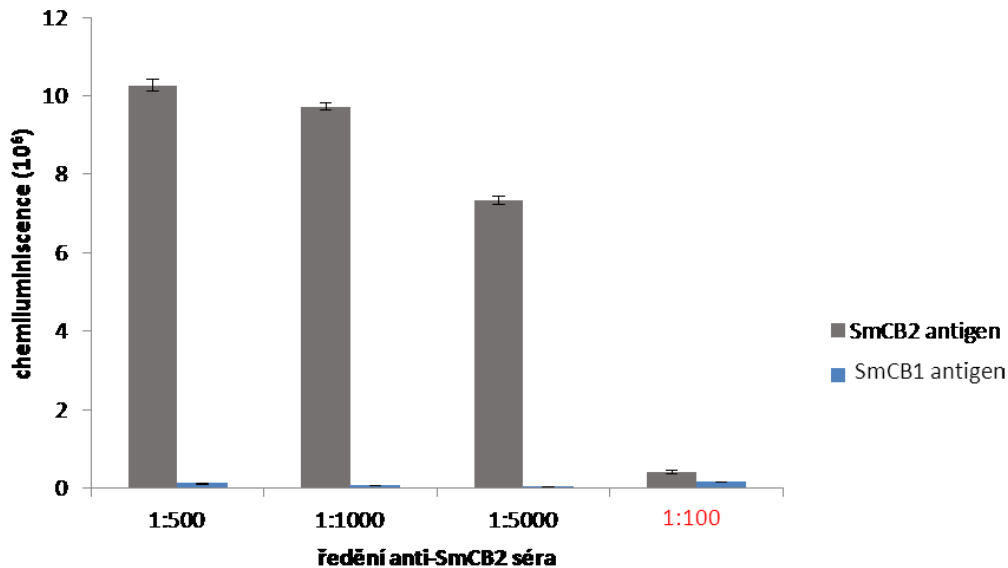
Krev byla odebírána z ocasní cévy myši před každou imunizační dávkou a krevní sérum bylo získáno centrifugací. Kinetika tvorby anti-SmCB2* protilátky byla monitorována pomocí ELISA za použití chemiluminiscenčního substrátu. V mikrotitrační destičce byl jako antigen adsorbován SmCB2* a byl následně inkubován s odebranými krevními séry, které byly spojeny do tří vzorků: (1) čtyř myši imunizovaných 10 μg SmCB2* (Obr. 23A, str. 54), (2) čtyř myši imunizovaných 25 μg SmCB2* (Obr. 23B, str. 54), (3) dvou kontrolních myši, u kterých bylo aplikováno pouze adjuvans. Ředění sér bylo zvoleno podle stanovení v kap. 5.4.1.1.. Destička byla promyta a po inkubaci se sekundární protilátkou proti myším IgG s konjugovanou s HRP byl přidán substrát a následně proměřena chemiluminiscence na čtečce Tecan Infinite M1000. Výsledky ukazují, že tvorba protilátek probíhala analogicky u myši, které byly imunizovány za použití nižší i vyšší dávky antigenu. K značnému nárůstu anti-SmCB2* protilátky došlo již po 2. imunizační dávce. U kontrolních myši nebyl detekován nárůst protilátek.



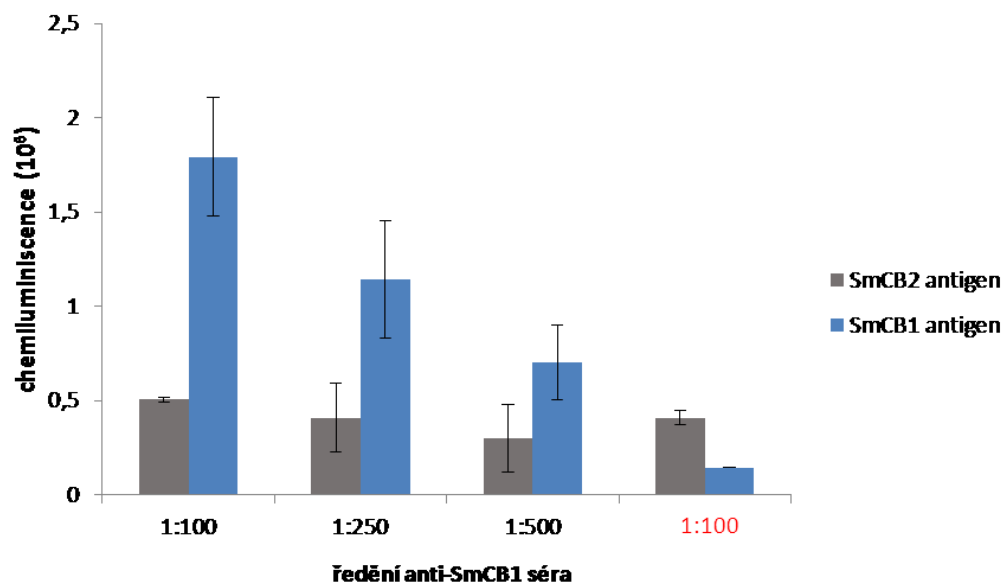
Obr. 23. Kinetika tvorby protilátky proti SmCB2*. Myši byly imunizovány 4 dávkami v intervalech 10 dnů. Krev byla odebírána z ocasní cévy myši před každou imunizační dávkou. Krevní sérum bylo získáno pomocí centrifugace a použito pro testování přítomnosti anti-SmCB2* protilátky metodou ELISA pomocí chemiluminiscence. V experimentu byl antigen adsorbován v množství 2 µg. Imunní séra byla testována ve třech ředěních. Kontrolní myši (ctrl) byly vakcinovány pomocí adjuvans bez antigenu. **A:** Vakcinace myši pomocí 10 µg SmCB2*. **B:** Vakcinace myši 25 µg SmCB2*.

5.4.2. Křížová reaktivita anti-SmCB2 a anti-SmCB1 protilátek

Proteázy SmCB2 a SmCB1 jsou homologické proteázy, jejichž aminokyselinová sekvence je přibližně z 50 % identická. Proto byla provedena analýza křížové reaktivity (a) anti-SmCB2* protilátky (připravena dle kap. 4.3.5.) k rekombinantnímu SmCB1 a (b) anti-SmCB1 protilátky (poskytnuto Mgr. Lenkou Ulrychovou) k rekombinantnímu SmCB2*. Reaktivita byla analyzována metodou ELISA postupem popsáným v kap. 4.3.7., použitá koncentrace sér byla určena z titračních křivek (Obr. 22, str. 52). Z výsledků vyplývá, že jak anti-SmCB2*, tak anti-SmCB1 protilátka nevykazuje křížovou reaktivitu k proteinu SmCB1, resp. SmCB2* a byla tak potvrzena jejich specifita (Obr. 24 a Obr. 25, str. 56). V dalším kroku byla anti-SmCB2* protilátka purifikována pomocí afinitní chromatografie na koloně Protein A Sepharose (5.4.5.) a použita k imunolokalizaci SmCB2 v parazitovi (kap. 5.5.).



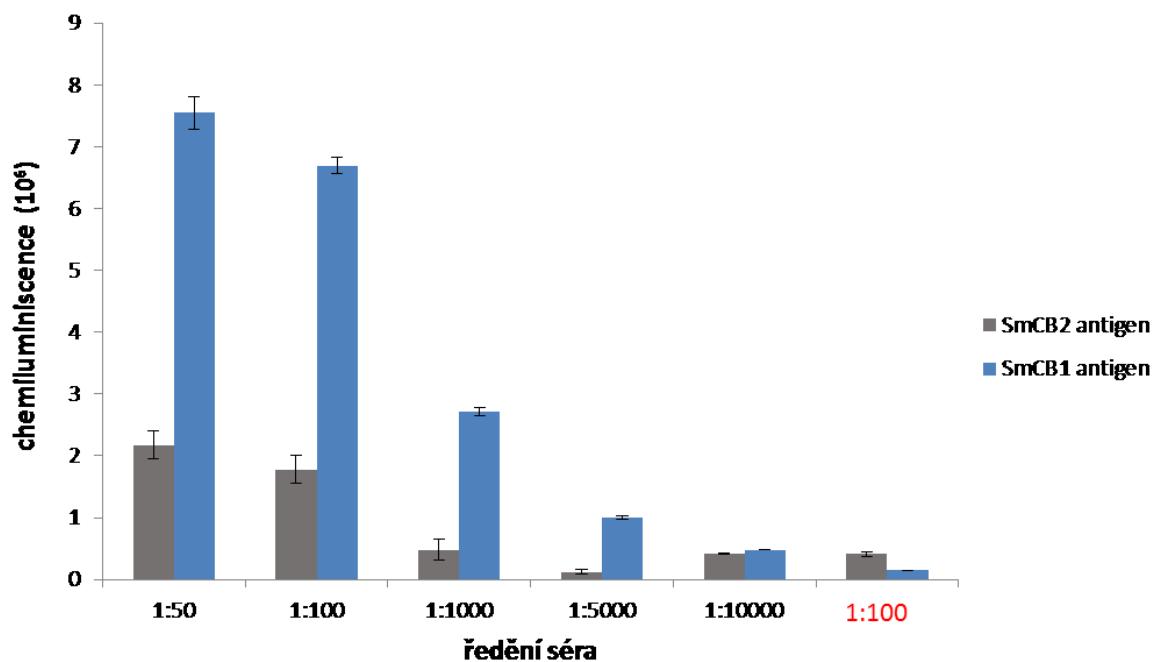
Obr. 24. Test křížového rozpoznání antigenu SmCB1 protilátkou proti SmCB2*. K měření byla použita metoda ELISA s chemiluminiscenční detekcí. Jako antigen byl v experimentech adsorbován SmCB2* nebo SmCB1 v množství 2 μ g. Použito bylo sérum myši imunizovaných proti SmCB2* ve třech koncentracích a sérum kontrolních myši, které byly vakcinovány pomocí adjuvans bez antigenu (červeně).



Obr. 25. Test křížového rozpoznání antigenu SmCB2* protilátkou proti SmCB1. K měření byla použita metoda ELISA s chemiluminiscenční detekcí. Jako antigen byl v experimentech adsorbován SmCB2* nebo SmCB1 v množství 2 μ g. Použito bylo sérum myši imunizovaných proti SmCB1 ve třech koncentracích a sérum kontrolních myši, které byly vakcinovány pomocí adjuvans bez antigenu (červeně).

5.4.3. Rozpoznání SmCB2 a SmCB1 hostitelem jako antigenů při infekci *S. mansoni*

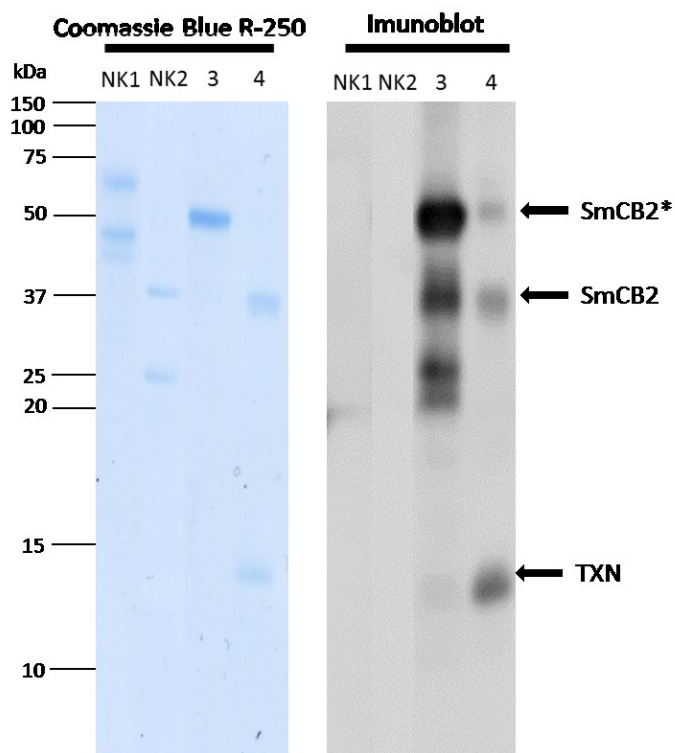
Pomocí ELISA analýzy bylo testováno, jestli je rekombinantní SmCB2* a SmCB1 rozeznáván protilátkami v sérech myši, které byly infikovány *S. mansoni*. K tomuto účelu byla použita směs sér z myši, která byla získána po 6. týdnu nákazy (poskytnuto Mgr. Martou Chanovou, Ph.D.). V mikrotitrační destičce byl adsorbován antigen SmCB2* nebo SmCB1 v množství 2 μ g. Používána byla séra v pěti ředěních z pěti infikovaných myši a v kontrolním pokusu séra dvou myši nenakažených. Z výsledků vyplývá, že při ředění séra 1:100 je SmCB2 významně rozeznáván protilátkami z infikovaných myši, signál je přibližně 3x vyšší oproti kontrole (Obr. 26, str. 57). Pro SmCB1 platí, že je při stejném ředění je signál asi 6x vyšší u sér infikovaných myši oproti kontrole.



Obr. 26. Rozpoznání antigenů SmCB2* a SmCB1 protilátkami v sérech myši infikovaných *S. mansoni* bylo měřeno metodou ELISA s chemiluminiscenční detekcí. V experimentu byl antigen adsorbován v množství 2 μg . K analýze bylo použito sérum infikovaných myši v pěti koncentracích a sérum nenakažených myši jako kontrola (červeně).

5.4.4. Analýza interakce anti-SmCB2 protilátky pomocí imunoblotu

Metodou imoblotu byla testována interakce polyklonální protilátky připravené proti rekombinantnímu SmCB2* s tímto imunizačním antigenem (Obr. 27, str. 58). Výsledky ukazují, že anti-SmCB2* protilátka rozpoznávala jak celý antigen SmCB2* (dráha 3 na Obr. 27, str. 58), tak SmCB2 a thioredoxin vyštěpené z fúzního proteinu SmCB2* pomocí TEV proteázy (dráha 4, Obr. 27, str. 58). Naproti tomu, negativní kontroly hovězího sérového albuminu (BSA), slepičího ovalbuminu (OVA) a rekombinantního proteinu SmSP2 ze *S. mansoni* (produkovaného v bakterii *E. coli* stejně jako SmCB2) nebyly protilátkou rozpoznávány (dráhy NK1 a NK2 na Obr. 27, str. 58). To prokazuje, že připravená protilátka rozeznává specificky SmCB2 v jeho fúzní (SmCB2*) i vyštěpené (SmCB2) podobě. Touto protilátkou je rozeznáván i thioredoxin, který je součástí fúzního konstruktů.

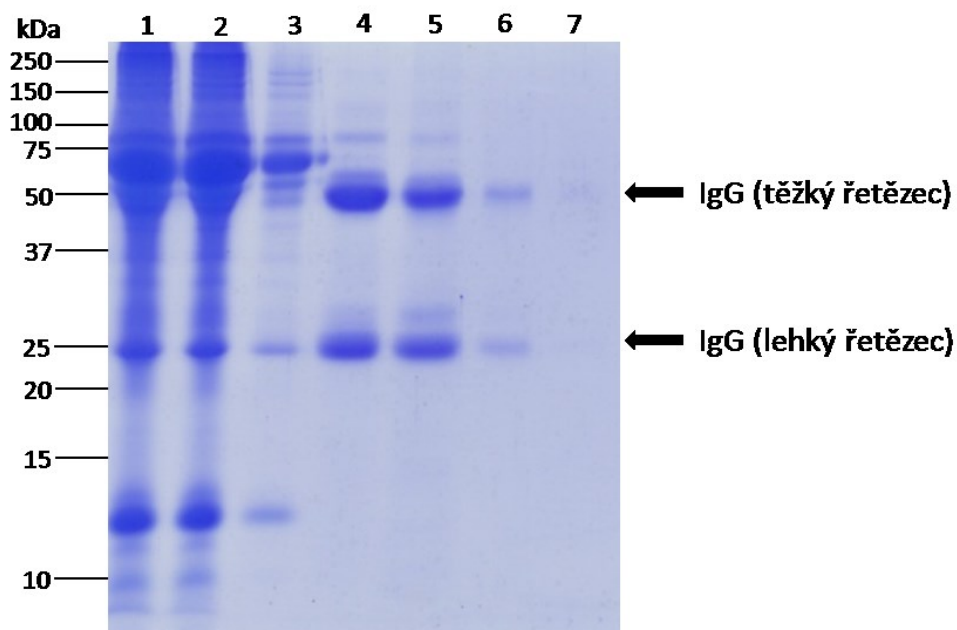


Obr. 27. Interakce polyklonální protilátky anti-SmCB2* s imunizačním antigenem. Testované proteiny byly rozděleny na SDS-PAGE a přeneseny na PVDF membránu. Byly detekovány (1) barvením membrány pomocí Coomassie Blue R-250 (vlevo) a (2) imunoblotem pomocí séra myši imunizovaných SmCB2* (ředění 1:5000), sekundární protilátky (proti myším IgG s navázanou HRP) a chemiluminiscenční vizualizace (vpravo). Jednotlivé dráhy jsou:

- NK1 Negativní kontrola: BSA, OVA
 NK2 Negativní kontrola 2: SmSP2 – rekombinantní protein produkovaný v bakterii *E. coli* jako SmCB2*
 3 Fúzní SmCB2*
 4 Fúzní SmCB2* štěpený TEV proteázou na SmCB2 a thioredoxin (TXN)

5.4.5. Purifikace anti-SmCB2 séra afinitní chromatografií

IgG frakce ze sér myši imunizovaných SmCB2* (kap. 4.3.5.) byla purifikována afinitní chromatografií na koloně Protein A Sepharose (kap. 4.3.6.). Průběh chromatografie byl analyzován pomocí SDS-PAGE (Obr. 28, str. 59). Na kolonu byly naneseny 2 ml séra. Kolona byla promyta 20 mM Na-fosfátovým pufrém, pH 7 (dráha 3) a eluce probíhala za použití 100 mM Na-citrátového pufru, pH 3. pH sbíraných elučních frakcí obsahujících IgG bylo ihned upraveno 1 M Tris-HCl pufrém na pH 8. Eluční frakce (dráhy 4 a 5 na Obr. 28, str. 59) obsahovaly především IgG; byly spojeny a použity pro imunolokalizaci SmCB2 v parazitovi (kap. 5.5.).

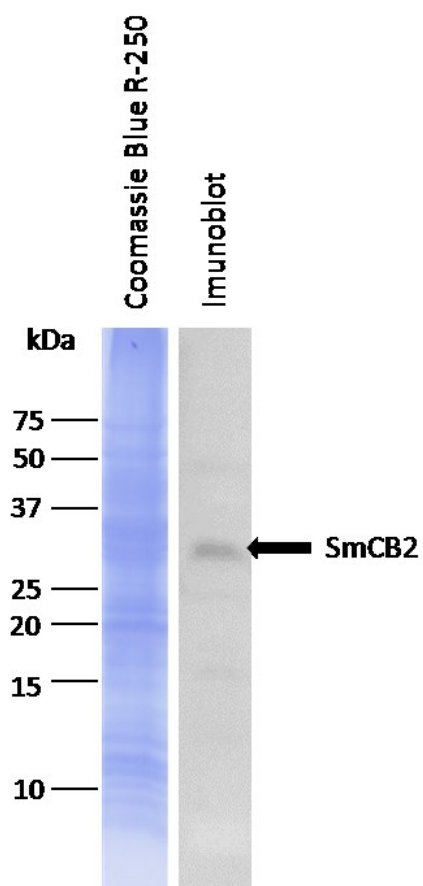


Obr. 28. SDS-PAGE analýza purifikace anti-SmCB2* protilátky z myšního séra pomocí afinitní chromatografie na koloně Protein A Sepharose. Jednotlivé dráhy jsou:

- 1 Krevní sérum nanášené na kolonu
- 2 Materiál nenavázaný na kolonu
- 3 Promytí 20 mM Na-fosfátovým pufrem, pH 7
- 4-7 Eluce 100 mM Na-citrátovým pufrem, pH 3

5.4.6. Imunodetekce nativního SmCB2 v homogenátu z červů *S. mansoni*

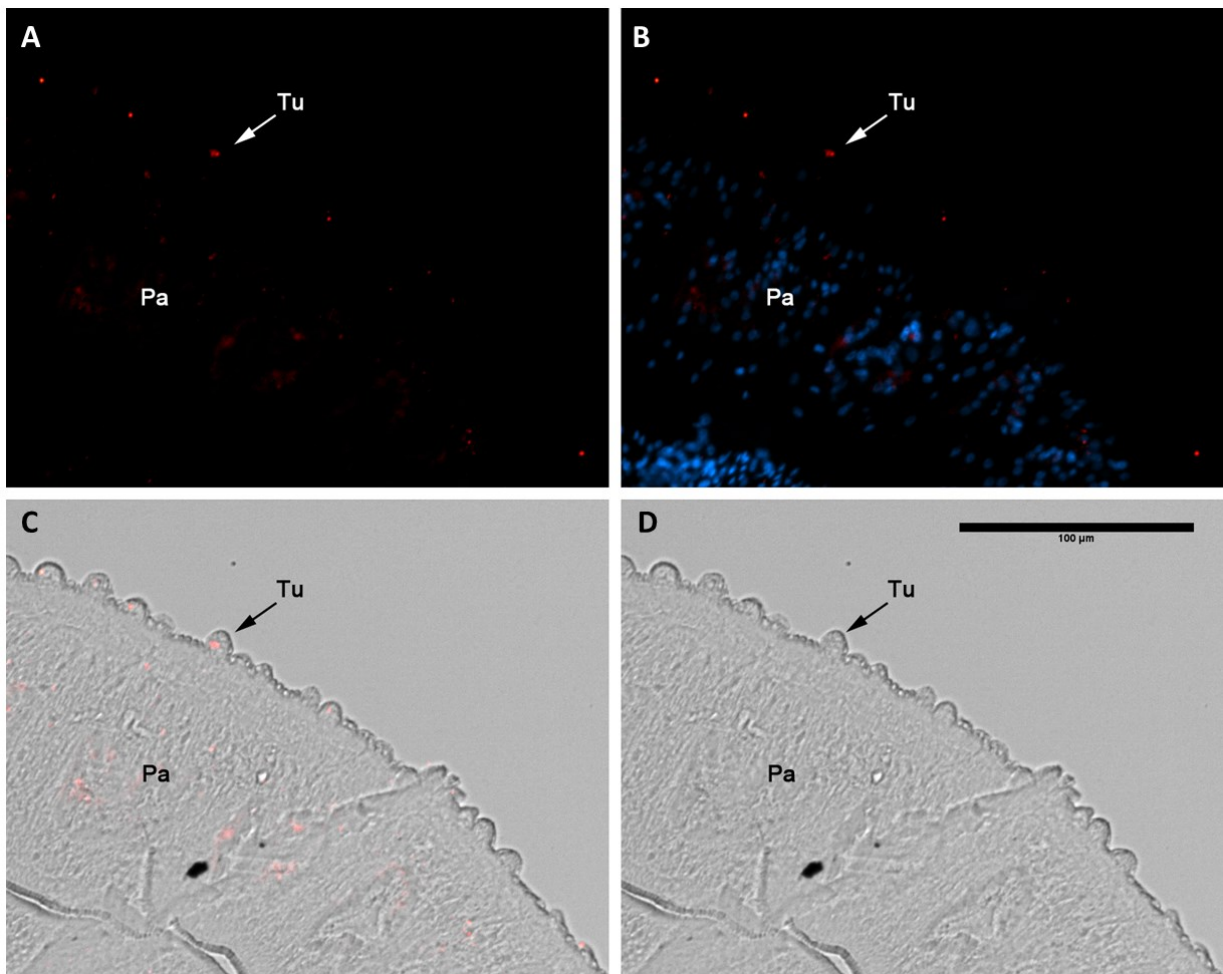
Purifikovaná anti-SmCB2* IgG frakce byla použita pro identifikaci nativního SmCB2 v homogenátu dospělců *S. mansoni* metodou imunoblotu. Detekovaný pás o molekulové hmotnosti 28 kDa odpovídá teoretické molekulové hmotnosti (vypočtené ze sekvence zralého SmCB2) a prokazuje přítomnost SmCB2 v analyzovaném homogenátu i specifitu připravené protilátky (Obr. 29, str. 60).



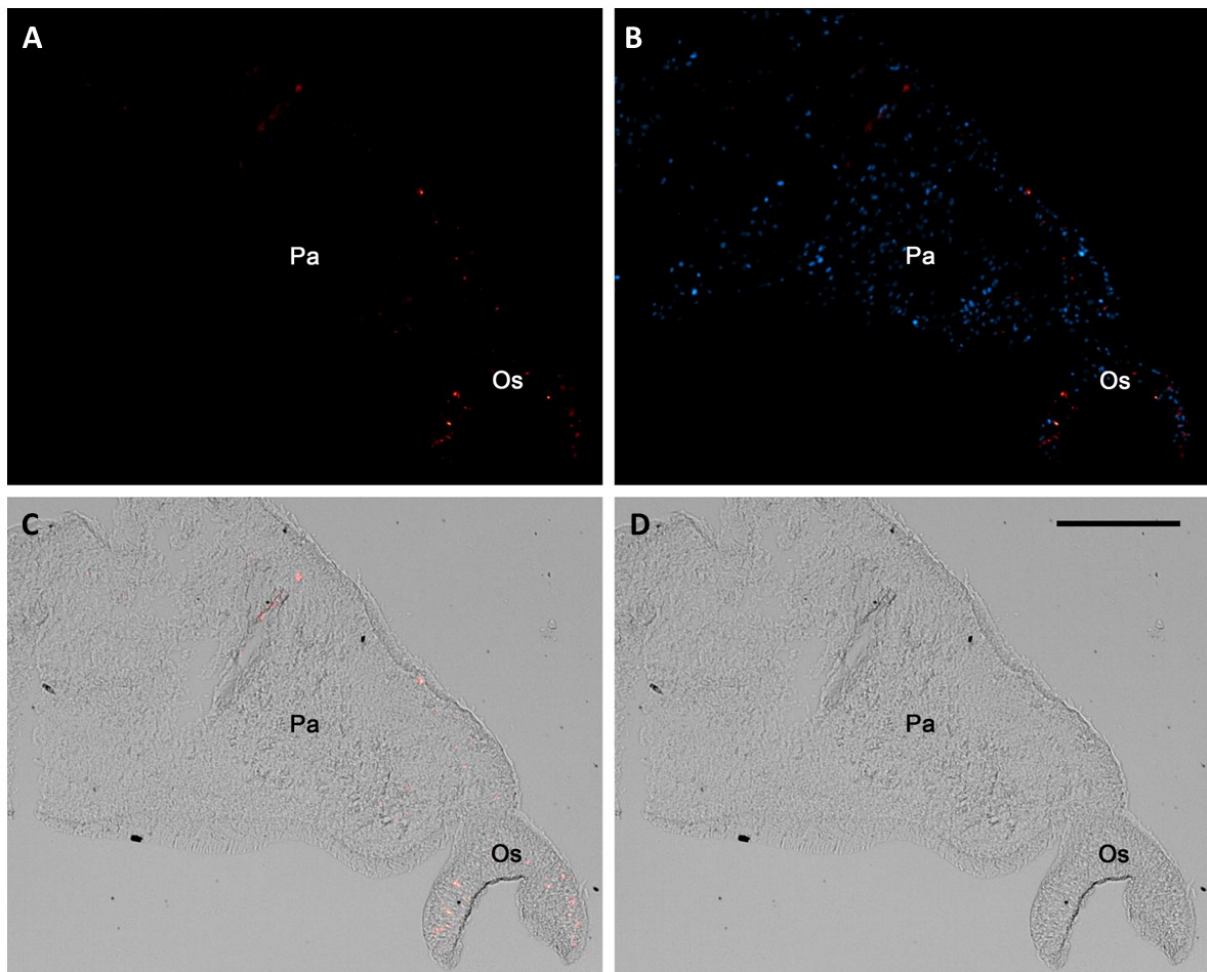
Obr. 29. Detekce nativní formy SmCB2 v proteinovém homogenátu z dospělé *S. mansoni* pomocí imunoblotu. Homogenát byl rozdělen na SDS-PAGE a přenesen na PVDF membránu. Proteiny byly detekovány barvením membrány pomocí Coomassie Blue R-250 (vlevo). Nativní SmCB2 (označeno šipkou) byl detekován imunoblotem s využitím purifikované anti-SmCB2* IgG frakce, sekundární protilátky proti myším IgG s navázanou HRP a chemiluminiscenční vizualizace (vpravo).

5.5. Imunolokalizace SmCB2 v červech *S. mansoni*

Purifikovaná anti-SmCB2* IgG frakce (kap. 5.4.5) (ředění 1:500) byla použita pro imunolokalizaci SmCB2 na tkáňových řezech (8 μm) dospělců *S. mansoni* pomocí fluorescenční mikroskopie. K vizualizaci byla použita sekundární fluorescenčně značená protilátka (červená). Slabý signál byl detekován v některých parenchymatických buňkách (Pa, Obr. 30 a Obr. 31, str. 62) a v oblasti ústního ústrojí (Os, Obr. 31, str. 62) parazita, naopak velmi silná intenzita SmCB2 byla zaznamenána v tuberkulích povrchového tegumentu (Tu, Obr. 30).



Obr. 30. Imunolokalizace SmCB2 v tělní části dospělé *S. mansoni*. K imunolokalizaci proteinu v parazitovi byl použita anti-SmCB2* IgG frakce (ředění 1:500) (kap. 5.4.5.) a sekundární fluorescenčně značená protilátka proti myším IgG (Alexa 647, červená). Jádra buněk byla vizualizována pomocí DAPI (modrá). A: SmCB2 (červená), B: SmCB2+DAPI, C: SmCB2 a diferenciální interferenční kontrast (DIC), D: DIC. SmCB2 byl nalezen v parenchymu (Pa) a v tuberkulích (Tu) povrchového tegumentu (zobrazeno šipkou).



Obr. 31. Imunolokalizace SmCB2 v hlavové části dospělce *S. mansoni*. K imunolokalizaci proteinu v parazitovi byl použita anti-SmCB2* IgG frakce (ředění 1:500) (kap. 5.4.5.) a sekundární fluorescenčně značená protilátka proti myším IgG (Alexa 647, červená). Jádra buněk byla vizualizována pomocí DAPI (modrá). A: SmCB2 (červená), B: SmCB2+DAPI, C: SmCB2 a diferenciální interferenční kontrast (DIC), D: DIC. SmCB2 byl nalezen v okolí ústního ústrojí (Os) a v parenchymu (Pa).

6. Diskuze

Krevničky jsou původcem závažného onemocnění zvané schistosomóza postihující více než 240 mil. lidí. Proteázy krevniček jsou perspektivními molekulárními cíli pro vývoj nových chemoterapeutik a vakcín proti schistosomóze, protože jsou nezbytné pro jejich životaschopnost a molekulární interakce s hostitelem. Diplomová práce se zabývala proteázou katepsinem B2 (SmCB2) z krevničky střešní (*S. mansoni*), jejíž biochemické vlastnosti a biologická funkce nebyly podrobně studovány. Zaměřila se na přípravu rekombinantního SmCB2, který umožnil pro následující studie: (1) identifikaci nových inhibitorů, (2) přípravu protilátek pro imunomikroskopickou lokalizaci a (3) detekci tvorby anti-SmCB2 protilátek v těle hostitele infikovaného krevničkou.

Rekombinantní SmCB2 byl připraven pomocí exprese v kvasinkách *P. pastoris*. V tomto expresním systému byl SmCB2 klonován a produkován ve formě neaktivního zymogenu. Bylo zjištěno, že v průběhu exprese a následné chromatografické purifikace v kyselém pH dochází k autokatalytické aktivaci tohoto enzymu a získání zralého proteinu v proteolyticky aktivním stavu. Toto chování je odlišné od homologické proteázy katepsin B1 (SmCB1) ze *S. mansoni*, u které dochází k autokatalytické aktivaci pouze v přítomnosti sulfatovaných polysacharidů (SP), jako jsou glykosaminoglykany (Jílková et al., 2014). Autoaktivace SmCB1 bez přítomnosti SP vede k tvorbě inaktivního intermediátu. Vysvětlení této skutečnosti dává srovnání sekvencí propeptidů SmCB2 a SmCB1. V propeptidu SmCB1 se nachází tzv. HB („heparin-binding“) motiv XBBXBBX (kde B je bazická aminokyselina a X je hydrofobická aminokyselina) pro interakci s glykosaminoglykany, který chybí v propeptidu SmCB2. Tento motiv byl identifikován pouze v trávicích katepsinech B u různých druhů parazitických motolic (Horn et al., 2011).

Práce přináší první popis inhibiční specifity SmCB2, pro který byla použita sada syntetických peptidomimetických inhibitorů, jež byly analyzovány pomocí aktivního testu *in vitro* s fluorogenním substrátem. Bylo testováno 20 inhibitorů s reaktivní vinylsulfonovou skupinou na peptidomimetické kostře s odlišnými substituenty. Pro tyto inhibitory byly stanoveny hodnoty IC_{50} a byly identifikovány první účinné inhibitory SmCB2 blokující jeho proteolytickou aktivitu v submikromolárních koncentracích. Stejná sada vinylsulfonových inhibitorů byla testována i s rekombinantním SmCB1 (Jílková et al., 2011), kdy byly nalezeny inhibitory účinně blokující aktivitu SmCB1 již v subnanomolárních koncentracích. Srovnání citlivosti obou izoenzymů k těmto inhibitorům ukazuje, že inhibiční specifita SmCB2 a SmCB1 je odlišná. To lze vysvětlit rozdílností ve struktuře jejich aktivních míst (oba izoenzymy

vykazují přibližně 50 % identitu v aminokyselinové sekvenci (Caffrey et al, 2002)). Získané výsledky umožňují v dalším období vyvinout selektivní inhibitory pro SmCB2, které bude možné použít pro validaci tohoto enzymu jako cílové molekuly pro antischistosomální inhibitory a studium jeho biologické funkce. Další strategií je vývoj inhibitorů vysoce účinných současně pro SmCB2 i SmCB1, které by umožnily využít potenciální kumulativní supresivní efekt v testech na živých krevničkách. Pro vývoj takových inhibitorů se zdá být vinylsulfonová peptidomimetická kostra vhodná, protože inhibitory tohoto typu byly v několika studiích úspěšně použity pro supresi *S. mansoni* v testech *ex vivo* na parazitech v kultuře (Jílková et al., 2011). Vinylsulfonový inhibitor K11777 byl také testován *in vivo* na myších infikovaných *S. mansoni*, kdy po jeho aplikaci došlo ke snížení orgánových patologií spojených se schistosomózou (Abdulla et al., 2007).

Proti rekombinantnímu SmCB2 byla připravena polyklonální protilátka imunizováním skupiny myší. Kinetika tvorby této protilátky byla analyzována metodou ELISA a byl získán titer anti-SmCB2 séra, který ukazuje, že SmCB2 je dobrý imunogen. Testováním anti-SmCB2 protilátky metodou imunoblotu a ELISA byla potvrzena její specifita, zejména negativní křížová reaktivita k homologickému izoenzymu SmCB1.

Pomocí získané anti-SmCB2 protilátky byla provedena imunolokalizace SmCB2 v dospělých červech *S. mansoni* pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie. SmCB2 byl lokalizován v parenchymu a povrchové tegumentální vrstvě parazita. Tato lokalizace byla již dříve zjištěna pomocí světlené mikroskopie (Caffrey et al., 2002) a koreluje s výsledkem diplomové práce. Použití konfokální fluorescenční mikroskopie přineslo detailnější a přesnější data o lokalizaci SmCB2 v tkáni parazita. Tato analýza potvrzuje, že SmCB2 má zcela odlišnou lokalizaci než SmCB1, který se nachází ve střevě (v lumen i v tkáni) krevničky, kde hraje zásadní roli při trávení hemoglobinu (Sajid et al., 2003). Povrchová lokalizace SmCB2 naznačuje, že tento izoenzym není součástí hemoglobinolytické kaskády a spíše se uplatňuje při interakcích s molekulárními systémy hostitele.

Diplomová práce přinesla první důkaz, že SmCB2 je rozpoznáván imunitním systémem hostitele při infekci *S. mansoni*. Studie byla provedena pomocí ELISA testů séra infikovaných myší. Tímto přístupem bylo prokázáno, že SmCB2 je rozpoznávaným parazitárním antigenem při schistosomóze, a představuje tak potenciální sérodiagnostický marker. Značná antigenní schopnost v infikovaných hostitelích (člověk a myš) byla prokázána i pro SmCB1, který byl původně objeven jako parazitární antigen Sm31 (Ruppel et al., 1987). K imunogenitě SmCB1 a SmCB2 přispívá jejich lokalizace: SmCB1 je částečně sekretován z trávicího traktu a SmCB2 je povrchový protein. Oba izoenzymy byly identifikovány v exkrečně/sekrečních produktech

dospělců *S. mansoni* (Hansell et al., 2008). Zjištěná imunogenita a povrchová lokalizace SmCB2 je zajímavá z pohledu vývoje nových antischistosomálních vakcín, kterým je v současné době věnována značná pozornost (El Ridi et al., 2015).

7. Závěr

Diplomová práce se zabývala katepsinem B2 (SmCB2) z krevničky střešní (*S. mansoni*), který představuje málo prozkoumaný proteolytický enzym tohoto medicínálně významného parazita. Zejména se soustředila na biochemické aspekty regulace enzymové aktivity SmCB2, na lokalizaci SmCB2 v těle parazita a jeho rozpoznávání imunitním systémem hostitele.

Hlavní výsledky diplomové práce jsou následující:

- Rekombinantní SmCB2 byl připraven v enzymaticky aktivní formě pomocí exprese v kvasinkách *P. pastoris*. Pro jeho purifikaci byl vyvinut několikastupňový chromatografický protokol. Identita SmCB2 byla potvrzena hmotnostní spektrometrií a proteinovým sekvenováním.
- Byla analyzována citlivost rekombinantního SmCB2 k sadě peptidomimetických vinylsulfonových inhibitorů v aktivním testu *in vitro* s fluorogenním substrátem. Byly identifikovány první účinné inhibitory SmCB2 s hodnotami IC_{50} nižšími než 0,1 μ M.
- Neaktivní forma SmCB2 byla připravena pomocí exprese v bakteriích *E. coli* a chromatograficky purifikována. Tento protein byl použit pro produkci polyklonálních protilátek v myších. Z analýzy kinetiky tvorby protilátkové odpovědi metodou ELISA vyplývá, že SmCB2 je dobrý imunogen. Specifita anti-SmCB2 protilátky byla ověřena negativní křížovou reaktivitou k homologickému enzymu SmCB1 z *S. mansoni*.
- Pomocí získaných protilátek byl SmCB2 lokalizován konfokální imunomikroskopií na dospělých červech *S. mansoni*. SmCB2 se vyskytuje v povrchové vrstvě (tegumentu), kde může potenciálně interagovat s molekulárními systémy hostitele.
- Bylo zjištěno, že v sérech myší infikovaných *S. mansoni* se vytvářejí protilátky proti SmCB2, který tak představuje antigen pro potenciální diagnostické aplikace.

Krevničky jsou původcem schistosomózy, významného parazitárního onemocnění, jež postihuje více než 240 mil. lidí. Proteázy krevniček jsou perspektivními molekulárními cíli pro vývoj nových chemoterapeutik a vakcín proti schistosomóze. Tato práce přináší nové významné informace o SmCB2 jako potenciální cílové molekule pro nové syntetické inhibitory a jako novém antigenu pro vakcinační studie.

8. Seznam použité literatury

- Abdulla, M.-H., Lim, K.-C., Sajid, M., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2007. Schistosomiasis Mansonii: Novel Chemotherapy Using a Cysteine Protease Inhibitor. *PLOS Med.*
- Abdulla, M.-H., Ruelas, D.S., Wolff, B., Snedecor, J., Lim, K.-C., Xu, F., Renslo, A.R., Williams, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2009. Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3.
- Austin, F.G., Stirewalt, M.A., Danziger, R.E., 1972. *Schistosoma mansoni*: Stimulatory effect of rat skin lipid fractions on cercarial penetration behavior. *Exp. Parasitol.* 31
- Baici, A., Lang, A., Hörler, D., Kissling, R., Merlin, C., 1995. Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 54, 289–297.
- Barrett, A.J., McDonald, J.K., 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.* 237, 935.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al-Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., Aslett, M.A., Bartholomeu, D.C., Blandin, G., Caffrey, C.R., Coghlan, A., Coulson, R., Day, T.A., Delcher, A., DeMarco, R., Djikeng, A., Eyre, T., Gamble, J.A., Ghedin, E., Gu, Y., Hertz-Fowler, C., Hirai, H., Hirai, Y., Houston, R., Ivens, A., Johnston, D.A., Lacerda, D., Macedo, C.D., McVeigh, P., Ning, Z., Oliveira, G., Overington, J.P., Parkhill, J., Perte, M., Pierce, R.J., Protasio, A.V., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Sajid, M., Salzberg, S.L., Stanke, M., Tivey, A.R., White, O., Williams, D.L., Wortman, J., Wu, W., Zamanian, M., Zerlotini, A., Fraser-Liggett, C.M., Barrell, B.G., El-Sayed, N.M., 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460, 352–358.
- 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. *J. Parasitol.* 87, 237–241.
- Bourke, C.D., Prendergast, C.T., Sanin, D.E., Oulton, T.E., Hall, R.J., Mountford, A.P., 2015. Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection. *Int. J. Parasitol.* 45, 215–224.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., Jordans, S., 2008. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 90, 194–207.
- Butterworth, A.E., Curry, A.J., Dunne, D.W., Fulford, A.J., Kimani, G., Kariuki, H.C., Klumpp, R., Koech, D., Mbugua, G., Ouma, J.H., 1994. Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni. *Trop. Geogr. Med.* 46, 197–208.
- Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M., 2004. Blood “n” guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 20, 241–248.
- Caffrey, C.R., Salter, J.P., Lucas, K.D., Khiem, D., Hsieh, I., Lim, K.-C., Ruppel, A., McKerrow, J.H., Sajid, M., 2002. SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 49–61.
- Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, G.P., 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 63–88. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.63
- Cheever, A.W., Hoffmann, K.F., Wynn, T.A., 2000. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today* 21, 465–466.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S., 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* 201, 19–25.

- 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. *J. Biol. Chem.* 281, 39316–39329.
- Doetze, A., Satoguina, J., Burchard, G., Rau, T., Löliger, C., Fleischer, B., Hoerauf, A., 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int. Immunol.* 12, 623–630.
- Dubin, G., 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 653–669.
- El Ridi, R., Othman, A.A., McManus, D.P., 2015. Editorial: The Schistosomiasis Vaccine – It is Time to Stand up. *Front. Immunol.* 6.
- Fallon, P.G., Richardson, E.J., McKenzie, G.J., McKenzie, A.N.J., 2000. Schistosome Infection of Transgenic Mice Defines Distinct and Contrasting Pathogenic Roles for IL-4 and IL-13: IL-13 Is a Profibrotic Agent. *J. Immunol.* 164, 2585–2591.
- Felleisen, R., Klinkert, M.Q., 1990. In vitro translation and processing of cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 9, 371–377.
- Fenwick, A., 2006. Waterborne Infectious Diseases; Could They Be Consigned to History? *Science* 313, 1077–1081.
- Gryseels, B., de Vlas, S.J., 1996. Worm burdens in schistosome infections. *Parasitol. Today* 12, 115–119.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet Lond. Engl.* 368, 1106–1118.
- Haas, W., Grabe, K., Geis, C., Päch, T., Stoll, K., Fuchs, M., Haberl, B., Loy, C., 2002. Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. *Parasitology* 124, 153–167.
- Hams, E., Aviello, G., Fallon, P.G., 2013. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front. Immunol.* 4, 89.
- Hansell, E., Braschi, S., Medzihradzky, K.F., Sajid, M., Debnath, M., Ingram, J., Lim, K.C., McKerrow, J.H., 2008. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e262.
- Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E., Katunuma, N., 1980. Inhibitions by E-64 Derivatives of Rat Liver Cathepsin B and Cathepsin L In Vitro and In Vivo. *J. Biochem. (Tokyo)* 88, 1805–1811.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., Wynn, T.A., 2000. IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. *J. Immunol.* 164, 6406–6416.
- Horn, M., Fajtová, P., Rojo Arreola, L., Ulrychová, L., Bartošová-Sojková, P., Franta, Z., Protasio, A.V., Opavský, D., Vondrášek, J., McKerrow, J.H., Mareš, M., Caffrey, C.R., Dvořák, J., 2014. Trypsin- and Chymotrypsin-like serine proteases in *Schistosoma mansoni*-- “the undiscovered country.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2766.
- Horn, M., Jílková, A., Vondrášek, J., Marešová, L., Caffrey, C.R., Mareš, 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 Chem. Biol.* 6, 609–617.
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Sachs, S.E., Sachs, J.D., 2006. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. *PLOS Med.* 3, e102.
- Hozumi, M., Ogawa, M., Sugimura, T., Takeuchi, T., Umezawa, H., 1972. Inhibition of Tumorigenesis in Mouse Skin by Leupeptin, a Protease Inhibitor from Actinomycetes. *Cancer Res.* 32, 1725–1728.

- Incani a McLaren, 1984. Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.*, 3, 259-76
- Jankovic, D., Aslund, L., Oswald, I.P., Caspar, P., Champion, C., Pearce, E., Coligan, J.E., Strand, M., Sher, A., James, S.L., 1996. Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 157, 806–814.
- Jedezsko, C., Sloane, B.F., 2004. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.* 385, 1017–1027.
- Jenkins, S.J., Hewitson, J.P., Ferret-Bernard, S., Mountford, A.P., 2005. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.* 17, 1409–1418.
- Jenkins, S.J., Mountford, A.P., 2005. Dendritic Cells Activated with Products Released by Schistosome Larvae Drive Th2-Type Immune Responses, Which Can Be Inhibited by Manipulation of CD40 Costimulation. *Infect. Immun.* 73, 395–402.
- Jesus, D., Ribeiro, A., Silva, A., Santana, L.B., Magalhães, A., Jesus, D., Almeida, A., Almeida, D., Pacheco, R., Rêgo, M.A.V., Burattini, M.N., Pearce, E.J., Carvalho, E.M., 2002. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis mansoni. *J. Infect. Dis.* 185, 98–105.
- Jílková, A., Horn, M., Řezáčová, P., Marešová, L., Fajtová, P., Brynda, J., Vondrášek, 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, 1786–1798.
- Jílková, A., Rezacová, P., Lepsík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfrlík, J., Brynda, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Mares, M., 2011a. Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 286, 35770–35781.
- King, C.L., Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J.H., Kazura, J.W., 1998. B Cell Sensitization to Helminthic Infection Develops In Utero in Humans. *J. Immunol.* 160, 3578–3584.
- Knudsen, G.M., Medzihradzsky, K.F., Lim, K.-C., Hansell, E., McKerrow, J.H., 2005. Proteomic Analysis of *Schistosoma mansoni* Cercarial Secretions. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1862–1875.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Lawrence, J.D., 1973. The Ingestion of Red Blood Cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 59, 60–63.
- MacDonald, A.S., Straw, A.D., Bauman, B., Pearce, E.J., 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 1982–1988.
- Mangold, B.L., Dean, D.A., 1983. Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration from skin to lungs in naive mice. Evidence that most attrition occurs after the skin phase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 785–789.
- Matsunaga, Y., Saibara, T., Kido, H., Katunuma, N., 1993. Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. *FEBS Lett.* 324, 325–330.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., 'ng, Sajid, M., 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 497–536.
- McManus, D.P., Loukas, A., 2008. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 225–242.

- Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M.S., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e504.
- Michallet, M.-C., Saltel, F., Preville, X., Flacher, M., Revillard, J.-P., Genestier, L., 2003. Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion. *Blood* 102, 3719–3726.
- Michel, A., Ghoneim, H., Resto, M., Klinkert, M.Q., Kunz, W., 1995. Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 7–18.
- Mountford, A.P., Trottein, F., 2004. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. *Trends Parasitol.* 20, 221–226.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N., 1991. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 10, 2321–2330.
- Nishimura, Y., Kato, K., 1987. Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 254–259.
- Novinec, M., Lenarčič, B., 2013. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomol. Concepts* 4, 287–308.
- Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K., Abe, M., Harn, D.A., 1999. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J. Immunol. Baltim. Md* 163, 6712–6717.
- Paveley, R.A., Aynsley, S.A., Turner, J.D., Bourke, C.D., Jenkins, S.J., Cook, P.C., Martinez-Pomares, L., Mountford, A.P., 2011. The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production. *Int. J. Parasitol.* 41, 1335–1345.
- Pearce, E.J., Kane, C., Sun, J., Taylor, J., McKee, A.S., Cervi, L., 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Rev.* 201, 117–126.
- Pearce, E.J., MacDonald, A.S., 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 499–511.
- Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, Ö.D., James, K.E., 2002. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chem. Rev.* 102, 4639–4750.
- Quraishi, O., Nägler, D.K., Fox, T., Sivaraman, J., Cygler, M., Mort, J.S., Storer, A.C., 1999. The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 5017–5023.
- Rabello, A., 1995. Acute human schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 277–280.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A., 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40, D343–350.
- Riveau, G., Deplanque, D., Remoué, F., Schacht, A.-M., Vodougnon, H., Capron, M., Thiry, M., Martial, J., Libersa, C., Capron, A., 2012. Safety and Immunogenicity of rSh28GST Antigen in Humans: Phase I Randomized Clinical Study of a Vaccine Candidate against Urinary Schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1704.
- Ross, A.G., Vickers, D., Olds, G.R., Shah, S.M., McManus, D.P., 2007. Katayama syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 7, 218–224.
- Ruppel, A., Shi, Y.E., Wei, D.X., Diesfeld, H.J., 1987. Sera of *Schistosoma japonicum*-infected patients cross-react with diagnostic 31/32 kD proteins of *S. mansoni*. *Clin. Exp. Immunol.* 69, 291–298.

- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., Franklin, C., Kim, J.-H., Caffrey, C.R., 2003. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131, 65–75.
- Salter, J.P., Lim, K.-C., Hansell, E., Hsieh, I., McKerrow, J.H., 2000. Schistosome Invasion of Human Skin and Degradation of Dermal Elastin Are Mediated by a Single Serine Protease. *J. Biol. Chem.* 275, 38667–38673.
- Samuelson and Caulfield, 1985. The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.* 100, 1423–1434.
- Secor, W.E., 2012. The effects of schistosomiasis on HIV/AIDS infection, progression and transmission. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 3, 254-259.
- Shinde, U., Inouye, M., 2000. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 35–44.
- Shuhua, X., Binggui, S., Chollet, J., Tanner, M., 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. *Acta Trop.* 76, 107–117.
- Skelly, P.J., Da'dara, A.A., Li, X.-H., Castro-Borges, W., Wilson, R.A., 2014. Schistosome Feeding and Regurgitation. *PLOS Pathog.* 10, e1004246.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 68–88.
- Utzinger, J., N'goran, E.K., Caffrey, C.R., Keiser, J., 2011. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. *Acta Trop.* 120 Suppl 1, S121-137.
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., Turk, B., 2007. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* 13, 387–403.
- Wheater, P.R., Wilson, R.A., 1979. *Schistosoma mansoni*: a histological study of migration in the laboratory mouse. *Parasitology* 79, 49–62.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Sturrock, R.F., Reid, G.D., 1990. Schistosome migration in primates: a study in the olive baboon (*Papio anubis*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 80–83.
- Woolhouse, M.E., Hagan, P., 1999. Seeking the ghost of worms past. *Nat. Med.* 5, 1225–1227.
- Xu, X., Lemaire, C., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Raccurt, M., Mullier, F., Zerimech, F., Decavel, J.P., Peyrol, S., Liu, J., Fontaine, J., Lafitte, S., Capron, A., Cesbron, J.Y., 1997. Expression of a *Schistosoma mansoni* 28-kilodalton glutathione S-transferase in the livers of transgenic mice and its effect on parasite infection. *Infect. Immun.* 65, 3867–3874.
- Yamamoto, A., Hara, T., Tomoo, K., Ishida, T., Fujii, T., Hata, Y., Murata, M., Kitamura, K., 1997. Binding mode of CA074, a specific irreversible inhibitor, to bovine cathepsin B as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *J. Biochem. (Tokyo)* 121, 974–977.
- Zhou, J., Zhang, Y.-Y., Li, Q.-Y., Cai, Z.-H., 2015. Evolutionary History of Cathepsin L (L-like) Family Genes in Vertebrates. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 1016–1025.