

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Marina Bakardjieva

Proteolytický systém krevniček rodu *Schistosoma*

Proteolytic system of blood flukes of the genus *Schistosoma*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Praha, 2015

Poděkování:

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. za cenné rady, vstřícnost a čas věnovaný při vypracovávání této práce. Děkuji RNDr. Liboru Mikešovi, Ph.D. za posouzení práce a jeho připomínky. Dále bych ráda poděkovala skupině laboratoře RNDr. Mareše, CSc. za pomoc a odborné rady, které přispěly k realizaci této práce. Děkuji své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Prohlášení:

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

V Praze, 28.4.2015

Podpis

Abstrakt

Krevničky rodu *Schistosoma* jsou parazitické motolice způsobující onemocnění zvané schistosomóza, které postihuje přes 200 milionů lidí v tropech a subtropích. Dospělé krevničky žijí v cévách člověka a živí se krví. Pro růst, vývoj a rozmnožování krevniček jsou zásadní živiny získané degradací hlavního krevního proteinu hemoglobinu. Za jeho trávení zodpovídá proteolytická výbava trávicího traktu krevniček, která je tvořena sadou enzymů z tříd cysteinových a aspartátových proteáz a metaloproteáz, které mají komplementární specifitu. Proteolytické enzymy hrají důležitou roli i při dalších procesech jako je průnik krevniček do hostitele, migrace tkáněmi, překonání imunitního systému a modulace zánětu. Mezi významné proteázy, které se účastní těchto procesů patří enzymy ze třídy serinových a cysteinových proteáz. Vzhledem k tomu, že proteolytický systém je nezbytný pro životaschopnost krevniček, je v současné době předmětem intenzivního výzkumu zaměřeného na vývoj nových vakcín a chemoterapeutik pro léčbu schistosomózy.

Klíčová slova: peptidáza, proteáza, katepsin, trávení, krevnička, *Schistosoma*

Abstract

Blood flukes of the genus *Schistosoma* are parasitic trematodes causing a disease called schistosomiasis, which afflicts more than 200 million people in the tropics and subtropics. Adult schistosomes live in human blood vessels and feed on blood. Critical nutrients required for growth, development and reproduction of schistosomes are obtained from the major blood protein haemoglobin. Its digestion is mediated by the proteolytic arsenal of the schistosome digestive tract, which includes enzymes with complementary specificity belonging to the classes of cysteine and aspartic proteases, and metalloproteases. Proteolytic enzymes also play an important role in other processes, such as host penetration, tissue migration, immune evasion and modulation of inflammation. Here, serine and cysteine proteases importantly participate. The proteolytic system is essential for the viability of schistosomes and is a current topic of intense research focused on the development of new vaccines and chemotherapeutics for the treatment of schistosomiasis.

Key words: peptidase, protease, cathepsin, digestion, blood fluke, *Schistosoma*

Obsah

1. Úvod	1
2. Krevničky rodu <i>Schistosoma</i>	2
2.1. Taxonomické zařazení a morfologie krevniček	2
2.2. Životní cyklus krevniček	2
2.3. Výskyt krevniček.....	4
3. Schistosomóza	5
3.1. Charakterizace schistosomózy	5
3.2. Symptomy a patogeneze schistosomózy	5
3.3. Léčba a prevence schistosomózy	6
4. Proteolytické enzymy	7
4.1. Klasifikace proteolytických enzymů	7
4.2. Aktivita proteolytických enzymů a její regulace	8
4.3. Výskyt, mechanismus a struktura proteolytických enzymů	8
4.3.1. Serinové proteázy	8
4.3.2. Cysteinové proteázy	9
4.3.3. Aspartátové proteázy	10
4.3.4. Metaloproteázy	11
4.3.5. Glutamátové a threoninové proteázy	11
5. Proteázy v genomu krevniček rodu <i>Schistosoma</i>	12
6. Proteolytické enzymy krevniček rodu <i>Schistosoma</i>	13
6.1. Proteolytická výbava trávicího traktu krevniček.....	14
6.1.1. Trávicí soustava krevniček	14
6.1.2. Trávení hemoglobinu krevničkami.....	14
6.1.2.1. Katepsin D z krevniček	15
6.1.2.2. Leucylaminopeptidáza z krevniček	16
6.1.2.3. Trávicí cysteinové katepsiny z krevniček.....	17
6.1.2.4. Asparaginylendopeptidáza z krevniček	21
6.2. Proteázy lokalizované mimo trávicí trakt krevniček.....	21
6.2.1. Serinové proteázy rodiny chymotrypsinu z krevniček	21
6.2.2. Katepsin B2 z krevniček.....	24
6.2.3. Kalpain z krevniček.....	25
7. Závěr	26
8. Seznam použité literatury	27

1. Úvod

Krevničky rodu *Schistosoma* jsou parazitičtí červi způsobující infekční onemocnění zvané schistosomóza nebo také bilharzióza. Uvádí se, že po malárii se jedná o druhé nejvýznamnější parazitární onemocnění. V současné době postihuje přes 200 milionů lidí, převážně v tropech a subtropích. Mezi nejdůležitější druhy způsobující schistosomózu u lidí patří *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium*.

Životní cykly těchto krevniček jsou si velmi podobné, jako mezihostitele využívají sladkovodního plže. K nákaze člověka dochází přes kontaminovanou vodu, ve které se nachází larvální stádium parazita zvané cercárie, které má schopnost penetrovat neporušenou kůží. Dospělí červi pak žijí v cévách člověka v okolí střev nebo urogenitálního traktu, kde dochází k produkci vajíček. Tato vajíčka jsou vylučována do prostředí, ovšem část z nich zůstává v hostiteli a způsobují tak patologii schistosomózy (Colley et al., 2014).

Dospělé krevničky se živí krví člověka a k trávení využívají proteolytické enzymy, díky kterým získávají nezbytné živiny pro růst, vývoj a rozmnožování. Kromě toho se proteázy krevniček účastní i dalších interakcí s hostitelem, a to u všech vývojových stádiích. Jsou jimi například procesy pronikání do těla hostitele, migrace tkáněmi, únik před imunitní odpovědí člověka a aktivace a modulace zánětu (Kašný et al., 2009).

K léčbě schistosomózy je řadu let využíván jediný lék praziquantel. Z důvodu vzniku možné rezistence je důležité zaměřit se na vývoj nových léčiv proti tomuto onemocnění. K tomu je zapotřebí detailní výzkum krevniček, včetně jejich proteolytických systémů, což přinese možnost zasáhnout do konkrétních životně důležitých dějů těchto parazitů (Cioli et al., 2014).

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o proteolytických enzimech krevniček rodu *Schistosoma*, popsat jejich životní cyklus a onemocnění schistosomózu.

2. Krevničky rodu *Schistosoma*

2.1. Taxonomické zařazení a morfologie krevniček

Krevničky *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* a *S. japonicum* jsou třemi hlavními druhy parazitujícími u člověka. Mezi další krevničky infikující člověka patří *S. mekongi* a *S. intercalatum*, které se však vyskytují jen v určitých oblastech a jsou významné lokálně (Colley et al., 2014).

Taxonomicky se tyto krevničky řadí do kmene Plathelminthes, třídy Trematoda, čeledi Schistosomatidae a rodu *Schistosoma*. Na rozdíl od ostatních zástupců třídy Trematoda, jsou odděleného pohlaví a mají výrazný pohlavní dimorfismus. Samečci jsou mohutnější a na ventrální straně mají rýhu označovanou jako *canalis gynaecophorus*, ve které je uložena užší samička a kde probíhá kopulace (Després a Maurice, 1995). Dospělé krevničky jsou charakteristické válcovitým tvarem těla. Mají ústní otvor pro příjem potravy a dvě přísavky v přední a ventrální straně těla sloužící k přichycení na cévní stěnu. Povrch těla krevniček je tvořen tegumentem, který hraje roli při příjmu potravy, úniku před imunitní odpovědí hostitele, osmoregulaci či signální transdukci (Jones et al., 2004).

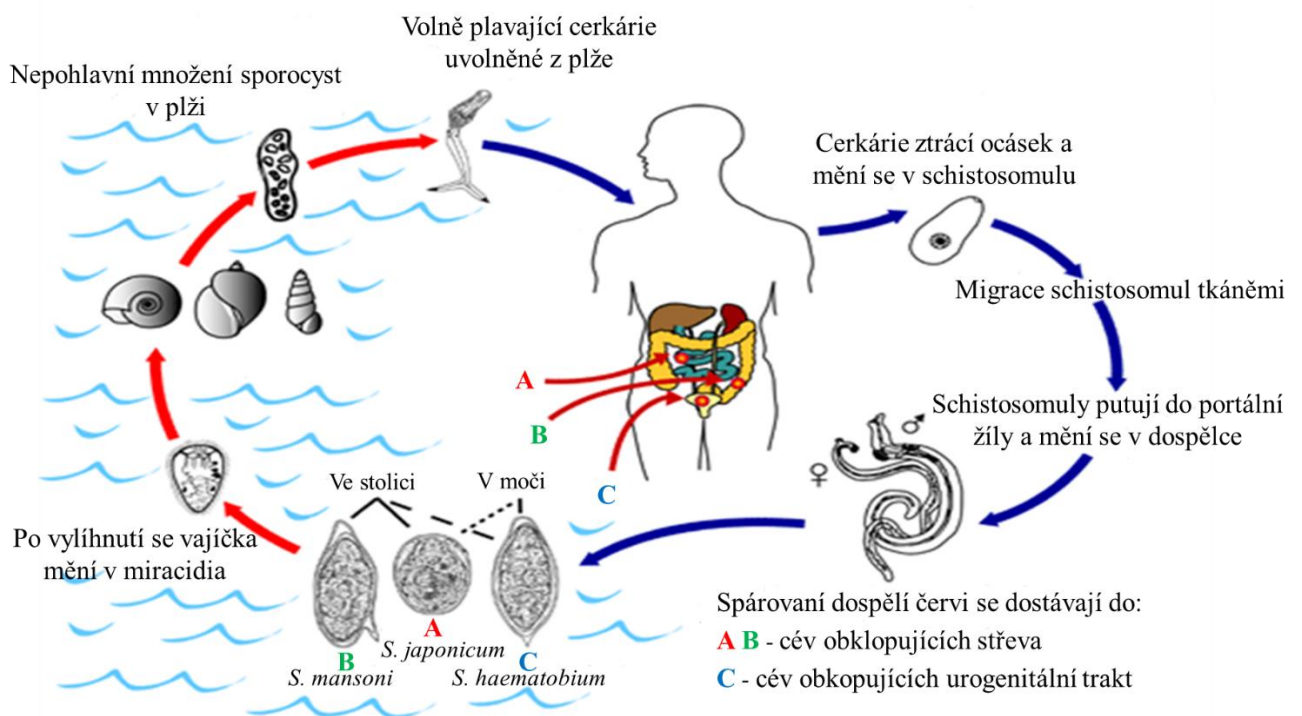
2.2. Životní cyklus krevniček

Životní cyklus krevniček je dvouhostitelský, kdy mezihostitelem je sladkovodní tropický plž rodu *Biomphalaria* (pro *S. mansoni*), *Bulinus* (*S. haematobium*) nebo *Oncomelania* (*S. japonicum*), ve kterém probíhá nepohlavní rozmnožování parazita, a definitivním hostitelem je většinou člověk, na kterého je vázáno pohlavní rozmnožování krevničky. *S. japonicum* infikuje kromě člověka řadu dalších savců, jako jsou hospodářská zvířata, což komplikuje snahu o eliminaci těchto krevniček. *S. mansoni* napadá jak člověka, tak i další primáty nebo hlodavce, nicméně za hlavní rezervoár krevničky je považován člověk (Colley et al., 2014).

K nákaze člověka dochází kontaminovanou vodou, ve které se nachází larvální stádium krevniček zvané cercárie. Tato larva penetruje kůží hostitele, ztrácí svůj rozdvojený ocásek a mění se tak v další vývojové stádium označované jako schistosomula, která dále vstupuje do kapilár a lymfatických cév. Odtud se dostává do srdce, do plic a následně do jater, kde se živí portální krví. Schistosomula zde rychle roste a mění se v dospělé. Dospělé krevničky se párují a sameček takto přenáší samičku do cév obklopujících střeva (*S. mansoni* a *S. japonicum*) nebo do cév v okolí urogenitálního traktu (*S. haematobium*), kde samička klade stovky až tisíce vajíček denně. Tato vajíčka se dostávají do příslušných orgánů a jsou vylučována stolicí nebo močí, přičemž část jich zůstává v těle hostitele, kde působí patologii onemocnění. Po kontaktu

vyloučených vajíček s vodou dochází k jejich líhnutí a uvolnění obrvené larvy zvané miracidium, která penetruje povrchem vhodného vodního plže. V těle plže se miracidium mění na mateřskou sporocystu, která se nepohlavně množí. Dceřiné sporocysty migrují do trávicích žláz plže, nepohlavně se dále rozmnožují a dávají vzniku mnoha novým cercáriím, které opouští meziphostitele a dostávají se do vody (obr. 1) (Thétiot-Laurent et al., 2013).

Stimuly ke změně směru pohybu volně plavající cercárie *S. mansoni* jsou dány látkami vyskytujícími se v kůži hostitele. Jsou jimi volné mastné kyseliny, L-arginin a peptidy obsahující terminálně vázaný L-arginin (Haerberlein a Haas, 2007). Přichycení cercárií na kůži člověka je dáno reakcí na L-arginin a teplo. Cercárie *S. mansoni* setrvávají na povrchu kůže díky schopnosti rozpoznání ceramidů v ní obsažených. Kromě tohoto chemického signálu, tyto cercárie reagují i na teplo (Haas et al., 2008). Oproti tomu u cercárií *S. japonicum* a *S. haematobium* nebylo zjištěno využití těchto specifických signálů pro setrvání na kůži. Taktéž se v porovnání se *S. mansoni* liší v rozpoznávání přítomnosti hostitele. *S. haematobium* reaguje na zastínění vodní hladiny a u *S. japonicum* se jedná o proces, který není závislý ani na chemických stimulech ani na světle (Haas et al., 1987; Haerberlein a Haas, 2007).

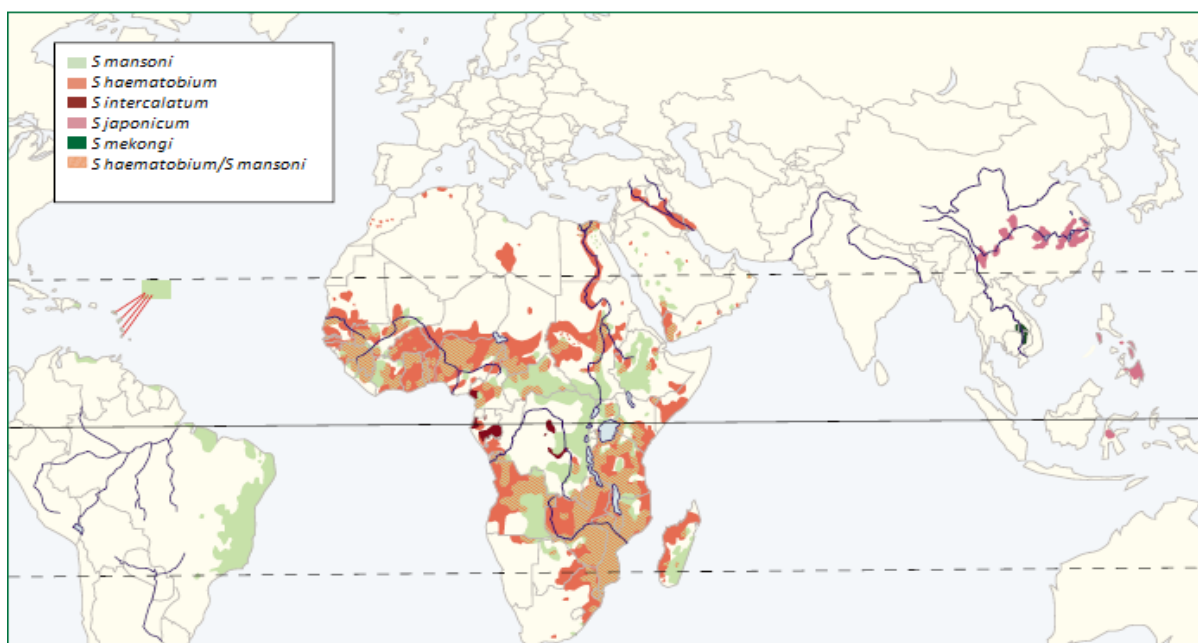


Obr.1 Životní cyklus krevničků rodu *Schistosoma*. Upraveno podle www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.

Stimulem pro penetraci jsou nenasyčené mastné kyseliny vyskytující se v lidské kůži (Haas et al., 1987). Po tomto stimulu cercárie sekretuje obsah svých acetabulárních žláz, který má proteolytickou aktivitu a ničí tím složky kůže. Nejvýznamnější detekovanou cercáriovou proteázou je serinová elastáza, která štěpí elastin a další komponenty kůže (Salter et al., 2000). Tato elastáza je charakteristická pro *S. mansoni* a *S. haematobium*, ovšem nebyla dosud objevena u *S. japonicum*. V acetabulárních žlázách *S. japonicum* byla naopak zjištěna několikanásobně větší aktivita katepsinu B oproti ostatním druhům (Dvořák et al., 2008). Kromě ztráty ocásku a sekrece z acetabulárních žláz je přeměna ve schistosomulu doprovázena i ztrátou povrchového glykokalyxu, což má význam ve vyhnutí se imunitní odpovědi hostitele (McKerrow a Salter, 2002). Pro vstup do cév se schistosomula orientuje pomocí koncentračního gradientu L-argininu a D-glukózy (Haas et al., 2008).

2.3. Výskyt krevniček

Krevničky rodu *Schistosoma* se vyskytují v tropech a subtropích (obr. 2). *S. mansoni* a *S. haematobium* jsou rozšířeny v Africe a na Středním Východě, přičemž *S. mansoni* se vyskytuje i v Jižní Americe a na některých Karibských ostrovech. *S. japonicum* je rozšířena v Asii, hlavně na Filipínách a v Číně. *S. mekongi* se nachází na povodí řeky Mekong v Asii a *S. intercalatum* pouze v některých oblastech západní a centrální Afriky (Colley et al., 2014).



Obr.2 Výskyt krevniček rodu *Schistosoma*. Upraveno podle Colley et al., 2014.

3. Schistosomóza

3.1. Charakterizace schistosomózy

Schistosomóza, nebo také bilharzióza podle svého objevitele Theodora Bilharze, je parazitární onemocnění způsobené krevničkami rodu *Schistosoma*. Jedná se o onemocnění, kterým je celosvětově nakaženo více než 200 milionů lidí a přes 700 milionů lidí je v ohrožení nákazou, z toho většina je v Africe. Schistosomóza je především rozšířena v chudých vesnických i městských oblastech, kde jsou zhoršené hygienické podmínky a nedostatečná kontrola vody. V endemických oblastech jde o chronické onemocnění s nejvyšší prevalencí a intenzitou infekce u dospívajících (Utzinger et al., 2009).

3.2. Symptomy a patogeneze schistosomózy

Akutní schistosomóza vyvolaná *S. mansoni* a *S. haematobium* se projevuje hlavně u turistů, tedy po prvním setkání s parazitem. U místní populace se akutní onemocnění projevuje zřídka, protože se opakovaně dostává do styku s infekční cercárií. Oproti tomu, akutní schistosomóza po infekci *S. japonicum* je častá i u lokálních společenstev a může vést až k hepatosplenomegalii a portální hypertenzi.

Projevy akutní schistosomózy jsou u všech tří krevniček obdobné. Prvním projevem je imunitní odpověď na průnik cercárií ve formě kožní vyrážky v místě průniku a objevuje se několik hodin po styku s kontaminovanou vodou. Dalším z nich je Katayamský syndrom, což je imunitní reakce na migrující schistosomulu a počáteční usazování produkovaných vajíček. Nastává po 14-84 dnech po infekci a zahrnuje symptomy jako je horečka, únava a bolest hlavy. Charakteristický je i zvýšený počet eosinofilů v krvi (Burke et al., 2009).

Chronická schistosomóza je častější formou onemocnění a je výsledkem opakovaného kontaktu s kontaminovanou vodou, kdy k primární infekci obvykle dochází již u dětí ve věku dvou let. Její příčinou je dlouhodobé usazování vajíček (Obr. 3) ve tkáních orgánů, což vyvolává imunitní reakci člověka, tvorbu granulomů a poškození příslušných orgánů. Hlavní příčinou patologie onemocnění jsou tedy vajíčka krevniček, nikoliv červi samotní. Udává se, že dospělí červi mohou v člověku přežívat v průměru 3-10 let (Colley et al., 2014). V případě intestinální a jaterní schistosomózy (způsobené *S. mansoni* a *S. japonicum*) jsou zasažena hlavně játra, slezina a střevo. Onemocnění se projevuje bolestí břicha, ztrátou chuti k jídlu a krvácivými průjmy. Tyto symptomy jsou způsobeny vajíčky usazenými ve střevní sliznici. V případě ukládání vajíček v jaterních sinusoidách dochází k tvorbě granulomů a hepatomegalie. Granulomatózní zánět vede k nadbytečné produkci kolagenu a dalších složek extracelulární matrix v játrech, což způsobuje fibrózu a blokáci portálních řečišť. To má za

následek portální hypertenzi, splenomegalii, ascites a gastrointestinální krvácení. Urogenitální schistosomóza je vyvolána infekcí *S. haematobium* a je způsobena usazováním vajíček ve stěně močového měchýře a močovodů. Onemocnění se mimo jiné projevuje přítomností krve v moči. Výsledkem je opět granulomatózní odpověď, fibróza a kalcifikace těchto orgánů. U žen navíc může docházet i k postižení pohlavních orgánů. Onemocnění je také spojováno s rakovinou močového měchýře a neplodností (Burke et al., 2009).



S. mansoni *S. japonicum* *S. haematobium*

Obr.3 Vajíčka krevniček a dospělí spárovaní červi *S. japonicum*.
Převzato z www.ruby.fgcu.edu/courses/davidb/50249/web/sm202; www.path.cam.ac.uk/~schisto/helminth_eggs/index.

3.3. Léčba a prevence schistosomózy

V současné době se k léčbě schistosomózy používá jediný lék s názvem praziquantel. Jeho výhodami jsou účinnost – působí na všechny druhy krevniček, cena a dobrá snášenlivost. Tento lék je ovšem účinný pouze na dospělé červy a vzhledem k tomu, že je plošně a opakovaně používán jako jediný, je zde možnost vývoje rezistence (Cioli et al., 2014). Snížená citlivost vůči praziquantelu se podařilo laboratorně navodit u *S. mansoni* na myším modelu (Fallon a Doenhoff, 1994). Mechanismus účinku praziquantelu není zcela objasněn, nicméně je známo, že působí na krevničky tím, že způsobuje influx vápenatých iontů do jejich těla, stahy svaloviny a narušení tegumentu. Předpokládá se, že praziquantel působí na regulační podjednotku vápenatého kanálu krevniček. Deriváty artemisininu mají také schopnost zabíjet krevničky, ale na rozdíl od praziquantelu působí na jejich larvální stádia. Nabízí se tak možnost kombinované léčby s velmi dobrou účinností. Ovšem vzhledem k tomu, že deriváty artemisininu se používají jako antimalarikum, jeho aplikace je limitována z důvodu možného vývoje rezistence u plasmodia, původce malárie (Cioli et al., 2014).

Pro úspěšnou eliminaci schistosomózy je zapotřebí kromě plošného užívání praziquantelu i výzkum nových strategií boje proti tomuto onemocnění. Jedním z nich je vývoj

vakcín proti schistosomóze, na který je dnes kladen velký důraz. Doposud byla testována řada antigenů, ovšem žádný z nich nenavozoval dostatečnou ochranu. Prozatím nejlepší výsledky byly dosaženy s rekombinantním enzymem označovaným 28 kDa glutation-S-transferáza (rSh28GST) ze *S. haematobium* proti urogenitální schistosomóze. Cílem této vakcíny je navodit protilátky schopné neutralizace enzymatické aktivity rSh28GST a zabránit tak detoxifikaci lipofilních molekul. Imunizace touto látkou a následná infekce experimentálních zvířat vedla k redukci počtu červů a menší produkci vajíček. Další studie ukázaly, že získané protilátky mohou hrát roli v ochraně proti reinfekci. Je to jediná vakcína, která již vstoupila do klinických studií (Riveau et al., 2012).

Dalším přístupem je vývoj nových chemoterapeutik, která by byla přímo cílena na určité molekulární dráhy parazita. Identifikaci molekulárních cílů umožňují data z analýz transkriptomů krevniček a sekvenování genomů. Další možností je analýza cílů pomocí RNA interference (Caffrey, 2007). Příkladem tohoto typu léčby je použití vinylsulfonového inhibitoru (K11777), o kterém bylo zjištěno, že blokuje aktivitu cysteinové proteázy katepsinu B1, který se nachází ve střevě krevničky a účastní se trávení. Účinnost tohoto inhibitoru byla testována na myších infikovaných *S. mansoni* a jeho podávání mělo za následek snížení patologie orgánů, stejně tak jako snížení množství červů i vajíček (Abdulla et al., 2007).

4. Proteolytické enzymy

4.1. Klasifikace proteolytických enzymů

Proteolytické enzymy neboli proteázy (obecně peptidázy) jsou enzymy katalyzující hydrolytické štěpení peptidové vazby v proteinech a peptidech. Dle EC (Enzyme Commission) systému jsou tyto enzymy klasifikovány jako hydrolázy, což znamená, že štěpí peptidovou vazbu za pomoci molekuly vody.

Dále můžeme proteázy klasifikovat jako endopeptidázy nebo exopeptidázy podle místa štěpení. Exopeptidázy štěpí aminokyseliny na konci peptidového řetězce, a to buď na C-konci (karboxypeptidázy) nebo N-konci (aminopeptidázy). Endopeptidázy pak štěpí uvnitř peptidového řetězce. Podle mechanismu katalytického účinku a aktivního místa jsou proteázy dále děleny do šesti hlavních skupin na cysteinové, serinové, threoninové, aspartátové, glutamátové proteázy a metaloproteázy (Garcia-Carreón a Del Toro, 1997; Rao et al., 1998). Podle databáze MEROPS jsou v závislosti na homologii jejich aminokyselinových sekvencí proteázy hierarchicky rozděleny do rodin a ty jsou dále zařazeny do klanů na základě strukturních podobností aminokyselinových zbytků v okolí aktivního místa (Rawlings et al., 2013).

4.2. Aktivita proteolytických enzymů a její regulace

Aktivní místo proteáz je podle konvenční terminologie tvořeno vazebnými podmísty, do kterých se specificky vážou odpovídající aminokyselinové zbytky substrátu, které jsou označovány P1 až Pn od štěpené peptidové vazby směrem k N-konci substrátu a P1' až Pn' směrem k C-konci substrátu. Analogicky se označují příslušná podmísta S1 až Sn a S1' až Sn' enzymu (Berger a Schechter, 1970).

Fyziologická funkce proteáz musí být regulována a jedním z důležitých mechanismů regulace je biosyntéza proteáz ve formě prekurzorů – proenzymů (zymogenů), které jsou neaktivní. Po správné lokalizaci prekurzoru v rámci buňky nebo po sekreci mimo buňku dochází k jeho proteolytickému štěpení (autokatalyticky nebo působením dalších proteáz) a tím k jeho aktivaci. Tímto štěpením je z molekuly prekurzoru odstraněn tzv. aktivační peptid (propeptid), který je kromě blokování aktivního místa také důležitý pro správné sbalení molekuly, stabilitu nebo intracelulární transport. Dále je aktivita proteolytických enzymů regulována pomocí pH a specifických endogenních inhibitorů proteinového charakteru (Shinde a Inouye, 2000).

4.3. Výskyt, mechanismus a struktura proteolytických enzymů

4.3.1. Serinové proteázy

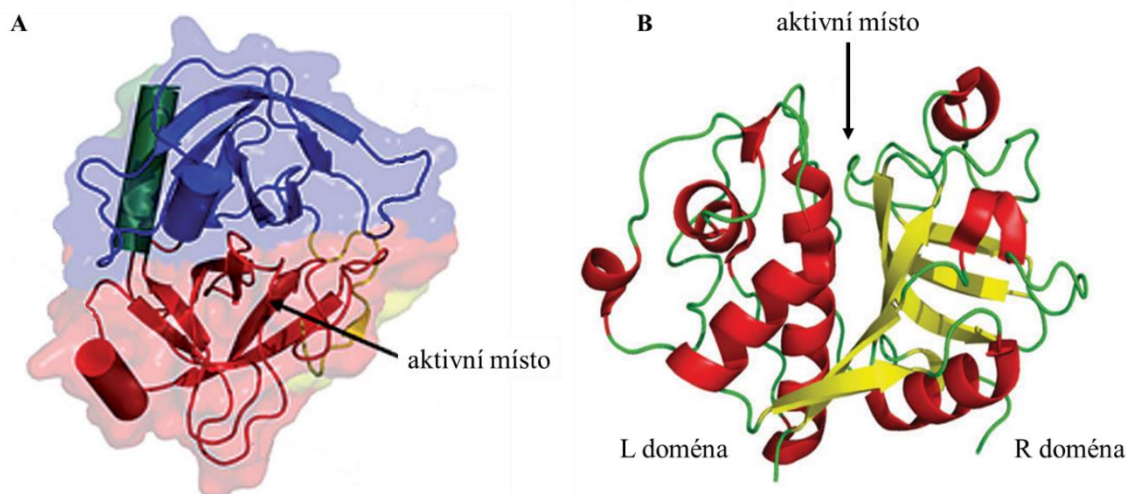
Serinové proteázy jsou velmi rozšířené a nacházejí se ve všech buněčných organismech i v mnoha virech. Dělí se do 14 klanů, které jsou dále rozděleny do 50 rodin. Největší rodinou je S1 rodina chymotrypsinu z klanu PA (Rawlings a Salvesen, 2013), kam patří kromě nejvíce prostudovaných trávicích proteáz trypsinu a chymotrypsinu i například proteázy účastnící se srážení krve (trombin) či imunitní odpovědi (katapsin G). Jsou syntetizovány jako neaktivní proenzymy obsahující propeptid na N-konci. Podle jejich substrátové specifity je lze rozdělit na proteázy (a) trypsinového typu, které štěpí za kladně nabitými aminokyselinami (Arg, Lys), (b) chymotrypsinového typu, které štěpí za velkými hydrofóbními aminokyselinami (Phe, Trp, Tyr) a (c) elastázového typu štěpící za malými aminokyselinami (Gly, Ala, Val) (Hedstrom, 2002). Struktura serinových proteáz rodiny S1 se vyznačuje dvěma doménami, mezi kterými se nachází aktivní místo s katalytickými aminokyselinovými zbytky. Tyto domény jsou tvořeny β -barely, jejichž konce jsou funkčně rozděleny a podílí se na katalýze i regulaci. Topologie β -barelů vykazuje strukturu tzv. motivu řeckého klíče (obr. 4A) (Page a Cera, 2008). Dalšími významnými klany serinových proteáz jsou klany SB obsahující subtilisiny či SC obsahující např. prolyl oligopeptidázy (Rao et al., 1998).

Serinové proteázy jsou obecně aktivní při neutrálním a zásaditém pH. V jejich aktivním místě se nachází katalytická triáda tvořená aminokyselinovými zbytky His, Asp, Ser. Zbytek serinu provádí nukleofilní atak karbonylové skupiny peptidové vazby substrátu, která je štěpena. Během reakce vzniká kovalentně vázaný intermediát enzym-peptid, který je dále hydrolyzován (Rao et al., 1998).

4.3.2. Cysteinové proteázy

Cysteinové proteázy byly nalezeny u prokaryot, eukaryot i virů. Nejpočetnější a nejlépe prostudovanou rodinou je C1 rodina papainu, kam patří živočišné, rostlinné, protozoální, bakteriální i virové proteázy. Společně s rodinou calpainu (C2) a rodinou streptopainu (C10) tvoří klan CA. Další významnou rodinou je rodina legumainu (C13) klanu CD. Klan CD cysteinových proteáz se v porovnání s klanem CA liší v uspořádání aktivního místa, a to v pořadí aminokyselin katalytické dyády v sekvenci molekuly, které je u těchto klanů opačné. Dále je substrátová specifita proteáz klanu CD určena spíše podmístem S1 enzymu než S2, jako je tomu u CA klanu. Cysteinové proteázy rodiny papainu (C1) jsou monomerní globulární proteiny o molekulové hmotnosti 25-35 kDa (Novinec a Lenarčíč, 2013; V. Turk et al., 2001) s výjimkou katepsinu C, který tvoří tetramerní oligomery (180-200 kDa). Terciální struktura proteáz rodiny papainu je tvořena levou (L) a pravou (R) doménou, které jsou orientovány do písmene V. V L doméně převažují α -helixy, zatímco R doména je tvořena motivem β -barelu. Mezi nimi se nachází aktivní místo enzymu s katalytickými zbytky Cys a His (obr. 4B). Jedny z nejdůležitějších savčích cysteinových proteáz rodiny papainu jsou lysozomální katepsiny, které se vyskytují téměř ve všech tkáních. Existuje 11 lidských cysteinových katepsinů – katepsiny B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W (Novinec a Lenarčíč, 2013). Jsou obecně aktivní v mírně kyselém pH. Mají široké spektrum působení, účastní se mnoha biologických procesů a jsou důležité pro udržení homeostázy. Fungují jak intracelulárně tak extracelulárně a zajišťují tak odbourávání makromolekul v lysozomech buňky, zpracování a aktivaci antigenů, remodelaci extracelulární matrix během hojení či nádorového bujení. Cysteinové katepsiny jsou syntetizovány jako neaktivní preproenzymy, kde signální sekvence zajišťuje vstup proteinu do lumen ER a je poté kotranslačně odštěpena. Propeptid je přirozeným inhibítorem katepsinů a hraje roli při transportu proenzymu do pozdních endozomů, kde je poté odštěpen a tím dochází k aktivaci proenzymu za vzniku zralého enzymu. Proteolytické odštěpení propeptidu je zajištěno buď jinými proteázami, nebo autokatalyticky snížením pH prostředí (Brix et al., 2008; Rowan et al., 1992).

Katalytický mechanismus cysteinových proteáz je podobný serinovým proteázám. Jejich aktivita je ale závislá na katalytické dyádě tvořené aminokyselinami Cys a His. Nukleofilní thiolová skupina zbytku cysteinu v aktivním místě napadá karbonyl štěpené peptidové vazby a histidin slouží stejně jako u serinových proteáz jako donor protonu (Rao et al., 1998).



Obr. 4 *Strukturní znaky proteáz rodiny chymotrypsinu (S1) a papainu (C1). A: Struktura proteáz chymotrypsinového typu. Mezi N-terminálním β -barelem (modře) a C-terminálním β -barelem (červeně) se nachází aktivní místo. Žlutě je zobrazen propeptid a zeleně C-terminální α -helix, který stabilizuje celkovou strukturu. B: Prostorové uspořádání levé (L) a pravé (R) domény papainu, které uprostřed tvoří aktivní místo s katalytickými zbytky. Upraveno podle Novinec a Lenarčíč, 2013; Page a Cera, 2008.*

4.3.3. Aspartátové proteázy

Aspartátové proteázy jsou rozšířeny mezi všemi buněčnými organismy i viry. Savčí aspartátové proteázy jsou klasifikovány do dvou klanů AA a AD. Klan AA obsahuje velkou rodinu pepsinu A1, do které patří kromě modelového pepsinu i chymosin, renin a katepsiny D a E (Horimoto et al., 2009). Byla vyřešena terciární struktura několika aspartátových proteáz rodiny pepsinu. Vyznačuje se dvěma strukturně velmi podobnými doménami obsahující sekvenční motiv, který vznikl genovou duplikací. Tento motiv obsahuje dva aspartátové zbytky, které tvoří aktivní místo enzymu. Jedna z domén obsahuje navíc β -vlásečkovou strukturu, ve které se nachází další důležitá aminokyselina tyrosin, která přispívá ke specifitě enzymu (obr. 5A). Tyrosin může interagovat se štěpeným substrátem a je součástí S1 podmísta enzymu (Rawlings a Salvesen, 2013). Aspartátové proteázy jsou ve většině případů syntetizovány jako inaktivní proenzymy a jejich aktivace probíhá autokatalytickým odštěpením N-koncového propeptidu v nízkém pH (Horimoto et al., 2009). Katalytický mechanismus

aspartátových proteáz se liší od mechanismu serinových a cysteinových proteáz v tom, že štěpená vazba je nukleofilně atakována vodou a ne nukleofilními aminokyselinovými zbytky. Většina známých aspartátových proteáz váže a aktivuje molekulu vody pomocí postranních řetězců katalytických aspartátových zbytků (Rawlings a Salvesen, 2013).

4.3.4. Metaloproteázy

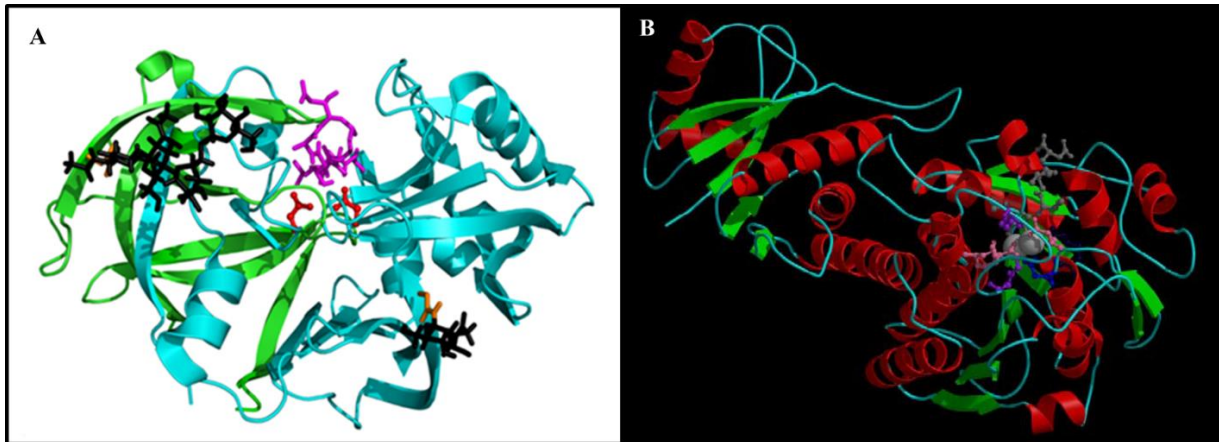
Metaloproteázy se katalytickým mechanismem podobají aspartátovým proteázám tím, že k nukleofilnímu napadení peptidové vazby využívají také molekulu vody. Ta je ovšem aktivovaná dvojmocnými ionty kovů. Metaloproteázy jsou rozděleny do 14 klanů v závislosti na počtu iontů kovů potřebných pro katalýzu. V aktivním centru většiny metaloproteáz je obvykle vázán jeden ion kovů. Nejčastěji se jedná o zinek, který je vázán v aktivním centru enzymu pomocí katalytických aminokyselinových zbytků. Některé metaloproteázy ovšem potřebují ke katalýze ionty dva, které působí společně. Příkladem jsou proteázy klanu MF. Tento klan obsahuje pouze jedinou rodinu, a to rodinu leucylaminopeptidáz (M17) z eukaryot a bakterií. Mají unikátní N-terminální doménu a C-doménu, ve které se nachází ligandy zinku a katalytické aminokyselinové zbytky. Tato C-terminální doména vykazuje znaky podobné i metaloproteázám z jiných klanů. Zinek je pentavalentní a jako ligandy využívá tři aspartáty, lysin a glutamát. Pro katalýzu jsou důležité aminokyselinové zbytky argininu a lysinu (obr. 5B) (Rawlings a Salvesen, 2013). Mezi důležité zástupce metaloproteáz patří enzymy jako je kolagenáza vyšších organismů nebo bakteriální termolysin, což jsou neutrální proteázy mající specifitu k hydrofóbním aminokyselinám. Mezi alkalické proteázy patří matrixové metaloproteázy, které mají důležitou roli při degradaci extracelulární matrix během morfogeneze, diferenciaci a během hojení (Rao et al., 1998). Propeptid matrixových metaloproteáz obsahuje konzervovaný cysteinový zbytek, který udržuje enzym v inaktivním stavu interakcí s iontem zinku (Van Wart a Birkedal-Hansen, 1990).

4.3.5. Glutamátové a threoninové proteázy

Rodina glutamátových proteáz (G1) obsahuje proteázy, které byly nalezeny v pouze houbách (*Ascomycota*). Dříve byly řazeny do aspartátových proteáz, ale analýza struktury a katalytického mechanismu odhalily, že patří do samostatné třídy. Glutamátové proteázy se vyznačují terciální strukturou „ β -sandwich“ a katalytickou dyádou tvořenou aminokyselinovými zbytky glutamátu a glutaminu, které aktivují nukleofilní molekulu vody (Sims et al., 2004).

Threoninové proteázy mohou být označeny jako N-terminální nukleofilní hydrolázy (Ntn-hydrolázy). Pro katalýzu je nezbytný N-koncový threoninový zbytek, který nukleofilně

napadá štěpenou vazbu. Zástupci těchto proteáz jsou například prokaryotní proteazom a penicilinacyláza (Dodson a Wlodawer, 1998).



Obr. 5 Krystalová struktura aspartátové proteázy katepsinu D a metaloproteázy leucylaminopeptidázy. **A:** Prostorová struktura lidského katepsinu D tvořená dvěma doménami (zeleně a modře) v komplexu s inhibítolem pepstatinem (fialově). V aktivním místě se nacházejí katalytické zbytky Asp (červeně). Černě jsou zobrazeny sacharidové modifikace. **B:** Prostorová struktura hovězí leucylaminopeptidázy v komplexu s inhibítolem amastatinem (šedě). Ionty zinku jsou zobrazeny světle šedě. Katalytickými zbytky jsou Lys (fialově) a Arg (modře). Převzato z Rawlings a Salvesen, 2013.

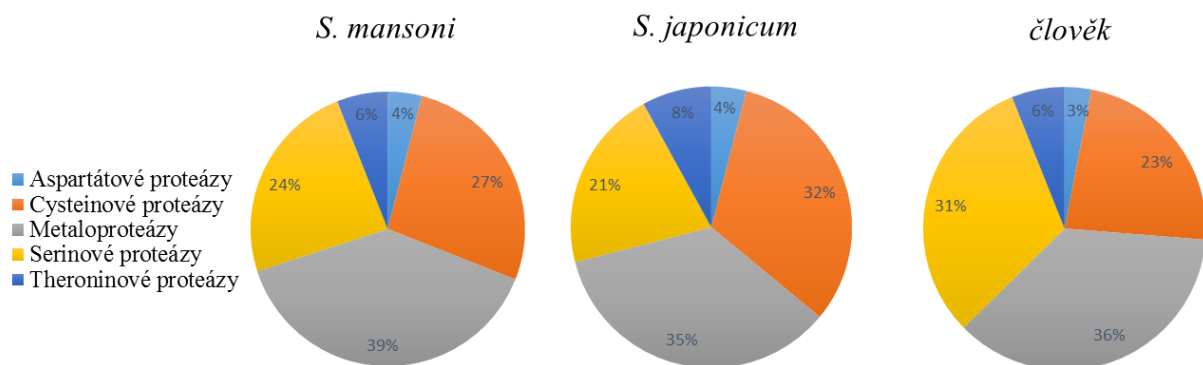
5. Proteázy v genomu krevniček rodu *Schistosoma*

Jaderný genom *S. mansoni* je tvořen 363 Mb a obsahuje 10 852 genů kódujících proteiny. Asi 2,5 % (335 sekvencí) genomu jsou sekvence proteolytických enzymů z pěti tříd proteáz (aspartátové, cysteinové, serinové, threoninové proteázy a metaloproteázy). Procentuální rozložení hlavních klanů proteáz je podobné tomu v lidském genomu s výjimkou zastoupení zástupců chymotrypsinové rodiny S1. Těchto proteáz je v genomu *S. mansoni* výrazně méně. Naopak rodina C1 cysteinových proteáz a rodiny M8 a M13 metaloproteáz obsahují větší množství zástupců v genomu *S. mansoni* oproti lidskému genomu (Berriman et al., 2009; Protasio et al., 2012).

Genom *S. japonicum* má velikost 397 Mb a obsahuje 13 469 genů kódujících proteiny. Bylo v něm nalezeno 314 proteolytických enzymů ze tříd cysteinových, serinových, aspartátových, threoninových proteáz i metaloproteáz. Oproti lidskému genomu má *S. japonicum* větší zastoupení cysteinových a threoninových proteáz a menší zastoupení serinových proteáz. *S. japonicum* a *S. mansoni* obsahují ve svém genomu nejvíce metaloproteáz, mezi které patří například významný antigen schistosomálních vajíček leucyl aminopeptidáza. Druhou největší skupinou proteáz v jejich genomu jsou cysteinové proteázy,

kteří mají klíčový význam při trávení krevniček. Vzhledem k sekvenční homologii s lidskými lysozomálními katepsiny jsou nazývány katepsiny B, C, F a L. Mezi serinovými proteázami *S. japonicum* byl objeven i gen pro elastázu (SjCE) (Zhou et al., 2009). Tato proteáza je pro *S. mansoni* (SmCE) i *S. haematobium* (ShCE) nezbytnou pro penetraci kůže hostitele, ale u *S. japonicum* využití této proteázy pro penetraci nebylo dokázáno (Dvořák et al., 2008). Zhou et al. (2009) ovšem identifikovali přítomnost elastázy SjCE ve sporocystě i cercárii *S. japonicum* a předpokládají, že se také podílí na průniku kůží hostitele.

S. haematobium má velikost genomu 385 Mb a celkový počet genů kódujících proteiny je 13 017. V genomu se nachází 188 sekvencí kódující proteázy. Srovnání tohoto genomu s genomem *S. mansoni* ukázalo podobné procentuální zastoupení repetitivních elementů a také vysokou shodu v nukleotidové sekvenci, což ukazuje na blízkou příbuznost těchto krevniček. Předpokládá se, že 2,6 % genomu *S. haematobium* kóduje proteiny sekreční dráhy, mezi které patří například katepsin B, „heat-shock“ proteiny, peroxidáza nebo superoxid dismutáza (Young et al., 2012).



Obr. 6 Porovnání zastoupení proteolytických enzymů u krevniček *S. mansoni*, *S. japonicum* a u člověka. Upraveno podle Bos et al., 2009; Southan, 2001; Zhou et al., 2009.

6. Proteolytické enzymy krevniček rodu *Schistosoma*

Proteolytické enzymy jsou nezbytné pro přežití parazitů a pro interakci s hostitelem. Krevničky je využívají při mnoha procesech, a to ve všech vývojových stádiích. Mají zásadní funkci při pronikání do hostitele, migraci jeho tkáněmi, úniku před imunitní odpovědí, modulaci zánětu či trávení a získávání živin degradací krevních proteinů (Kašný et al., 2009).

6.1. Proteolytická výbava trávicího traktu krevniček

6.1.1. Trávicí soustava krevniček

Krevničky přijímají potravu jak trávicím traktem, který je důležitý hlavně pro získávání aminokyselin, tak i povrchem těla, díky kterému krevničky získávají především glukózu. Samičky přijímají výrazně více potravy než samečci vzhledem k vyšším výdejům při kladení vajíček (Skelly et al., 2014).

Trávicí soustava krevniček se skládá z ústního otvoru, jícnu a slepého střeva. Jícen je obklopen žlázou, která uvolňuje sekrety do lumen střeva působící na požitou krev. Lumen střeva je pokryt epiteliální vrstvou zvanou gastrodermis. Gastrodermální buňky vykazují ultrastrukturní znaky proteosynteticky aktivních buněk s dobře vyvinutým drsným endoplasmatickým retikulem a četnými vezikuly. Jícen má při trávení důležitou funkci, protože se v něm odehrává lýze erytrocytů, při které dochází k uvolnění hemoglobinu. Hemoglobin a složky plasmy jsou tráveny v lumen střeva, kde je kyselé prostředí, které napomáhá jednak rozrušení struktury trávených proteinů a zároveň aktivaci trávicích proteáz a jejich optimálnímu působení. Trávicí trakt krevniček je slepý a odpadní produkty trávení jsou vyvrhovány zpět do krve hostitele (Skelly et al., 2014). Vzhledem k tomu, že celkové pH ve střevě krevniček je vyšší (kolem pH 6) než pH optimum pro proteolytickou degradaci hemoglobinu a sérového albuminu (kolem pH 4), předpokládá se existence výběžků střeva s mikrokly, které zajišťují potřebné nižší pH pro trávení (Delcroix et al., 2007).

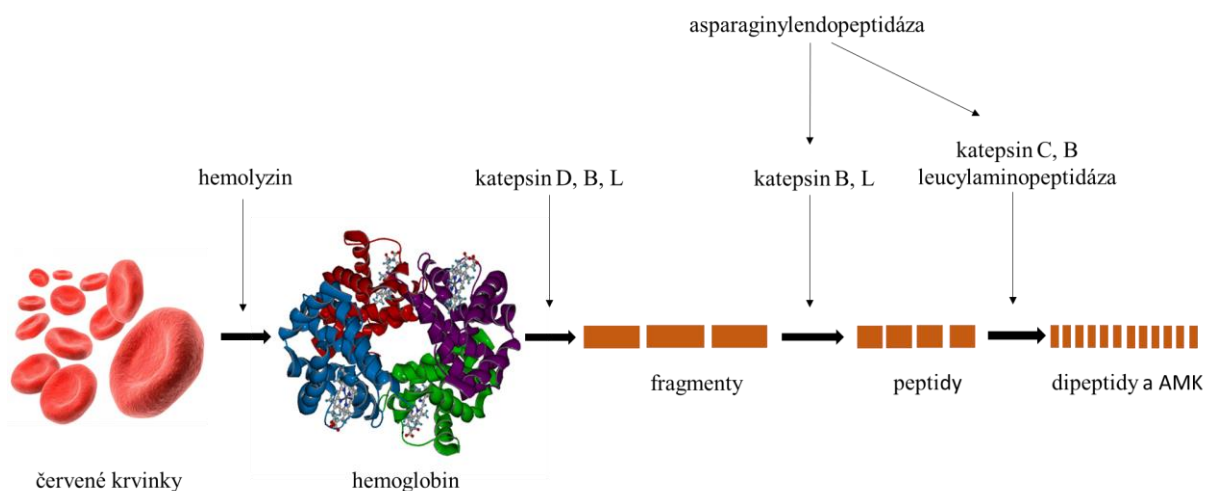
6.1.2. Trávení hemoglobinu krevničkami

Dospělé krevničky a schistosomuly se živí krví hostitele a k jejímu trávení využívají proteolytických enzymů lokalizovaných v jejich střevě. Hlavním zdrojem živin pro růst, vývoj a reprodukci jsou krevní proteiny, především hemoglobin. Ve střevě krevniček byly nalezeny proteázy cysteinové (katepsiny B1 a C, L1 až L3, asparaginylendopeptidáza), aspartátové (katepsin D) a metaloproteázy (leucylaminopeptidáza). Na rozdíl od hematofágního hmyzu nebo obratlovců, krevničky nevyužívají k trávení serinové proteázy (Delcroix et al., 2006). Ve střevě *S. mansoni* byl kromě těchto proteáz dále identifikován cystatin – proteázový inhibitor cysteinových katepsinů, který může regulovat aktivitu této skupiny proteáz (Delcroix et al., 2007).

Prvním krokem trávení je hemolýza červených krvinek pomocí hemolyzinu. Poté nastává kooperativní degradace uvolněného hemoglobinu. Degradace hemoglobinu je zahájena štěpením pomocí endopeptidáz – aspartátového katepsinu D a cysteinových katepsinů B1, L1,

L2 a L3. Vzniklé primární fragmenty jsou dále štěpeny endopeptidázovou aktivitou uvedených cysteinových katepsinů za vzniku menších peptidů. Exopeptidázy katepsin C a leucylaminopeptidáza dále degradují produkované peptidy na krátké absorbovatelné peptidy a aminokyseliny. Konečného exopeptidázového štěpení se účastní i katepsin B1, který má jak endopeptidázovou tak exopeptidázovou aktivitu. Asparaginylendopeptidáza (legumain) hraje důležitou roli v této kaskádě, protože aktivuje katepsin B (Delcroix et al., 2006). Schéma trávení hemoglobinu je zobrazeno na obr. 7. Kromě leucylaminopeptidázy, která má neutrální pH optimum, mají tyto trávicí proteázy pH optimum kyselé, což odpovídá i pH lumen střeva krevniček. Leucylaminopeptidáza byla ale lokalizována v gastrodermálních buňkách vystylajících lumen střeva a usuzuje se, že zde štěpí krátké peptidy přijaté z lumen na aminokyseliny (Skelly et al., 2014).

Při trávení hemoglobinu je uvolněna z každé podjednotky hemoglobinu prostetická skupina, neboli hem, která je pro krevničky toxická a je potřeba její detoxifikace. Hem je přeměňován na nerozpustný tmavě hnědý pigment hemozoin, který se hromadí ve střevě krevniček (a udílí jim tak tmavou barvu) a je vyvrhován (Skelly et al., 2014).



Obr. 7 Schéma trávení hemoglobinu z červených krvinek proteázami krevničky. Názvy konkrétních izoenzymů jsou uvedeny v textu. Upraveno dle Delcroix et al., 2006.

6.1.2.1. Katepsin D z krevniček

Katepsin D je aspartátová proteáza, která patří do rodiny pepsinu (klan AA, rodina A1). Jedná se o endopeptidázu, jejíž substrátová specifita je dána preferencí hydrofóbních aminokyselinových zbytků v pozicích P1 a P1' substrátu. Na rozdíl od lidského katepsinu D, který má preferenci pro glutamát v pozici P2, pro schistosomální katepsin D je typ aminokyseliny v této pozici méně významný (Brindley et al., 2001; Dunn a Hung, 2000).

Katepsin D byl pomocí protilátek detekován v gastrodermis krevniček *S. mansoni* a *S. japonicum*, což naznačuje jeho funkci při trávení. Tomu nasvědčuje i vyšší exprese u samic vzhledem k vyššímu příjmu potravy spojeném s kladením vajíček a experimenty s rekombinantními enzymy. K autoaktivaci rekombinantního katepsinu D ze *S. mansoni* (SmCD) i *S. japonicum* (SjCD) dochází při pH 3,6 a zralý enzym má schopnost degradace hemoglobinu za vzniku tripeptidů, tetrapeptidů a větších fragmentů. Obě proteázy štěpí hemoglobin v rozmezí hodnot pH 2,5-4,6. Kromě přednostně štěpených vazeb Phe-Leu a Phe-Phe v P1 a P1' místech substrátu, SmCD a SjCD navíc štěpí substrát, ve kterém se na pozici P1' nachází prolin. Pozice štěpení v aminokyselinové sekvenci hemoglobinu se liší u lidského a schistosomálního katepsinu D, což by mohlo být výhodou při vývoji selektivních chemoterapeutických inhibitorů (Brindley et al., 2001; Brinkworth et al., 2001). Kromě degradace hemoglobinu, schistosomální katepsiny D štěpí lidské imunoglobuliny a mají tak funkci nejen při trávení ale při úniku před imunitní odpovědí člověka. SjCD byl nalezen ve všech vývojových stádiích krevničky, což také naznačuje více funkcí tohoto enzymu (Caffrey et al., 2004).

6.1.2.2. Leucylaminopeptidáza z krevniček

Leucylaminopeptidáza (LAP) je metaloproteáza patřící do klanu MF, rodiny M17. Má exopeptidázovou aktivitu a odštěpuje aminokyseliny z N-konce substrátu s preferencí k leucinu v P1 pozici. Substrátová specifita je dále určena P1' pozicí, na které se vyskytuje tyrosin nebo fenylalanin. Substráty s aspartátem a glycinem na P1 pozici a prolinem na P1' pozici nejsou štěpeny (Lowther a Matthews, 2002).

Schistosomální LAP byla první charakterizovanou aminopeptidázou z rodiny M17 vyskytující se v parazitických červech. Leucylaminopeptidázová aktivita byla objevena u krevniček *S. mansoni* a *S. japonicum* a pomocí imunologických metod byla lokalizována v gastrodermálních buňkách vystylajících lumen střeva. To značí její funkci při trávení. Rekombinantně připravený i nativní enzym je aktivní při neutrálním až mírně alkalickém pH, pH optimum je kolem 8. Je neaktivní při pH nižším než 6,5, což je prostředí charakteristické pro lumen střeva krevniček. LAP navíc oproti ostatním trávicím enzymům postrádá signální peptid potřebný pro vstup do sekretorické dráhy, což naznačuje, že LAP je intracelulárním enzymem. Jeho funkcí je zpracovávat krátké peptidy, které vznikly štěpením trávicích proteáz v lumen střeva, a které byly následně transportovány do cytosolu gastrodermálních buněk na volné aminokyseliny. Ty mohou být dále distribuovány v těle krevniček difúzí nebo pomocí aminokyselinových permeáz. SmLAP byla též lokalizována v tegumentu a může tak mít kromě

trávicí funkce i další roli v biologických procesech krevničky (McCarthy et al., 2004). LAP aktivita byla nalezena ve vajíčkách, miracidíích a cercáriích *S. mansoni*, přičemž nejvyšší aktivita byla naměřena u vajíček. Po inhibici LAP aktivity nedošlo k líhnutí vajíček a uvažuje se tedy o roli LAP v tomto procesu (Xu a Dresden, 1986).

6.1.2.3. Trávicí cysteinové katepsiny z krevniček

Cysteinové katepsiny patří do klanu CA a rodiny papainu (C1), která sestává především z endopeptidáz ale i z enzymů, které vykazují kromě endopeptidázové aktivity i aktivitu exopeptidázovou. Takovými proteázami jsou **katepsiny B**, které štěpí jak uvnitř řetězce substrátu (endopeptidázová aktivita), tak odštěpují i dipeptidy z C-konce substrátu (karboxydipeptidázová aktivita). Tato exopeptidázová aktivita katepsinů B je dána sekvenčním segmentem o délce 20-30 aminokyselin, který vytváří ve struktuře smyčku zvanou „occluding loop“ a obsahuje dva histidinové zbytky důležité pro interakci s C-koncem substrátu. Tato smyčka je pro všechny katepsiny B charakteristická a odlišuje je tím od ostatních papainových proteáz (obr. 8A) (Musil et al., 1991). Substrátová specifita katepsinů B je, stejně jako u ostatních papainových proteáz, dána hlavně S2 podmístem, kam se preferenčně vážou velké hydrofóbní aminokyseliny jako je fenylalanin a tyrosin, ale i arginin. Do S1 podmísta se především vážou kladně nabitě aminokyseliny a S3 podmísto enzymu upřednostňuje hydrofóbní a aromatické aminokyseliny (Cezari et al., 2002; Taralp et al., 1995).

Katepsin B1 ze *S. mansoni* (SmCB1) je nejhojněji se vyskytující proteáza ve střevě krevničky. Je také známá pod označením Sm31 kvůli molekulové hmotnosti 31 kDa své glykosylované formy. Pro tuto proteázu byly v genomu *S. mansoni* nalezeny dva geny (SmCB1.1 a SmCB1.2), jejichž produkty mají 95 % aminokyselinovou identitu (Caffrey et al., 2004). SmCB1 byl lokalizován jak v lumen tak i v gastrodermis střeva krevniček a jedná se o klíčový enzym využívaný při degradaci hemoglobinu. Je exprimován v neaktivní formě. U rekombinantního zymogenu SmCB1 nebyla pozorována autoaktivace ani při nízkém pH, ale aktivace je možná za pomoci další cysteinové proteázy přítomné ve střevě krevniček – asparaginylendopeptidázy (SmAE). Tato proteáza proteolyticky odštěpuje propeptid SmCB1, přičemž ponechává dvě aminokyseliny před počátkem sekvence zralého enzymu. Tyto dvě aminokyseliny jsou dále odstraněny katepsinem C za vzniku zralého enzymu. Alternativní cestou aktivace je autoaktivace v přítomnosti glykosaminoglykanů (Jílková et al., 2014). Optimální pH aktivity je kolem 6,5, narozdíl od schistosomálních katepsinů L1, L2, C a D, které mají pH optimum nižší než 5 (Sajid et al., 2003). Kvůli svým antigenním vlastnostem byl

SmCB1 vyhodnocen jako možný diagnostický marker (Losada et al., 2005). Byla vyřešena krystalová struktura SmCB1 enzymu i jeho komplexů s inhibitory (obr. 8A) (Jílková et al., 2011). Inhibitor vinylsulfonového typu K11777 byl úspěšně testován v experimentech *in vitro* s rekombinantním SmCB1, na kultivovaných krevničkách i na myších infikovaných krevničkami a bylo prokázáno, že SmCB1 je vhodnou cílovou molekulou pro vývoj nových inhibitorů jako léčiv proti schistosomóze (Abdulla et al., 2007; Jílková et al., 2011). Katepsin B1 byl také izolován z krevniček *S. japonicum* (Sj31) a lokalizován v jejich střevě. Jeho schopnost *in vitro* degradace hemoglobinu koresponduje s vlastnostmi SmCB1 a předpokládá se jeho majoritní funkce při degradaci proteinů při trávení *in vivo* (Caffrey a Ruppel, 1997). K charakterizaci cysteinových proteáz z krevničky *S. haematobium* byl použit celotělní homogenát a byla identifikována proteáza, která se svými vlastnostmi podobá katepsinu B1 ze *S. mansoni*. Katepsiny B1 ze *S. haematobium* a *S. mansoni* vykazují stejnou molekulovou hmotnost a značnou podobnost N-terminální sekvence (Rege et al., 1992). Homologa SmCB1 byla potvrzena v genomech *S. japonicum* i *S. haematobium* (Young et al., 2012; Zhou et al., 2009)

Katepsiny L jsou obecně endopeptidázy a od katepsinů B se odlišují především rozdílnou substrátovou specifitou. Stejně jako u katepsinů B byla popsána preference pro hydrofóbní aminokyselinové zbytky v P2 pozici substrátu, katepsiny L však narozdíl od katepsinů B neštěpí substráty s Arg v P2 pozici. Je to dáno odlišnou strukturou S2 podmísta katepsinů L, které nemá schopnost vázat polární guanidinovou skupinu argininu (Sajid a McKerrow, 2002).

Byly identifikovány tři katepsiny L (označované L1 až L3) v krevničkách, které hrají roli především při trávení. Jedná se o endopeptidázy účastnící se počátečního štěpení hemoglobinu, ale předpokládá se i jejich další funkce při interakci s hostitelem.

Katepsin L2 ze *S. mansoni* (SmCL2) byl imunolokalizován v reprodukčním systému samic a v *canalis gynaecophorus* sameček a nepředpokládala se jeho funkce při trávení (Michel et al., 1995). Později byl ovšem imunologicky nalezen v lumen i gastrodermis střeva krevničky, což ukazuje na jeho funkce při trávení krevních proteinů (Bogitsh et al., 2001). SmCL2 byl také nalezen v cercáriích, a to v jejich acetabulárních žlázách. To naznačuje jeho roli při penetraci kůže hostitele (Dalton et al., 1997). Jeho exprese ve vajíčkách a miracidích nebyla prokázána (Brady et al., 2000). Katepsiny L2 a L1 (viz dále) byly objeveny ve *S. japonicum* (SjCL2 a SjCL1), a protože byly detekovány i ve vajíčkách mohou se podílet na vyvolání granulomatózní odpovědi člověka při nákaze (Day et al., 1995).

Katepsin L3 ze *S. mansoni* (SmCL3) byl pomocí protilátek lokalizován ve střevě krevniček. Je exprimován především v dospělých červech a schistosomulách. SmCL3 štěpí hemoglobin, a to s největší účinností v rozmezí hodnot pH 4-6. Tyto hodnoty odpovídají i hodnotám pH v lumen střeva krevniček a o SmCL3 se uvažuje jako o trávicí proteáze. Oproti SmCL2 a SmCL1 (viz dále), má SmCL3 delší propeptid, jehož N-terminální konec je prodloužen o přibližně 30 aminokyselin. SmCL3 se odlišuje i tím, že se v krevničce nachází především ve formě inaktivního zymogenu. Na rozdíl od SmCB1 není SmCL3 aktivován za pomoci asparaginylendopeptidázy a předpokládá se, že u rekombinantního SmCL3 dochází k autoaktivaci. Sekvenční analýza ukázala na příbuznost SmCL3 a SmCL2. Orthologní sekvence byla nalezena i v *S. japonicum* (SjCL3) (Dvořák et al., 2009).

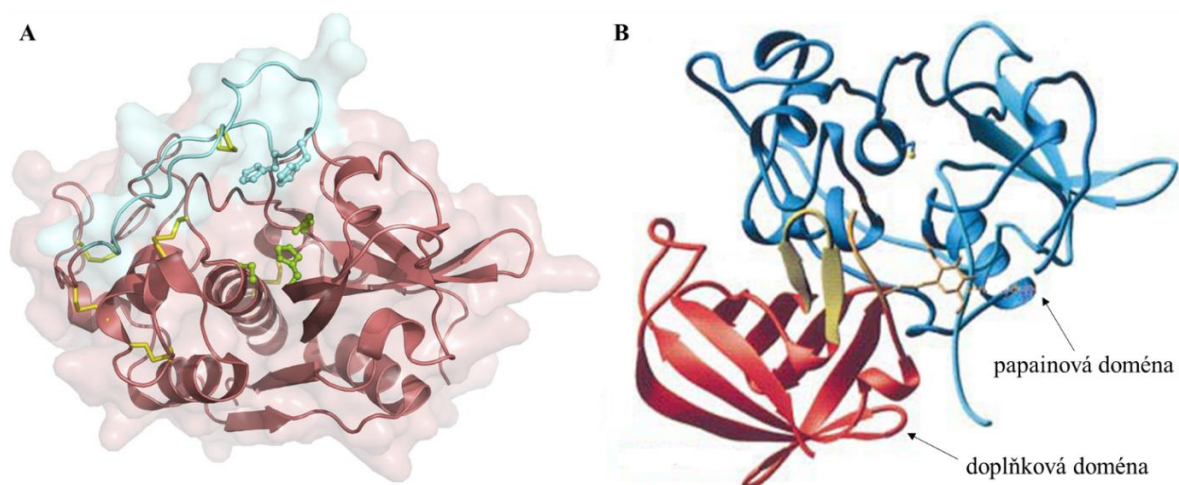
Katepsin L1 ze *S. mansoni* (SmCL1) vykazuje stejně jako SmCL2 preferenci pro substráty s hydrofóbním aminokyselinovým zbytkem na P2 pozici. Tyto proteázy se ovšem odlišují v S3 podmístě, což jim udílí rozdílnou substrátovou specifitu. SmCL2 má oproti SmCL1 inzertované dvě aminokyseliny v sekvenci oblasti S3 podmísta (Robinson et al., 2013).

SmCL1 byl přejmenován na SmCF, protože vykazuje vyšší homologii s katepsiny F než s katepsiny L (lidským a SmCL2) (Caffrey et al., 2004). SmCL1 a SmCL2 se navíc liší svojí substrátovou specifitou a pH profilem aktivity. SmCL2 je aktivní pouze v kyselém prostředí při pH optimu 5, SmCL1 naproti tomu vykazuje aktivitu při širokém spektru pH, pH optimum je 6,5. SmCL1 a SmCL2 tedy nejspíše nejsou produkty alel stejného genu (Brady et al., 2000). Toto platí i pro katepsin L ze *S. japonicum*, protože SjCL1 a SjCL2 vykazují také méně než 50 % sekvenční identity (Brindley et al., 1997).

SmCL1 byl lokalizován jak v trávicím traktu krevničky *S. mansoni* tak i v tegumentu. Kromě role tohoto katepsinu v proteolytickém štěpení hemoglobinu je zřejmé, že se účastní i dalších dějů při interakci parazit-hostitel. Předpokládá se, že štěpí hostitelské imunoglobuliny (Bogitsh et al., 2001). SmCL1 je exprimován jak v samičkách, tak v samečcích, ale vzhledem k vyšším příjmům potravy syntetizují samičky tohoto enzymu více. V extraktu z cercárií byl identifikován inaktivní zymogen SmCL1. Nascentní trávicí trakt cercárií se stává aktivním až po penetraci kůže hostitele a po přeměně cercárie v schistosomulu. Cercárie tedy uchovávají tuto inaktivní prekurzorovou formu SmCL1, aby byla zajištěna přítomnost enzymu pro potřeby trávení krve čerstvě transformovanou schistosomulou. Přítomnost katepsinu L1 nebyla prokázána u vajíček ani u miracidí (Brady et al., 2000).

Katepsin C neboli dipeptidylaminopeptidáza I je exopeptidáza, která má aminodipeptidázovou aktivitu, odštěpuje po dvou aminokyselinách z N-konce substrátu. Katepsin C má široké spektrum substrátové specifity. Substráty nejsou touto proteázou štěpeny v případě, že se v okolí štěpené vazby nachází prolin nebo je lysin či arginin na N-konci substrátu. Zymogen katepsinu C je charakteristický tím, že má dlouhý propeptid (asi 200 aminokyselin) v porovnání s katepsinem B (asi 60 aminokyselin) a katepsinem L (asi 90 aminokyselin). Část propeptidu katepsinu C navíc zůstává součástí aktivního enzymu a nazývá se doplňková doména (obr. 8B) (Caffrey et al., 2004). Katepsin C je také v rámci proteáz rodiny papainu unikátní v tom, že tvoří tetramer o molekulové hmotnosti 200 kDa namísto monomeru o velikosti 25-35 kDa, který je typický pro ostatní katepsiny (Novinec a Lenarčíč, 2013).

Katepsin C byl lokalizován v gastrodermis krevniček *S. mansoni* (SmCC) i *S. japonicum* (SjCC) a dále v buňkách reprodukčních orgánů samiček i samečků (Bogitsh a Dresden, 1983). Při degradaci hemoglobinu se účastní konečného štěpení fragmentů (Delcroix et al., 2006). Exprese zymogenu SjCC v hmyzích buňkách prokázala neschopnost autoaktivace. Je tedy možné, že v lumen střeva krevniček dochází k aktivaci zymogenu za pomoci např. katepsinu L nebo F (Caffrey et al., 2004).



Obr. 8 Krystalová struktura katepsinu B1 ze *Schistosoma mansoni* (SmCB1) a lidského katepsinu C. A: SmCB1 – katalytické aminokyselinové zbytky Cys, His, Asn jsou zobrazeny zeleně. Pro katepsin B je charakteristická smyčka „occluding loop“ (zobrazena tyrkysově), která obsahuje dva His důležité pro interakci se substrátem. Žlutě jsou zobrazeny disulfidické můstky. B: Zobrazení katalytické domény (typické pro papainové katepsiny) a doplňkové domény monomerní jednotky katepsinu C. Upraveno podle Jílková et al., 2011; Turk et al., 2001.

6.1.2.4. Asparaginylendopeptidáza z krevniček

Asparaginylendopeptidáza (AE) neboli legumain je cysteinová endopeptidáza, která patří do klanu CD, rodiny C13. Asparaginylendopeptidáza z krevničky *S. mansoni* (SmAE) štěpí substráty s asparaginem v pozici P1. Tato proteáza vykazuje preferenci pro threoninové a alaninové zbytky v P2 a P3 pozici substrátu (Mathieu et al., 2002).

SmAE je také nazývána Sm32 a je důležitým imunodiagnostickým antigenem pro schistosomózu. Je exprimována jako neaktivní zymogen a zralým enzymem se stává autoaktivací při pH 4,5. Během autoaktivace dochází k odštěpení C-terminální části enzymu, která vykonává funkci obdobnou N-terminálnímu propeptidu katepsinu B a L – inhibice aktivního místa. SmAE je kódována dvěma geny, kdy produkt jednoho z nich je neaktivní, z důvodu záměny cysteinu za asparagin v aktivním místě enzymu. Tento enzym byl rekombinantně exprimován a nebyla u něj pozorována autoaktivace (Caffrey et al., 2000). Asparaginylendopeptidáza se nachází ve střevě krevniček (*S. mansoni*, *S. japonicum*) a co se týče funkce, uplatňuje se při aktivaci jiných enzymů přítomných ve střevě krevniček důležitých pro degradaci hemoglobinu jako je SmCB1 (Sajid et al., 2003). Společně s SmCB1 byl také nalezen v cercáriích a předpokládá se, že se účastní procesů exkrece a osmoregulace buněk jejich vylučovacích orgánů – protonefridií (Skelly a Shoemaker, 2001). Výsledky experimentů prováděných s celotělním homogenátem krevničky *S. haematobium* ukázaly, že tato krevnička exprimuje malé nebo žádné množství asparaginylendopeptidázy (Rege et al., 1992). SmAE a lidská asparaginylendopeptidáza se liší preferencí pro aminokyselinové zbytky v P3 pozici, což může být využito při navrhování inhibitorů selektivních pro SmAE (Mathieu et al., 2002).

6.2. Proteázy lokalizované mimo trávicí trakt krevniček

6.2.1. Serinové proteázy rodiny chymotrypsinu z krevniček

V obratlovcích plní serinové proteázy řadu důležitých funkcí jako je trávení, srážení krve nebo imunitní odpověď a jsou obecně velmi dobře prozkoumanou skupinou proteáz. Doposud se pozornost soustředila především na studium serinových proteáz chymotrypsinové rodiny (S1), klan PA, zejména na cercáriové elastázy (Kašný et al., 2009).

Cercáriová elastáza ze *S. mansoni* (SmCE) je jedním z nejprostudovanějších schistosomálních enzymů, který se neúčastní trávení. Substrátová specifita je určena preferencí pro velké hydrofóbní aminokyselinové zbytky v P1 místě substrátu. Název enzymu pochází z elastinu, který je hlavní složkou dermis kůže a je jedním ze substrátů elastázy (Salter et al.,

2002). SmCE štěpí i další složky kůže jako je kolagen, keratin, fibronektin, laminin a také má schopnost rozrušovat mezibuněčné spoje v epidermis (McKerrow a Salter, 2002).

V genomu *S. mansoni* bylo nalezeno pět genů kódujících různé izoenzymy elastázy, přitom produkty ze dvou z nich jsou zodpovědné za více než 90% aktivity a jsou shodné v biochemických vlastnostech. Ostatní geny exprimují pouze malé množství této proteázy nebo jsou umlčeny. Orthologní geny pro elastázu byly nalezeny i u *S. haematobium* (Salter et al., 2002). Genom *S. japonicum* taktéž kóduje elastázu, ovšem narozdíl od *S. mansoni* i *S. haematobium* obsahuje jen jeden gen pro tuto proteázu. Předpokládá se, že je orthologní k jednomu z izoenzymu elastázy *S. mansoni* (Zhou et al., 2009).

SmCE je syntetizována v acetabulárních žlázách a její aktivita byla detekována v sekretech, které cercárie uvolňuje během penetrace kůže hostitele. Produkce sekretů z acetabulární žlázy je přitom nezbytnou částí tohoto procesu. Zajímavé je, že v sekretech *S. japonicum* nebyly nalezeny serinové proteázy orthologní k SmCE stejně tak byla potvrzena absence jiných proteáz chymotrypsinového typu. Cercárie *S. japonicum* ovšem také využívá sekrece proteolytických enzymů k průniku kůží hostitele a na rozdílnost využívání proteáz těmito krevničkami ukazuje i fakt, že v porovnání se *S. mansoni* a *S. haematobium* migruje směrem k cévám rychleji. Analýzou sekretů z cercárie *S. japonicum* byla zjištěna přítomnost cysteinové proteázy, která nejspíše nahrazuje funkci cercárie elastázy (Dvořák et al., 2008).

Další serinové proteázy chymotrypsinové rodiny (S1) krevniček jsou pouze zčásti charakterizované a narozdíl od cercárie elastázy je o nich méně informací. Serinové proteázy ze *S. mansoni* nazvané SmSP1 až SmSP5 patří do rodiny S1 a jsou exprimovány v různých stádiích vývoje krevniček. SmSP1 až SmSP4 mají predikovanou trypsinovou aktivitu, tedy preferenci k Arg a Lys v P1 pozici substrátu, zatímco SmSP5 aktivitu chymotrypsinovou, tedy preferenci pro Phe a Leu v P1 pozici. Jsou syntetizovány ve formě proenzymu nebo preproenzymu. V genomu *S. japonicum* byly nalezeny orthologní geny ke každému ze *S. mansoni*, tj. S_jSP1-S_jSP5 (Horn et al., 2014).

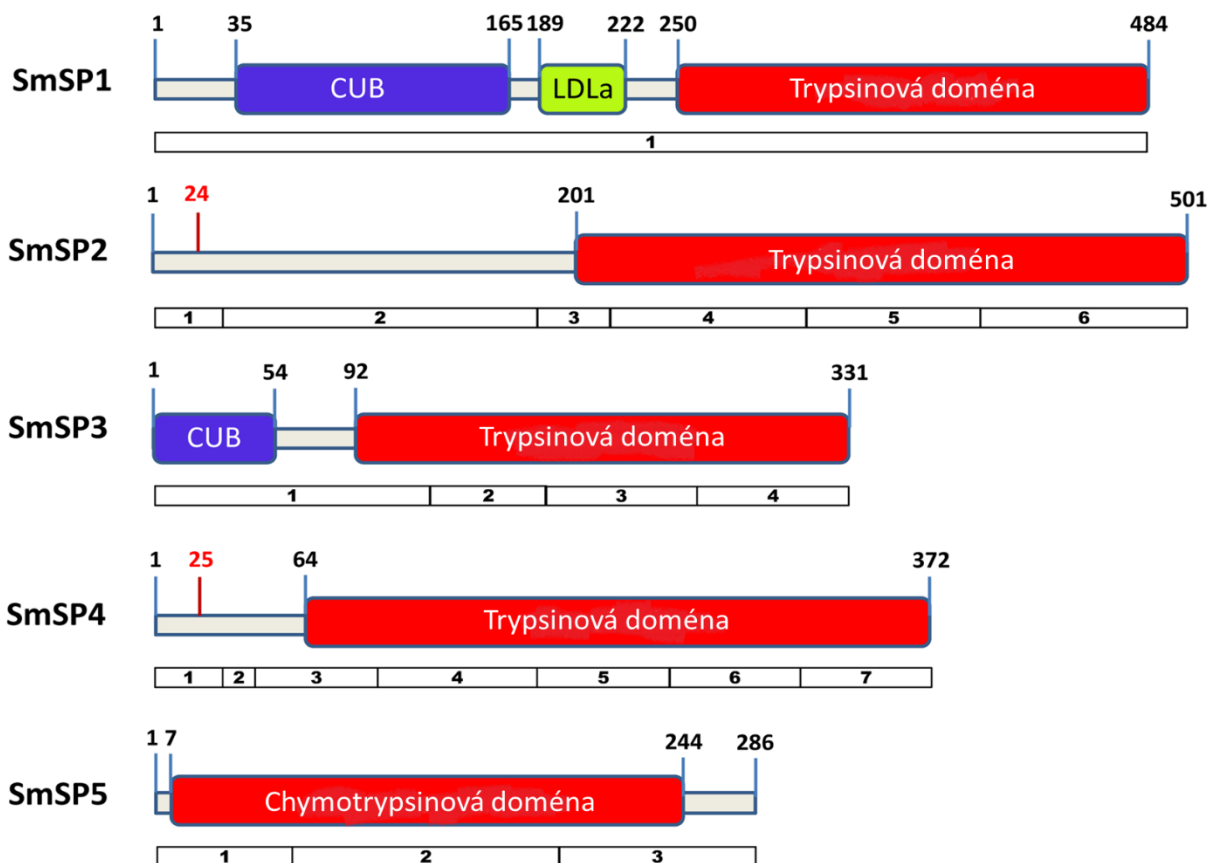
SmSP1 je serinová proteáza kalikreinového typu ze *S. mansoni*. Kallikreiny jsou obecně serinové proteázy, které se účastní mnoha fyziologických funkcí v organismu. Vyštěpují bioaktivní peptidy kininy (z jejich prekurzoru kininogenu), které hrají roli například při zánětu nebo regulaci propustnosti kapilár (Carvalho et al., 1998). SmSP1 byla identifikována v cercáriích i dospělých červech *S. mansoni* a sekvenční analýza ukázala větší podobnost s lidským kalikreinem než s cercárie elastázou SmCE (Cocude et al., 1997). Později byla ukázána i homologie s lidským faktorem I, který má funkci při imunitní odpovědi. SmSP1 byla

imunolokalizována v sekrečních produktech schistosomuly a na povrchu dospělých samečků. To vše naznačuje, že SmSP1 má funkci v překonávání a modulaci imunitní odpovědi hostitele (Cocude et al., 1999). SmSP1 je multidoménný protein, který obsahuje kromě trypsinové proteázové domény i dvě nekatalytické domény CUB a LDLa (obr. 9). CUB doména sestává přibližně ze 110 aminokyselin a účastní se protein-proteinových interakcí extracelulárních nebo plasmatických proteinů. U LDLa domény se předpokládá, že může mít funkci při vychytávání cholesterolu z krve hostitele. Krevničky totiž nedokáží cholesterol syntetizovat, ale zároveň je nezbytný pro energetické výdaje spojené s produkcí vajíček (Horn et al., 2014).

Další enzym s kalikreinovou aktivitou byl izolován z extraktu dospělých červů *S. mansoni* a byl nazván sK1. Pokusy na experimentálních zvířatech ukázaly, že sK1 má schopnost vazodilatace a snížení krevního tlaku. Nachází se v tegumentu krevniček s vyšší aktivitou u samečků. Funkce sK1 nejspíše spočívá v tom, že zvětšuje průměr cév hostitele v místech přítomnosti krevniček pomocí lokálního uvolňování kininů (Carvalho et al., 1998).

SmSP2 je exprimována v největším množství v rámci všech SmSP proteáz a nachází se především ve schistosomule a dospělých červech. Tím se odlišuje od ostatních SmSP, které jsou exprimovány komplexně ve všech vývojových stádiích. SmSP2 je stejně jako SmSP4 syntetizována ve formě preproenzymu, obsahují tedy signální sekvenci umožňující vstup do sekretorické dráhy. Obě proteázy se také vyznačují dlouhým N-terminálním propeptidem. SmSP3 obsahuje neúplnou CUB doménu, která je koexprimována společně s proteázovou doménou (obr. 9) pouze ve vajíčkách a dospělých červech (Horn et al., 2014).

SmSP5 se od ostatních SmSP proteáz odlišuje především specifitou. Na rozdíl od SmSP proteáz a trypsinovou aktivitou, které obsahují konzervovaný Asp v S1 podmístě, je u SmSP5 tato aminokyselina zaměněna za Gly. Tím se SmSP5 řadí mezi proteázy chymotrypsinového/elastázového typu. Fylogenetické studie také ukázaly na větší příbuznost SmSP5 s cercáriovou elastázou. Tato proteáza je exprimována především ve vajíčkách (Horn et al., 2014).



Obr. 9 Organizace domén a otevřené čtecí rámce SmSP proteáz. CUB domény jsou zobrazeny modře, LDLa doména zeleně a proteázové domény S1 rodiny červeně. N-terminální signální sekvence SmSP2 a SmSP4 jsou odděleny červenými čarami. Čísla označují aminokyselinové pozice. Struktura exonů genů kódujících SmSP je zobrazena pomocí očíslovaných rámečků pod každým proteinem. Upraveno podle Horn et al., 2014.

6.2.2. Katepsin B2 z krevniček

Katepsin B2 je cysteinová proteáza rodiny papainu (C1), která byla izolována ze *S. mansoni* a nazvána SmCB2. Tento katepsin byl rekombinantně připraven a biochemicky charakterizován. Vykazuje podobné enzymatické vlastnosti jako katepsin B1 (SmCB1), který se nachází ve střevě a je důležitý pro trávení. Nicméně SmCB2 byl imunolokalizován v tegumentu a parenchymu dospělých samečků a v parenchymu samiček, kdy vyšší exprese byla zaznamenána u samečků. Je syntetizován ve formě preproproteinu a jeho katalytická doména se z velké části shoduje jak s SmCB1, tak s SjCB1 i lidským katepsinem B. V SmCB2 byla taktéž nalezena struktura „occluding loop“, která zodpovídá za karboxydipeptidázovou aktivitu. Substrátová specifita je dána preferencí fenylaninu v P2 pozici substrátu a pH optimum aktivity je kolem 5. Vzhledem k nízkému pH aktivity se předpokládá, že se SmCB2 nachází v lysozomech nebo jiných kyselých kompartmentech a vzhledem ke své lokalizaci se nejedná

o trávicí enzym. Pravděpodobně se tato proteáza účastní obratu tegumentálních proteinů, degradace endocytovaných proteinů či přispívá k obraně parazita (Caffrey et al., 2002).

Katepsin B2 byl také nalezen v sekretomu z cercárie *S. japonicum* (SjCB2) a bylo zjištěno, že má schopnost degradovat složky kůže a pojivovou tkáň. Zdá se tedy, že hlavní proteáza účastnící se průniku kůží hostitele u *S. japonicum* je tato cysteinová proteáza. Tímto se odlišuje od cercárií *S. mansoni* a *S. haematobium*, které k penetraci využívají serinovou cercáriovou elastázu. Tomu nasvědčuje i fakt, že mnohonásobně větší aktivita katepsinu B byla zjištěna v sekretech ze *S. japonicum* (Dvořák et al., 2008).

6.2.3. Kalpain z krevniček

Kalpainy jsou cysteinové proteázy patřící do klanu CA, rodiny C2. Jsou to intracelulární nelysozomální proteázy, které hrají roli například při aktivaci kináz či degradaci cytoskeletálních proteinů u savců. Jejich aktivita je regulována ionty vápníku a inhibitorem kalpastatinem. Skládají se z velké katalytické domény (80 kDa) a malé regulační podjednotky (30 kDa). Obě podjednotky vážou ionty vápníku a velká podjednotka obsahuje papainovou proteázovou doménu (Andresen et al., 1991). Velké podjednotky schistosomálních kalpainů vykazují podobnost v aminokyselinové sekvenci s lidským kalpainem. Obsahují cysteinový a histidinový zbytek v aktivním místě papainové domény a charakteristické strukturní motivy pro vazbu vápníku (Andresen et al., 1991; Zhang et al., 2000).

Kalpainy ze *S. mansoni* (SmCaNp) i *S. japonicum* (SjCaNp) byly nalezeny ve sporocystách a dospělých červech (Andresen et al., 1991; Zhang et al., 2000). SmCaNp byl imunolokalizován v tegumentu *S. mansoni* a exprese SjCaNp byla zaznamenána i v tegumentu *S. japonicum*. Předpokládá se, že hrají roli při metabolických dějích odehrávajících se v tegumentu (Liu et al., 2006; Siddiqui et al., 1993). Dále byly identifikovány v sekretomu z cercárií *S. japonicum* i *S. mansoni* (Dvořák et al., 2008; Knudsen et al., 2005). SmCaNp i SjCaNp mohou být vhodnými kandidáty na vývoj vakcín proti schistosomóze (Ohta et al., 2004).

7. Závěr

Tato bakalářská práce je zaměřena na proteolytické enzymy krevniček *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium*. Schistosomální proteázy (peptidázy) jsou krevničkami využívány pro životně důležité děje jako je trávení proteinů, průnik do hostitele nebo překonání imunitního systému hostitele. V současné době je proteolytickému systému krevniček věnována značná pozornost, protože se jedná o atraktivní molekulární cíl pro vývoj nových strategií pro léčbu schistosomózy, významného onemocnění způsobeného krevničkami.

K trávení hemoglobinu (a dalších proteinů z krve hostitele) využívají krevničky sadu proteáz lokalizovaných v jejich střevě. Tyto proteázy mají součinné působení a svou endopeptidázovou a exopeptidázovou aktivitou účinně degradují hemoglobin na dipeptidy a aminokyseliny. Nejvíce zastoupenou proteázou ve střevě je cysteinová proteáza katepsin B1, která hraje v trávení zásadní roli. Mezi další proteázy účastníci se trávení patří cysteinové proteázy – katepsiny C, L1 až L3 a asparaginylendopeptidáza (legumain), dále aspartátová proteáza katepsin D a metaloproteáza leucylaminopeptidáza.

Práce se zabývá i proteázami, které jsou lokalizované mimo trávicí trakt krevniček a neúčastní se procesu trávení krevních proteinů. Jedná se o méně prozkoumanou skupinu enzymů, do které patří zejména serinové a cysteinové proteázy. Významnou serinovou proteázou je cercáriová elastáza, která je klíčová pro penetraci kůže hostitele. Další serinové schistosomální proteázy jsou označovány SmSP1 až SmSP5 a sK1 a zřejmě se podílejí na modulaci imunitní odpovědi hostitele a cévní vazodilataci. Cysteinové proteázy katepsin B2 a kalpain se nacházejí v tegumentu krevniček a pravděpodobně hrají roli při dějích spojených s metabolismem tegumentu. Katepsin B2 ze *S. japonicum* byl nalezen v sekretomu cercárií, kde hraje podobnou úlohu jako cercáriová elastáza u jiných druhů krevniček při průniku kůží hostitele.

8. Seznam použité literatury

* sekundární zdroj

** internetový zdroj

- Abdulla, M.-H., Lim, K.-C., Sajid, M., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2007. Schistosomiasis Mansoni: Novel Chemotherapy Using a Cysteine Protease Inhibitor. *PLoS Med.* 4, 130–138.
- Andresen, K., Tom, T.D., Strand, M., 1991. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 266, 15085–15090.
- Berger, A., Schechter, I., 1970. Mapping the Active Site of Papain with the Aid of Peptide Substrates and Inhibitors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 257, 249–264.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al-Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., Aslett, M.A., Bartholomeu, D.C., Blandin, G., Caffrey, C.R., Coghlan, A., Coulson, R., Day, T.A., Delcher, A., DeMarco, R., Djikeng, A., Eyre, T., Gamble, J.A., Ghedin, E., Gu, Y., Hertz-Fowler, C., Hirai, H., Hirai, Y., Houston, R., Ivens, A., Johnston, D.A., Lacerda, D., Macedo, C.D., McVeigh, P., Ning, Z., Oliveira, G., Overington, J.P., Parkhill, J., Perte, M., Pierce, R.J., Protasio, A.V., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Sajid, M., Salzberg, S.L., Stanke, M., Tivey, A.R., White, O., Williams, D.L., Wortman, J., Wu, W., Zamanian, M., Zerlotini, A., Fraser-Liggett, C.M., Barrell, B.G., El-Sayed, N.M., 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460, 352–358.
- Bogitsh, B.J., Dresden, M.H., 1983. Fluorescent Histochemistry of Acid Proteases in Adult *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.* 69, 106–110.
- Bogitsh, B.J., Dalton, J.P., Brady, C.P., Brindley, P.J., 2001. Gut-associated immunolocalization of the *Schistosoma mansoni* cysteine proteases, SmCL1 and SmCL2. *J. Parasitol.* 87, 237–241.
- Bos, D.H., Mayfield, C., Minchella, D.J., 2009. Analysis of regulatory protease sequences identified through bioinformatic data mining of the *Schistosoma mansoni* genome. *BMC Genomics* 10, 488.
- Brady, C.P., Brindley, P.J., Dowd, A.J., Dalton, J.P., 2000. *Schistosoma mansoni*: Differential Expression of Cathepsins L1 and L2 Suggests Discrete Biological Functions for Each Enzyme. *Exp. Parasitol.* 94, 75–83.
- *Brindley, P.J., Kalinna, B.H., Dalton, J.P., Day, S.R., Wong, J.Y.M., Smythe, M.L., McManus, D.P., 1997. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 1–9.
- Brindley, P.J., Kalinna, B.H., Wong, J.Y.M., Bogitsh, B.J., King, L.T., Smyth, D.J., Verity, C.K., Abbenante, G., Brinkworth, R.I., Fairlie, D.P., Smythe, M.L., Milburn, P.J., Bielefeldt-Ohmann, H., Zheng, Y., McManus, D.P., 2001. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 103–112.
- Brinkworth, R.I., Prociv, P., Loukas, A., Brindley, P.J., 2001. Hemoglobin-degrading, Aspartic Proteases of Blood-feeding Parasites Substrate Specificity Revealed by Homology Models. *J. Biol. Chem.* 276, 38844–38851.

- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., Jordans, S., 2008. Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie, Cellular proteolysis* 90, 194–207.
- Burke, M.L., Jones, M.K., Gobert, G.N., Li, Y.S., Ellis, M.K., McMANUS, D.P., 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 31, 163–176.
- Caffrey, C.R., Ruppel, A., 1997. Affinity Isolation and Characterization of the Cathepsin B-like Proteinase Sj31 from *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.* 83, 1112–1118.
- Caffrey, C.R., Ruppel, A., 1997. Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Parasitol. Res.* 83, 632–635.
- Caffrey, C.R., Mathieu, M.A., Gaffney, A.M., Salter, J.P., Sajid, M., Lucas, K.D., Franklin, C., Bogyo, M., McKerrow, J.H., 2000. Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 466, 244–248.
- Caffrey, C.R., Salter, J.P., Lucas, K.D., Khiem, D., Hsieh, I., Lim, K.-C., Ruppel, A., McKerrow, J.H., Sajid, M., 2002. SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 49–61.
- *Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M., 2004. Blood “n” guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 20, 241–248.
- *Caffrey, C.R., 2007. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr. Opin. Chem. Biol., Next-generation therapeutics* 11, 433–439.
- Carvalho, W.S., Lopes, C.T., Juliano, L., Coelho, P.M.Z., Cunha-Melo, J.R., Beraldo, W.T., Pesquero, J.L., 1998. Purification and partial characterization of kininogenase activity from *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology* 117, 311–319.
- Cezari, M.H.S., Puzer, L., Juliano, M.A., Carmona, A.K., Juliano, L., 2002. Cathepsin B carboxydipeptidase specificity analysis using internally quenched fluorescent peptides. *Biochem. J.* 368, 365.
- *Cioli, D., Pica-Mattocchia, L., Basso, A., Guidi, A., 2014. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 23–29.
- Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Godin, C., Capron, A., Khalife, J., 1997. Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology* 115, 395–402.
- Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Fontaine, J., Godin, C., Capron, A., Khalife, J., 1999. Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I. *Parasitology* 118, 389–396.
- *Colley, D.G., Bustinduy, A.L., Secor, W.E., King, C.H., 2014. Human schistosomiasis. *Lancet* 383, 2253–2264.
- Dalton, J.P., Clough, K.A., Jones, M.K., Brindley, P.J., 1997. The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 114, 105–112.
- Day, S.R., Dalton, J.P., Clough, K.A., Leonardo, L., Tiu, W.U., Brindley, P.L., 1995. Characterization and Cloning of the Cathepsin L Proteinases of *Schistosoma japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1–9.
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lim, K.-C., Dvořák, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J.H., 2006. A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. *J. Biol. Chem.* 281, 39316–39329.

- Delcroix, M., Medzihradsky, K., Caffrey, C.R., Fetter, R.D., McKerrow, J.H., 2007. Proteomic analysis of adult *S. mansoni* gut contents. *Mol. Biochem. Parasitol.* 154, 95–97.
- Després, L., Maurice, S., 1995. The evolution of dimorphism and separate sexes in schistosomes. *Proceedings: Biological Sciences.* 262, 175-180.
- *Dodson, G., Wlodawer, A., 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* 23, 347–352.
- Dvořák, J., Mashiyama, S.T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G.M., Hansell, E., Lim, K.-C., Hsieh, I., Mackenzie, B., Medzihradsky, K.F., Babbitt, P.C., Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., 2008. Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* 90, 345–358.
- Dvořák, J., Mashiyama, S.T., Sajid, M., Braschi, S., Delcroix, M., Schneider, E.L., McKerrow, W.H., Bahgat, M., Hansell, E., Babbitt, P.C., Craik, C.S., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2009. SmCL3, a Gastrodermal Cysteine Protease of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 3, 1–16.
- Fallon G.P., Doenhoff J.D., 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 83–8.
- *Garcia-Carreón, F.L., Del Toro, M.A.N., 1997. Classification of proteases without tears. *Biochem. Educ.* 25, 161–167.
- Grabe, K., Haas, W., 2004. Navigation within host tissues: *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata* schistosomula respond to chemical gradients. *Int. J. Parasitol.* 34, 927–934.
- Groves, M.R., Coulombe, R., Jenkins, J., Cygler, M., 1998. Structural basis for specificity of papain-like cysteine protease proregions toward their cognate enzymes. *Proteins* 32, 504–514.
- Haas, W., Granzer, M., Garcia, E.G., 1987. Host Identification by *Schistosoma japonicum* cercariae. *J. Parasitol.* 73, 568–577.
- Haas, W., Haberl, B., Schmalfuss, G., Khayyal, M.T., 1994. *Schistosoma haematobium* cercarial host-finding and host-recognition differs from that of *S. mansoni*. *J. Parasitol.* 80, 345–353.
- Haas, W., Haeberlein, S., Behring, S., Zoppelli, E., 2008. *Schistosoma mansoni*: Human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. *Exp. Parasitol.* 120, 94–97.
- Haeberlein, S., Haas, W., 2007. Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol. Res.* 102, 657–662.
- *Hedstrom, L., 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501–4524.
- *Horimoto, Y., Dee, D.R., Yada, R.Y., 2009. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnol., Special Issue: Biotechnology Annual Review 2009*, 25, 318–324.
- Horn, M., Fajtová, P., Rojo Arreola, L., Ulrychová, L., Bartošová-Sojková, P., Franta, Z., Protasio, A.V., Opavský, D., Vondrášek, J., McKerrow, J.H., Mareš, M., Caffrey, C.R., Dvořák, J., 2014. Trypsin- and chymotrypsin-like serine proteases in *Schistosoma mansoni* – “The Undiscovered Country.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 1–13.

- Jia, X., Schulte, L., Loukas, A., Pickering, D., Pearson, M., Mobli, M., Jones, A., Rosengren, K.J., Daly, N.L., Gobert, G.N., Jones, M.K., Craik, D.J., Mulvenna, J., 2014. Solution structure, membrane interactions, and protein binding partners of the tetraspanin Sm-TSP-2, a vaccine antigen from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 289, 7151–7163.
- Jílková, A., Řezáčová, P., Lepšík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfrlík, J., Brynda, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Mareš, M., 2011. Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 286, 35770–35781.
- Jílková, A., Horn, M., Řezáčová, P., Marešová, L., Fajtová, P., Brynda, J., Vondrášek, J., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Mareš, M., 2014. Activation route of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: Structural map with a glycosaminoglycan switch. *Structure* 22, 1786–1798.
- Jolly, E.R., Chin, C.-S., Miller, S., Bahgat, M.M., Lim, K.C., DeRisi, J., McKerrow, J.H., 2007. Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biol.* 8, 65.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P., McManus, D.P., 2004. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host–parasite interactions. *BioEssays* 26, 752–765.
- *Kašný, M., Mikeš, L., Hampl, V., Dvořák, J., Caffrey, C.R., Dalton, J.P., Horák, P., 2009. Chapter 4 Peptidases of Trematodes, in: Hay, D.R. and S.I. (Ed.), *Advances in Parasitology*. Academic Press, 205–297.
- Knudsen, G.M., Medzihradszky, K.F., Lim, K.-C., Hansell, E., McKerrow, J.H., 2005. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 4, 1862–1875.
- Leow, C.Y., Willis, C., Osman, A., Mason, L., Simon, A., Smith, B.J., Gasser, R.B., Jones, M.K., Hofmann, A., 2014. Crystal structure and immunological properties of the first annexin from *Schistosoma mansoni*: insights into the structural integrity of the schistosomal tegument. *FEBS J.* 281, 1209–1225.
- Liu, F., Lu, J., Hu, W., Wang, S.-Y., Cui, S.-J., Chi, M., Yan, Q., Wang, X.-R., Song, H.-D., Xu, X.-N., Wang, J.-J., Zhang, X.-L., Zhang, X., Wang, Z.-Q., Xue, C.-L., Brindley, P.J., McManus, D.P., Yang, P.-Y., Feng, Z., Chen, Z., Han, Z.-G., 2006. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathog* 2, 268–281.
- Losada, S., Chacón, N., C.Colmenares, Bermúdez, H., Lorenzo, A., Pointier, J.P., Theron, A., Alarcón de Noya, B., Noya, O., 2005. *Schistosoma*: Cross-reactivity and antigenic community among different species. *Exp. Parasitol.* 111, 182–190.
- *Lowther, W.T., Matthews, B.W., 2002. Metalloaminopeptidases: Common Functional Themes in Disparate Structural Surroundings. *Chem. Rev.* 102, 4581–4608.
- Mair, G.R., Maule, A.G., Fried, B., Day, T.A., Halton, D.W., 2003. Organization of the musculature of schistosome cercariae. *J. Parasitol.* 89, 623–625.
- Mathieu, M.A., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Choe, Y., Lee, J., Chapman, H., Sajid, M., Craik, C.S., McKerrow, J.H., 2002. Substrate specificity of schistosome versus human legumain determined by P1–P3 peptide libraries. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 99–105.

- McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S.M., Doyle, S., Mann, V.H., Brindley, P.J., Stewart, M., Day, T.A., Maule, A.G., Dalton, J.P., 2004. Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 703–714.
- *McKerrow, J.H., Salter, J.P., 2002. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. *Trends Parasitol.* 18, 193–195.
- Michel, A., Ghoneim, H., Resto, M., Klinkert, M.-Q., Kunz, W., 1995. Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 7–18.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N., 1991. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 10, 2321–2330.
- *Novinec, M., Lenarčič, B., 2013. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomol. Concepts* 4, 287–308.
- Ohta, N., Kumagai, T., Maruyama, H., Yoshida, A., He, Y., Zhang, R., 2004. Research on calpain of *Schistosoma japonicum* as a vaccine candidate. *Parasitol. Int., Centenary Symposium to Celebrate the Discovery of Schistosoma japonicum Part II* 53, 175–181.
- Page, M.J., Cera, E.D., 2008. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1220–1236.
- Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M.A., De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J.C., Clark, R.C., Davidson, C., Dillon, G.P., Holroyd, N.E., LoVerde, P.T., Lloyd, C., McQuillan, J., Oliveira, G., Otto, T.D., Parker-Manuel, S.J., Quail, M.A., Wilson, R.A., Zerlotini, A., Dunne, D.W., Berriman, M., 2012. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 6, 1–13.
- *Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597–635.
- *Rawlings, N.D., Salvesen, G., 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd ed. Elsevier Academic Press.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A., 2013. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 1–7.
- Rege, A.A., Wang, W., Dresden, M.H., 1992. Cysteine proteinases from *Schistosoma haematobium* adult worms. *J. Parasitol.* 78, 16–23.
- Riveau, G., Deplanque, D., Remoué, F., Schacht, A.-M., Vodougnon, H., Capron, M., Thiry, M., Martial, J., Libersa, C., Capron, A., 2012. Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, 1–8.
- Robinson, M., Brindley, P.J., McKerrow, J.H., Dalton, J., Robinson, M., Brindley, P.J., McKerrow, J.H., Dalton, J., 2013. Trematode cysteine endopeptidases., in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*.
- Rowan, A.D., Mason, P., Mach, L., Mort, J.S., 1992. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 15993–15999.

- Ruppel, A., Shi, Y.E., Wei, D.X., Diesfeld, H.J., 1987. Sera of *Schistosoma japonicum*-infected patients cross-react with diagnostic 31/32 kD proteins of *S. mansoni*. *Clin. Exp. Immunol.* 69, 291–298.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1–21.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., Franklin, C., Kim, J.-H., Caffrey, C.R., 2003. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131, 65–75.
- Salter, J.P., Lim, K.-C., Hansell, E., Hsieh, I., McKerrow, J.H., 2000. Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *J. Biol. Chem.* 275, 38667–38673.
- Salter, J.P., Choe, Y., Albrecht, H., Franklin, C., Lim, K.-C., Craik, C.S., McKerrow, J.H., 2002. Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 24618–24624.
- Samuelson, J.C., Caulfield, J.P., 1982. Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.* 94, 363–369.
- ***Schistosoma* spp. <http://ruby.fgcu.edu/courses/davidb/50249/web/sm202.htm> (accessed 3.9.15).
- Shinde, U., Inouye, M., 2000. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 35–44.
- Shuai Liu, P.C., 2014. Expression profile of the *Schistosoma japonicum* degradome reveals differential protease expression patterns and potential anti-schistosomal intervention targets. *PLoS Comput. Biol.* 10, 1–13.
- Shuhua, X., Binggui, S., Chollet, J., Tanner, M., 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. *Acta Trop.* 76, 107–117.
- Siddiqui, A.A., Zhou, Y., Podesta, R.B., Karcz, S.R., Tognon, C.E., Strejan, G.H., Dekaban, G.A., Clarke, M.W., 1993. Characterization of Ca(2+)-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 37–44.
- Sims, A.H., Dunn-Coleman, N.S., Robson, G.D., Oliver, S.G., 2004. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 95–101.
- Skelly, P.J., Shoemaker, C.B., 2001. *Schistosoma mansoni* proteases Sm31 (cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae. *J. Parasitol.* 87, 1218–1221.
- *Skelly, P.J., Da´dara, A.A., Li, X.-H., Castro-Borges, W., Wilson, R.A., 2014. Schistosome Feeding and Regurgitation. *PLoS Pathog.* 10, 1–10.
- Southan, C., 2001. A genomic perspective on human proteases as drug targets. *Drug Discov. Today* 6, 681–688.
- **SRC Helminth Eggs http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/helminth_eggs/index.html (accessed 3.9.15).

- Taralp, A., Kaplan, H., Sytwu, I.-I., Vlattas, I., Bohacek, R., Knap, A.K., Hiramata, T., Huber, C.P., Hasnain, S., 1995. Characterization of the S subsite specificity of cathepsin B. *J. Biol. Chem.* 270, 18036–18043.
- *Thétiot-Laurent, S.A.-L., Boissier, J., Robert, A., Meunier, B., 2013. Schistosomiasis Chemotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 7936–7956.
- Turk, D., Janjić, V., Štern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S.W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B., 2001. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J.* 20, 6570–6582.
- *Utzinger, J., Raso, G., Brooker, S., De Savigny, D., Tanner, M., Ørnbjerg, N., Singer, B.H., N'goran, E.K., 2009. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology* 136, 1859–1874.
- Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H., 1990. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 5578-5582.
- Wasilewski, M.M., Lim, K.C., Phillips, J., McKerrow, J.H., 1996. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81, 179–189.
- Xu, Y., Dresden, M.H., 1986. Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* Eggs. *J. Parasitol.* 72, 507–511.
- Young, N.D., Jex, A.R., Li, B., Liu, S., Yang, L., Xiong, Z., Li, Y., Cantacessi, C., Hall, R.S., Xu, X., Chen, F., Wu, X., Zerlotini, A., Oliveira, G., Hofmann, A., Zhang, G., Fang, X., Kang, Y., Campbell, B.E., Loukas, A., Ranganathan, S., Rollinson, D., Rinaldi, G., Brindley, P.J., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Gasser, R.B., 2012. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat. Genet.* 44, 221–225.
- Zhang, R., Suzuki, T., Takahashi, S., Yoshida, A., Kawaguchi, H., Maruyama, H., Yabu, Y., Fu, J., Shirai, T., Ohta, N., 2000. Cloning and molecular characterization of calpain, a calcium-activated neutral proteinase, from different strains of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Int.* 48, 233–242.
- Zhou, Y., Zheng, H., Chen, Y., Zhang, L., Wang, K., Guo, J., Huang, Z., Zhang, B., Huang, W., Jin, K., Dou, T., Hasegawa, M., Wang, L., Zhang, Y., Zhou, J., Tao, L., Cao, Z., Li, Y., Vinar, T., Brejova, B., Brown, D., Li, M., Miller, D.J., Blair, D., Zhong, Y., Chen, Z., Liu, F., Hu, W., Wang, Z.-Q., Zhang, Q.-H., Song, H.-D., Chen, S., Xu, X., Xu, B., Ju, C., Huang, Y., Brindley, P.J., McManus, D.P., Feng, Z., Han, Z.-G., Lu, G., Ren, S., Wang, Y., Gu, W., Kang, H., Chen, J., Chen, X., Chen, S., Wang, L., Yan, J., Wang, B., Lv, X., Jin, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhang, W., Hu, Q., Zhu, G., Wang, J., Yu, J., Wang, J., Yang, H., Ning, Z., Beriman, M., Wei, C.-L., Ruan, Y., Zhao, G., Wang, S., Zhang, Q., 2009. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature* 460, 345–351.