

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bc. Adrian Leontovyč

Serinová proteasa SmSP2 z krevničky *Schistosoma mansoni*

Serine protease SmSP2 of *Schistosoma mansoni*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: RNDr. Jan Dvořák, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Rád bych poděkoval RNDr. Janu Dvořákovi, PhD. za cenné rady, ochotu a vstřícnost při vypracovávání diplomové práce. Děkuji kolektivu laboratoře RNDr. Michaela Mareše, CSc., zejména pak Mgr. Martinu Hornovi, CSc. za veškerou pomoc a trpělivost. Také bych rád poděkoval Dr. Jimovi McKerrowovi (University of California, San Francisco, USA) za to, že mi umožnil výzkumný pobyt v jeho laboratoři, dále pak Dr. Conoru Caffreyemu a Brianovi Suzukimu, kteří mi během tohoto pobytu pomohli překonat všechny překážky. Děkuji Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za to, že mi umožnil vypracovat tuto diplomovou práci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

Abstrakt:

Krevnička *Schistosoma mansoni* patří k nejvýznamnějším lidským parazitům. Proteolytický systém schistosomy je klíčový pro její interakci s hostitelem, proto se v poslední době staly některé proteasy potenciálním cílem terapeutického zásahu. Tato práce se zabývá dosud nepopsanou serinovou proteasou SmSP2, jejíž biologická funkce je dosud neznámá. Tato proteasa je též zajímavá extrémně vysokým expresním profilem u vývojových stádií parazitujících člověka. V rámci této diplomové práce byla rekombinantní SmSP2 exprimována v prokaryotickém i eukaryotickém expresním systému (*E. coli* a *P. pastoris*) a purifikována pomocí chromatografických metod. Byly připraveny polyklonální protilátky proti SmSP2. Byly optimalizovány podmínky pro refolding SmSP2 a byla provedena základní biochemická charakterizace. Substrátová preference pro jednotlivé aminokyseliny v P1 – P4 pozicích byla určena pomocí kombinatoriální knihovny syntetických fluorogenních peptidů (PS-SCL).

Abstract:

Blood fluke *Schistosoma mansoni* is one of the most important human parasites. Proteolytic system of schistosoma is crucial for parasite – host interactions. Therefore some of the proteases became potential therapeutic targets. This work is focused on not yet characterized serine protease SmSP2. SmSP2 is newly discovered protease of *S. mansoni*, whose biological role is unknown. This protease is highly expressed in developmental stages parasitizing humans. SmSP2 was recombinantly expressed in prokaryotic and eukaryotic expression system (*E. coli* a *P. pastoris*) and purified using chromatographic methods. Recombinant SmSP2 was used for polyclonal antibody production. Conditions for refolding were optimized. Basic biochemical properties of the protease were detected and substrate amino acid preferences for P1 – P4 sites for single aminoacids were identified using synthetic fluorogenic peptides for positional scanning substrate combinatorial library (PS-SCL). (In Czech)

Obsah

1. Úvod.....	13
1.1. <i>Schistosoma mansoni</i>	13
1.1.1. Životní cyklus krevničky <i>Schistosoma mansoni</i>	13
1.2. Schistosomóza	15
1.2.1. Patogeneze a klinické příznaky schistosomózy	16
1.2.2. Diagnóza schistosomózy	17
1.2.3. Léčba schistosomózy.....	17
1.3. Proteasy	17
1.3.1. Serinové proteasy	18
1.3.2. S1 rodina serinových proteas	20
1.3.3. Proteasy u <i>S. mansoni</i>	22
1.3.4. Serinové proteasy u <i>S. mansoni</i>	23
1.3.5. SmSP2	26
2. Cíle práce.....	28
3. Materiál	29
3.1. Přístroje a pomůcky	29
3.2. Biologický materiál	29
3.3. Chemikálie.....	30
3.4. Kultivační media.....	31
3.5. Chromatografické kolony a nosiče	31
3.6. Soupravy	31
3.7. Bakteriální a kvasinkové kmeny.....	32
4. Metody	34
4.1. Exprese SmSP2 v <i>E. coli</i>	34
4.1.1. Amplifikace inzertů a klonování	34

4.1.2.	Příprava inzertu MUT s bodovou mutací	35
4.1.3.	Transformace plazmidu do buněk	36
4.1.4.	PCR kontrola pozitivních kolonií	36
4.1.5.	Izolace plazmidové DNA	37
4.1.6.	Expresse proteinu	37
4.1.7.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu SDS-PAGE	38
4.1.8.	Purifikace pomocí afinitní chromatografie	38
4.1.9.	Produkce polyklonálních protilátek	39
4.1.10.	Imunodetekce SmSP2 pomocí polyklonálních protilátek	39
4.2.	Refolding	40
4.2.1.	Refolding pomocí dialýzy	40
4.2.2.	Refolding pomocí ředění	40
4.2.3.	Refolding na koloně	40
4.2.4.	Měření proteolytické aktivity	41
4.3.	Expresse SmSP2 v kvasinkách <i>Pichia pastoris</i>	41
4.3.2.	Transformace plazmidu do buněk <i>E. coli</i> One Shot TOP10	42
4.3.3.	Velkoobjemová příprava plazmidu	43
4.3.4.	Linearizace plazmidu	43
4.3.5.	Transformace buněk <i>P. pastoris</i> elektroporací	43
4.3.6.	Expresse proteinu v <i>P. pastoris</i>	44
4.3.7.	Gelová chromatografie na koloně G-25	44
4.3.8.	Imunodetekce	45
4.3.9.	Značení SmSP2 fluorescenční značkou BoRC	45
4.3.10.	Afinitní chromatografie na koloně Ni-NTA Superflow	45
4.3.11.	Iontově výměnná chromatografie na koloně Mono S	46
4.3.12.	Afinitní chromatografie na koloně HiTrap Benzamidine FF	46
4.4.	Biochemická analýza SmSP2	46

4.4.1.	Měření pH optima SmSP2.....	46
4.4.2.	Inhibice proteolytické aktivity	47
4.4.3.	Určení substrátové specifity SmSP2	47
5.	Výsledky.....	48
5.1.	Rekombinantní exprese SmSP2 v <i>E. coli</i>	48
5.1.1.	Klonování	48
5.1.2.	Expresa SmSP2 v <i>E. coli</i>	49
5.1.3.	Purifikace pomocí afinitní chromatografie	50
5.2.	Refolding	52
5.2.1.	Refolding pomocí dialýzy	53
5.2.2.	Refolding SmSP2 na koloně	53
5.2.3.	Refolding pomocí ředění	54
5.3.	Expresa SmSP2 v kvasinkách <i>Pichia pastoris</i>	57
5.3.1.	Příprava expresních vektorů pro expresi SmSP2 v <i>P. pastoris</i>	57
5.3.2.	Expresa SmSP2	58
5.4.	Purifikace SmSP2	59
5.4.1.	Gelová permeační chromatografie	59
5.4.2.	Značení SmSP2 fluorescenční značkou BoRC	61
5.4.3.	Afinitní chromatografie na Ni-NTA koloně.....	62
5.4.4.	Iontově výměnná chromatografie.....	63
5.4.5.	Afinitní chromatografie na benzamidinové koloně.....	64
5.5.	Biochemická analýza SmSP2	65
5.5.1.	Určení pH optima SmSP2	65
5.5.2.	Identifikace substrátové specifity SmSP2	65
5.5.3.	Inhibice proteolytické aktivity	68
6.	Diskuze.....	70
7.	Závěr.....	73

8. Seznam použité literatury	74
------------------------------------	----

Seznam zkratek:

ACC	7-amino-4-karbamoylmethyl-kumarin
AMC	7-amino-4-methyl-coumarin
BMM	indukční medium pro kvasinky (z angl. buffered minimum methanol)
Boc-LRR-AMC	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl -Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
cDNA	DNA vzniklá zpětnou transkripcí mRNA (z angl. complementary DNA)
CUB	doména proteinů komplementu C1r/C1s, Uegf, Bmp1 (z angl. complement proteins C1r/C1s, Uegf, Bmp1)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	směs deoxynukleosidtrifosfátů
DTT	dithiotreitol
E64	N-[N-(L-3-trans-karboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]-agmatin
ELISA	analýza s enzymem navázaným na immunosorbent (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
GSH	glutathion (redukovaný)
GSSG	glutathion (oxidovaný)
HRP	křenuvátá peroxidasa (z angl. horseradish peroxidase)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB	Luria Bertani medium
LDLa	doména receptorů pro lipoproteiny nízké density třídy A (z angl. low-density lipoprotein receptor domain class A)
LSLB	Luria Bertani medium se sníženým obsahem soli (z angl. low salt Luria Bertani)
MES	kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
Ni-NTA	nikl-nitriloctová kyselina
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	pufrovací fyziologický roztok (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
Pefabloc	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluorid
PEG	polyethylenglykol

PFR-AMC	Pro-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PS-SCL	kombinatoriální knihovna syntetických peptidů (z angl. positional scanning synthetic combinatorial library)
PVDF	polyvinylidendifluorid
RFU	relativní fluorescenční jednotka (z angl. relative fluorescent unit)
SDS	dodecylsírán sodný
SmCE	cerkáriová elastasa ze <i>S. mansoni</i> (z angl. <i>S. mansoni</i> cercarial elastase)
SmSP	serinová proteasa ze <i>S. mansoni</i> (z angl. <i>S. mansoni</i> serine protease)
SOC	optimalizované Luria Bertani medium (z angl. super optimal broth with catabolite repression)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
YNB	kvasinková dusíkatá báze (z angl. yeast nitrogen base)
YPD	kultivační medium pro kvasinky (z angl. yeast extract pepton dextrose)

Zkratky aminokyselin

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

1. Úvod

1.1. *Schistosoma mansoni*

Schistosoma mansoni (krevnička střevní, obr. 1) je parazitický helmint z čeledi *Schistosomatidae*, který spolu s dalšími druhy způsobuje onemocnění zvané schistosomóza. Jsou to gonochoristé s výrazným pohlavním dimorfismem, kteří parazitují v krevním řečišti vnitřních orgánů. Schistosomy patří mezi motolice (třída *Trematoda*) z kmene ploštěnci (*Platyhelminthes*)¹.



Obr. 1: *Schistosoma mansoni* (pár), upraveno dle².

1.1.1. Životní cyklus krevničky *Schistosoma mansoni*

Životní cyklus parazita (obr. 2) je dvouhostitelský, dospělci žijí v portální žíle a cévách mezenteria definitivního hostitele, kterým může být člověk, další primáti nebo někteří hlodavci, jako mezipřihoditel slouží sladkovodní plž rodu *Biomphalaria*. Dospělé schistosomy žijí v páru, mohutnější samec (6 – 12 mm dlouhý a asi 1 mm široký) má na ventrální straně takzvaný *canalis gynaecophorus*, rýhu, ve které přidrhuje samičku (10 – 16 mm dlouhá a asi 0,2 mm široká)¹.

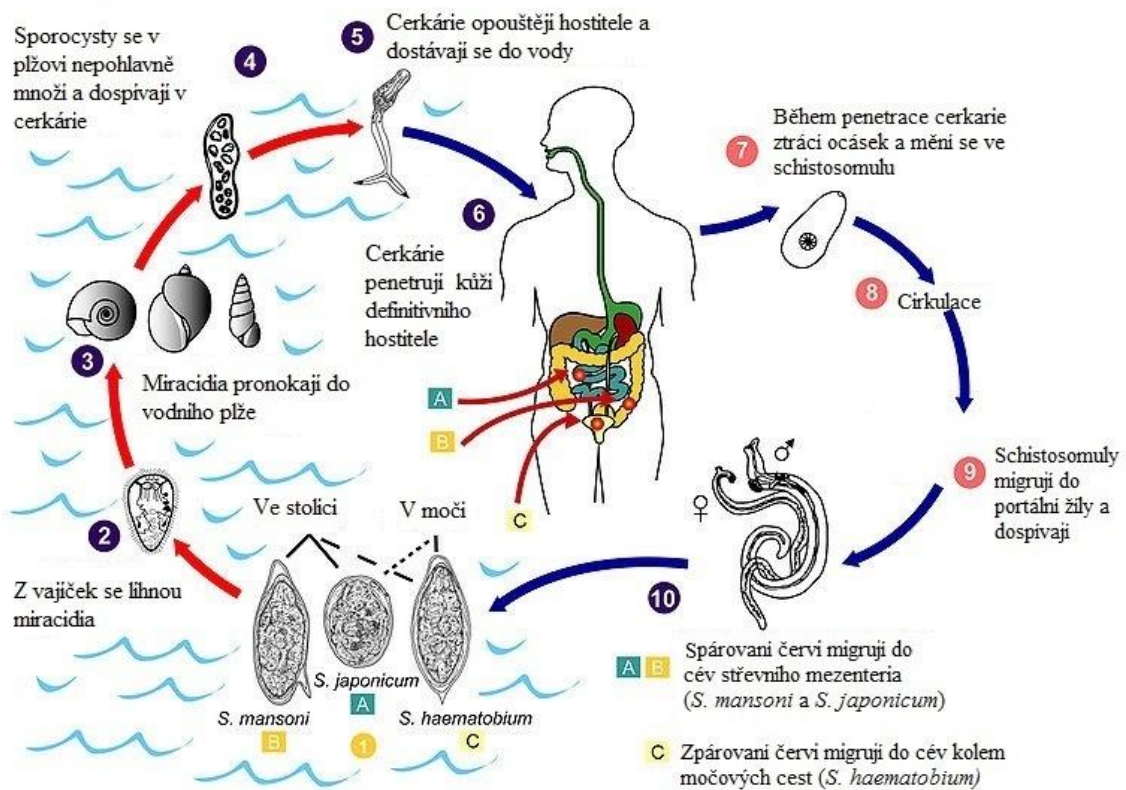
Samice kladou po oplodnění vajíčka do cév vnitřních orgánů definitivního hostitele. Kolem vajíčka přichyceného na cévní stěnu se tvoří zánět, který se podílí na pronikání vajíčka skrz

stěnu cévy do lumen střeva. Pronikání napomáhá charakteristický trn, kterým je vajíčko opatřeno. Poté vajíčka odchází se stolicí do vnějšího prostředí.

Ve vodním prostředí se z vajíčka líhne miracidium, stimulem k líhnutí je především nízká osmotická hodnota vody. Miracidium aktivně vyhledává meziphostitele, kterého rozpoznává podle makromolekulárních glykokonjugátů, přítomných ve šnečím slizu³. Miracidium nepřijímá potravu, a pokud nedokáže najít meziphostitele během 24 hodin, zemře⁴. Po proniknutí do meziphostitele se miracidium vyvíjí v mateřskou sporocystu, ztrácí řasinkové epidermální buňky, které jsou nahrazeny tegumentem⁵. Po 2 – 3 týdnech života ve tkáni plže se sporocysta začne nepohlavně množit za produkce dceřiných sporocyst, které migrují do hepatopankreatické trávicí žlázy. Dceřiné sporocysty se dále nepohlavně množí a poté produkují infekční larvy, cercárie. Díky asexuálnímu množení v meziphostiteli může jedno miracidium ve výsledku vést k produkci stovek až tisíců cercárií.

První cercárie opouští meziphostitele 3 – 4 týdny po infekci miracidiiem, stimulem je světlo, což koreluje s cirkadiálním rytmem savčích definitivních hostitelů⁶. Cercárie aktivně vyhledává definitivního hostitele⁷. Stejně jako miracidium, cercárie nepřijímá potravu a bez hostitele dokáže přežít maximálně jeden den. Cercárie rozpoznává definitivní hostitele podle volných mastných kyselin, argininu a malých peptidů obsahujících arginin na konci řetězce⁸. Cercárie penetruje kůži definitivního hostitele za pomoci proteolytických enzymů, především cercárieové elastasy, a dostává se do krevního řečiště⁹. Během tohoto procesu dochází k morfologickým, fyziologickým a metabolickým změnám a cercárie se mění ve schistosomulu. Nejsignifikantnějšími změnami jsou odvržení ocasu a ztráta silně imunogenního glykokalyxu, díky čemuž se stávají méně atraktivní pro imunitní systém hostitele¹⁰. Na povrchu má schistosomula (stejně jako dospělci) zdvojenou vnější cytoplazmatickou membránu tegumentu, na rozdíl od předchozích stadií, které mají jednoduchou membránu. Tato zdvojená membrána pravděpodobně slouží jako ochrana proti imunitnímu systému hostitele¹⁰. Schistosomula migruje krví do plic a poté se dostává do jaterní portální žíly, kde dospívá¹.

Dospělé schistosomy žijí v portální žíle a cévách mezenteria, kde se živí krevními proteiny, zejména hemoglobinem z požitých červených krvinek. Jediná samice schistosomy produkuje denně stovky vajec, z nichž většina odchází skrz cévní stěnu do střeva, odkud opouštějí tělo hostitele se stolicí. Vejce, která jsou zanesena krevním řečištěm do jiných tkání, způsobují hlavní patologické příznaky nemoci, viz níže^{1, 11}.

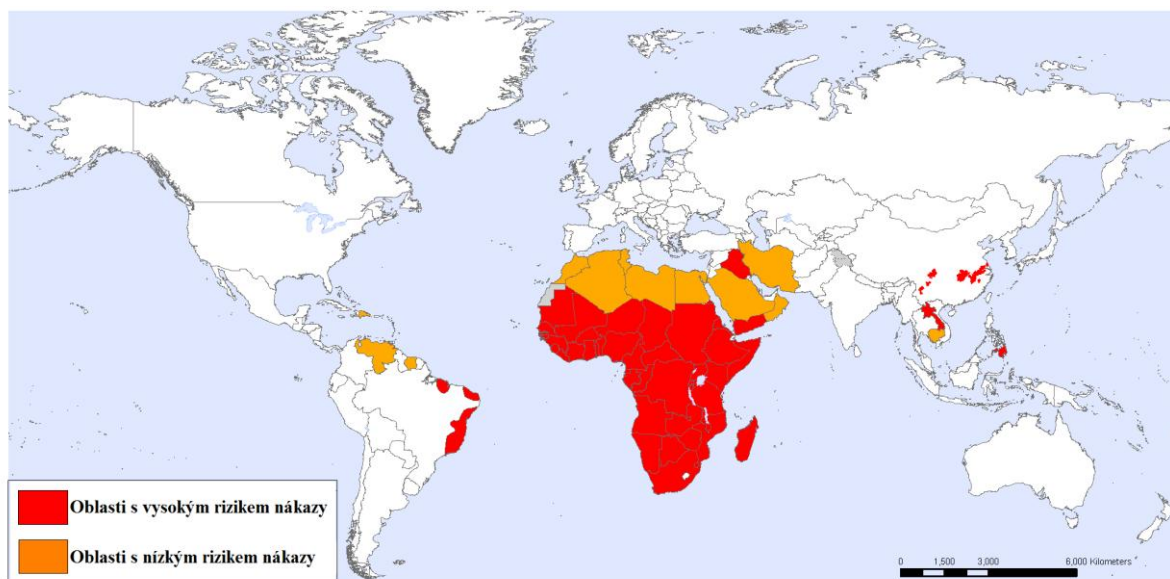


Obr. 2: Životní cyklus krevniček rodu *Schistosoma*. Upraveno dle ¹².

1.2. Schistosomóza

Schistosomóza (někdy též zvaná bilharzióza) je onemocnění způsobené několika druhy motolic rodu *Schistosoma*, především *S. mansoni*, *S. haematobium* a *S. japonicum* ¹³. Jedná se o závažné onemocnění (po malárii druhá nejvýznamnější parazitóza), které postihuje celosvětově přes 200 milionů lidí. Dalšíh 700 milionů lidí je nákazou ohroženo ¹⁴.

Schistosomóza je rozšířena v tropických a subtropických oblastech Afriky, Jižní Ameriky a jihovýchodní Asie (obr. 3).



Obr. 3: Rozšíření Schistosomózy. Upraveno dle ¹⁵

1.2.1. Patogeneze a klinické příznaky schistosomózy

Po proniknutí cercárií skrz kůži hostitele se někdy může objevit cercáriová dermatitida (vyrážky a svědění), ale většinou se první symptomy objevují 5 – 10 týdnů po infekci. Tyto symptomy zahrnující horečku, zimnici a bolest svalů se však u lidí trvale žijících v oblasti nákazy zpravidla neobjevují. Asi 12 týdnů po infekci nastává chronická fáze, kdy schistosomy začínají produkovat maximum vajíček. Samotní červi jsou velmi málo imunogenní, příznaky jsou způsobeny reakcí imunitního systému na vajíčka jako hlavní patogenní agens ¹⁶. Jejich značná část nepronikne do lumen střeva, ale jsou zanesena krevním řečištěm do jiných tkání, především do jaterní tkáně portální žilou. Zde vyvolávají silnou zánětlivou imunitní odpověď, která vede k tvorbě granulomů a způsobuje významné poškození jaterní tkáně. V pokročilém stadiu dochází k portální hypertenzi, cirhóze, rakovině střev a ascitu (obr. 4). U dětí také často dochází k anemii a podvýživě ¹⁶.



Obr. 4: Ascity způsobené schistosomózou. Převzato z ¹⁷.

1.2.2. Diagnóza schistosomózy

Nejběžnější metodou diagnózy je nález vajíček ve stolici. U lehčích infekcí to však bývá komplikovaná metoda s nízkou záchytností, proto se také používají imunologické metody, především ELISA, kdy se v séru detekují protilátky vytvořené jako imunitní odpověď proti parazitovi nebo povrchové antigeny parazita v séru a moči ¹⁶.

1.2.3. Léčba schistosomózy

V současné době se používá prakticky jediný lék – praziquantel ¹⁸. Jedná se o antihelmitikum ze skupiny chinolinových derivátů. Mechanismus účinku není zcela objasněn. Experimentálně bylo prokázáno, že praziquantel zvyšuje permeabilitu membrány pro vápenaté ionty, díky čemuž dochází k nekontrolovatelným kontrakcím svalstva parazita a paralýze ¹⁶. Vzhledem k tomu, že u pacientů opakovaně léčených praziquantelem byly pozorovány rezistentní kmeny schistosomy, je nezbytné hledat nové způsoby léčby ^{19, 20}.

1.3. Proteasy

Proteolytické enzymy (proteasy, proteinasy, peptidasy) jsou enzymy, které hydrolyticky štěpí peptidovou vazbu a degradují tak proteiny na menší peptidy a jednotlivé aminokyseliny.

Proteasy jsou přítomny ve všech živých organismech a hrají esenciální roli v řadě fyziologických procesů ²¹.

Proteasy se dají klasifikovat podle několika kritérií. Rozlišujeme exopeptidasy, štěpící aminokyseliny na N-konci nebo C-konci peptidového řetězce, a endopeptidasy, štěpící uvnitř peptidového řetězce.

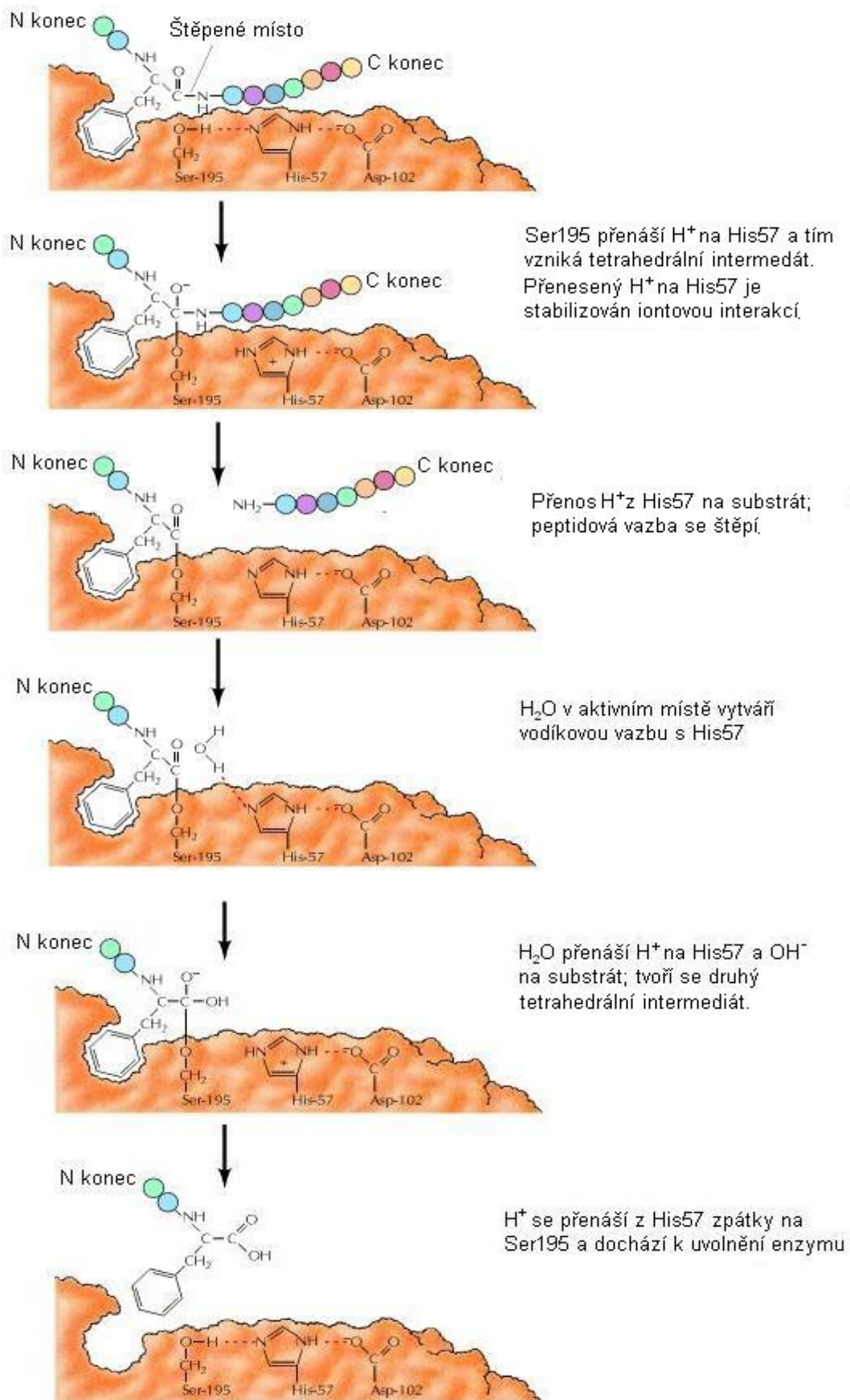
Dále se proteasy dají dělit podle uspořádání aktivního místa a katalytického mechanismu na aspartátové, cysteinové, serinové, glutamátové, threoninové a metaloproteasy.

Podle homologie můžeme proteasy dělit do klanů podle terciární struktury a podobných sekvenčních motivů kolem katalytických aminokyselinových zbytků. V rámci klanů se proteasy dále dělí do rodin podle homologie aminokyselinové sekvence ^{21, 22}.

1.3.1. Serinové proteasy

Serinové proteasy tvoří téměř třetinu všech známých proteas. Svůj název získaly podle aminokyseliny serinu v aktivním místě, který zde slouží jako nukleofil a přímo se účastní štěpení peptidové vazby ²³. Katalytický mechanismus serinových proteas (obr. 5) je založen na katalytické triádě, která je u naprosté většiny serinových proteas tvořena aminokyselinovými zbytky serinu, histidinu a aspartátu ²⁴. Po navázání peptidového řetězce (substrátu) serin nukleofilně atakuje uhlík karbonylové skupiny štěpené peptidové vazby za vzniku tetrahedrálního intermediátu. Proton alkoholové skupiny serinu přechází na imidazolový kruh histidinu za vzniku imidazoliového iontu, který je stabilizován karboxylovou skupinou aspartátu. Peptidová vazba se štěpí a vzniká acyl-enzymový intermediát (fragment peptidového řetězce vázaný na serin katalytické triády enzymu). N-konec druhého fragmentu je stabilizován histidinem. Tento fragment se uvolňuje a je nahrazen molekulou vody. Voda atakuje karbonyl acyl-enzymového intermediátu. Proton z vody je přenesen na histidin, hydroxyl na karbonylový uhlík acyl-enzymového intermediátu a vzniká druhý tetrahedrální intermediát. Tento intermediát se rozpadá, uvolňuje se druhý fragment štěpeného peptidového řetězce a regeneruje se enzym ²⁵.

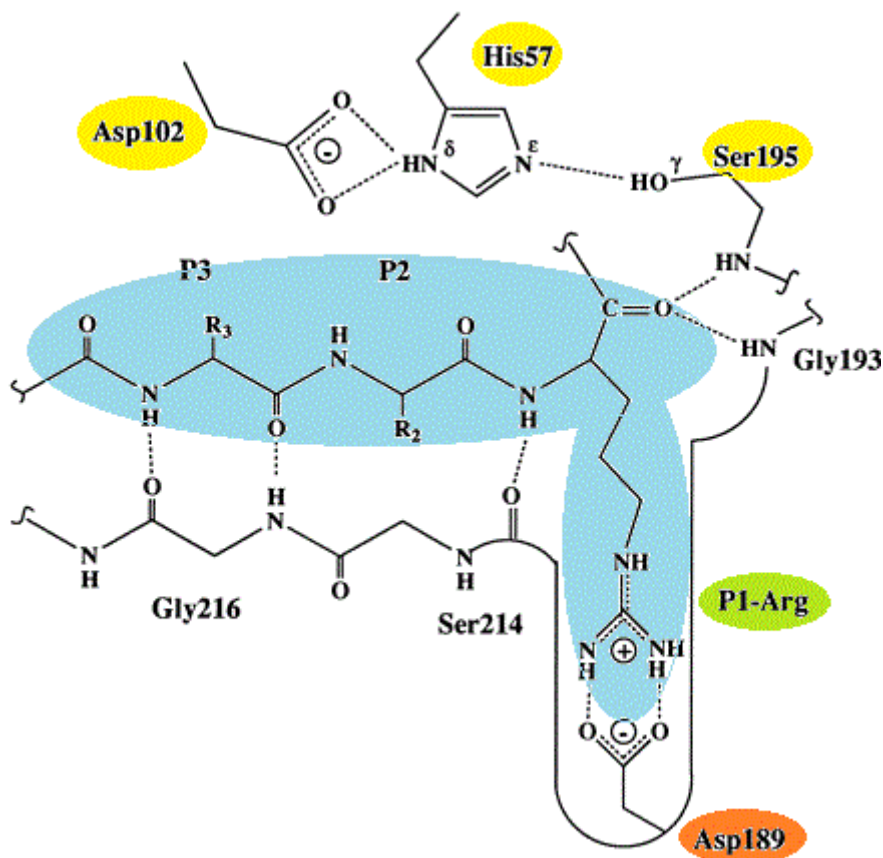
Podle homologie se serinové proteasy dělí do 16 klanů, které se dále dělí do 53 rodin. Proteasa SmSP2, kterou se zabývá tato diplomová práce, spadá do S1 rodiny serinových proteas v rámci klanu PA, největšího klanu serinových proteas ²².



Obr. 5: Mechanismus katalýzy chymotrypsinu. Upraveno dle ²⁶.

1.3.2. S1 rodina serinových proteas

Rodina S1, někdy také nazývaná rodina chymotrypsinu, je největší proteasovou rodinou. V jejím rámci rozeznáváme podle substrátové specifity tři typy proteas. Proteasy chymotrypsinového typu štěpí peptidový řetězec za velkými hydrofobními aminokyselinami (tyrosin, fenylalanin, tryptofan), proteasy trypsinového typu štěpí za bazickými aminokyselinami (arginin, lysin), proteasy elastasového typu štěpí za malými alifatickými aminokyselinami (alanin, glycin, valin). Substrátovou specifitu těchto proteas určuje S1 vazebné místo (obr. 6)^{25, 27}.



Obr. 6: Vazba substrátu do aktivního místa proteasy trypsinového typu. Modře je vyznačen substrát, žlutě katalytická triáda, zeleně arginin v P1 místě substrátu, oranžové aspartát v S1 vazebném místě enzymu. Číslování aminokyselinových zbytků je založeno na číslování chymotrypsinu, který slouží jako modelová proteasa pro S1 rodinu. Nomenklatura aminokyselinových zbytků substrátu je Pn..., P3, P2, P1, P1', P2', P3'..., .Pn'. Štěpená vazba se nachází mezi aminokyselinami P1 a P1'. Analogické aminokyselinové zbytky enzymu se označují Sn..., S3, S2, S1, S1', S2', S3'..., .Sn'. Upraveno dle²⁸.

Všechny proteasy této rodiny jsou endopeptidasy, pořadí aminokyselinových zbytků v katalytické triádě je histidin, aspartát, serin²². Patří sem nejen jednoduché proteasy jako například trypsin a chymotrypsin, ale také komplexní enzymy složené z několika domén jako plasminogen nebo některé faktory účastnící se srážení krve²⁹.

S1 proteasy mají rozmanité funkce, mezi které patří například trávení (trypsin, chymotrypsin, elastasa), srážení krve (trombin, koagulační faktory), imunita (faktory komplementu, tryptasy sekrečních granulí mastocytů, granzymy cytotoxických buněk) nebo regulace homeostázy (kalikreiny)³⁰.

Krystalová struktura byla vyřešena pro řadu proteas rodiny S1 (obr. 7). Peptidasové jednotky těchto proteas jsou obvykle tvořeny 2 doménami, mezi nimiž se nachází aktivní místo. Každá doména obvykle obsahuje 2 β -barely složené do tzv. motivu řeckého klíče (greek key motif). Díky tomu se aminokyseliny katalytické triády dostanou k sobě, i přesto, že jsou v primární struktuře vzdáleny. I když se geometrie katalytického jádra mezi jednotlivými taxony liší, relativní pozice aminokyselin katalytické triády a stabilizujících aminokyselin zůstává vysoce konzervována³⁰.



Obr. 7: Krystalová struktura hovězího trypsinu. Upraveno dle³¹

Většina serinových proteas z S1 rodiny je exprimovaná jako katalyticky neaktivní zymogeny. Svou katalytickou aktivitu získávají až po odštěpení propeptidu - peptidového řetězce na N konci proteinu, kterým je zymogen inaktivován. Tento propeptid může nabývat různé délky, od několika aminokyselin až po několik set ²⁷.

1.3.3. Proteasy u *S. mansoni*

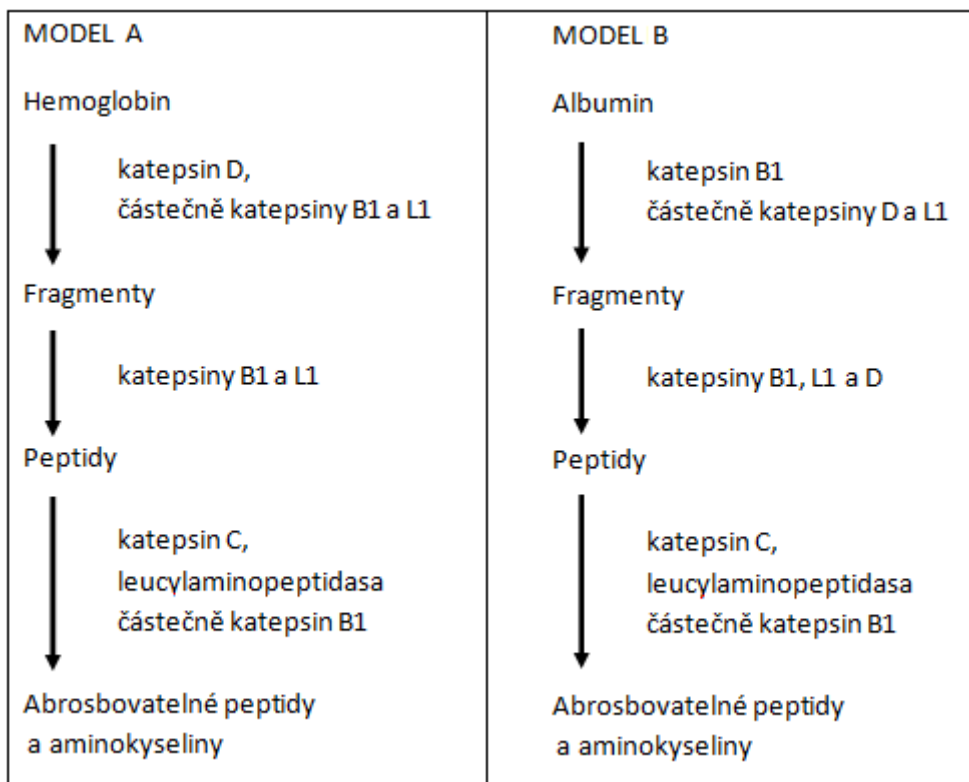
Proteasy jsou samozřejmě pro schistosomu nezbytnými enzymy účastníci se řady procesů, od líhnutí miracidíí přes pronikání do těla hostitele až po trávení živin. Výzkum proteas schistosomy byl zaměřen především na aspartátové a cysteinové proteasy, které se účastní degradace hemoglobinu, albuminu a dalších krevních proteinů, které slouží dospělým schistosomám jako zdroj živin ³².

V jícnu schistosom dochází k hemolýze červených krvinek, uvolněný hemoglobin a ostatní proteiny se dostávají do střeva, kde dochází k jejich trávení ³³. Trávení se účastní velké množství proteolytických enzymů, kterým dominují cysteinové a aspartátové proteasy ³⁴. Jedná se o proteasy s nízkým pH optimem, které se vzájemně doplňují při trávení hemoglobinu a albuminu. Patří sem cysteinové proteasy katepsin B1, katepsiny L1 – L3, katepsin C a asparaginyl endopeptidasa (legumain), aspartátová proteasa katepsin D a metaloproteasová leucylaminopeptidasa ^{32, 34}.

Primární štěpení hemoglobinu na fragmenty provádí endopeptidasy, především katepsin D, ale částečně také katepsiny B1 a L1. Vzniklé fragmenty jsou dále štěpeny katepsiny B1 a L1 na menší peptidy, které jsou štěpeny exopeptidasami katepsinem C a leucylaminopeptidasou na dipeptidy a jednotlivé aminokyseliny. Tohoto štěpení se účastní i katepsin B1, který má kromě endopeptidasové aktivity také aktivitu exopeptidasovou ^{34, 35}.

Albuminu je štěpen na fragmenty primárně katepsinem B1, v menší míře pak katepsiny D a L1. Stejně proteasy pak štěpí fragmenty na menší peptidy. Tyto peptidy jsou stejně jako v případě hemoglobinu štěpeny katepsiny C, B1 a leucylaminopeptidasou ^{34, 35}.

Schéματα trávicí kaskády hemoglobinu a albuminu jsou zobrazena na obr. 8.



Obr. 8: Schéma trávicí kaskády hemoglobinu a albuminu u schistosomy. Upraveno dle ³⁴.

1.3.4. Serinové proteasy u *S. mansoni*

Serinové proteasy schistosom jsou opomíjenou skupinou a je o nich známo jen velmi málo informací. Výjimku tvoří dobře prozkoumaná cercáriová elastasa (SmCE), která je nezbytná pro penetraci kůže hostitele cercáriemi ³⁶. Částečně bylo popsáno dalších 5 serinových proteas z rodiny S1. Tyto proteasy byly pojmenovány zkratkou SmSP (*Schistosoma mansoni* Serine Protease) a pořadovým číslem 1 - 5. Biologická funkce těchto proteas zatím není známa ³⁷

SmCE

SmCE patří do S1 rodiny v rámci PA klanu serinových proteas. Navzdory svému jménu má chymotrypsinovou specifitu, nazvána byla podle substrátů, které štěpí. Těmi jsou epidermální proteiny jako elastin, keratin, kolageny, fibronektiny a laminin. Také je schopná rozrušovat mezibuněčné spoje. SmCE je produkována acetabulárními žlázami cercárií během penetrace kůže definitivního hostitele ³⁶. Bylo prokázáno, že serinové proteasy produkovévané acetabulární žlázou jsou nezbytné pro úspěšnou infekci definitivního hostitele ^{38, 39}. Bylo

nalezeno pět isoform SmCE, ovšem za 90 % aktivity SmCE jsou zodpovědné pouze dvě z nich. Ostatní tři geny produkují málo proteinu nebo jsou umlčeny³⁷.

SmSP1

SmSP1 je nejvíce prozkoumanou proteasou ze všech SmSP proteas. Je to proteasa s trypsinovou specifitou, která kromě trypsinové domény obsahuje další dvě nekatalytické domény – CUB a LDLa (obr. 9)³⁷. CUB doména je strukturní motiv obsahující kolem 110 aminokyselin se čtyřmi konzervovanými aminokyselinovými zbytků cysteinu. Zprostředkovává protein – proteinové interakce v extracelulárních a membránových regulačních proteinech⁴⁰. LDLa je doména nacházející se u receptoru pro LDL lipoprotein. Schistosomy nedokáží syntetizovat cholesterol a musí ho získávat od hostitele, je tedy možné, že se LDLa doména proteasy SmSP1 účastní tohoto procesu^{37, 41}. Kompletní SmSP1 s CUB doménou byla nalezena pouze u vajíček, u ostatních vývojových stadií se CUB doména nachází jako samostatný produkt³⁷.

Trypsinová doména SmSP1 vykazuje významnou homologii s myším plazmovým kallikreinem a lidským faktorem I^{42, 43}. Tato homologie a fakt, že SmSP1 byla identifikována v povrchových oblastech červů a byla sekretována do kultivačního media, naznačuje, že by SmSP1 mohla ovlivňovat například imunitní systém hostitele či vasodilataci cév^{37, 44}.

SmSP2

Protease SmSP2 je věnována samostatná kapitola (kap. 1.3.5.).

SmSP3

Protease SmSP3 se podobá protease SmSP1. Má trypsinovou specifitu a obsahuje nekompletní CUB doménu (obr. 9). Tato doména je koexprimována s trypsinovou doménou pouze u vajíček a dospělců, u ostatních vývojových stadií je exprimována samostatně³⁷.

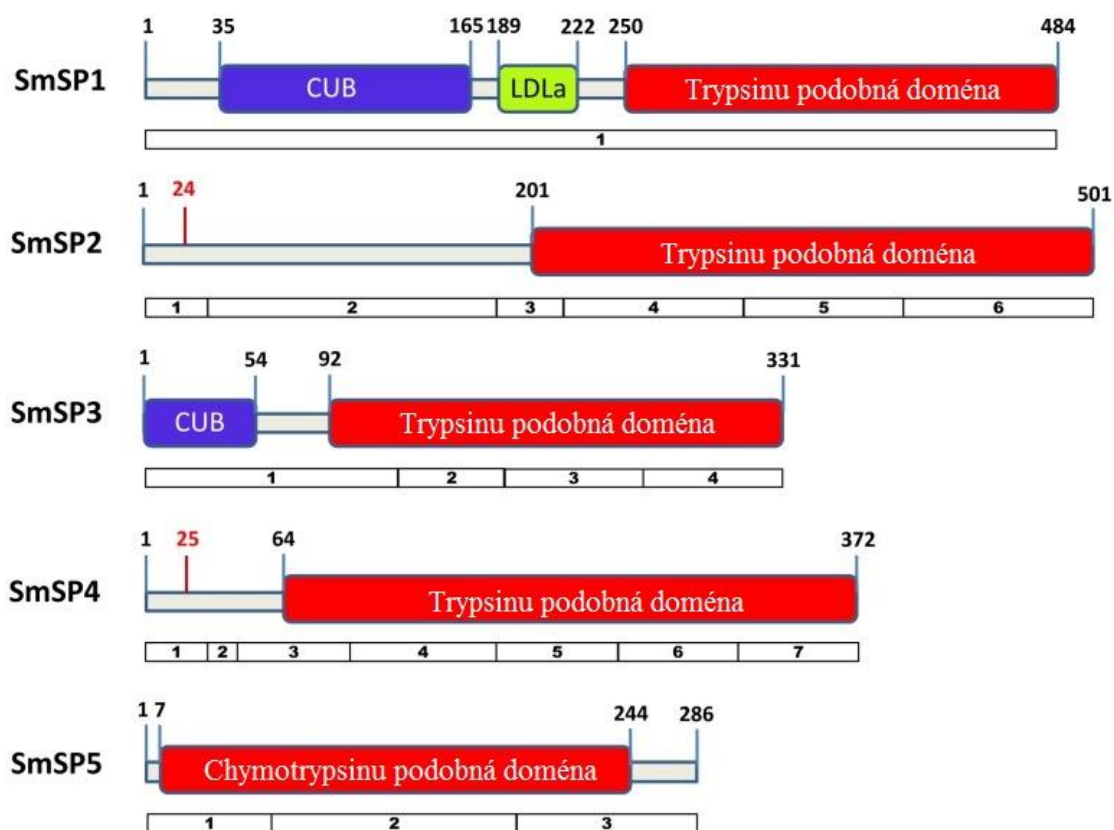
SmSP4

SmSP4 je proteasa s trypsinovou specifitou. Na svém N – konci obsahuje signální peptid předcházející poměrně dlouhý propeptid (obr. 9)³⁷.

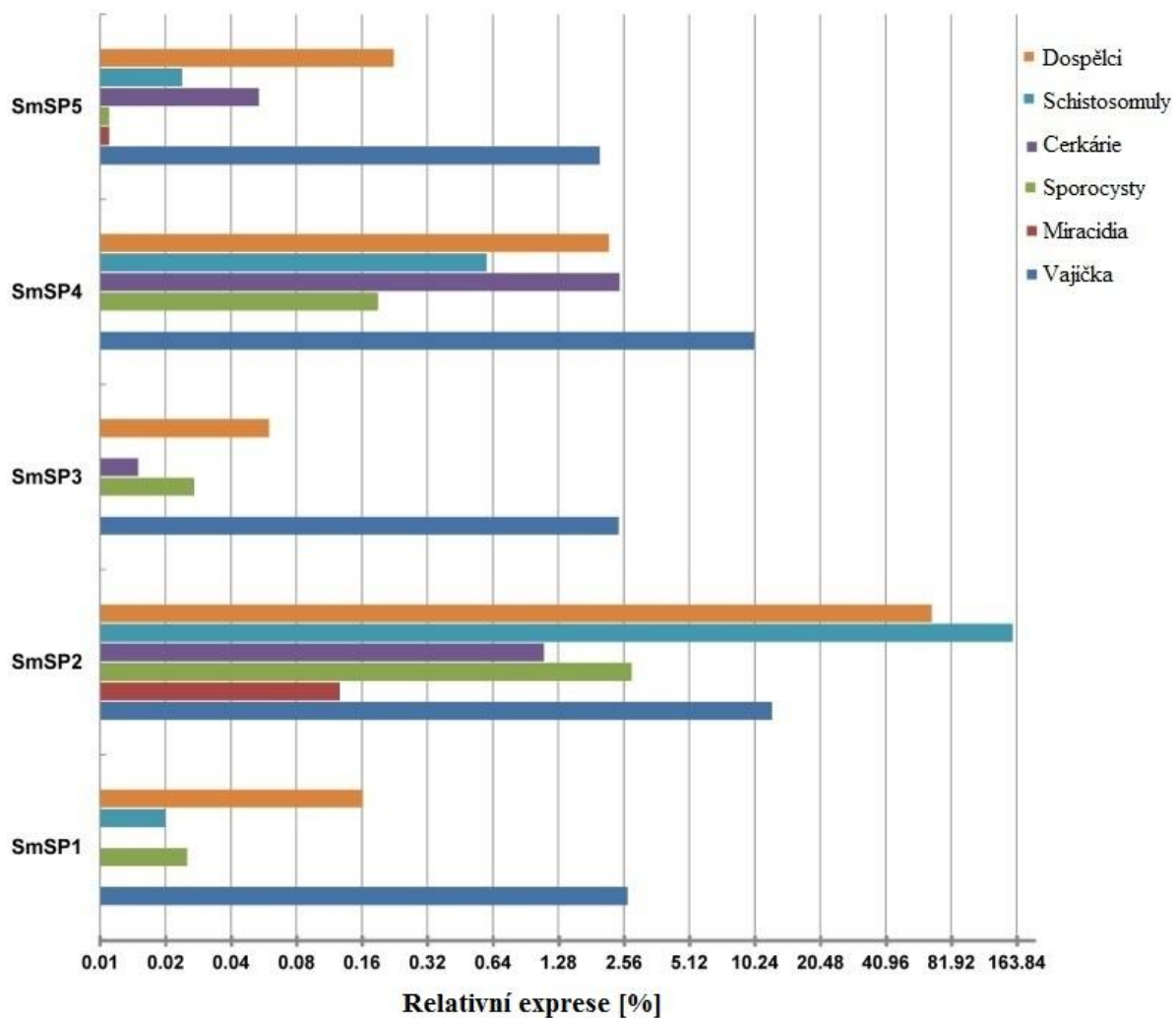
SmSP5

SmSP5 se od předchozích 4 proteas poněkud odlišuje. Ostatní SmSP proteasy mají v S1 místě aspartát, který určuje jejich trypsinovou specifitu, SmSP5 místo tohoto aspartátu obsahuje glycin a její specifita se podobá proteasám chymotrypsinového a elastasového typu. Proteasová doména SmSP5 obsahuje pouze tři disulfidické můstky, na rozdíl od ostatních SmSP, které mají čtyři. Tento čtvrtý disulfidický můstek u trypsinů stabilizuje S1 vazné místo a chybí také u cercáριοvé elastasy. Fylogenetická analýza odhalila podobnost s cercáριοvou elastasou a SmSP5 se tak stala chybějícím článkem mezi skupinou cercáριοvých elastas a dalšími chymotrypsinovými proteasami ³⁷.

SmSP5 má velmi krátký propeptid (7 aminokyselin) a na C-konci za chymotrypsinovou doménou obsahuje extenzi bohatou na threonin a asparagin (obr. 9). Tato extenze se u ortologních serinových proteas nenachází ³⁷.



Obr. 9: Organizace domén SmSP proteas. CUB domény jsou vyznačeny modře, LDLa doména zeleně a proteasové domény červeně. N-terminální signální peptidy jsou odděleny červenou čarou. Čísla nahoře označují pořadí aminokyselin. Struktura exonů genů kódujících SmSP proteasy je znázorněna čísly v rámečcích pod jednotlivými proteiny. Upraveno dle ³⁷.



Obr. 10: Relativní exprese jednotlivých SmSP ve vývojových stádiích schistosomy stanovaná pomocí qRT-PCR. mRNA exprese je vyjádřena v procentech vůči konstitutivně exprimovanému genu cytochrom c oxidasy I (\log_2 měřítko). Upraveno dle ³⁷.

1.3.5. SmSP2

Proteasa SmSP2 patří do skupiny proteas trypsinového typu. Název pochází ze zkratky *Schistosoma mansoni* serine protease 2 ³⁷. SmSP2 je syntetizována jako neaktivní preproprotein s N-terminálním signálním peptidem. Signální sekvence zajišťuje transport SmSP2 přes membránu endoplasmatického retikula a poté je odštěpena. Za signálním peptidem následuje propeptid, který nesdílí homologii se známými proteiny, pouze s ortologními proteasami krevniček *Schistosoma japonicum* a *Clonorchis sinensis* ³⁷. Tento propeptid je neobvyklý jednak svou délkou (200 aminokyselin), jednak úsekem, obsahujícím

velké množství histidinu (obr. 11). Je možné, že propeptid může mít i jinou funkci, než je pouhá inaktivace trypsinové domény v neaktivní formě enzymu (zymogenu).

Odštěpením propeptidu se zymogen aktivuje a enzym získává katalytickou aktivitu ³⁷. Propeptid je u SmSP2 od peptidasové domény oddělen zbytkem lysinu, který představuje potenciální místo aktivace SmSP2, jak bylo popsáno u jiných proteas rodiny S1.

Velmi zajímavá je míra exprese proteasy SmSP2 u schistosomul a dospělců (obr. 10). U dospělců dosahuje míra exprese 60 % oproti cytochrom c oxidase I, u schistosomul je to dokonce 150 %. V těchto stádiích je to nejvíce exprimovaná serinová proteasa, u schistomul patří k nejvíce exprimovaným proteasám vůbec. Poměrně vysokou míru exprese dosahuje SmSP2 i u vajíček (10 % míry exprese cytochrom c oxidasy). U ostatních stadií je míra exprese slabá ³⁷.

Biologická funkce SmSP2 není známa, ovšem vysoká míra exprese u schistosomul a dospělců naznačuje, že by se mohlo jednat o proteasu hrající zásadní roli v interakci s definitivním hostitelem.

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
MILINTYLIYFICFILSFIPNSNTSEYDYNKEYIDEEESLNQFINNSNDGDDDDYDHDHHR 60
HHDHHRHHDHHRHHPQHINKNVGRKIQQKFFPLSFHFNRPKSQEIYVFNIERYSNWSD 120
WKECLPMECIEIRYRKCLDDSWKTI SPNLIHTTRCISKYYAEKRTCLNKTQCNEYTGDOI 180
IKNLTNTGIRKSDNQIMEKILGGKAVEPHSWPWA VRLSVKLP RRRSVTFGGTLIAPQW 240
ILTAAHCVLVENKHIPVGKPVMLADHMKSTIYAHLGDH DRYKQEEAAQIDHRVTVA I LHPN 300
YHRKLQTDGYDIALLR LSEPVKTTPEIDFALPSKNLKLTSNSKYAVGWGSNKGGKIPT 360
FDNIHSILESLFLPFP S LFNTPFTFGRRESSIWN IKKLEEEESSKELHEVELPIVSIDD 420
RKY YADISSKVHVAGAKNKITAGDSGGGLYLED TNRWHIVGVTSFGLARGGLNPG 480
VYTSTSSHMDWISKQLATKIF 501

```

Obr. 11: Aminokyselinová sekvence preproproteinu SmSP2. Podtržená část je signální sekvence, neoznačená část je propeptid se světlemodře vyznačeným úsekem bohatým na histidin, šedivě je vyznačená peptidasová doména, červeně katalytický triáda a světlezeleně aspartát ve vazebném místě S1, který je zodpovědný za trypsinovou aktivitu SmSP2. Žlutě, růžově, tmavě zeleně, fialově a tmavě modře jsou vyznačeny páry cysteinů, tvořící cysteinové můstky. Párování cysteinových zbytků je odvozeno z porovnání sekvence SmSP2 se sekvencemi trypsinu a chymotrypsinu. Upraveno dle ³⁷.

2. Cíle práce

Diplomová práce se zabývá proteasou SmSP2 z krevničky *Schistosoma mansoni*. Proteolytické enzymy parazitů představují významný cíl terapeutického zásahu. Serinová proteasa SmSP2 nebyla dosud studována a mohla by představovat právě takový cíl.

Dílčí cíle jsou následující:

- 1) Připravit konstrukty SmSP2 s odlišnou délkou N-terminální domény pro expresi v bakterii *E. coli*
- 2) Exprimovat rekombinantní SmSP2 v *E. coli*
- 3) Navrhnout protokol pro chromatografickou purifikaci rekombinantní SmSP2
- 4) Navrhnout a optimalizovat postup pro refolding rekombinantní SmSP2
- 5) Alternativně připravit SmSP2 rekombinantní expresí v kvasinkách *P. pastoris*
- 6) Navrhnout protokol pro chromatografickou purifikaci rekombinantní SmSP2
- 7) Analyzovat proteolytickou aktivitu rekombinantní SmSP2, zejména určit pH optimum a substrátovou a inhibiční specifitu

3. Materiál

3.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AE 163	Mettler Toledo, Švýcarsko
Amicon® Ultra Centrifugal Filters	Millipore, USA
Autokláv Labo Autoclave	Sanyo, Japonsko
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Blotovací zařízení XCell II	Life Technologies, USA
CCD kamera ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Centrifuga Allegra® X-15R	Beckman, USA
Centrifuga Beckman J2-MI	Beckman, USA
Centrifuga Microcentrifuge 5415 D	Eppendorf, Německo
DNA termocyklér TC-3000	MIDSCI, USA
Fluorescenční/absorbanční čtečka Infinite® M1000 PRO	Tecan, Rakousko
Fotografický film	Kodak, USA
FPLC ÄKTA Explorer	GE Healthcare, Švédsko
Konduktoměr Dual Star	Thermo Scientific, USA
Lyofilizátor CoolSafe 110-4	LaboGene, Dánsko
NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel	Life Technologies, USA
pH metr Orion DUAL STAR Meter	Thermo Scientific, USA
Předvážky PB 403-S	Mettler Toledo, Švýcarsko
PVDF membrána	Millipore, USA
Sonikátor Soniprep 150 MSE	Hielscher, Německo
Spektrofotometr BioSpectrometer Kinetic	Eppendorf, Německo
Termoblok	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Třepačka Innova 44R	New Brunswick Scientific, USA
Typhoon 9410 variable mode imager	Amersham, UK
UV prosvěcovací lampa	Bio-Rad, USA
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	Thermosavant, USA
Vertikální agarosová elektroforéza Horizon	Bio-Rad, USA
Vertikální elektroforéza XCell SureLock	Life Technologies, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA

3.2. Biologický materiál

cDNA z dospělé krevničky *S. mansoni* byla poskytnuta z laboratorních zdrojů (syntetizována z mRNA izolované ze schistosom z laboratorního cyklu na Ústavu molekulární genetiky AV ČR).

3.3. Chemikálie

Substráty a inhibitory

Bachem, Švýcarsko: Boc-Leu-Arg-Arg-AMC, Pro-Phe-Arg-AMC

Sigma-Aldrich, USA: Benzamidin, E64, Pefabloc, PMSF

Ostatní chemikálie

Sigma-Aldrich, USA:

Močovina, BSA, DTT, DMSO, glycerol, PEG 1500, Tris, glycin, arginin, agar, ampicilin, ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix, IPTG, glukosa, tween 20, 2-merkaptoethanol, GSH GSSG, YPD, MES, sorbitol, isopropanol, amoniak, činidlo bradfordové

ÚOCHB AV ČR (Dr. M. Nussbaumerová):

Fluorescenční afinitní značka BoRC

Lach-ner, ČR:

Ethanol, hydroxid sodný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, methanol, aceton, ostatní běžné chemikálie

New England Biolabs:

Restrikční endonukleasa PstI, restrikční endonukleasa SacI, pufr NEBuffer 1.1, pufr NEBuffer 3.1

Penta, ČR:

Glycerol

Invitrogen:

Plazmid pPICZαB, zeocin

Thermo Scientific, USA:

DNA standard GeneRuler DNA Ladder Mix, standard molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, roztok pro barvení polyakrylamidových gelů PageBlue Protein Staining Solution, vzorkový pufr pro elektroforézu na polyakrylamidovém gelu Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer

3.4. Kultivační media

BMM medium: YNB (13,4 g/l), biotin (0,0004 g/l), 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0

LB medium: Trypton (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l)

LSLB medium: Trypton (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), NaCl (5 g/l)

YPD medium: Pepton (20 g/l), kvasničný extrakt (10 g/l), Glukosa (20 g/l)

SOC medium: Trypton (10g/l), kvasničný extrakt (10 g/l), NaCl (0,5 g/l), KCl (0,186 g/l), MgCl₂ (0,952 g/l), glukosa (3,603 g/l)

3.5. Chromatografické kolony a nosiče

HiTrap[®] Benzamidine Fast Flow

MonoS HR 5/5

Ni-NTA Superflow (5 ml)

Sephadex G-25, HR 5/5 GE

Sigma-Aldrich, USA

GE Healthcare Life Sciences, Švédsko

Qiagen, Německo

GE Healthcare Life Sciences, Švédsko

3.6. Soupravy

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit

High-Speed Plasmid Mini Kit

Champion™ pET101 Directional TOPO® Expression Kit

In-Fusion® HD Cloning Kit

KAPA HiFi PCR Kit

Novex® ECL Chemiluminiscent Substrate Reagent Kit

PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep

Geneaid, USA

Geneaid, USA

Life Technologies, USA

Clontech USA

Kapa Biosystems, USA

Life Technologies, USA

Life Technologies, USA

3.7. Bakteriální a kvasinkové kmeny

Escherichia coli One Shot TOP10
Escherichia coli BL21 Star (DE3)
Pichia pastoris X-33

Life Technologies, USA
Life Technologies, USA
Life Technologies, USA

3.8. Seznam primerů

Primery pro klonování do pET101/D-TOPO

SmSP2C_FWp101

CACCATGATCTTAATCAATACATACTTAATCTACTTTATATGTTTT

SmSP2TRPL FWp101

CACCATGAATCTAACTAATACATGTGGAATACGTAAATCA

SmSP2TRP FWp101

CACCATGGGAATACGTAAATCAGACAATCAAATAATGG

SmSP2 REVp101

AAATATTTTTGTTGCTAATTGTTTTGATATCCAA

(části primerů zvýrazněné tučně a podtržené jsou přesahy, které byly k inzertům připojeny.

Tyto přesahy jsou nezbytné pro ligaci inzertů do plazmidu pET101/D-TOPO)

Mutační primery pro tvorbu konstruktů MUT

SmSP2TRP FWp101

CACCATGGGAATACGTAAATCAGACAATCAAATAATGG

SmSP2_MUT REV:

TTTAAATTTTTGATGGTAAAGATGCAAATCAATTTCTGGTG

SmSP2_MUT FW:

CACCAGAAATTGATTTTGCATCTTTACCATCAAAAAATTTAAA

SmSP2 REVp101:

AAATATTTTTGTTGCTAATTGTTTTGATATCCAA

Primery použité pro PCR kontrolu pozitivních kolonií

T7 FW

TAATACGACTCACTATAGGG

T7 REV

GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Primery pro klonování do plazmidu pPICZ α B

SmSP2C FWpPICZ α B

AAGAGAGGCTGAAGCTGCATCTGAATATGATTATAATAAAGAGTATATTGAT

SmSP2TRPL FWpPICZ α B

AAGAGAGGCTGAAGCTGCAAATCTAACTAATACATGTGGAATACG

SmSP2Mut FWpPICZ α B

AAGAGAGGCTGAAGCTGCAGGAATACGTAAATCAGACAATCAA

SmSP2 REVpPICZ α B

GGCCACGTGAATTCC**TTAATGATGATGATGATGATG**AAATATTTTTGTTGCTAATTGTTTTGA

(části primerů zvýrazněné tučně a podtržené jsou přesahy, které byly k inzertům připojeny. Tyto přesahy jsou nezbytné pro ligaci inzertů do plazmidu pPICZ α B pomocí systému In-Fusion. Dále byla k inzertům připojena sekvence kódující histidinovou kotvu (vyznačena zeleně) a sekvence kódující stop kodon (vyznačena červeně)

4. Metody

4.1. Exprese SmSP2 v *E. coli*

4.1.1. Amplifikace inzertů a klonování

Inzerty vkládané do expresního plazmidu byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1, teploty a časy jednotlivých kroků v tabulce 2. Celkový objem reakční směsi byl 25 μl . Jako templát byla použita cDNA dospělých jedinců *S. mansoni*.

Byly vytvořeny celkem 4 konstrukty, které se lišily délkou prodomény, jeden z nich obsahoval bodovou mutaci (podrobněji viz kap. 4.1.2.).

Tabulka 1: Reakční směs PCR reakce.

Složka	Objem [μl]
Pufř KAPA HiFi Fidelity buffer (5x)	5
dNTPs (10mM)	0,75
FW primer (10mM)	0,75
REV primer (10mM)	0,75
cDNA	0,5
KAPA HiFi DNA polymerase	0,5
Voda	16,75

Tabulka 2: Teploty a časy jednotlivých kroků PCR reakce.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95°C	3 min	1
Denaturace	98°C	20 s	35
Nasedání primeru	60°C	20 s	
Elongace	72°C	120 s	
Finální elongace	72°C	5 min	1

PCR produkty byly analyzovány elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Zóny odpovídající velikosti byly vyříznuty a DNA z nich byla izolována pomocí soupravy Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (*Geneaid*).

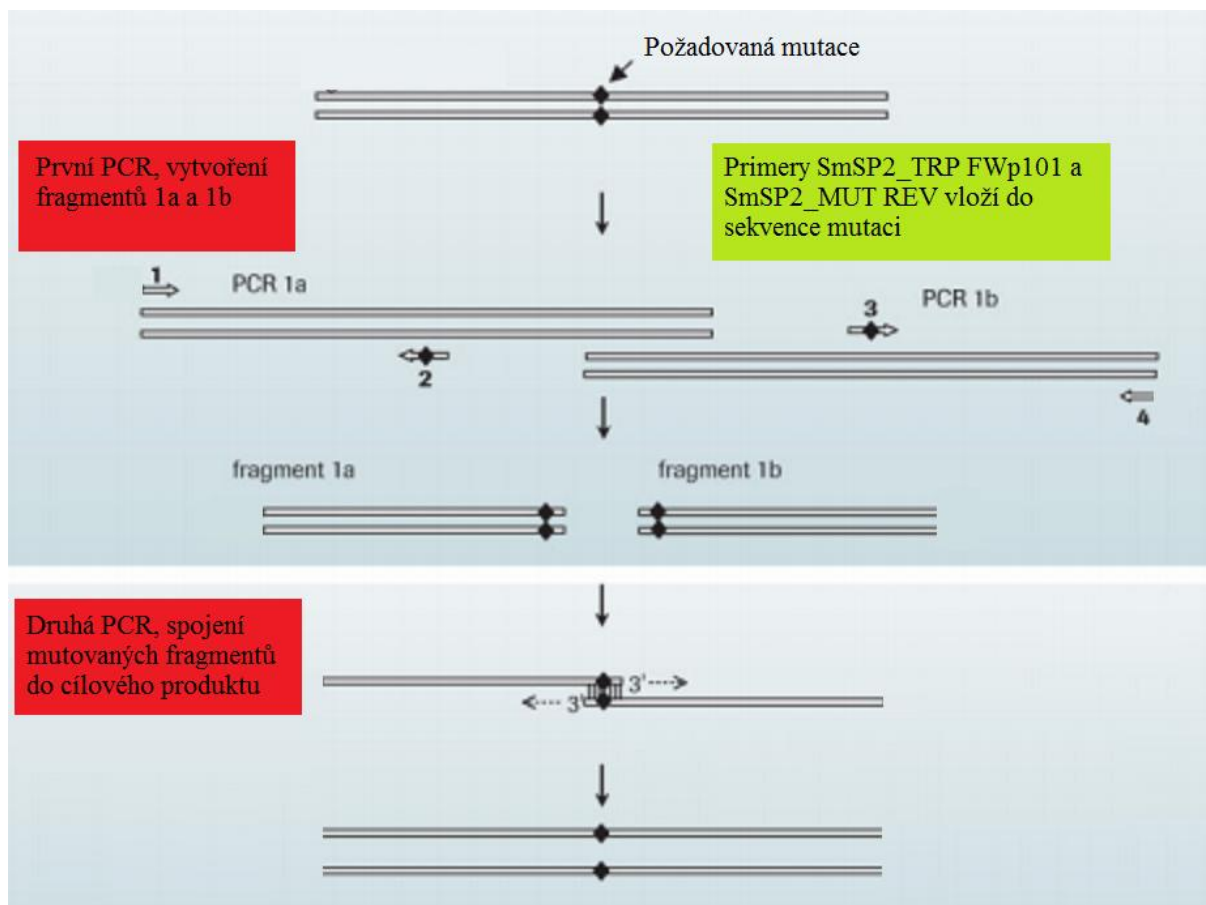
Inzerty byly zaklonovány do plazmidů pET101/D-TOPO pomocí soupravy Champion™ pET101 Directional TOPO® Expression Kit. 2 μl přečištěného PCR produktu bylo smícháno s 0,5 μl roztoku soli (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) a 0,5 μl plazmidu pET101/D-TOPO (10ng/ μl). Reakce běžela 30 min při pokojové teplotě, poté následovala transformace kompetentních buněk *E. coli* One Shot TOP10 (*Life Technologies*).

Vložení inzertu do plazmidu je založeno na aktivitě topoisomerasy I, která je vázána na plazmidu ⁴⁵. Plazmid pET101/D-TOPO umožňuje připojit histidinovou kotvu na C-konec exprimovaného proteinu pro jeho snadnou purifikaci pomocí afinitní chromatografie.

4.1.2. Příprava inzertu MUT s bodovou mutací

Konstrukt MUT obsahoval bodovou mutaci, Cys331 byl nahrazen serinem. Nejprve byly pomocí dvou samostatných PCR vytvořeny dva fragmenty. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1, teploty a časy jednotlivých kroků v tabulce 2. Fragment 1a byl vytvořen pomocí přímého primeru SmSP2_TRP FWp101 a reversního primeru SmSP2_MUT REV a obsahoval první část sekvence genu, bodovou mutaci (která byla obsažena v reverzním primeru) a za ní přesah 21 párů bazí. Fragment 1b byl vytvořen pomocí přímého primeru SmSP2_MUT FW a reversního primeru SmSP2 REVp101 a obsahoval přesah 21 párů bazí, bodovou mutaci (která byla obsažena v přímém primeru) a druhou část sekvence genu. Oba fragmenty tedy obsahovaly stejný, 43 párů bazí dlouhý úsek (fragment 1a na 3' konci, fragment 1b na 5' konci). Oba fragmenty byly analyzovány agarosovou elektroforézou a izolovány z gelu pomocí soupravy Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (*Geneaid*).

Fragmenty byly použity pro druhou PCR reakci. Bylo smícháno 7,5 µl každého fragmentu, 4 µl pufru Fidelity buffer (5x), 0,5 µl dNTPs (10mM), 0,5 µl KAPA HiFi DNA polymerase. Podmínky reakce byly stejné jako při amplifikaci inzertů, avšak pouze s deseti cykly. Během této reakce vznikl požadovaný produkt s bodovou mutací, který byl poté amplifikován pomocí PCR s použitím primerů SmSP2TRP FWp101 a SmSP2 REVp101. Postup přípravy inzertu s bodovou mutací je shrnut na obr. 12.



Obr. 12: Schéma přípravy insertu obsahujícího bodovou mutaci. Upraveno dle ⁴⁶.

4.1.3. Transformace plazmidu do buněk

Transformace kompetentních buněk *E. coli* One Shot TOP10 byla provedena teplotním šokem. Buňky byly rozmrazeny na ledu, poté k nim byl přidán plazmid (reakční směs z kap. 4.1.1.). Směs buněk s plazmidem byla inkubována 30 min na ledu, poté byla 30 s zahřívána při 42°C a poté okamžitě přemístěna zpátky na led. Následně bylo ke směsi přidáno 250 μ l SOC media a směs byla inkubována 60 min v třepačce při 37°C a 220 ot./min. Poté byly buňky rozetřeny na Petriho misky s LB agarem obsahujícím ampicilin (100 μ g/ml) a inkubovány přes noc při 37°C.

4.1.4. PCR kontrola pozitivních kolonií

Kolonie transformované plazmidem s požadovaným insertem byly identifikovány pomocí PCR. Analyzovaná kolonie byla resuspendována v reakční směs obsahující 1 μ l každého primeru (T7_FW a T7_REV, 10mM), 8 μ l vody a 10 μ l reakční směsi ReadyMixTM Taq PCR

Reaction Mix (*Sigma-Aldrich*). Teploty a časy jednotlivých kroků PCR reakce jsou uvedeny v tabulce 3. Produkty PCR reakce byly analyzovány agarosovou elektroforézou.

Tabulka 3: Teploty a časy jednotlivých kroků PCR reakce.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94°C	3 min	1
Denaturace	94°C	20 s	35
Nasedání primeru	50°C	20 s	
Elongace	72°C	120 s	
Finální elongace	72°C	5 min	1

4.1.5. Izolace plazmidové DNA

Klony, které podle agarosové elektroforézy obsahovaly inzert o očekávané délce, byly zaočkovány do 5 ml LB media s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubovány přes noc v třepačce při 37°C a 220 ot./min.

Z napěstované kultury byla izolována plazmidová DNA pomocí soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit (*Geneaid*) dle návodu výrobce.

Izolovaná plazmidová DNA byla poslána na sekvenaci do laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Sekvenace byla provedena na přístroji Genetic Analyzer 3130 (*Applied Biosystems*) s 16 kapilárami. Byla ověřena správnost sekvence inzertů v expresních plazmidech.

4.1.6. Exprese proteinu

Buňky *E. coli* BL21 Star (DE3) (*Life Technologies*) byly transformovány expresními plazmidy. Transformace byla provedena teplotním šokem (viz kap. 4.1.3.). Transformované buňky byly přidány do 10 ml LB media s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubovány přes noc v třepačce (37°C, 220 ot./min). Narostlá kultura byla použita k inokulaci 500 ml LB media s ampicilinem (100 µg/ml) a 20mM glukosou.

Bakterie byly inkubovány v třepačce (37°C, 220 ot./min) do dosažení OD = 1,0. Buňky byly centrifugovány (3000 x g, 10 min) a resuspendovány v 500 ml LB mediu s ampicilinem (100 µg/ml), které obsahovalo 1mM IPTG. Buňky byly indukovány přes noc (37°C, 220 ot./min). Další den byly buňky centrifugovány (3000 x g, 10 min), resuspendovány v sonikačním pufru (20mM Tris-HCl, pH 8,0) a sonikovány na ledu (3 x 30 s). Cytoplazmatická frakce byla izolována centrifugací (4000 x g, 10 min), inkluzní tělíska

obsažena v peletu byla resuspendována v sonikačním pufru a znovu sonikována. Tento postup byl ještě dvakrát zopakován. Inkluzní tělíska byla rozpuštěna v pufru A (8M močovina, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, pH 8,0) a zfiltrována (0,22 µm filtr) a analyzována pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

4.1.7. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu SDS-PAGE

Byl používán gradientový polyakrylamidový gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel. K 10 µl vzorku (rozpuštěná inkluzní tělíska, kap. 4.1.6.) byly přidány 4 ml vzorkového pufru (Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer, *Fermentas*) a DTT (finální koncentrace 50 mmol/l) a byly 10 min zahřívány při 90°C. Poté byly nanесeny na gel. Elektroforéza běžela 90 min při konstantním napětí 150 V.

Gel byl opláchnut 3 x 5 min v destilované vodě, poté byl 30 min barven pomocí PageBlue Protein Staining Solution (*Thermo Scientific*). Nakonec byl odbarven v destilované vodě.

4.1.8. Purifikace pomocí afinitní chromatografie

Protein byl purifikován na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona Ni-NTA Superflow s imobilizovanými ionty Ni²⁺. Tyto ionty tvoří koordinačně kovalentní vazbu s imidazolovými kruhy histidinové kotvy připojené k proteinu. Eluce se provádí puftrem obsahující 250mM imidazol. Volný imidazol kompetuje s imidazolovými skupinami histidinové kotvy o vazbu na nikelnaté ionty, a tak uvolňuje rekombinantní protein z vazby na kolonu. Kolona byla ekvilibrována 10 ml pufru A, který obsahoval 8M močovinu, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, pH 8,0, poté byl nanесen vzorek (inkluze rozpuštěné v pufru A), následovalo promytí 20 ml pufru A s 10mM imidazolem, 20 ml pufru A s 15mM imidazolem a 15 ml pufru A s 20mM imidazolem. Eluce byla provedena puftrem A obsahujícím 250mM imidazol. Průtok kolonou byl nastaven na 1ml/min.

Koncentrace proteinu v eluované frakci byla měřena metodou dle Bradfordové. K 3 µl roztoku proteinu bylo přidáno 7 µl vody a 190 µl činidla Bradfordové. Směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě a poté byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Byla sestrojena kalibrační přímka pro různé koncentrace BSA (od 0,01 mg/ml po 0,5 mg/ml), ze směrnice této přímky byla spočítána koncentrace proteinu purifikovaného afinitní chromatografií. Eluovaný protein byl analyzován pomocí SDS elektroforézy, nanášeno bylo 10 µl vzorku (kap. 4.1.7.)

Purifikovaný protein byl dialyzován (viz kap. 4.2.1.) a použit pro imunizaci králíka za účelem produkce protilátek.

4.1.9. Produkce polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky byly vytvořeny firmou Moravian Biotechnology. Imunizovaným zvířetem byl králík. Z odebraného antiséra byla izolována IgG frakce pomocí afinitní chromatografie na koloně Protein A Sepharose CL-4B. Purifikaci protilátek provedl Dr. J. Dvořák z Ústavu molekulární genetiky AV ČR

4.1.10. Imunodetekce SmSP2 pomocí polyklonálních protilátek

Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.1.7.). Bylo použito 0,5 µl vzorku doplněného vodou na 10 µl. Proteiny byly z gelu přeneseny na PVDF membránu pomocí blotovacího zařízení XCell II™ Blot Module (*Life Technologies*). Membrána byla inkubována 10 s v methanolu. Poté byly gel, membrána, filtrační papíry a pěnové podložky inkubovány 15 min v transferovém pufru. Do blotovacího zařízení byly na katodu postupně navrstveny 3 pěnové podložky, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, 3 pěnové podložky a anoda. Přenos probíhal 90 min při napětí 33 V. Celý systém byl po celou dobu chlazen ve vodní lázni s ledem.

Po přenosu byla membrána opláchnuta ve vodě a poté inkubována přes noc při 4°C v TBS-T pufru obsahujícím 3% BSA. Poté byla membrána inkubována opláchnuta TBS-T pufrům a 3 h v přítomnosti kraličích polyklonálních protilátek proti SmSP2 (Moravian Biotech, ředění 1:1000) v TBS-T pufru obsahujícím 1% BSA. Následoval oplach 4 x 10 min TBS-T pufrům a poté inkubace 2 h v přítomnosti sekundární protilátky proti králičím IgG s navázanou křenovou peroxidasou (ředění 1:5000) v TBS-T pufru obsahujícím 1% BSA. Membrána byla znovu opláchnuta 4 x 10 min v TBS-T pufru a nakonec 2 x 10 min v TBS pufru.

Vizualizace probíhala pomocí komerčního chemiluminiscenčního substrátu Novex® ECL Chemiluminiscent Substrate Reagent Kit (*Life Technologies*) s použitím fotografického filmu nebo CCD kamery.

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

TBS-T: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween 20

TBS: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl

4.2. Refolding

Protein byl exprimován neaktivní ve formě nerozpustných inkluzních tělísek, proto musel být převeden do své nativní konformace procesem zvaným refolding. V rámci této diplomové práce bylo vyzkoušeno několik variant refoldingu, které jsou popsány dále.

4.2.1. Refolding pomocí dialýzy

Roztok SmSP2 po purifikaci afinitní chromatografií na Ni-NTA koloně byl dialyzován proti pufru obsahujícímu 25mM Tris-HCl, pH = 8, 150mM NaCl, 4M močovinu, 10% glycerol a 1mM merkaptoethanol. Následovala dialýza proti stejnému pufru obsahujícímu 2M močovinu, poté proti pufru bez močoviny a nakonec proti PBS. Každá dialýza probíhala 24 h při teplotě 6°C. Byla použita dialyzační membrána s průchodností 10 kDa. Po dialýze byl protein zakoncentrován na centrifugačním koncentrátoru Amicon Ultra. Koncentrovaný protein byl použit k produkci polyklonálních protilátek.

4.2.2. Refolding pomocí ředění

Protokol pro refolding byl sestaven podle ⁴⁷. Roztok obsahující 10-30 µg SmSP2 purifikované afinitní chromatografií na Ni-NTA koloně byl přidán do roztoku obsahujícího 50mM Tris-HCl, pH 8,8, 8M močovinu a 50mM GSH. Celkový objem tohoto redukčního roztoku byl 50 µl. Redukční roztok byl 1 h míchán při laboratorní teplotě. Směs byla poté pomalu přikapávána do 450 µl refoldovacího pufru, jehož složení a pH se lišilo v uvedeném rozmezí: 50mM Tris-HCl, pH 7,5-9,5, 0-30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5mM GSSG, 0-0,5M arginin. Směs byla poté 30 min třepána při laboratorní teplotě a následně inkubována 3 dny v lednici.

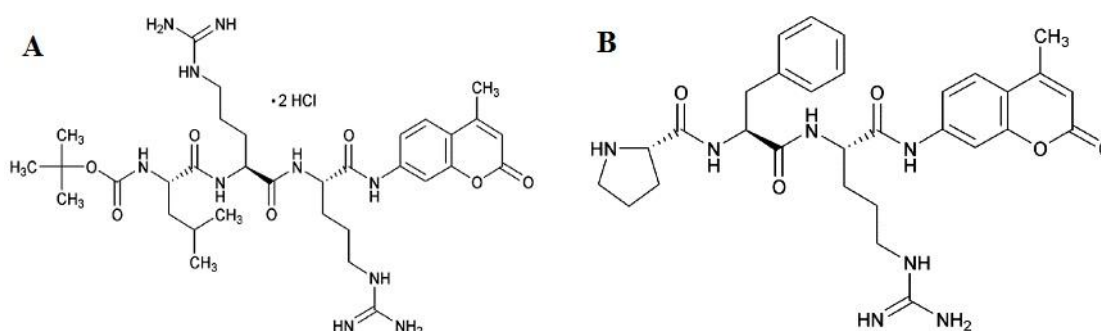
4.2.3. Refolding na koloně

Potokol byl sestaven podle ⁴⁸. Inkluzní tělíška byla rozpuštěna v nanášecím pufru o složení 20mM Tris-HCl, 0,5M NaCl, 5mM imidazol, 6M guanidin, 1mM merkaptoethanol, pH 8,0. Purifikace a refolding byly provedeny na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona Ni-NTA Superflow. Kolona byla ekvilibrována 10 ml nanášecího pufru, poté byl nanesen vzorek, následovalo promytí 20 ml pufru o složení 20mM Tris-HCl, 0,5M NaCl, 20mM imidazol, 6M urea, 1mM merkaptoethanol, pH 8,0. Refolding byl proveden lineárním gradientem močoviny

6M – 0M. Objem gradientu byl 50 ml, průtok 0,5 ml/min. Poté byla kolona promyta 10 ml pufru o složení 20mM Tris-HCl, 0,5M NaCl, 20mM imidazol, 1mM merkaptoethanol, pH 8,0. Eluce proteinu byla provedena stejným pufrům obsahujícím 250mM imidazol.

4.2.4. Měření proteolytické aktivity

Měření probíhalo na přístroji Tecan Infinite M1000. Byly používány fluorogenní substráty Boc-LRR-AMC a PFR-AMC (*Bachem*), (obr. 13). Byla měřena fluorescence odštěpeného AMC, excitační vlnová délka byla 380 nm, měřená emisní vlnová délka byla 460 nm. Měření probíhalo v 0,1M Tris-HCl pufru jehož pH se lišilo v rozmezí 8-8,8. Měření probíhalo v bílé 96 jamkové mikroděstičce, objem reakce byl 100 μ l, koncentrace substrátu byla 50 μ mol/l.



Obr. 13: Fluorogenní substráty používané pro stanovení proteolytické aktivity. A) Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Boc-LRR-AMC), upraveno dle ⁴⁹. B) Pro-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (PFR-AMC), upraveno dle ⁵⁰.

4.3. Expres SmSP2 v kvasinkách *Pichia pastoris*

4.3.1. Příprava rekombinantní DNA pro expresi SmSP2

Inzerty vkládané do expresního plazmidu byly amplifikovány pomocí PCR (viz kap. 4.1.1.). Byly vytvořeny celkem 3 konstrukty, které se lišily délkou prodromény, jeden z nich obsahoval bodovou mutaci (podrobněji viz kap. 4.1.2.).

Pomocí primerů byly k inzertům připojeny 15 bp přesahy nezbytné pro ligaci inzertu do plazmidu pomocí systému In-Fusion (*Clontech*).

Plazmid pPICZαB byl linearizován pomocí restrikční endonukleasy PstI. Reakční směs obsahovala 3 µg plazmidu, 3 µl pufru NEBuffer 3.1 (10x), 0,5 µl PstI (20 U/µl) a byla doplněna vodou na celkový objem 30 µl. Reakce běžela 3 h při 37°C, poté byla PstI inaktivována zahřátím na 80°C po dobu 20 min. Linearizovaný plazmid byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy a izolován z gelu pomocí soupravy Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (*Geneaid*). Byla změřena koncentrace a čistota linearizovaného plazmidu a inzertů pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000.

Poté byly inzerty ligovány do linearizovaného plazmidu pomocí soupravy In-Fusion® HD Cloning Kit (*Clontech*). Reakční směs je popsána v tabulce 4. Reakce probíhala 15 min při 50 °C, poté byla směs umístěna na led a použita k transformaci kompetentních buněk *E. coli* One Shot TOP10.

Tabulka 4: Složení reakční směsi

Inzert	50 ng
Linearizovaný plazmid	75 ng
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	1 µl
Voda	x µl
Celkový objem	5 µl

NEBuffer 3.1 (1x): 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100µg/ml BSA, pH 7.9

4.3.2. Transformace plazmidu do buněk *E. coli* One Shot TOP10

Transformace byla provedena stejně jako v kap. 4.1.3. s následujícími rozdíly: Místo ampicilinu byl použit zeocin (*Invitrogen*) v koncentraci 33 µg/ml. Byl použit LSLB agar.

Narostlé kolonie byly analyzovány pomocí PCR reakce, pozitivní kolonie byly vybrány pro produkci plazmidu („miniprep“), viz kap. 4.1.4 a 4.1.5.

4.3.3. Velkoobjemová příprava plazmidu

0,5 l LSLB media obsahujícího zeocin (33 µg/ml) bylo zaočkováno buňkami *E. coli* One Shot TOP10, které byly transformovány expresním plazmidem. Kultura rostla přes noc při 37°C a třepání 220 ot./min. Narostlé kultury byly centrifugovány při 4000 x g, 10min, supernatant odsán a peleta použita pro izolaci plazmidu pomocí komerční soupravy PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit (*Life Technologies*).

Byla měřena absorbance při 260 a 280 nm pro zjištění koncentrace a čistoty získané plazmidová DNA.

4.3.4. Linearizace plazmidu

Plazmidy obsahující sekvenci SmSP2 byly linearizovány restriční endonukleasou SacI. Reakční směs obsahovala 30 µg plazmidu, 1,5 µl SacI, 2 µl pufru NEBuffer 1.1 (10x). Reakční směs byla doplněna vodou na celkový objem 20 µl. Reakce běžela 3 h při 37°C. Poté byl enzym SacI inaktivován inkubací 20 min při 65°C. Následovalo srážení DNA ethanolom. K reakční směsi bylo přidáno 2 µl 3M octanu sodného a 55 µl vychlazeného 100% ethanolu. Směs byla inkubována 30 min při -20°C, poté byla centrifugována 20 min při 21 000 x g a 4°C. Peleta byla opláchnuta 200 µl vychlazeného 75% ethanolu a centrifugován za stejných podmínek. Supernatant byl odebrán, pelet vysušen na vakuové odparce a rozpuštěn v 20 µl vody. 1 µl plazmidové DNA byl analyzován elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Byla změřena koncentrace a čistota linearizovaného plazmidu pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000.

NEBuffer 1.1 (1x): 10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl₂, 100µg/ml BSA, pH 7.0

4.3.5. Transformace buněk *P. pastoris* elektroporací

50 ml YPD media bylo inokulováno buňkami *P. pastoris* X-33. Kultura byla třepána přes noc při 28°C a 200 ot./min. Narostlá kultura byla použita k inokulaci 200 ml YPD media, následovala inkubace za stejných podmínek do dosažení optické hustoty 1,5. Poté byly centrifugovány 5 min při 1500 g a 4°C. Buňky byly 2x opláchnuty 200 ml vychlazené vody a 1x 10ml předchlazeného 1M sorbitolu. Nakonec byly resuspendovány v 1 ml předchlazeného 1M sorbitolu.

Buňky v suspenzi 80 μ l byly smíchány s 10 μ g linearizovaného plazmidu, přeneseny do vychlazené elektroporační kyvety a inkubovány 5 min na ledu. Elektroporace byla provedena pulsem 2000 V, 25 μ F, 186 Ω . Okamžitě byl přidán 1 ml vychlazeného 1M sorbitolu. Obsah kyvety byl převeden do kultivační zkumavky a inkubován 2 h při 28°C bez třepání. Poté byla směs natřena na Petriho misky obsahující YPD agar se zeocinem (100 μ g/ml) a inkubována 4 dny při 28°C.

4.3.6. Expres proteinu v *P. pastoris*

Nejprve byl proveden expresní test v malém objemu. Z narostlých kolonií bylo vybráno 10 od každého konstruktu, kterými bylo inokulováno 5 ml YPD media se zeocinem (100 μ g/ml). Kolonie byly inkubovány při 28°C a 220 ot./min do dosažení $OD_{600} = 6$. Poté následovala indukce methanolem: Buňky byly centrifugovány (1 500 g, 10 min), medium bylo odebráno a buňky byly resuspendovány v 5 ml indukčního media BMM. Buňky byly třepány 5 dní při 28°C a 220 ot./min. Každý den bylo přidáno 50 μ l methanolu (celková koncentrace methanolu v mediu byla 1 %). pH media bylo každý den bylo kontrolováno a udržováno na hodnotě 6 přidáváním roztoku amoniaku. Po 3, 4 a 5 dnech od indukce byly odebrány alikvoty media, které bylo centrifugováno (3 000 x g, 10 min) a v supernatantu byla měřena proteolytická aktivita za použití substrátu PFR-AMC (viz kap. 4.2.4.). Od každého konstruktu byla vybrána jedna kolonie, u které byla naměřena nejvyšší proteolytická aktivita a byla použita pro expresi ve velkém objemu.

Velkoobjemová exprese byla provedena v 500 ml media, postup a podmínky byly stejné jako v případě exprese v malém objemu (objemy medií a ostatních komponent byly adekvátně zvýšeny).

Po 5 dnech indukce byla kultura centrifugována 10 min při 1500 g, medium bylo zamrazeno a poté lyofilizováno.

4.3.7. Gelová chromatografie na koloně G-25

Proteinová frakce media byla izolována pomocí gelové chromatografie. Lyofilizované medium bylo rozpuštěno v 50 ml 50mM Tris-HCl, pH 8,0. Tento pufr byl použit k ekvilibraci kolony a jako mobilní fáze. Rozpuštěné medium bylo aplikováno na ekvilibrovanou kolonu o objemu 470 ml obsahující nosič Sephadex G-25. Poté byla puštěna mobilní fáze, rychlost průtoku byla 2 ml/min. Byly jímány frakce o objemu 10 ml, ve kterých byla měřena

absorbance při vlnové délce 280 nm (detekce proteinů) a konduktivita (detekce solí). Ve vybraných frakcích byla měřena proteolytická aktivita se substrátem PFR-AMC. Bylo odebráno 5 µl frakce. Frakce, kde byla aktivita naměřena, byly spojeny a použity v dalších purifikačních krocích.

4.3.8. Imunodetekce

Z proteinové frakce po gelové chromatografii bylo odebráno 300 µl vzorku, který byl zkoncentrován na konečný objem 10 µl. Tento vzorek byl separován pomocí SDS-PAGE a imunodetekován. Postup byl stejný jako v kap. 4.1.10.

4.3.9. Značení SmSP2 fluorescenční značkou BoRC

Bylo provedeno značení aktivního místa pomocí fluorescenční značky BoRC. Bylo smícháno 25 µl vzorku (proteinová frakce po gelové chromatografii), inhibitor cysteinových proteas E-64 (výsledná koncentrace 0,1 mmol/l) a doplněno na 27,5 µl pufrům obsahujícím 20mM Tris-HCl, pH 8,0. Směs byla inkubována 15 min na ledu. Kontrolní vzorky obsahovaly navíc inhibitor serinových proteas Pefabloc (výsledná koncentrace 1 mmol/l) a byly inkubovány 15 min při 37°C. Poté bylo ke všem vzorkům přidáno 2,5 µl směsi obsahující fluorescenční značku (finální koncentrace 1 µmol/l). Vzorky byly inkubovány 1 h na při 37°C. Poté byly vzorky separovány elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Gel byl vizualizován na fluorescenčním skeneru Typhoon při excitační vlnové délce 532 nm a s emisním flitrem na 550 nm.

4.3.10. Afinitní chromatografie na koloně Ni-NTA Superflow

Purifikace byla provedena na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona Ni-NTA Superflow. Kolona byla ekvilibrována 10 ml pufru o složení 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 8,0. Poté byl nanesen vzorek, následovalo promytí 30 ml stejného pufru s 20mM imidazolem. Eluce byla provedena stejným pufrům obsahujícím 250mM imidazol.

Koncentrace proteinu v eluované frakci byla měřena metodou dle Bradfordové (viz kap. 4.1.8.). Eluovaný protein byl analyzován pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.1.7.)

4.3.11. Iontově výměnná chromatografie na koloně Mono S

Na kolonu MonoS HR 5/5 ekvilibrovanou nanášecím pufrem o složení 20 mM MES, pH 5 byl nanesen vzorek (SmSP2 po gelové chromatografii). Poté byl kolona promyta 15 ml nanášecího pufru. Průtok byl při všech krocích 0,5 ml/ min. Eluční pufr obsahoval 20 mM MES, 1M NaCl, pH = 5. Eluce byla provedena lineárním gradientem 1M NaCl. Objem gradientu byl 50 ml, průtok 0,5 ml/min. Byly sbírány frakce o objemu 2 ml. Průběh purifikace byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Ve vybraných frakcích byla měřena proteolytická aktivita za použití fluorogenního substrátu PFR-AMC (viz kap. 4.2.4.). Frakce, které vykazovaly proteolytickou aktivitu, byly převedeny do pufru obsahujícího 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 pomocí centrifugačního koncentrátoru Amicon Ultra.

4.3.12. Afinitní chromatografie na koloně HiTrap Benzamidine FF

Chromatografie byla provedena na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona HiTrap Benzamidine FF (1 ml). Kolona byla promyta 10 ml vody a poté ekvilibrována 10 ml pufru o složení 0,5M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0. Následně byl nanesen vzorek. Kolona byla promyta nanášecím pufrem. Eluce byla provedena pufrem o složení 50mM glycin, pH 3,0. Průběh purifikace byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Ve sbíraných frakcích bylo okamžitě upraveno pH na hodnotu 8 pomocí pufru obsahujícího 1M Tris-HCl, pH 9,0. Poté byla v těchto frakcích měřena proteolytická aktivita za použití fluorogenního substrátu PFR-AMC (kap. 4.2.4.).

4.4. Biochemická analýza SmSP2

Pro biochemickou analýzu byla použita SmSP2 exprimovaná v *P. pastoris* a purifikovaná pomocí iontově výměnné chromatografie.

4.4.1. Měření pH optima SmSP2

Pro zjištění pH optima byla měřena proteolytická aktivita SmSP2 v pufrech jejichž pH se pohybovalo od 5,0 do 10,5. Vzhledem k širokému rozmezí pH musely být použity různé pufrů, které jsou uvedeny v tabulce 5. Měření bylo provedeno s enzymem purifikovaným

pomocí iontové výměnné chromatografie, použité množství SmSP2 v jedné reakci bylo 1 ng, použitý substrát PFR-AMC o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$, celkový objem reakce 100 μl . Měření probíhalo při teplotě 37°C.

Tabulka 5: Pufry použité pro měření pH optima SmSP2

Pufr	pH
0,1M Na-citrát/fosfát	5 - 7
0,1M Tris-HCl	7,5 - 9
0,05M Glycin/NaOH	9,5 – 10,5

4.4.2. Inhibice proteolytické aktivity

Pro inhibici proteolytické aktivity bylo testováno několik různých inhibitorů proteas (tab. 8, kap. 5.5.3.). Roztok enzymu byl nejprve inkubován 10 min s inhibitorem, poté byl přidán substrát a byla měřena proteolytická aktivita. Jako kontrola sloužil enzym bez inhibitoru. Měření probíhalo v pufru o složení 0,1M Tris-HCl, pH 8,5, byl použit substrát PFR-AMC (50 $\mu\text{mol/l}$), celkový objem reakce byl 100 μl , množství SmSP2 v reakci byl 1 ng. Reakce probíhala při 37°C

4.4.3. Určení substrátové specifity SmSP2

Pro určení substrátové specifity byla použita kombinatoriální knihovna syntetických peptidů (Positional Scanning Synthetic Combinatorial Library, PS-SCL) poskytnutá laboratoří prof. Charlese Craika (University of California, San Francisco).

Byla měřena proteolytická aktivita proteasy SmSP2 v každé z 80 subknihoven. Byla měřena fluorescence odštěpeného ACC v čase. Excitační vlnová délka byla 380 nm, emitovaná fluorescence byla měřena při 460 nm. Měření probíhalo v černé 96 jamkové mikrodestičce. Reakce probíhala 1 h v pufru obsahujícím 0,1M Tris-HCl, pH 8,5; 0,01% Tween 20 při 37°C. Finální koncentrace každé složky z celkových 8000 složek jedné subknihovny v jedné jamce bylo 31,25 nmol/l. Použité množství SmSP2 v jedné reakci bylo 5 ng. Celkový objem reakce byl 100 μl .

5. Výsledky

5.1. Rekombinantní exprese SmSP2 v *E. coli*

Hlavním cílem práce bylo připravit dostatečné množství rekombinantního proteinu pro jeho další studium. Nejprve byl zvolen bakteriální expresní systém, pro svou jednoduchost, rychlost a vysoké výtěžky. SmSP2 obsahuje disulfidické můstky, takže bylo pravděpodobné, že protein nebude exprimován v nativní konformaci a bude muset být refoldován.

5.1.1. Klonování

Inzerty byly úspěšně amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce. Byly vytvořeny celkem 4 konstrukty, které se vzájemně lišily délkou propeptidu (obr. 14). Konstrukt C („complete“) obsahoval kompletní sekvenci SmSP2 (s celou N-termínální extenzí o délce 200 aminokyselin), ale předpokládal jsem, že refolding tohoto konstruktu bude velmi komplikovaný. Proto byly vytvořeny další konstrukty s N-termínální extenzí obsahující pouze propeptid. Konstrukt TRP („trypsin“) měl kratší propeptid o délce 12 aminokyselin. Vzhledem k tomu, že konstrukt TRP neobsahoval v propeptidu Cys188, který tvoří disulfidický můstek s Cys331, byl vytvořen ještě konstrukt TRPL („trypsin long“) s propeptidem o délce 18 aminokyselin obsahující Cys188, a konstrukt MUT, který měl stejný propeptid jako TRP a Cys331 zmutován a nahrazen serinem.

Inzerty byly vloženy po plazmidu pET101/D-TOPO, který umožňuje připojit histidinovou kotvu na C-konec řetězce rekombinantního proteinu. Tato fúzní značka usnadňuje purifikaci pomocí chelatační afinitní chromatografie. Klonování probíhalo pomocí ligační aktivity topoisomerasy I navázané na plazmidu.

Transformace plazmidů do kompetentních buněk *E. coli* byla provedena teplotním šokem. Nejprve byl transformován kmen TOP10, který byl použit k propagaci plazmidu. Z pozitivních klonů byla izolována plazmidová DNA a pomocí sekvenování DNA byla ověřena správnost sekvence a orientace vloženého inzertu.

Konstrukt C:

MILINTYLIYFICFILSFIPNSNTSEYDYNKEYIDEESLNQFINNSNDGDDDDYDHDHHRHDDHHRHDDHHRH
HPQHIHKNVGRKIQQKFFPLSFHFNRPKSQEIYVFNIERYSNWSDWKECLPMECIEIRYRKCLDDSWKTISP
HTTRCISKYAAEKRTCLNKTCNEYTGDQI IKNLNTNGIRKSDNQIMEKILGGKAVEPHSWP
AVRLSVKLP
RRRSVTFGGTLIAPQWILTAAHVLVENKHIPV
GKPVMLADHMKSTIY
AHLGDH
DRYKQEA
AQIDHRV
TVAI
LHPN
YHRK
LQTDG
YDIAL
LRLSE
PVKT
TPEID
FACL
PSKNL
KLT
SNSK
CYAV
GWGS
NKG
GKI
PTFD
NIH
SILE
SLFL
PFP
PSL
FNT
PFT
FGR
RESS
IWN
IKK
LEEE
ESS
SKEL
HEVE
LPIV
SIDD
RKYY
ADIS
SKV
HVAG
AKNK
DTAG
DSSG
GGLY
CYLE
DTNR
WHIV
GVTS
FGL
ARG
GLN
PGV
YTST
SSH
MDW
ISK
QLAT
KIF

Konstrukt TRPL:

NLTNTNGIRKSDNQIMEKILGGKAVEPHSWP
AVRLSVKLP
RRRSVTFGGT
LIAPQWIL
TAAHVL
VENKH
IPV
GKPV
MLAD
HMKS
TIYA
HLGD
H
DRYK
QEA
AQID
HRV
TVAI
LHPN
YHRK
LQTD
G
YDIA
LLRL
SE
PVKT
TPEI
DFACL
PSKN
L
KLT
SNSK
CYAV
GWGS
NKG
GKI
PTFD
NIH
SILE
SLFL
PFP
PSL
FNT
PFT
FGR
RESS
IWN
IKK
LEEE
ESS
SKEL
HEVE
LPIV
SIDD
RKYY
ADIS
SKV
HVAG
AKNK
DTAG
DSSG
GGLY
CYLE
DTNR
WHIV
GVTS
FGL
ARG
GLN
PGV
YTST
SSH
MDW
ISK
QLAT
KIF

Konstrukt TRP:

GIRKSDNQIMEKILGGKAVEPHSWP
AVRLSVKLP
RRRSVTFGGT
LIAPQWIL
TAAHVL
VENKH
IPV
GKPV
MLAD
HMKS
TIYA
HLGD
H
DRYK
QEA
AQID
HRV
TVAI
LHPN
YHRK
LQTD
G
YDIA
LLRL
SE
PVKT
TPEI
DFACL
PSKN
L
KLT
SNSK
CYAV
GWGS
NKG
GKI
PTFD
NIH
SILE
SLFL
PFP
PSL
FNT
PFT
FGR
RESS
IWN
IKK
LEEE
ESS
SKEL
HEVE
LPIV
SIDD
RKYY
ADIS
SKV
HVAG
AKNK
DTAG
DSSG
GGLY
CYLE
DTNR
WHIV
GVTS
FGL
ARG
GLN
PGV
YTST
SSH
MDW
ISK
QLAT
KIF

Konstrukt MUT:

GIRKSDNQIMEKILGGKAVEPHSWP
AVRLSVKLP
RRRSVTFGGT
LIAPQWIL
TAAHVL
VENKH
IPV
GKPV
MLAD
HMKS
TIYA
HLGD
H
DRYK
QEA
AQID
HRV
TVAI
LHPN
YHRK
LQTD
G
YDIA
LLRL
SE
PVKT
TPEI
DFASL
PSKN
L
KLT
SNSK
CYAV
GWGS
NKG
GKI
PTFD
NIH
SILE
SLFL
PFP
PSL
FNT
PFT
FGR
RESS
IWN
IKK
LEEE
ESS
SKEL
HEVE
LPIV
SIDD
RKYY
ADIS
SKV
HVAG
AKNK
DTAG
DSSG
GGLY
CYLE
DTNR
WHIV
GVTS
FGL
ARG
GLN
PGV
YTST
SSH
MDW
ISK
QLAT
KIF

Obr. 14: Aminokyselinová sekvence jednotlivých konstruktů. Sekvence propeptidu je psána černou barvou, trypsinová doména je červená. Párování cysteinových zbytků je odvozeno z porovnání sekvence SmSP2 se sekvencemi trypsinu a chymotrypsinu. Zbytky cysteinu, které spolu v rámci peptidasové domény tvoří disulfidické můstky jsou vyznačeny stejnou barvou (žlutě, zeleně, šedě, světle a tmavě modře). V konstruktu MUT je žlutě označen serin, kterým byl nahrazen původní cystein. Konstrukt C obsahoval kompletní propeptid, u ostatních konstruktů byl zkrácen (propeptid konstruktů TRPL obsahoval 18 aminokyselin, propeptidy konstruktů TRP a MUT 12 aminokyselin). Konstrukt MUT obsahoval bodovou mutaci – Cys331 byl nahrazen serinem.

5.1.2. Exprese SmSP2 v *E. coli*

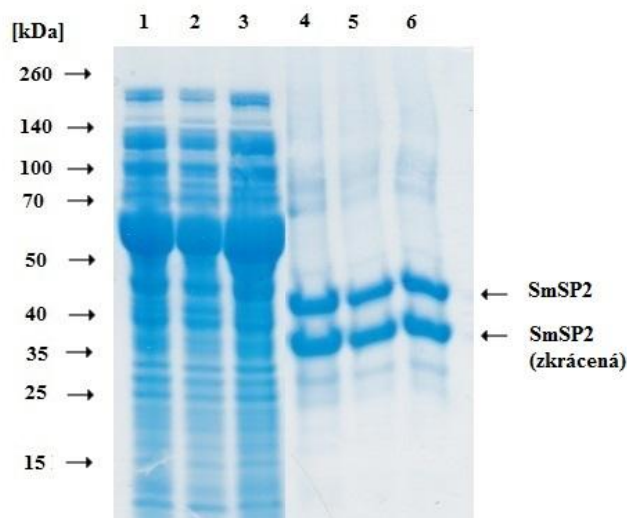
Pro exprese byly použity buňky *E. coli* BL21 Star (DE3). U konstruktů TRP, TRPL a MUT byla exprese poměrně vysoká, u konstruktů C však k expresi nedocházelo. Exprese tohoto konstruktů byla vyzkoušena i v jiném kmeni *E. coli* (Rosetta), ale výsledky byly také negativní. Tento konstrukt tedy nebyl v bakteriálním systému exprimován a dále bylo

pracováno pouze s konstrukty TRP, TRPL a MUT. Konstrukt C byl úspěšně exprimován v eukaryotickém systému *P. pastoris* (kap. 5.3.).

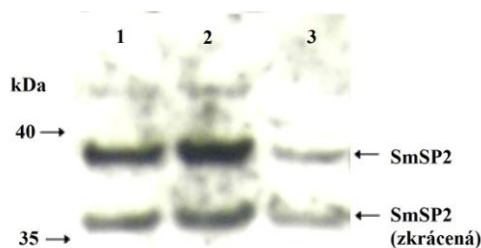
Protein se nacházel v inkluzních tělískách, které byly izolovány, rozpuštěny a použity jako výchozí vzorek pro purifikaci pomocí afinitní chromatografie.

5.1.3. Purifikace pomocí afinitní chromatografie

Konstrukty TRP, TRPL a MUT byly exprimovány s připojenou histidinovou kotvou, která umožnila purifikaci pomocí afinitní chromatografie. Purifikace byla provedena na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona Ni-NTA Superflow s imobilizovanými ionty Ni^{2+} . Vstupní materiál byly inkluze rozpuštěné v pufru obsahujícím 8M močovinu. Záznam průběhu afinitní chromatografie pro konstrukt MUT je na obr. 17. Chromatogramy ostatních dvou konstruktů byly analogické. Eluovaná frakce byla analyzována SDS elektroforézou a pomocí imunodetekce (obr. 15 a 16).



Obr. 15: SDS – PAGE analýza rozpuštěných inkluzních tělísek a proteinů eluovaných z chromatografie SmSP2 na koloně Ni-NTA. Byl použit gradientový polyakrylamidový gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel. Bylo nanášeno 10 μg vzorku. Dráhy 1, 2 a 3 obsahují inkluzní tělíška konstruktů MUT, TRP a TRPL, dráhy 4, 5 a 6 obsahují eluční frakce (ve stejném pořadí). Gel barven pomocí PageBlue Protein Staining Solution (*Thermo Scientific*). Označeny jsou standardy molekulových hmotností.

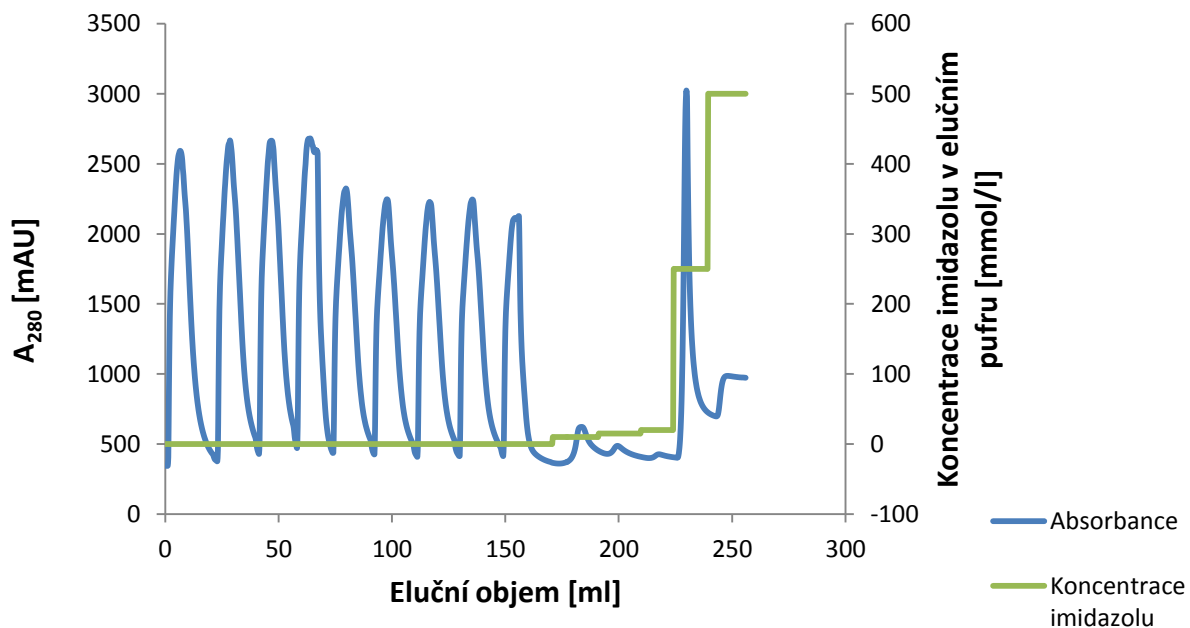


Obr. 16: SmSP2 analyzována pomocí imunodetekce. Byla provedena SDS-PAGE proteinů eluovaných z chromatografie SmSP2 na koloně Ni-NTA. Byl použit gradientový polyakrylamidový gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel, nanášeno bylo 0,5 µl vzorku (koncentrace pro jednotlivé konstrukty jsou uvedeny v tab. 6). Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a imunodetkovány králičí polyklonální protilátkou proti SmSP2 a sekundární protilátkou proti králičímu IgG s navázanou křenovou peroxidasou. Dráhy 1, 2 a 3 obsahují jednotlivé konstrukty v pořadí: MUT, TRP a TRPL.

Pro všechny tři konstrukty byly nalezeny dva pásy. Jeden z nich velikostí odpovídal SmSP2 (předpokládaná molekulová hmotnost konstruktů TRPL byla 39 kDa, pro konstrukty MUT a TRP 38,5 kDa). Druhý pás odpovídal velikosti asi 35 kDa. Oba pásy byly analyzovány hmotnostní spektrometrií, která potvrdila, že se opravdu jedná o SmSP2. Dále byla určena N-koncová sekvence obou proteinů. V případě delšího proteinu byly nalezeny sekvence, které u všech tří konstruktů odpovídají odpovídajícímu N-konci konstruktů SmSP2, kratší protein ve všech případech začínal N-koncovou sekvencí MLADHM. Kromě kompletních konstruktů SmSP2 tedy docházelo také k expresi neúplného proteinu. Exprese začínala od Met262. Koncentrace proteinu v elučních frakcích byla měřena metodou dle Bradfordové. Koncentrace jednotlivých konstruktů a jejich celkové množství jsou uvedeny v tab. 6.

Tab. 6: : Koncentrace proteinu v elučních frakcích po purifikaci SmSP2 pomocí chelatační chromatografie. Objem media, ve kterém byla exprese proteinu provedena, byl 0,5 l

Konstrukt	Koncentrace proteinu [mg/ml]	Celkové množství proteinu [mg]
TRP	1,1	12,6
TRPL	1,5	14,4
MUT	1,9	15,1



Obr. 17: Purifikace SmSP2 konstruktů MUT z inkluzí pomocí chelatační chromatografie na koloně Ni-NTA Superflow (5 ml). Na ekvilibrovanou kolonu bylo naneseno celkem 90 ml rozpuštěných inkluzních tělísek postupně po 10 ml. Potom následovalo promytí ekvilibračním pufrům obsahujícím 10mM, 15 mM a 20mM imidazol, poté byla provedena eluce ekvilibračním pufrům obsahujícím 250mM imidazol. Nakonec byla zvýšena koncentrace imidazolu v elučním pufru na 500 mmol/l, ale žádné další proteiny už eluovány nebyly. Detekce byla prováděna kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm (A_{280}).

5.2. Refolding

Protein nebyl exprimován ve své nativní konformaci, ale špatně složený ve formě nerozpustných inkluzních tělísek. Proto bylo potřeba protein převést do správné konformace procesem zvaným refolding. Všechny metody refoldingu jsou založeny na podobném principu. Nejprve je protein zdenaturován silným denaturačním činidlem (obvykle vysoce koncentrovaná močovina nebo guanidin). Poté je přidáno redukční činidlo (např. DTT, GSH, merkaptoethanol), aby došlo k přerušení disulfidických můstků, které se mohli nesprávně vytvořit. Následně je denaturační činidlo odstraněno nebo zředěno natolik, aby se jeho denaturační účinky neprojevíly. Zároveň jsou přidány látky, které usnadňují refolding. Tyto

látky lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky, které posilují protein - proteinové interakce. Patří sem například polyoly (glycerol, sorbitol, sacharosa) a některé soli (síran amonný). Do druhé skupiny patří látky zabraňující agregaci proteinů. Jsou to například cyklodextriny, arginin nebo prolin ⁵¹.

Výchozím materiálem pro refolding byla SmSP2 purifikovaná pomocí afinitní chromatografie. Všechny varianty refoldingu byly provedeny se všemi třemi konstrukty (TRP, TRPL a MUT). Sbalení SmSP2 do správné konformace bylo testováno aktivním testem s použitím substrátů LRR-AMC a PFR-AMC. Při použití substrátu PFR-AMC byly naměřeny vyšší proteolytické aktivity, proto jsou zde prezentována data z měření s tímto substrátem.

5.2.1. Refolding pomocí dialýzy

Roztok SmSP2 po purifikaci afinitní chromatografií na Ni-NTA koloně byl dialyzován v několika krocích, aby se koncentrace močoviny snižovala pozvolna, při prudkém snížení koncentrace močoviny by mohlo docházet ve velké míře k precipitaci proteinu.

Dialyzační refolding nebyl úspěšný. Roztok proteinu po dialýze nevykazoval proteolytickou aktivitu. Byly provedeny pokusy i s jiným složením dialyzačních pufrů, ale výsledky byly také negativní.

Dialyzovaný protein byl zakoncentrován a použit pro produkci protilátek.

5.2.2. Refolding SmSP2 na koloně

Refolding na koloně probíhal hned po afinitní chromatografii. SmSP2 obsahovala histidinovou kotvu, pomocí níž byla zachycena na koloně s imobilizovanými Ni²⁺ ionty. Kolona se zachyceným proteinem byla promývána refoldovacím pufrem, ve kterém se kontinuálně snižovala koncentrace močoviny až na nulovou koncentraci. Nakonec byla kolona promývána refoldovacím pufrem bez močoviny. Během tohoto procesu se měl protein refoldovat. Následně byl protein eluován refoldovacím pufrem obsahujícím 250 mM imidazol.

Refolding na koloně nebyl úspěšný. Eluovaný protein nevykazoval proteolytickou aktivitu.

5.2.3. Refolding pomocí ředění

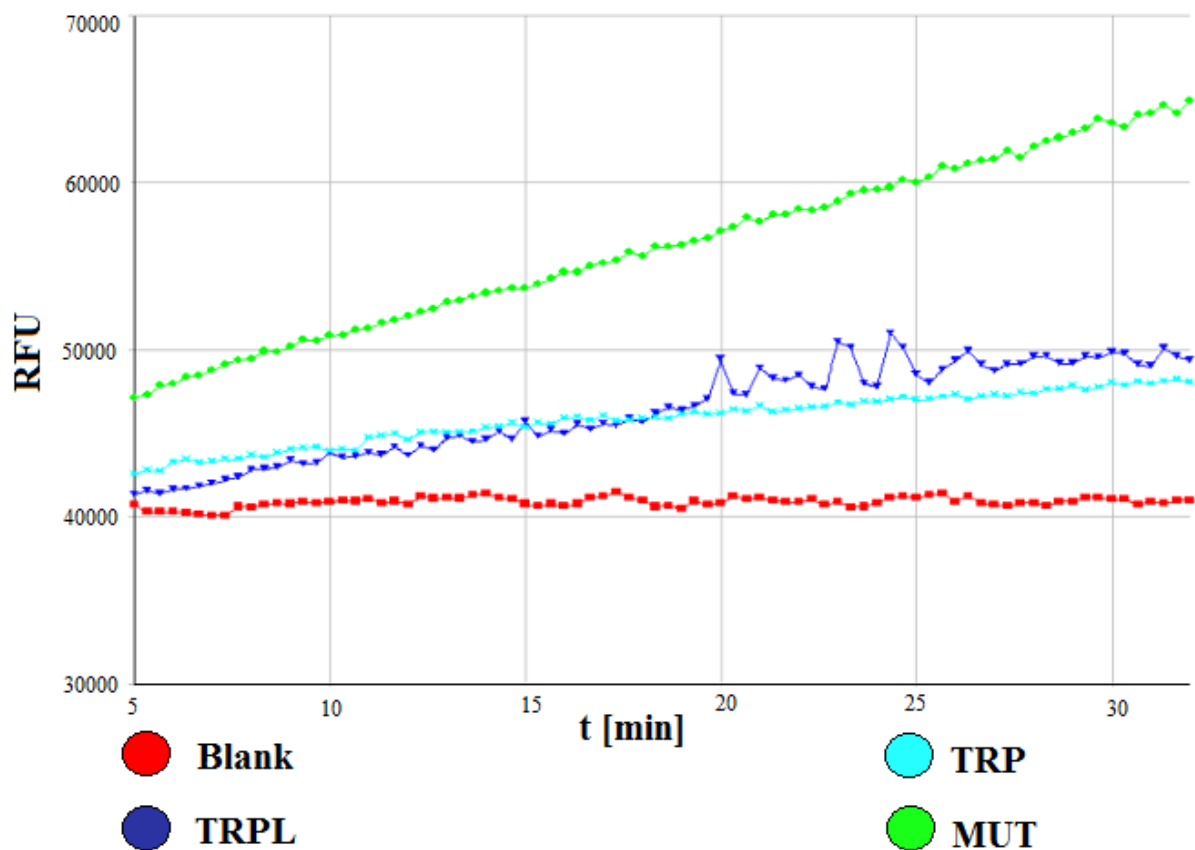
V případě dilučního refoldingu není denaturační činidlo z roztoku odstraněno, ale zředěno natolik, že už protein nedokáže denaturovat. Ředěné denaturační činidlo může naopak napomáhat refoldingu tím, že brání agregaci proteinu.

Protein, nacházející se v denaturačním pufru obsahujícím 8M močovinu, byl nejprve redukován pomocí 50mM GSH. Poté byl zredukovaný protein pomalu přikapáván do refoldovacího pufru za stálého míchání. Bylo vyzkoušeno několik různých variant refoldovacího pufru, které se mezi sebou lišily obsahem a koncentrací jednotlivých složek, koncentrací proteinu a pH (kap. 4.2.2.).

Složení redukčního a refoldovacího pufru, se kterými bylo dosaženo nejlepších výsledků, je uvedeno v tab. 7.

Tab. 7: Složení redukčního a refoldovacího pufru použitých pro úspěšný refolding.

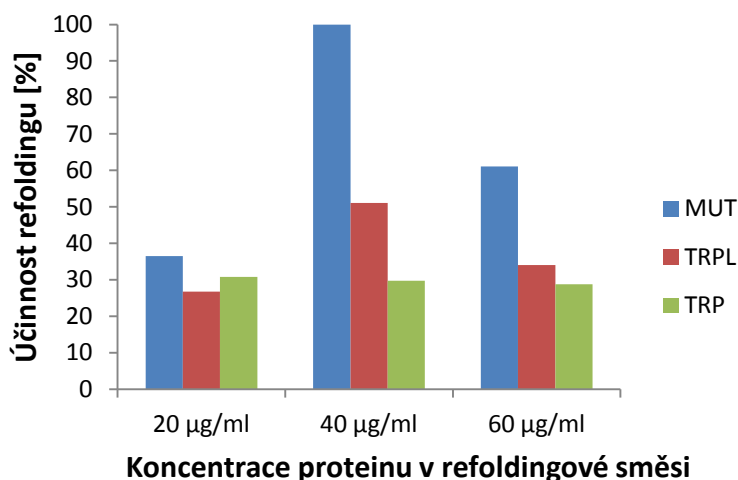
Redukční pufr	Refoldovací pufr
50mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl
8M močovina	30% glycerol
50mM GSH	0,05% PEG 1500
	0,5mM GSSG
pH 8,8	pH 8,8



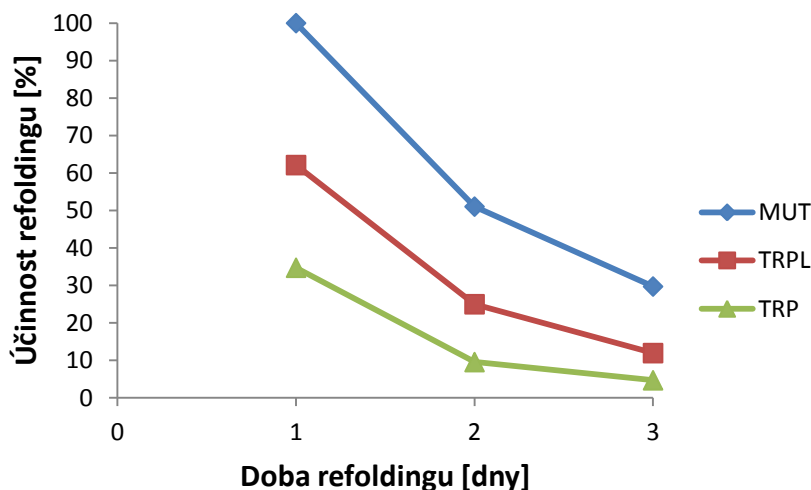
Obr. 18: Měření proteolytické aktivity (1. den refoldingu). Byl použit substrát PFR-AMC (finální koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$), reakce probíhala v 0,1M Tris-HCl. Bylo použito 30 μl refoldovací směsi, celkový objem reakce byl 100 μl . Aktivita je vyjádřena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU). Jako blank byla použita refoldovací směs, ve které chyběla SmSP2 (směs redukčního a refoldovacího pufru).

Nejvyšší proteolytickou aktivitu vykazoval konstrukt MUT, konstrukty TRPL a TRP měly aktivitu podobně vysokou (obr. 18). Refolding byl proveden pro tři různé koncentrace SmSP2 v refoldovací směsi (20, 40 a 60 $\mu\text{g/ml}$). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 19).

Byla měřena závislost účinnosti refoldingu na délce inkubace. Účinnost refoldingu byla pro všechny tři konstrukty nejvyšší po prvním dnu inkubace (obr. 20).



Obr. 19: Závislost účinnosti refoldingu na koncentraci proteinu v refoldovací směsi (viz tab. 7). SmSP2 byla redukována v pufru o složení 50mM Tris HCl, 8M močovina, 50mM GSH, pH 8,8. Poté byla směs přikapávána do refoldovacího pufru o složení 50mM Tris-HCl, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5mM GSSG, pH 8,8. Směs byla inkubována 24 h při 4°C. Byl použit substrát PFR-AMC (finální koncentrace 50 µmol/l), reakce probíhala v 0,1M Tris-HCl. Bylo použito 30 µl refoldovací směsi, celkový objem reakce byl 100 µl. Aktivita je vyjádřena přírůstkem relativních fluorescenčních jednotek za sekundu (RFU/s) a normalizována na nejvyšší naměřenou hodnotu.



Obr. 20: Závislost účinnosti refoldingu na době inkubace. SmSP2 byla redukována v pufru o složení 50mM Tris HCl, 8M močovina, 50mM GSH, pH 8,8. Poté byla směs přikapávána do refoldovacího pufru o složení 50mM Tris-HCl, 30% glycerol, 0,05% PEG 1500, 0,5mM GSSG, pH 8,8. Směs byla inkubována 3dny při 4°C. Byl použit substrát PFR-AMC (finální koncentrace 50 µmol/l), reakce probíhala v 0,1M Tris-HCl. Bylo použito 30 µl refoldovací směsi, celkový objem reakce byl 100 µl. Aktivita byla vyjádřena přírůstkem relativních fluorescenčních jednotek za sekundu (RFU/s) a normalizována na nejvyšší naměřenou hodnotu. Finální koncentrace proteinu byla 40 µg/ml proteinu.

Celková úspěšnost refoldingu byla poměrně nízká, tj. pomocí této metody se nepodařilo připravit dostatečné množství proteinu pro další experimenty, proto byl zvolen alternativní postup – SmSP2 byla exprimována v eukaryotickém expresním systému, kvasinkách *Pichia pastoris*.

5.3. Expres SmSP2 v kvasinkách *Pichia pastoris*

5.3.1. Příprava expresních vektorů pro expresi SmSP2 v *P. pastoris*

Inzerty byly úspěšně amplifikovány pomocí PCR. Byly vytvořeny 3 konstrukty označené C, TRPL a MUT. Tyto konstrukty se shodovaly s konstrukty použitými pro expresi v *E. coli* (obr. 14), ale obsahovaly na koncích přesahy dlouhé 15 párů bazí. Tyto přesahy byly nezbytné pro ligaci do expresního vektoru. Inzerty byly ligovány do plazmidu pPICZ α B pomocí soupravy In-Fusion® HD Cloning Kit (*Clontech*).

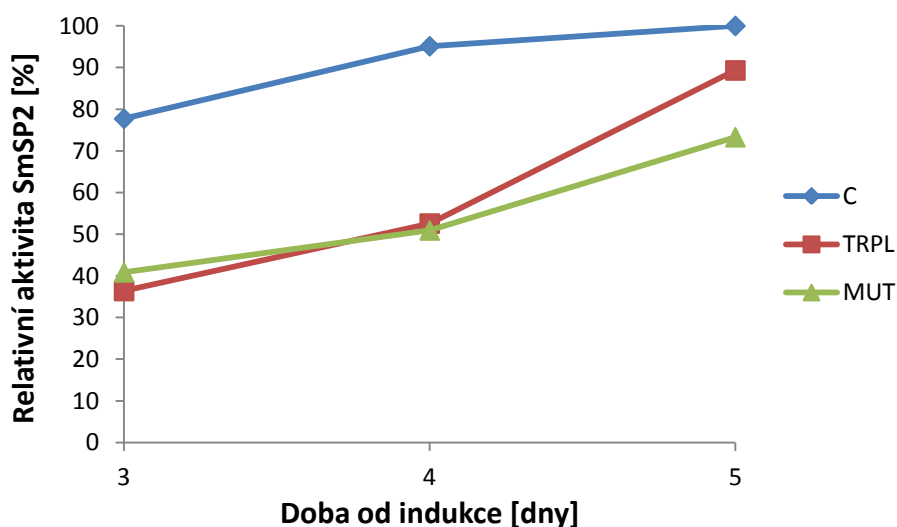
Plazmid pPICZ α B obsahuje signální sekvenci kvasinkového α -faktoru umožňující sekreci exprimovaného proteinu do media. Vzhledem k této signální sekvenci neobsahoval konstrukt C signální sekvenci SmSP2, která se nachází na N-konci kompletní SmSP2. Dále je v tomto plazmidu obsažen gen zajišťující rezistenci na zeocin (*Sh ble* gen). Zeocin byl použit jako selekční marker. Pomocí primerů byla na C-konec inzertů připojena DNA sekvence kódující šest histidinů (histidinová kotva).

Transformace plazmidu do kompetentních buněk *E. coli* One Shot TOP10 (*Life Technologies*) byla provedena teplotním šokem. Tyto buňky byly použity k propagaci plazmidu. Buňky byly kultivovány na LB agaru obsahujícím zeocin, čímž byly selektovány pouze transformované klony. Z těchto buněk byl plazmid izolován a pomocí sekvenace byla ověřena správnost sekvence a orientace vloženého inzertu. Klony *E. coli*, které obsahovaly plazmidy se správně vloženými inzerty byly použity pro velkoobjemovou produkci plazmidů.

5.3.2. Exprese SmSP2

Plazmid linearizovaný restriční endonukleasou *SacI* byl transformován do buněk elektroporací. Tato metoda se ukázala jako velmi účinná. Transformované buňky byly rozetřeny na petriho misky, které obsahovaly YPD agar se zeocinem, který sloužil jako selekční marker. Z kolonií narostlých na miskách bylo vybráno deset od každého konstruktu. Tyto kolonie byly použity pro zaočkování YPD media se zeocinem, kultivace probíhala 24 hodin. Poté byly buňky převedeny do BMM média a v tomto médiu byla exprese indukována přidáním methanolu. Indukce trvala 5 dní, každý den byl přidáván methanol do finální koncentrace 1 %. Po 3, 4 a 5 dnech od začátku indukce byly odebírány alikvoty expresního media, ve kterých byla měřena proteolytická aktivita SmSP2 pomocí kinetického testu se substrátem PFR-AMC. U všech kolonií a konstruktů aktivita s dobou indukce rostla (obr. 21), maximální akumulace aktivity SmSP2 bylo dosaženo 5 den. Nejvyšší aktivita byla naměřena u konstruktu C, konstrukt MUT měl o něco nižší aktivitu, nejnižší měl konstrukt TRPL. Obecně však byly aktivity pro všechny konstrukty vysoké. Jako kontrola při měření byl použit buňky *Pichia pastoris* X-33, které nebyly transformovány expresním plazmidem. Tyto buňky byly kultivovány za stejných podmínek, s tím rozdílem, že kultivační medium neobsahovalo zeocin.

Od každého konstruktu byl vybrán jeden klon, u kterého byla pozorována nejvyšší proteolytická aktivita. Tyto klony byly použity pro preparativní expresi, která byla provedena za stejných podmínek jak expresní test, jen byl zvýšen objem media na 500 ml. Po pěti dnech bylo medium odebráno, buňky odstaněny centrifugací, médium filtrováno a lyofilizováno.



Obr. 21: Časový průběh exprese SmSP2 v *P. pasatoris*. V průběhu exprese byly v uvedených intervalech (osa x) odebrány alikvoty expresního média, ve kterém byla následně měřena proteolytická aktivita SmSP2. Byl použit substrát PFR-AMC (finální koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$), reakce probíhala v 0,1M Tris-HCl. Bylo použito 10 μl media, celkový objem reakce byl 100 μl . Aktivita je vyjádřena v procentech přírůstku relativních fluorescenčních jednotek za sekundu (RFU/s) normalizovaných na nejvyšší naměřenou hodnotu.

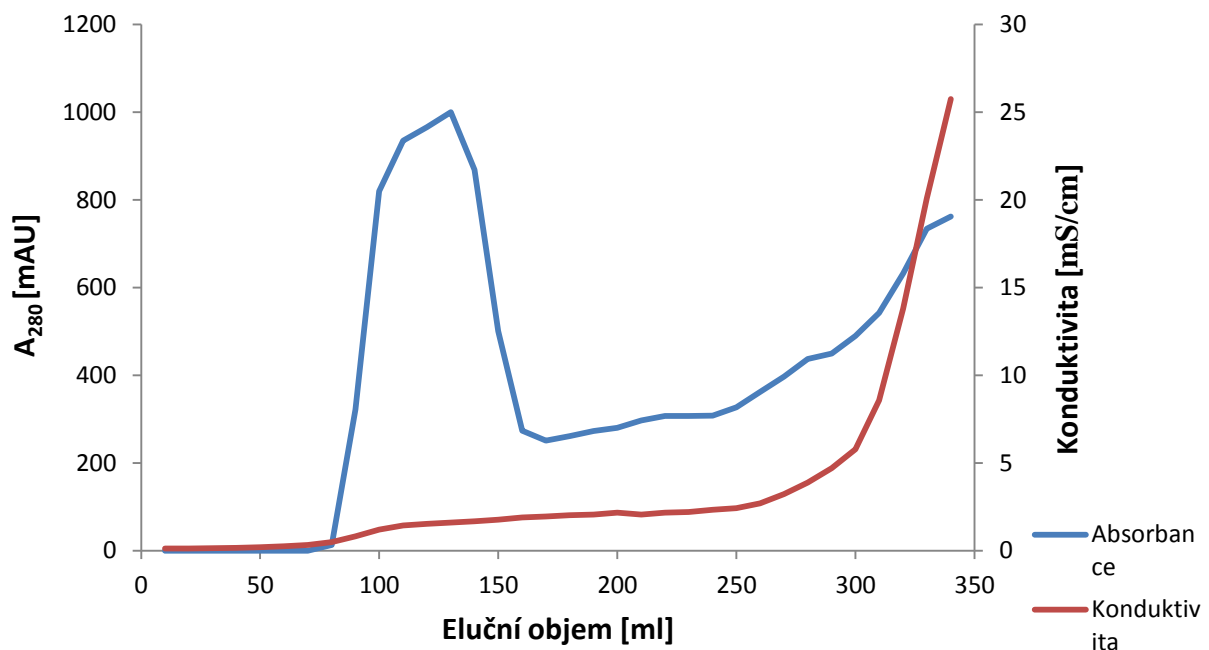
5.4. Purifikace SmSP2

Výchozím materiálem pro purifikaci SmSP2 byl lyofilizát, získaný lyofilizací kultivačního media obsahujícího exprimovanou SmSP2 (kap. 5.3.2.). Pro purifikaci SmSP2 bylo navrženo několik purifikačních metod. Nejprve byl vzorek zbaven nežádoucích solí obsažených v médiu pomocí gelové chromatografie. Dalšími purifikačními metodami byly afinitní chromatografie s použitím kolony Ni-NTA, iontově výměnná chromatografie a afinitní chromatografie s použitím benzamidinové kolony

5.4.1. Gelová permeační chromatografie

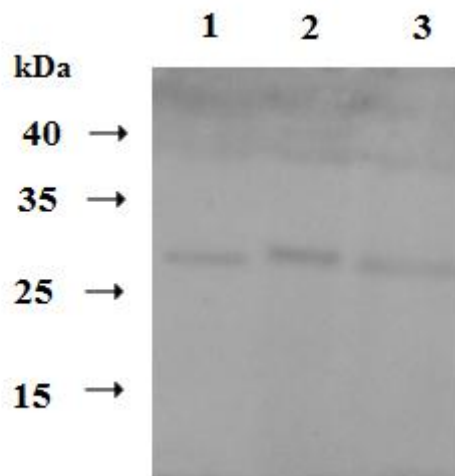
Nejprve bylo nutně odstranit z lyofilizátu soli a získat pouze proteinovou frakci. Toto bylo provedeno pomocí gelové permeační chromatografie. Lyofilizát byl rozpuštěn a aplikován na kolonu obsahující nosič Sephadex G-25. V jímáných frakcích byla měřena absorbance při vlnové délce 280 nm (detekce proteinů) a konduktivita (detekce solí). Průběh chromatografie pro konstrukt C je znázorněn grafem na obr. 22, pro ostatní konstrukty byl průběh obdobný.

Proteiny byly obsaženy ve frakcích 9 – 16 (90 – 160 ml). V těchto frakcích byla měřena proteolytická aktivita. Aktivitu vykazovaly frakce 10 – 15 (100 – 150 ml), které byly použity v dalších purifikačních krocích. Pro konstrukty TRPL a MUT byl průběh gelové chromatografie analogický, proto zde nejsou data uvedena.



Obr. 22: Průběh gelové permeační chromatografie konstruktu C. Lyofilizát byl rozpuštěn v 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a aplikován na kolonu. Byly jímány 10 ml frakce, ve kterých byla měřena absorbance při 280 nm (modrá křivka) a konduktivita (červená křivka). Ve frakcích obsahujících protein byla měřena proteolytická aktivita. Vybrané frakce byly spojeny a použity v dalších purifikačních krocích.

Proteinová frakce po gelové chromatografii byla zakoncentrována pomocí centrifugačního koncentrátoru Amicon Ultra a SmSP2 byla analyzována imunodetekcí s použitím polyklonálních protilátek proti SmSP2 (obr. 23), získanými imunizací králíka rekombinantní SmSP2 exprimovanou v *E. coli*. Byl detekován pás odpovídající velikosti asi 27 kDa. Teoretická relativní molekulová hmotnost trypsinové domény vypočtená podle aminokyselinové sekvence je 33,5 kDa. Pro ověření, že se opravdu jedná o trypsinovou proteasu, bylo provedeno značení fluorescenční značkou BoRC, která je specifická pro trypsinové a papainové proteasy.

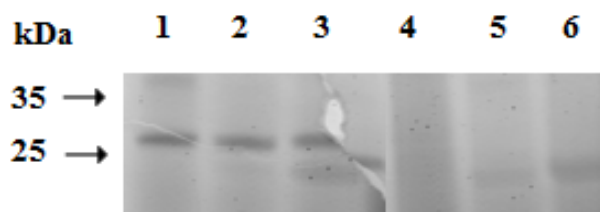


Obr. 23: Imunodetekce SmSP2. Vzorky (300 μ l) byly po gelové chromatografii koncentrovány a separovány pomocí SDS-PAGE. Byl použit gradientový polyakrylamidový gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel. Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a imunodetekovány králičí polyklonální protilátkou proti SmSP2 a sekundární protilátkou proti králičímu IgG s navázanou křenovou peroxidasou. V dráze 1 je konstrukt C, v dráze 2 konstrukt MUT a v dráze 3 konstrukt TRPL.

5.4.2. Značení SmSP2 fluorescenční značkou BoRC

Bylo provedeno fluorescenční značení SmSP2, aby se ověřilo, jestli protein detekovaný pomocí protilátek je trypsinová proteasa. Byla použita fluorescenční značka BoRC. Tato značka je ireversibilním inhibítorem papainových a trypsinových proteas. Je tvořena peptidovým inhibítorem (sekvence Phe-Pro-Arg), který se váže do aktivního místa a reaktivní chloromethylovou skupinou reaguje s katalytickým serinem nebo cysteinem. Dále obsahuje fluorescenční skupinu Bodipy TMR která umožňuje vizualizaci na fluorescenčním skeneru. Vzhledem k tomu, že by se značka mohla vázat do aktivního místa papainových proteas, byl do reakční směsi přidán inhibitor cysteinových proteas E-64. Díky tomu by bylo aktivní místo cysteinové proteasy obsazeno tímto inhibítorem a značka se do něj tudíž nemohla navázat. Jako kontrola byly použity vzorky, ke kterým byl přidán inhibitor serinových proteas Pefabloc. U kontroly nebyl pozorován žádný signál, tudíž bylo možno vyloučit nespecifickou vazbu značky jinam, než do aktivního místa trypsinových proteas.

Značka vizualizovala pás odpovídající velikosti asi 27 kDa (obr. 24), což se shoduje s proteinem detekovaným pomocí protilátek. S největší pravděpodobností se jednalo o SmSP2.



Obr. 24: Analýza SmSP2 na SDS-PAGE a vizualizace pomocí fluorescenční sondy BoRC. Byl použit gradientový polyakrylamidový gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel. Na gel bylo nanášeno 25 µl vzorku (proteinové frakce po gelové chromatografii). V drahách 1 – 3 jsou konstrukty C, MUT a TRPL, v drahách 4 – 6 je kontrola (konstrukty C, MUT a TRPL, které byly nejprve preinkubovány s inhibítorem serinových proteas Pefabloc).

5.4.3. Afinitní chromatografie na Ni-NTA koloně

Stejně jako v případě SmSP2 exprimované v *E. coli* i k SmSP2 exprimované v *P. pastoris* byla připojena histidinová kotva. Purifikace probíhala obdobně, ovšem za nativních podmínek, takže pufr neobsahoval močovinu ani guanidin.

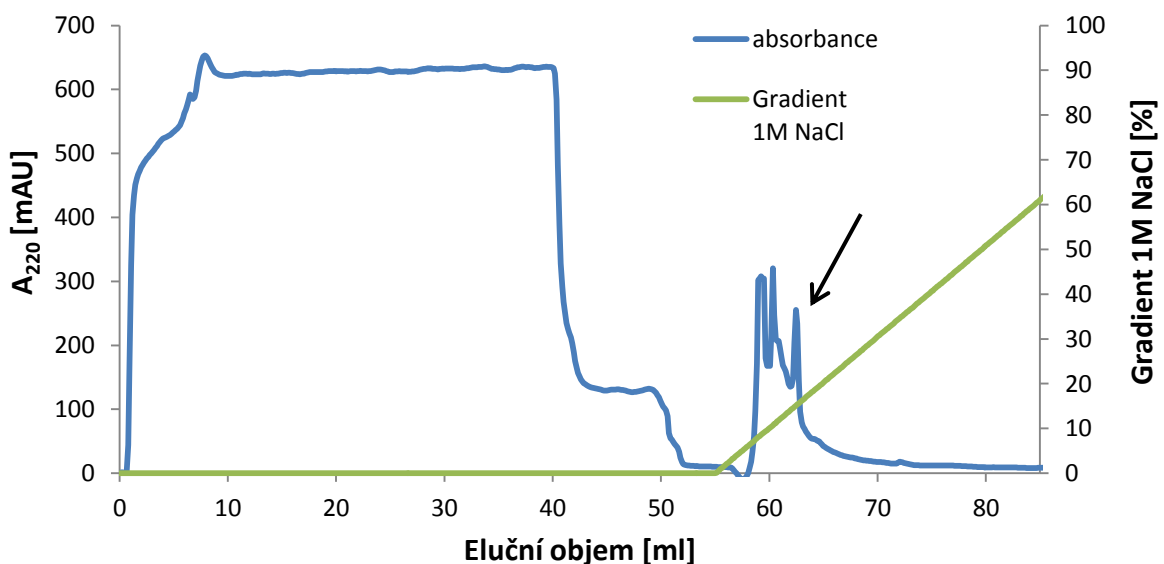
Purifikace byla provedena na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona Ni-NTA Superflow s imobilizovanými ionty Ni^{2+} . Pomocí afinitní chromatografie se protein nepodařilo purifikovat, nedocházelo k zachycení na imobilizované nikelnaté ionty. Proteolytická aktivita byla naměřena pouze v prošlé frakci. Nejpravděpodobnějším vysvětlení je, že při expresi proteinu došlo k odštěpení histidinové kotvy.

Vzhledem k neúspěchu této purifikace byly vyzkoušeny další dvě purifikační metody: iontové výměnná chromatografie a afinitní chromatografie na benzamidinové koloně. Dále bylo pracováno pouze s konstruktem C, protože u tohoto konstruktu byla naměřena nejvyšší aktivita.

5.4.4. Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie byla provedena na přístroji ÄKTApurifier 10, použita byla kolona MonoS HR 5/5. Teoretická hodnota pI SmSP2 byla 8,6. Podle pI bylo zvoleno pH použitých pufrů. Pro vazbu na nosič byl použit pufr 20mM MES, pH 5,0. Eluce byla provedena lineárním gradientem NaCl od 0 mol/l do koncentrace 1 mol/l. Byly jímány jednotlivé frakce, ve kterých byla měřena proteolytická aktivita SmSP2 pomocí aktivního testu se substrátem PFR-AMC. Proteolytická aktivita byla nalezena pouze ve frakcích, které odpovídají absorpčnímu vrcholu vyznačenému na obr. 25.

Celkový objem spojených frakcí obsahující SmSP2 byl 1,5 ml, koncentrace proteinu byla 1,3 µg/ml. I přes nízkou koncentraci vykazovala SmSP2 vysokou proteolytickou aktivitu. Pro další experimenty byly používány jednotky nanogramů enzymu, ovšem proteolytická aktivita byla pozorována i při použití jednotek pikogramů SmSP2 (objem reakce byl vždy 100 µl).

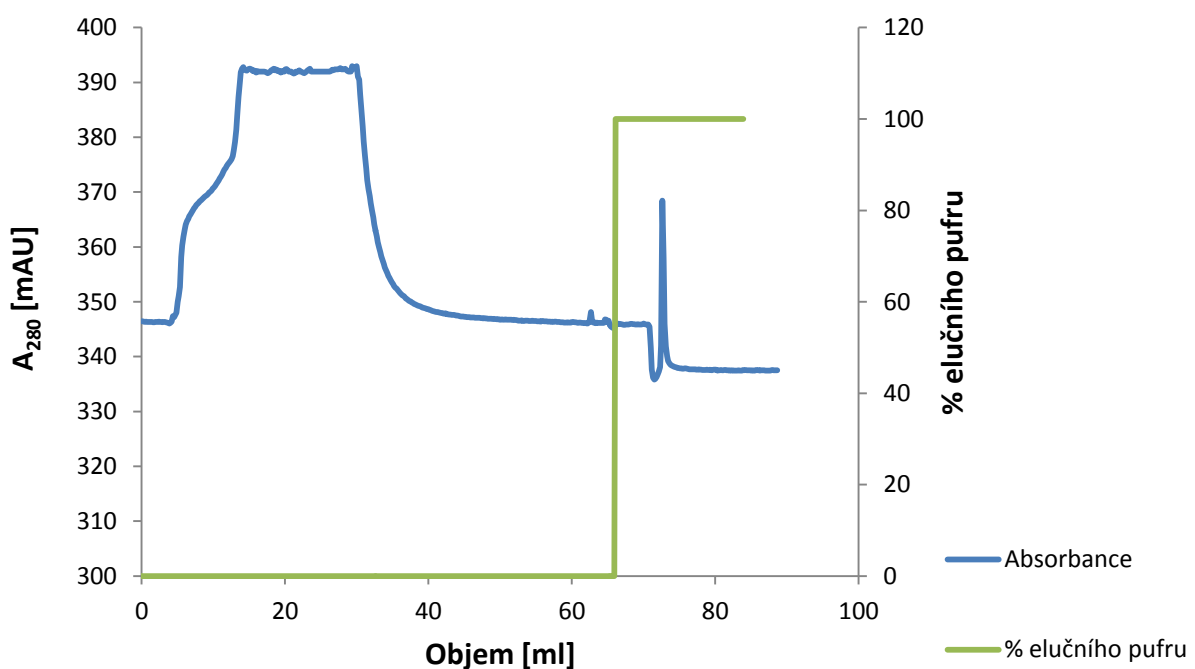


Obr. 25: Purifikace SmSP2 pomocí iontové výměnné chromatografie na koloně MonoS HR 5/5 ily na kolonu ekvilibrovanou 20mM MES, pH 5,0 byly naneseny proteinové frakce po gelové chromatografii. Eluce byla provedena lineárním gradientem NaCl od 0 mol/l do koncentrace 1 mol/l. Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm (A_{280}). Šipkou je označen absorpční vrchol, kde byla nalezena proteolytická aktivita SmSP2 v kinetickém testu, použitým substrátem byl PFR-AMC.

5.4.5. Afinitní chromatografie na benzamidinové koloně

V tomto purifikační kroku byla použita kolona HiTrap™ Benzamidine FF obsahující sepharosu s navázaným benzamidinem. Benzamidin je reverzibilní kompetitivní inhibitor trypsinových proteas. Trypsinové proteasy se váží na imobilizovaný benzamidin, eluce se provádí nízkým pH nebo p-aminobenzamidinem. V tomto případě byla eluce provedena puftrem obsahujícím 50 mM glycin, pH 3,0. V eluovaných frakcích bylo okamžitě upraveno pH pomocí 1M Tris-HCl, pH 9,0 na konečnou hodnotu pH 8,0. V těchto frakcích byla měřena proteolytická aktivita SmSP2 s použitím substrátu PFR-AMC. Záznam chromatografie je uveden na obr. 26.

Celkový objem spojených frakcí obsahující SmSP2 byl 1,1 ml, koncentrace proteinu byla 2,1 $\mu\text{g/ml}$. Stejně jako SmSP2 purifikovaná pomocí iontově výměnné chromatografie, i SmSP2 purifikovaná afinitní chromatografií na benzamidinové koloně vykazovala vysokou proteolytickou aktivitu.

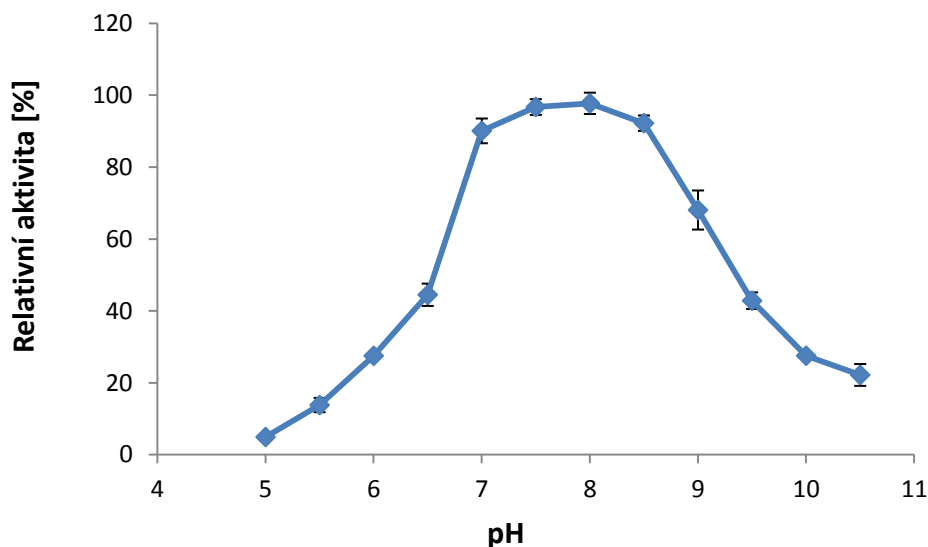


Obr. 26: Průběh afinitní chromatografie s použitím benzamidinové kolony. Na ekvilibrovanou kolonu byl nanesen vzorek (spojené frakce po gelové chromatografii), eluce byla provedena puftrem obsahujícím 50mM glycin, pH 3,0. Ve sbíraných frakcích bylo pH okamžitě upraveno na hodnotu 8. Průběh chromatografie byl monitorován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm (A_{280}).

5.5. Biochemická analýza SmSP2

5.5.1. Určení pH optima SmSP2

K určení pH optima byl použit fluorogenní substrát PFR-AMC. Substrát byl štěpen v rozmezí pH 5,5-10,5 s pH optimem v mírně bazické oblasti v rozmezí 7 – 8,5 (obr. 27).


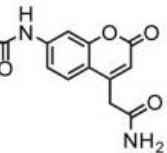

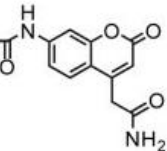

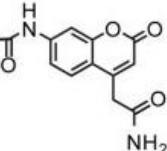

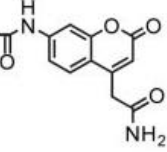



Obr. 27: Závislost proteolytické aktivity SmSP2 na pH. Byl použit substrát PFR-AMC (finální koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$). Byl použit 1 ng SmSP2 purifikované iontově výměnnou chromatografií, celkový objem reakce byl 100 μl . Pro různá pH byly použity různé pufrы (tab. 5, kap. 4.4.1.). Aktivita je vyjádřena v procentech přírůstku relativních fluorescenčních jednotek za sekundu (RFU/s) normalizovaných na nejvyšší naměřenou hodnotu.


5.5.2. Identifikace substrátové specifity SmSP2



Pomocí kombinatoriální knihovny syntetických peptidů (PS-SCL) byla určena preference SmSP2 pro jednotlivé aminokyseliny v P1, P2, P3 a P4 místě. PS-SCL knihovna je tvořena tetrapeptidy s připojenou fluorogenní skupinou, 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarinem (ACC). Skládá se ze čtyř menších knihoven (P1, P2, P3 a P4 knihovny). Každá tato menší knihovna obsahuje dvacet subknihoven. Subknihovna obsahuje vždy jednu z dvaceti aminokyselin fixovanou v P1, P2, P3 nebo P4 místě, ostatní tři aminokyseliny jsou randomizované. V těchto 20 aminokyselinách není obsažen cystein, který je nahrazen

norleucinem. Celkově tedy každá ze čtyř menších knihoven obsahuje 160 000 různých tetrapeptidů (všechny možné kombinace aminokyselin, obr. 28) ⁵².

Knihovna	P4	P3	P2	P1	ACC	Počet subknihoven	Počet složek v jedné subknihovně
P1	Ac—(Mix)	(Mix)	(Mix)			20	8000
P2	Ac—(Mix)	(Mix)		(Mix)		20	8000
P3	Ac—(Mix)		(Mix)	(Mix)		20	8000
P4	Ac— 	(Mix)	(Mix)	(Mix)		20	8000

 = Ekvimolární směs 20 aminokyselin (neobsahuje cystein, ten je nahrazen norleucinem)

 = Samostatně přiřazená individuální aminokyselina

 +  = Subknihovna skládající se ze tří pozic obsahující směs a jedné samostatně přiřazené pozice

Obr. 28: PS-SCL knihovna. V jedné pozici je vždy jedna konkrétní aminokyselina, ostatní pozice obsahují ekvimolární směs 20 proteinogenních aminokyselin (mimo cysteinu, který je nahrazen norleucinem). Upraveno dle ⁵².

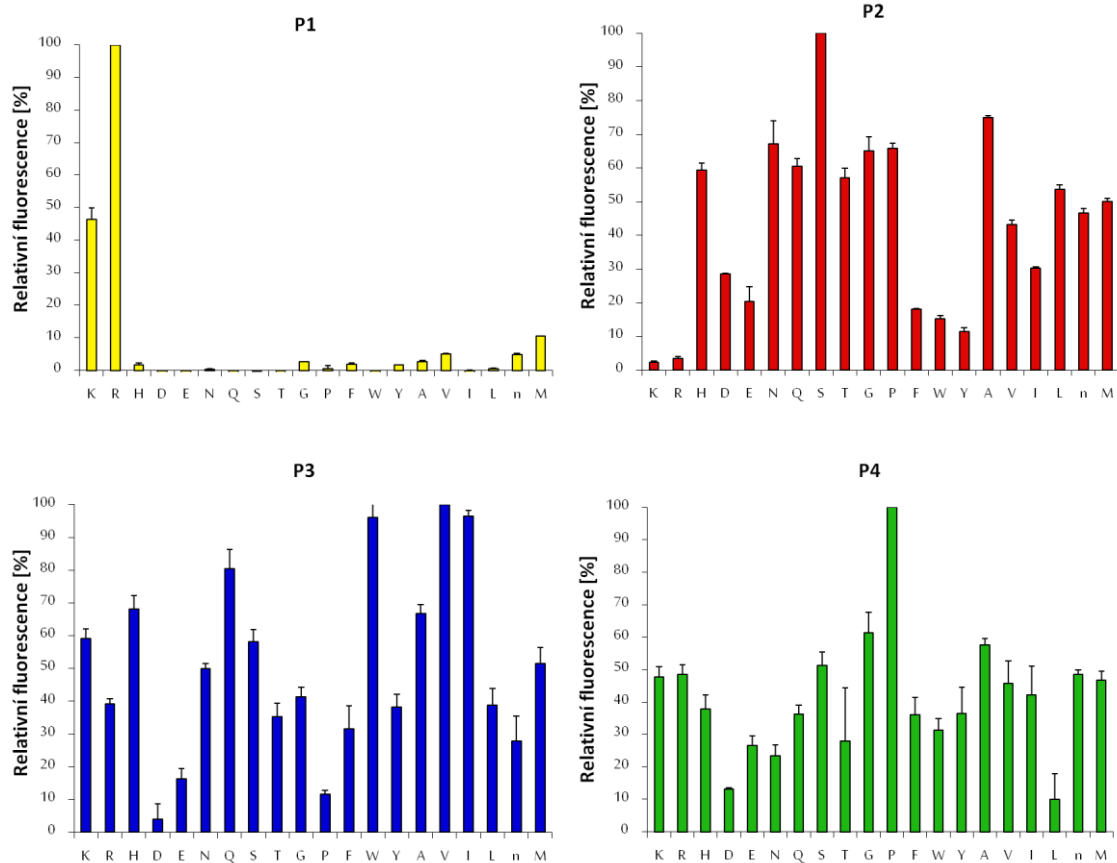
V P1 místě byla zdaleka nejvyšší aktivita SmSP2 naměřena pro arginin. V případě lysinu byla aktivita poloviční. U ostatních aminokyselin nebyly aktivity žádné anebo velmi nízké.

V případě P2 místa byla naměřena nejvyšší aktivita u serinu. Poměrně vysoké aktivity byly naměřeny u několika dalších aminokyselin, které spolu nesdílejí žádnou podobnost. Na druhou stranu je patrné, že v P2 místě nevyhovují aromatické aminokyseliny a aminokyseliny obsahující druhou karboxylovou skupinu. Téměř nulové aktivity byly také naměřeny v případě bazických aminokyselin argininu a lysinu.

V P3 místě také nebyla pozorována výrazná preference. Vysoké aktivity byly nalezeny u některých hydrofobních aminokyselin (valin, isoleucin, tryptofan).

V P4 místě je na první pohled vidět vysoká preference pro prolin, v jehož případě dosahuje aktivita téměř dvojnásobku druhé nejvyšší aktivity. Mezi ostatními aminokyselinami byly aktivity podobně vysoké, o něco nižší u aspartátu a leucinu.

Jednotlivé grafy výsledků měření jsou uvedeny na obr. 29.



Obr. 29: Preference SmSP2 pro jednotlivé aminokyseliny v P1-P4 místech. Aktivita byla stanovena v aktivním kinetické testu s použitím kombinatoriální knihovny fluorogenních syntetických tetrapeptidů. Reakce probíhala 1 h v pufru obsahujícím 0,1M Tris-HCl, pH 8,5; 0,01% Tween 20 při 37°C. Finální koncentrace každé složky z celkových 8000 složek jedné subknihovny v jedné jamce bylo 31,25 nmol/l. Použité množství SmSP2 v jedné reakci bylo 5 ng. Celkový objem reakce byl 100 μ l. Měření bylo provedeno v triplicátech. Aktivita je vyjádřena v procentech přírůstku relativních fluorescenčních jednotek za sekundu (RFU/s) normalizovaných na nejvyšší naměřenou hodnotu.

5.5.3. Inhibice proteolytické aktivity

Byly testovány tyto inhibitory specificky inhibující jednotlivé skupiny proteas: pustatin, E-64, fenantrolin, pefabloc, benzamidin a PMSF. Cílové skupiny proteas jednotlivých inhibitorů, jejich koncentrace a míra inhibice jsou shrnuty v tab. 8.

SmSP2 byla inhibována pouze inhibitory serinových proteas, u ostatních inhibitorů byla míra inhibice nulová nebo velmi nízká.

Tab. 8: Míra inhibice SmSP2 inhibitory pro různé skupiny proteas.

Inhibitor	Cílová skupina proteas	Koncentrace v reakci	Míra inhibice
Pepstatin	Aspartátové proteasy	1 $\mu\text{mol/l}$	0 %
E-64	Cysteinové proteasy	10 $\mu\text{mol/l}$	3 %
Fenanthrolin	Metaloproteasy	1 mmol/l	6 %
Pefabloc	Serinové proteasy	1 mmol/l	100 %
Benzamidin	Serinové proteasy	2 mmol/l	100 %
PMSF	Serinové proteasy	2 mmol/l	90 %

6. Diskuze

Tato diplomová práce se zabývala proteasou SmSP2 krevničky *S. mansoni*. Schistosomy jsou významní parazité člověka, způsobující onemocnění schistosomiázu, která je druhou nejvýznamnější parazitózou po malarii. Celosvětově je nakaženo přes 200 milionů lidí. Vakcinace neexistuje a k léčbě se používá prakticky jediný lék – praziquantel. V poslední dekádě byly pozorovány kmeny schistosom, které byly rezistentní na léčbu praziquantelem, což může mít v současné době, kdy probíhá několik masivních léčebných kampaní v Africe a Asii, katastrofální následky¹⁸. Proto je nezbytné hledat nové způsoby léčby.

Proteasy jsou pro schistosomy, tak jako pro všechny organismy, nepostradatelnými enzymy. Účastní se zásadních procesů, jako je například trávení živin, invaze do hostitele nebo ovlivňování obranných mechanismů hostitele. Inhibitory vybraných proteas či vakcinace proti nim by mohly sloužit jako účinná alternativa v léčbě schistosomózy. Takto se podařilo potlačit infekci u nakažených myší pomocí inhibitoru katepsinu B1 (trávicí cysteinová proteasa). Protože proteáza SmSP2 je výrazně exprimována právě u stádií parazitující člověka, studium tohoto enzymu může přinést zajímavé poznatky z biologie schistosom, jejich interakce s hostitelem a potenciálně by mohla být i cílem terapeutického zásahu⁵³.

SmSP2 je serinová proteasa trypsinového typu spadající do S1 rodiny. Tato proteasa je zajímavá především svým extrémně vysokým expresním profilem u vývojových stádií parazitujících u člověka (schistosomul a dospělců). U schistosomul dosahuje míra exprese 150 % míry exprese cytochrom c oxidasy I a patří tak k nejvíce exprimovaným proteasám ze všech. Není známá biologická funkce SmSP2, ale její vysoký expresní profil u schistosomul a dospělců naznačuje, že by se mohlo jednat o proteasu, hrající zásadní roli v úspěšné infekci definitivního hostitele, ať již v přímé interakci s hostitelem, nebo ve fyziologických procesech samotného parazita³⁷.

Hlavním cílem této práce byla příprava aktivní rekombinantní SmSP2. Nejprve byl zvolen prokaryontní expresní systém *E. coli*, přestože to znamenalo, že výsledný rekombinantní protein bude muset být převeden do aktivní konformace pomocí refoldingu. Z tohoto důvodu bylo vytvořeno několik konstruktů, lišící se délkou prodomény, která by mohla mít vliv na úspěšný refolding enzymu. Nejprve byl vytvořen konstrukt, který obsahoval kompletní

prodoménu. Tento konstrukt se ovšem nepodařilo v prokaryotickém systému exprimovat. Byly vytvořeny další konstrukty, které obsahovaly kratší prodoménu. Konstrukt TRP obsahoval prodoménu dlouhou 12 aminokyselinových zbytků, ovšem neobsahoval Cys188, který se pároval s Cys331 v peptidasové doméně. Proto byly vytvořeny další dva konstrukty, který tento problém vyřešily – konstrukt TRPL, který měl delší prodoménu (18 aminokyselinových zbytků), která zahrnovala i Cys188, a konstrukt MUT, který měl stejnou prodoménu jako konstrukt TRP, ale Cys331 byl mutován a nahrazen serinem.

SmSP2 byla úspěšně exprimována v poměrně velkém množství. Jak jsme předpokládali, byla exprimována neaktivní ve formě inkluzních tělísek. SmSP2 byla exprimována s připojenou histidinovou kotvou, což umožnilo jednoduchou purifikaci pomocí afinitní chromatografie. Purifikovaný enzym byl refoldován, bylo vyzkoušeno několik různých přístupů. Jedinou úspěšnou metodou byl refolding pomocí ředění, který se ovšem nedařilo optimalizovat a nebylo možné pomocí této metody získat dostatečné množství aktivního proteinu. Proto byl zvolen alternativní postup a SmSP2 byla exprimována v eukaryotickém expresním systému – kvasinkách *Pichia pastoris* (viz dále).

Protein exprimovaný v *E. coli* byl použit k imunizaci králíka a tvorbě polyklonálních protilátek. Protilátky byly používány k imunodetekci SmSP2 na PVDF membráně a budou použity v dalším studiu SmSP2.

Expresa v *P. pastoris* byla nesrovnatelně nižší než v *E. coli*. Množství exprimovaného proteinu bylo tak malé, že nebyl detekovatelný pomocí SDS-PAGE. Proto byl analyzován imunodetekcí pomocí polyklonálních protilátek. Také byl vizualizován pomocí specifické fluorescenční značky navázané do aktivního centra. I přes nízkou koncentraci však proteasa vykazovala vysokou proteolytickou aktivitu. Byly vytvořeny tři konstrukty, pro další experiment byl vybrán konstrukt C (SmSP2 s kompletní N-terminální extenzí), protože vykazoval nejvyšší aktivitu. Tento konstrukt byl vybrán také proto, že takto je SmSP2 exprimována u schistosomy.

Komplikovanou záležitostí byla purifikace. K proteinu byla sice připojena histidinová kotva, ale pravděpodobně došlo k jejímu odštěpení během exprese proteasy, protože purifikace pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA koloně byla neúspěšná. Proto byly vyzkoušeny dvě další metody purifikace.

Pomocí iontově výměnné chromatografie se podařilo SmSP2 purifikovat. S takto purifikovanou SmSP2 bylo poté dále pracováno. Byla také vyzkoušena druhá metoda

purifikace – afinitní chromatografie na benzamidinové koloně. Tato purifikace byla také úspěšná.

SmSP2 exprimovaná v kvasinkách *P. pastoris* a purifikovaná pomocí iontově výměnné chromatografie byla použita k určení jejího pH optima, které se nacházelo v mírně bazické oblasti (v rozmezí pH 7 – 8,5). Inhibiční test ukázal, že SmSP2 je inhibována inhibitory serinových proteas, inhibitory ostatních skupin proteas neměly na aktivitu SmSP2 téměř žádný vliv. Dále byla stanovena substrátová specifita pomocí kombinatoriální knihovny syntetických tetrapeptidů (PS-SCL). Pomocí této knihovny byly zjištěny preference SmSP2 pro P1 – P4 místo.

Měření preference pro P1 místo přineslo předpokládané výsledky. Prakticky jediné dvě aminokyseliny, za kterými byla SmSP2 schopná štěpit byly bazické aminokyseliny arginin a lysin, což bylo v případě trypsinové proteázy, kterou SmSP2 na základě sekvenční analýzy je, očekávané

V P2 místě byla nalezena nejvyšší aktivita pro serin, ovšem několik dalších aminokyselin mělo také vysoké aktivity, proto z tohoto výsledku nelze činit jednoznačné závěry. S určitostí ovšem můžeme říct, že v P2 místě jsou zcela nevyhovující aromatické aminokyseliny a aminokyseliny s druhou karboxylovou skupinou. Téměř nulové aktivity u argininu a lysinu v P2 místě nutí k zamyšlení. Toto by mohlo být totiž způsobeno tím, že došlo ke štěpení vazby mezi P2 a P1 místem (tedy za argininem/lysinem, v podstatě se tyto aminokyseliny dostaly do P1 místa). Poté by totiž zůstal fluorogenní ACC s jednou navázanou aminokyselinou a proto by nevykazoval fluorescenci.

V P3 místě nebyla pozorována žádná konkrétní preference. Nejvyšší aktivity byly naměřeny u tryptofanu, valinu a leucinu.

V P4 místě byla nalezena vysoká preference pro prolin, což je poměrně neobvyklá záležitost. Takováto substrátová specifita byla nalezena u β -tryptas, proteas, které jsou sekretované mastocyty⁵⁴. Tato podobnost by mohla indikovat možnost, že se SmSP2 účastní ovlivňování imunitního systému hostitele.

7. Závěr

Tato práce se zabývala serinovou proteasou trypsinového typu SmSP2 z krevničky *Schistosoma mansoni*. SmSP2 byla úspěšně exprimovaná jako rekombinantní protein, s kterým bylo dále pracováno.

Hlavní závěry jsou:

- 1) SmSP2 byla exprimována v bakteriálním expresním systému (*E. coli*) ve formě inkluzních tělísek, ze kterých byla SmSP2 purifikována afinitní chromatografií.
- 2) Rekombinantní SmSP2 byla použita pro produkci polyklonálních protilátek v králíkovi.
- 3) Byly nalezeny podmínky pro refolding SmSP2.
- 4) SmSP2 byla exprimována v eukaryotickém expresním systému (*P. pastoris*). SmSP2 byla purifikována pomocí iontově výměnné chromatografie a afinitní chromatografie na benzamidinové koloně.
- 5) Bylo nalezeno pH optimu pro SmSP2, které se nacházelo mezi hodnotami 7 – 8,5.
- 6) Byla určena substrátová specifita SmSP2 pro P1 – P4 místo.

8. Seznam použité literatury

1. Volf, P., Horák, P. (2007) *Paraziti a jejich biologie*, Vol. 1., Triton, Praha.
2. <http://biology.unm.edu/biology/esloker/grants/schisto.html>, (26. 6. 2014)
3. Kalbe, M., Haberl, B., and Haas, W. (1996) Schistosoma mansoni miracidial host-finding: species specificity of an Egyptian strain, *Parasitol Res* 82, 8-13.
4. Haberl, B., and Haas, W. (1992) Miracidium of Schistosoma mansoni: a macromolecular glycoconjugate as signal for the behaviour after contact with the snail host, *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 101, 329-333.
5. Basch, P. F. (1976) Intermediate host specificity in Schistosoma mansoni, *Exp Parasitol* 39, 150-169.
6. Asch, H. L. (1972) Rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata: control by illumination, *Exp Parasitol* 31, 350-355.
7. Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., and Kestens, L. (2006) Human schistosomiasis, *Lancet* 368, 1106-1118.
8. Haeberlein, S., and Haas, W. (2008) Chemical attractants of human skin for swimming Schistosoma mansoni cercariae, *Parasitol Res* 102, 657-662.
9. McKerrow, J. H., and Salter, J. (2002) Invasion of skin by Schistosoma cercariae, *Trends Parasitol* 18, 193-195.
10. Protasio, A. V., Dunne, D. W., and Berriman, M. (2013) Comparative study of transcriptome profiles of mechanical- and skin-transformed Schistosoma mansoni schistosomula, *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2091.
11. Wilson, R. A., and Coulson, P. S. (1986) Schistosoma mansoni: dynamics of migration through the vascular system of the mouse, *Parasitology* 92 (Pt 1), 83-100.
12. <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>, (3. 7. 2014)
13. Lockyer, A. E., Olson, P. D., Ostergaard, P., Rollinson, D., Johnston, D. A., Attwood, S. W., Southgate, V. R., Horak, P., Snyder, S. D., Le, T. H., Agatsuma, T., McManus, D. P., Carmichael, A. C., Naem, S., and Littlewood, D. T. (2003) The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of Schistosoma Weinland, 1858, *Parasitology* 126, 203-224.
14. Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., and Utzinger, J. (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk, *Lancet Infect Dis* 6, 411-425.
15. <http://www.ihatetaxis.com/medical/schistosomiasis>, (4. 7. 2014)
16. Muller, R., and Wakelin, D. (2002) *Worms and human disease*, 2nd ed., CABI, Wallingford, Oxon, UK; New York.
17. http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/schisto_pathology_HS.html, (10. 7. 2014)
18. Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Basso, A., and Guidi, A. (2014) Schistosomiasis control: Praziquantel forever?, *Mol Biochem Parasitol*.
19. Wang, W., Wang, L., and Liang, Y. S. (2012) Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review, *Parasitol Res* 111, 1871-1877.
20. Greenberg, R. M. (2013) New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes, *Parasitology* 140, 1534-1546.
21. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. (2004) *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston.

22. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res* 40, D343-350.
23. Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity, *Chem Rev* 102, 4501-4524.
24. Ekici, O. D., Paetzel, M., and Dalbey, R. E. (2008) Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration, *Protein Sci* 17, 2023-2037.
25. Page, M. J., and Di Cera, E. (2008) Serine peptidases: classification, structure and function, *Cell Mol Life Sci* 65, 1220-1236.
26. Cooper, G. M. (2000) The cell : a molecular approach, 2nd ed. ed., ASM Press ; Sinauer Associates., Washington, D.C. Sunderland, Mass.
27. Di Cera, E. (2009) Serine proteases, *IUBMB Life* 61, 510-515.
28. Perona, J. J., and Craik, C. S. (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold, *J Biol Chem* 272, 29987-29990.
29. Arai, K., Madoiwa, S., Mimuro, J., Asakura, S., Matsuda, M., Sako, T., and Sakata, Y. (1998) Role of the kringle domain in plasminogen activation with staphylokinase, *J Biochem* 123, 71-77.
30. Laskar, A., Rodger, E. J., Chatterjee, A., and Mandal, C. (2012) Modeling and structural analysis of PA clan serine proteases, *BMC Res Notes* 5, 256.
31. http://www.rcsb.org/pdb/images/1s0q_bio_r_500.jpg?bioNum=1, (12. 7. 2014)
32. Kasny, M., Mikes, L., Hampl, V., Dvorak, J., Caffrey, C. R., Dalton, J. P., and Horak, P. (2009) Chapter 4. Peptidases of trematodes, *Adv Parasitol* 69, 205-297.
33. Li, X. H., de Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Vance, G. M., Demarco, R., Neves, L. X., Evans, G. J., and Wilson, R. A. (2013) The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing, *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2337.
34. Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C. R., Lim, K. C., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., and McKerrow, J. H. (2006) A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite, *J Biol Chem* 281, 39316-39329.
35. Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P., and Sajid, M. (2004) Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases, *Trends Parasitol* 20, 241-248.
36. Dvorak, J., Mashiyama, S. T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G. M., Hansell, E., Lim, K. C., Hsieh, I., Bahgat, M., Mackenzie, B., Medzihradzky, K. F., Babbitt, P. C., Caffrey, C. R., and McKerrow, J. H. (2008) Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae, *Biochimie* 90, 345-358.
37. Horn, M., Fajtova, P., Rojo Arreola, L., Ulrychova, L., Bartosova-Sojkova, P., Franta, Z., Protasio, A. V., Opavsky, D., Vondrasek, J., McKerrow, J. H., Mares, M., Caffrey, C. R., and Dvorak, J. (2014) Trypsin- and Chymotrypsin-like serine proteases in schistosoma mansoni-- 'the undiscovered country', *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2766.
38. Cohen, F. E., Gregoret, L. M., Amiri, P., Aldape, K., Railey, J., and McKerrow, J. H. (1991) Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling, *Biochemistry* 30, 11221-11229.
39. Portnoy, M., Higashi, G. I., and Kamal, K. A. (1983) Percutaneous infection by *Schistosoma mansoni* "tailless" cercariae, *J Parasitol* 69, 1162-1164.
40. Bork, P., and Beckmann, G. (1993) The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins, *J Mol Biol* 231, 539-545.
41. Meyer, F., Meyer, H., and Bueding, E. (1970) Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*, *Biochim Biophys Acta* 210, 257-266.
42. Cocude, C., Pierrot, C., Cetre, C., Fontaine, J., Godin, C., Capron, A., and Khalife, J. (1999) Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine

- protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I, *Parasitology* 118 (Pt 4), 389-396.
43. Cocude, C., Pierrot, C., Cetre, C., Godin, C., Capron, A., and Khalife, J. (1997) Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease, *Parasitology* 115 (Pt 4), 395-402.
 44. Da'dara, A., and Skelly, P. J. (2011) Manipulation of vascular function by blood flukes?, *Blood Rev* 25, 175-179.
 45. Cheng, C., and Shuman, S. (2000) Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of topoisomerase IB-induced double-strand breaks, *Mol Cell Biol* 20, 8059-8068.
 46. http://www.5prime.com/media/434208/app_13.pdf, (15. 7. 2014)
 47. Sijwali, P. S., Shenai, B. R., Gut, J., Singh, A., and Rosenthal, P. J. (2001) Expression and characterization of the *Plasmodium falciparum* haemoglobinase falcipain-3, *Biochem J* 360, 481-489.
 48. http://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/pure_protein/pdf/refolding_of_his-tag.pdf, (3. 7. 2014)
 49. <http://shop.bachem.com/i-1585-1.html>, (3. 7. 2014)
 50. <http://shop.bachem.com/i-1295-1.html>, (3. 7. 2014)
 51. Alibolandi, M., and Mirzahoseini, H. (2011) Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies, *Biochem Res Int* 2011, 631607.
 52. Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D. C., Lecaille, F., Bogyo, M., Bromme, D., Ellman, J. A., and Craik, C. S. (2006) Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities, *J Biol Chem* 281, 12824-12832.
 53. Abdulla, M. H., Lim, K. C., Sajid, M., McKerrow, J. H., and Caffrey, C. R. (2007) Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor, *PLoS Med* 4, e14.
 54. Harris, J. L., Niles, A., Burdick, K., Maffitt, M., Backes, B. J., Ellman, J. A., Kuntz, I., Haak-Frendscho, M., and Craik, C. S. (2001) Definition of the extended substrate specificity determinants for beta-tryptases I and II, *J Biol Chem* 276, 34941-34947.

