

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Hostitelsko-parazitární interakce mezi motolicí
Schistosoma mansoni a vaskulárním systémem
definitivního hostitele.**

Bakalářská práce

Marie Kropšová

Školitel: Jan Dvořák, PhD., Biologické centrum AV ČR, PaÚ

České Budějovice 2012

Kropšová, M., 2012: Hostitelsko-parazitární interakce mezi motolicí *Schistosoma mansoni* a vaskulárním systémem definitivního hostitele. [Host-parasite interactions between fluke *Schistosoma mansoni* and vasculature of definitive host. Bc. Thesis, in Czech] - 31 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

During the long co-evolution with the mammalian hosts, schistosomes were able to develop sophisticated modulatory mechanisms in order to successfully establish infection, survive and reproduce. Their effector bioactive molecules are primarily targeting host physiology within the circulatory system. Apart of battery of already discovered molecules, proteases may be contributory in such processes. Schistosomal serine proteases that have been neglected so far are in our research focus due to their apparent similarities several mammalian protease regulatory factors.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 24.4. 2012.

Marie Kropšová

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Biogeografie a fylogeneze.....	1
1.2. Životní cyklus schistosom	3
1.3. Symptomy nákazy a imunitní odpověď hostitele	4
2. Parazitární molekuly <i>S. mansoni</i> významné pro hostitelsko-parazitární interakce.....	5
2.1. Strukturní molekuly	5
2.1.1. Organizace tegumentu a jeho funkce.....	5
2.1.2. Molekuly se strukturní funkcí.....	7
2.2. Bioaktivní molekuly <i>S. mansoni</i>	9
2.2.1. Vasoaktivní molekuly	9
2.2.1.1. Kininy.....	9
2.2.1.2. Biogenní aminy	9
2.2.1.3. Eikosanoidy.....	10
2.2.1.4. Oxid dusnatý a syntázy oxidu dusnatého	10
2.2.1.5. Vaskulární řízení ionty a produkty metabolismu	11
3. Proteázy	11
3.1. Aspartátové proteázy	12
3.2. Cysteinové proteázy	12
3.3. Metaloproteázy	12
3.4. Serinové proteázy	12
3.4.1. Cerkáriová elastáza.....	13
3.4.2 Serinové proteázy trypsinového typu	13
3.4.2.1. SmSP1	13
3.4.2.2. Enzym sK1 s kallikreinovou aktivitou	16
3.4.2.3. Plazmin-like proteáza	17

3.4.3. Prolyl-like proteázy	17
3.4.3 Enterokinase-like proteáza	19
4. Závěr	20
5. Seznam použité literatury	23

1. Úvod

1.1. Biogeografie a fylogeneze

Zástupci čeledi Schistosomatidae jsou motolice patřící do kmene Plathelminthes, třída Trematoda. Jsou primárně vázáni na sladkovodní prostředí, kde se nachází vhodné biotopy pro jejich meziphostitelské plže (Lockyer et al., 2003). Rozeznáváme 14 rodů a zhruba 100 druhů schistosom, mezi něž patří druhy, které parazitují přímo člověka nebo mají dopad na hospodářskou produkci parazitací dobytka (Khalil, 2002). Schistosomou je v současné době nakaženo přes 200 miliónů lidí v 74 zemích světa. Z tohoto důvodu a z důsledku fatálních následků nemoci je schistosomóza považována za nejzávažnější helmintózu lidské populace (McManus a Loukas, 2008).



Obr. 1: Globální distribuce schistosomózy (Zdroj: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/schistosomiasis.htm>, 12.8.2011).

Jako definitivní hostitel slouží člověk nejčastěji pěti druhům schistosom: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* a *S. intercalatum* (McManus a Loukas, 2008). Lockyer a kol. (2003) prováděla fylogenetický výzkum založený na sekvenci tří genů - malé ribozomální podjednotky rRNA, velké ribozomální podjednotky rRNA a mitochondriální cytochrom oxidázy 1. Dále byla studie založena na morfologických znacích, druhu meziphostitele, definitivním hostiteli a biogeografii. Na základě této studie rozlišujeme v rámci čeledi Schistosomatidae následující skupiny druhů:

1. Druhy skupiny *S. mansoni*, která způsobuje střevní schistosomózu a jako meziphostitele využívá plže rodu *Biomphalaria* (Lockyer et al., 2003). Vyskytuje se zejména v celé Africe a Arabském poloostrově. Díky lidské migraci byl druh introdukován též do Brazílie, Surinamu, Venezuely a Karibské oblasti, (McManus a Loukas, 2008). Do této skupiny patří také *S. rodhaini* - parazit hlodavců a *S. edwardiense* a *S. hippopotami*, které jsou paraziti hrochů.

2. Druhy skupiny *S. haematobium*, která způsobuje močovou schistosomózu a jako meziphostitele využívá plže rodu *Bulinus*. Vyskytuje se v subsaharské Africe, údolí řeky Nilu, Egyptě, Súdánu, oblasti Maghrebu a Arabském poloostrově. Do této skupiny lze zařadit většinu afrických zástupců - *S. intercalatum*, která mimo člověka infikuje také ovce a dobytek; *S. bovis*, *S. matthei* a *S. curassoni* (Lockyer et al., 2003). Odhaduje se, že nejméně 165 miliónů kusů dobytka je nakaženo právě těmito parazity (de Bont a Vecruysse, 1997).

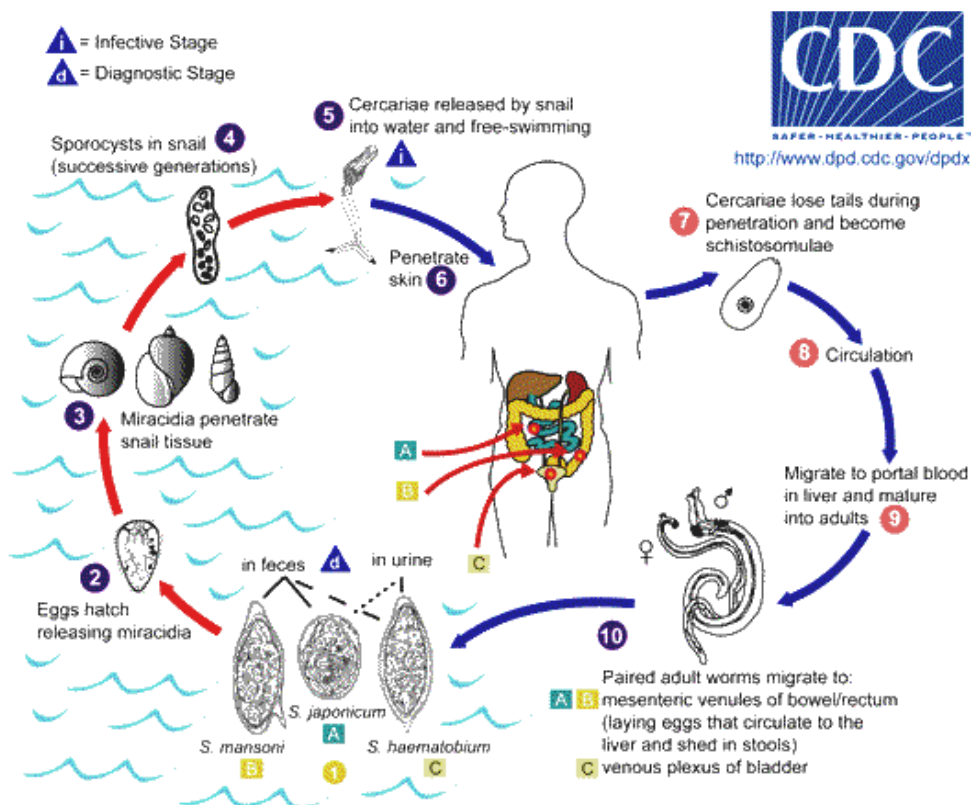
3. Druhy skupiny *S. japonicum*, která je rozšířená ve východní Asii (pouze v Japonsku byla eradikována), na Filipínských ostrovech a na dalších místech v Indonésii (McManus a Loukas, 2008). Mezi další asijské druhy patří *S. sinensium*, *S. mekongi*, *S. malayensis* a nedávno popsáný druh *S. ovuncatum* (Attwood et al., 2002).

4. Druhy skupiny *S. indicum* patří do skupiny indických druhů. Není známo, že by některý druh z této skupiny infikoval člověka. Tyto druhy se vyskytují se v Indii a části jihovýchodní Asie. Dále sem patří *S. incognitum* a *S. spindale* (Lockyer et al., 2003).

Za pozornost stojí fakt, že u nás rozšířené ptačí schistosomy rodu *Trichobilharzia*, mohou také penetrovat kůži člověka. I přes neúspěšnou infekci, kdy parazit posléze není schopen dlouhodobé infekce, způsobují cercáriovou dermatitidu a mohou pronikat dále do tkání hostitele (Horák a Kolářová, 2001).

1.2. Životní cyklus schistosom

Schistosoma má dvouhostitelský životní cyklus. Na rozdíl od převážně většiny druhů trematod jsou zástupci schistosom gonochoristé. Samec má ve svém těle ventrální rýhu tzv. canalis gynaecophorus, ve které drží dospělou samici (Gryseels et al., 2006; Ross et al., 2002). Dospělci mají válcovité tělo dlouhé 7-20 mm. Nákaza schistosomou je způsobena přímým stykem se sladkou vodou, ve které se vyskytují volně žijící invazní larvy - cercárie. Cercárie (dlouhé cca 0,5 mm) nepřijímají potravu, proto je délka jejich života omezena za účelem vyhledání definitivního hostitele. Při penetraci kůže hostitele cercárie využívá proteolitické enzymy, zejména cercáriovou elastázu (Salter et al., 2002), vstoupí do vlásečnic a lymfatických cév, kterými se pak dostává do plic (Wilson et al., 1978). Juvenilní červi, tzv. schistosomuly, migrují do portálního žilního systému, kde pohlavně dospějí (McManus a Loukas, 2008). V místě definitivní lokalizace začíná produkce vajíček, která se dostávají ven z hostitele (v závislosti na druhu s výkaly, močí nebo u nasálních druhů s nosními hleny) a vylíhnou se z nich obrvené larvy – miracidia. Tyto larvy aktivně pronikají do sladkovodního plže. Z miracidia vzniká mateřská sporocysta, která produkuje asexuálně dceřinné sporocysty, ze kterých jsou v konečné fázi uvolněny infekční cercárie do vodního prostředí.



Obr. 2: Životní cyklus schistosomy (Zdroj: CDC, 20.8. 2011).

1.3. Symptomy nákazy a imunitní odpověď hostitele

Zdrojem přenosu schistosomózy je člověk nebo jiní savci, kteří kontaminují vodu stolicí a močí. Člověk se může nakazit jakýmkoliv kontaktem s vodou s cercáriemi. Vlastními patogenními agens nejsou jen samotné migrující schistosmuly a poté dospělci, ale především jejich vajíčka. Z vajíček uvolňované molekuly stimulují lokální zánětlivou reakci a tvorbu granulomů, z čehož vznikají spleno- a hepatomegálie (Förstl et al., 2003). První tzn. invazní stádium nemoci je spojené se vznikem cercáriové dermatitidy, následuje akutní stádium (Katayama syndrom), při kterém migruje schistosomula tělem hostitele a pokud je doprovázeno symptomy, jsou to především horečka a bolesti svalů. Následuje chronické stádium, během kterého dochází k imunitní odpovědi k vajíčkům (McManus a Loukas, 2008). Symptomy nemoci zahrnují periportální fibrózu, portální hypertenze, urinární obstrukce, karcinomy, sterilitu, podvýživu a vývojovou retardaci (Pearce a MacDonald, 2002). Podle lokalizace nakladených vajíček rozeznáváme močovou, střevní a jaterní schistosomózu, vzácně se mohou vyskytovat i poruchy CNS (Förstl et al., 2003).

V závislosti na jednotlivých fázích choroby se liší imunitní odpověď hostitele. V první fázi, kdy nedochází k produkci vajíček, je dominantní imunitní odpověď typu Th1 a trvá asi 3-5 týdnů. V další fázi (po 5-6 týdnech), kdy parazit dospívá a začíná produkovat vajíčka, se imunitní odpověď výrazně mění: množství Th1 komponent se snižuje a vzniká Th2 imunitní odpověď. Během chronické fáze nemoci je Th2 modulována a granulomy, které se formují okolo nově uložených vajíček, jsou menší než v dřívější fázi infekce (Pearce a MacDonald., 2002). Z dřívějších studií, které byly prováděny na myších, vyplývá korelace mezi neschopností vytvářet granulomy a persistence vysoce prozánětlivé Th1 imunitní odpovědi mimo akutní fáze infekce a vývoje hepatotoxického efektu na játra (Fallon et al., 2000). Granulomy zprostředkované Th2 chrání hepatocyty, ale dovolují vývoj jaterní fibrózy. Th2 imunitní odpověď je též spojená s přirozeně získanou rezistencí k reinfekci touto parazitární nákazou (Pearce a MacDonald, 2002).

Za zmínku také stojí, že horečnatý průběh nemoci v akutní fázi infekce se daleko častěji vyhýbá jedincům, kteří žijí v endemických oblastech schistosomózy, než jedincům, kteří nebyli dříve vystaveni nákaze. Vysvětlením je, že jedinci v endemických oblastech, prodělali senzibilizaci *in utero* následkem maternální infekce. Ukazuje se tak, že odpověď plodu je fenotypicky podobná odpovědi matky (King et al., 1998; Malhotra et al., 1997). Předcházející Th2 odpověď u těchto dětí zapříčiňuje méně pravděpodobný vývoj

prozánětlivé odpovědi v prvním stádiu schistosomární infekce (Pearce a MacDonald, 2002).

Běžně používanou terapií je léčivo praziquantel. Jedná se o chinolinovou sloučeninu, která je resorbovaná ve střevě a metabolizovaná v játrech a která působí na všechna stadia schistosom (Förstl et al., 2003). Po mnoho let se také pracuje na vývoji vakcín. A v neposlední řadě je zde snaha o vývoj alternativních léčiv (Caffrey a Secor, 2011).

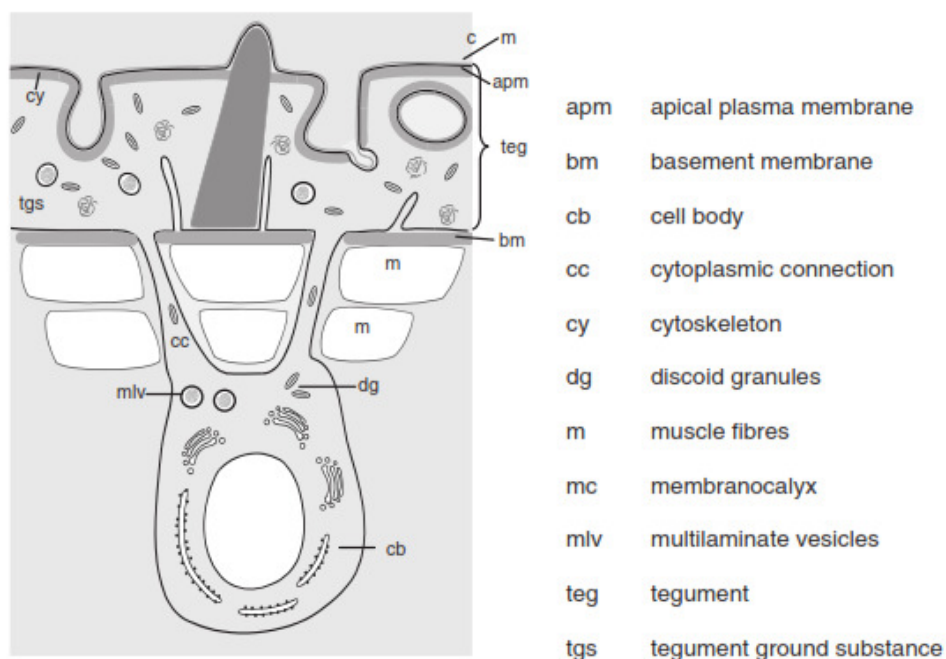
Z hlediska vývoje účinné vakcíny je důležitý výzkum hostitelsko-parazitárních interakcí. Schistosoma napadá svého definitivního hostitele, je s ním v bezprostředním kontaktu a její povrchová vrstva - tegument s ním aktivně interaguje. Tegument je dynamická vrstva (viz níže), která se účastní výživy, imunitní modulace, exkrece a osmoregulace a příjmu a převodu senzorických signálů (Jones et al., 2004). Molekuly tegumentu mohou být významným vodítkem k poznání biochemie, fyziologie a únikových strategií parazita před rozpoznáním imunitním systémem hostitele. Důležitou součástí obranné strategie parazita jsou též bioaktivní molekuly, které se podílejí na vasokonstrikci, vasodilataci, tkáňové a buněčné invazi a imunomodulaci.

2. Parazitární molekuly *S. mansoni* významné pro hostitelsko-parazitární interakce

2.1. Strukturní molekuly

2.1.1. Organizace tegumentu a jeho funkce

Tegument schistosomy je syncytium, které pokrývá celé tělo parazita. Tegumentální cytoplazmatická vrstva ležící pod povrchem membrány obsahuje mimo jiné diskoidní tělíčka a multilaminární vesikuly (Wilson a Barnes, 1974b). Cytoplazma tegumentu je spojena mikrotubuly s těly buněk, tzv. cytony, které leží pod periferní vrstvou svalů. Pro tegument helmintů nacházejících se v krevním řečišti je typický multilaminární charakter. Jedná se o adaptaci k přežití v tomto prostředí. Wilson a Barnes (1974b) navrhovali, že se jedná o heptalaminární strukturu. Později se však ukázalo, že se jedná o dvě blízké lipidické dvojvrstvy ve formě obvyklé plazmatické membrány (Wilson a Barnes, 1974a). Obsah multilaminárních vesikulů by proto mohl být považován za membranózní ekvivalent glykokalyxu. Z tohoto důvodu se pro vnější dvojvrstvu používá termín membranokalyx (Wilson a Barnes, 1974a).



Obr.3: Schéma struktury tegumentu schistosomy (Zdroj: Skelly a Wilson, 2003).

Produkty vycházející z tegumentu jsou sdíleny hostitelským krevním řečištěm; v séru nakažených zvířat byly prokázány protilátky proti tegumentálním proteinům (Brindley a Sher, 1987). Stále však zůstává nejasné, zda je tegument terčem primární reakce antiparazitární imunity. Na povrchu schistosom byly sice nalezeny protilátky, ale hodně jich je vázaných přes Fc doménu. To dělá protilátky nedostupné např. pro složky komplementu nebo imunitní efektorové buňky (Loukas, 2001).

Jak parazit migruje hostitelem, membranokalyx zachytává hostitelské makromolekuly a váže tak např. antigeny krevních skupin a tkání. Podle jedné z hypotéz se hraniční vrstva odlučuje, a tak se minimalizuje přístup hostitelských protilátek a buněk. Stejně jako bakteriální glykokalyx se membranokalyx chrání před imunitní odpovědí různými mechanismy, například sníženou celulární adhezí a ochranou proti působení komplementu (Skelly a Wilson, 2003).

Získávání molekul hostitele probíhá díky přímému fyzickému kontaktu - díky hydrofobicitě membranokalyx parazita. Důsledkem toho je, že schistosoma získává antigeny už během penetrace kůže, MHC molekuly, když se dostává do plicní mikrovaskulatury a glykolipidy z erytrocytů skrze krevní oběh (Skelly a Wilson, 2003). Tím, že parazit získává hostitelské molekuly, se snaží sám sebe zamaskovat. Jednak tím může bránit rozpoznávání imunitního

systému hostitele a následně indukci protiparazitární imunity a také tím může maskovat své povrchové proteiny před útokem efektorových mechanismů imunity (Skelly a Wilson, 2003).

Mezi hostitelské antigeny patří například **α 2-makroglobulin**. Jedná se o silný proteázový inhibitor, který se nachází v krevním oběhu. Jeho přítomnost prokázala protilátka proti α 2-makroglobulinu na povrchových strukturách dospělců schistosomy (Kemp et al., 1976).

Mezi další molekuly, které se nachází na povrchu tegumentu a pocházejí od hostitele, patří např. faktory komplementu, konkrétně 70 kDA **delay accelerating faktor (DAF)**. DAF umožňuje vyhnout se aktivaci alternativních drah komplementu (Pearce et al., 1990), kde DAF na povrchu membrány inhibuje aktivitu komponent komplementu, C3 a C4 konvertázy a může tak zabránit nahromadění membránového efektorového komplementu (MAC). C3 konvertáza se nachází na povrchu tegumentu (Braschi et al., 2005) a může být též inaktivována regulačním proteinem komplementu (CRP). CRP parazit získává z plazmy hostitele (Skelly a Wilson, 2003).

2.1.2. Molekuly se strukturní funkcí

Ve svalových buňkách schistosomy byly nalezeny makromolekuly **paramyosinu**. Paramyosin je myofibrilární glykoprotein, který interaguje s částmi komplementu a imunoglobulinem a tlumí tak imunitní odpověď hostitele (Skelly a Wilson, 2003). V případě myši imunizovaných rozpustným extraktem parazita byl paramyosin cílem humorální imunitní odpovědi (Pearce et al., 1986). Poslední proteomická analýza však naznačila, že se nenachází na povrchu tegumentu schistosomy (van Balkom et al., 2005).

Protein **Sm23**, obsahuje čtyři transmembránové oblasti (Wright et al., 1990) a tím se řadí do tetraspaninové rodiny. Tetraspaniny hrají významnou úlohu v buněčné adhezi, migraci a přežití a navázání protilátek na tyto proteiny může spustit změny v fosforylačních schématech buněk (Maecker et al., 1997). Protein Sm23 byl nalezen u cercárií, schistosomul a dospělců. U laboratorních zvířat imunizovaných tímto proteinem se v experimentálních podmínkách vyvinula ochranná imunitní odpověď. Protilátková ochrana proti tomuto proteinu je spojená s Th1 typem imunitní odpovědi (Da'ara et al., 2001).

SmTSP-2 a **SmTSP-1** jsou tetraspaniny, které byly nalezeny na povrchu *S. mansoni*. Rekombinant TSP-2 je rozpoznáván IgG1 a IgG3 (ne však IgE) přirozeně rezistentních jedinců, ale není rozpoznáván IgG chronicky infikovanými jedinci. Po vakcinaci

laboratorních myší rekombinantními proteiny bylo zaznamenáno signifikantně snížené procento patologických jevů způsobených infekcí (Tran et al., 2006).

Superoxid dismutáza (SOD) byla imunolokalizována v tegumentu a subtegumentální tkáni dospělců *S. mansoni*. SOD inhibuje toxicitu granulocytů pro metabolickou aktivitu ve vajíčkách a líhnutí (McManus a Loukas, 2008). cDNA kódující SOD se signálním peptidem byla naklonována z *S. mansoni* a tento rekombinantní protein byl rozpoznán séry infikovaných lidí (Simurda et al., 1988).

FABP (fatty acid binding protein) je cytozolický protein lokalizovaný v bazální lamině tegumentu a ve střevním epitelu schistosomul a dospělců (Brito et al., 2002). Vyvolává signifikantní zvýšení IgG3 a také indukuje produkci INF- γ (McManus a Loukas, 2008).

Protein **A1.12/9** patří do skupiny graninových proteinů a pravděpodobně by mohl regulovat hostitelsko-parazitární interakce, konkrétně zasahováním do sekrece proteinů hostitele. Nachází se na neuronech a na sensorických receptorech cercárií a stádií obývajících savce (Havercroft a Smith, 1993).

"**Spine glykoprotein**" byl nalezen pomocí monoklonálních protilátek a to převážně, jak napovídá název, v blízkosti trnů samce a samičky (Norden et al., 1982). Není však úplně jasné, jestli se "spine glykoprotein" nachází na povrchu membrány parazita, a je možné, že trny byly přípravou experimentu mechanicky poškozeny (Skelly a Wilson, 2003).

Sm25 je hlavním cílem protilátek, které se objeví u myší po vakcinaci extraktem z tegumentální membrány dospělců schistosomy. Titr anti-Sm25 protilátek tvořených v myších koreluje s mírou ochrany (Smithers et al., 1989). Podle Ali a kol. (1991) je Sm25 integrální membránový glykoprotein.

Sm29 je protein s neznámou funkcí, který má C terminální transmembránovou doménu (McManus a Loukas, 2008). Je rozpoznáván protilátkami přirozeně rezistentních jedinců. Rozsah selektivity není tak široký jako u SmTSP-2, přesto by mohl fungovat jako účinná rekombinantní vakcína (Loukas et al., 2007).

Calpain je intracelulární cysteinová proteáza (viz kapitola 3.2 Proteolytické enzymy). I když sama o sobě neplní strukturní funkci, je spojená s vnitřní membránou (Braschi a Wilson, 2006). U zvířat vakcinovaných calpainem došlo k produkci IgG a IgM protilátek a zvýšení

produkce cytokinů během Th1 a Th2 imunitní odpovědi. Dominantní protektivní imunitní odpověď ke calpainu byla Th1 typu (Ahmad et al., 2009).

Mezi další molekuly se strukturní funkcí patří např. **tetraspanin B**, **annexin**, **Sm200**, **Sm11921** a tetraspanin **Sm07392** (Braschi a Wilson, 2006).

2.2. Bioaktivní molekuly *S. mansoni*

2.2.1. Vasoaktivní molekuly

Významným účinkem schistosomy na konečného hostitele je modulace funkce oběhového systému, mezi něž patří vasokonstrikce a vasodilatace, které jim umožní pohyb v malých kapilárách. Schistosomy dokáží řídit tonus cév a předpokládá se, že je to pomocí molekul, kterými mohou být enzymy, sekretované peptidy, deriváty aminokyselin, lipidy, plynné molekuly a nebo vlastní metabolity parazita (Da'dara a Skelly, 2011). Zda některé z uvedených molekul sekretovaných parazitem jsou opravdu účinné na vaskulární systém hostitele však nebylo doposud přímo dokázáno. Některé látky také mohou být pouze produkty metabolismu parazita (Da'dara a Skelly, 2011).

2.2.1.1. Kininy

Kininy vznikají z kininogenů působením specifických enzymů - např. plazmového kallikreinu (viz níže). Významně působí jako vasodilatátory, čímž zvyšují permeabilitu cév (Carvalho et al., 1998). Enzym s aktivitou podobnou kallikreinu, regulující hladinu kininů, byl lokalizován na povrchu tegumentu *S. mansoni*, což potvrzuje její schopnost regulovat průchodnost cév (viz kapitola 3.4.2. Enzym sK1 s kallikreinovou aktivitou) (Cocude et al., 1999).

2.2.1.2. Biogenní aminy

Histamin patří mezi nejvýznamnější neuroaktivní látky v obratlovcích i bezobratlých živočiších a dokáže působit jako silný vasodilatátor. V dospělých schistosom se nachází v periferním nervovém systému (El-Shehabi a Ribeiro, 2010). Hypoteticky by mohla ovlivnit hostitelský histaminový signální systém. Zda ale schistosoma dokáže řídit vaskulární funkce sekrecí histaminu do svého okolí, je zatím neznámé.

Serotonin patří mezi ubiquitinové neuroaktivní agens. Nachází se v krvi obratlovců a působí jako silný vasokonstriktor (Da'dara a Skelly, 2011). *S. mansoni* má funkční tryptofanovou

hydroxylázu (enzym, který se účastní biosyntézy serotoninu), která ukazuje, že paraziti mají aparát k syntéze tohoto metabolitu (Hamdan a Ribeiro, 1999). Mimo toho mají také schistosomy schopnost exogenního importu serotoninu (Bennett a Bueding, 1973).

2.2.1.3. Eikosanoidy

Eikosanoidy se podílejí na řízení mnoha funkcí v organismu, včetně vaskulárního systému. Existují čtyři skupiny eikosanoidů - **prostaglandiny**, **prostacykliny**, **thromboxany** a **leukotrieny**. Schistosomy mají schopnost tyto látky syntetizovat a sekretovat do svého okolí (Angeli et al., 2001); mnohé z nich mohou působit jako inhibitory hostitelské imunitní odpovědi (Salafsky a Fusco, 1987). Například prostaglandin D₂ (PGD₂) a prostaglandin E₂ (PGE₂), které jsou vypouštěny larvami a dospělci schistosom, jsou silnými vasodilátátory (Giles a Leff, 1988). Další eikosanoidy jako například leukotrien B₄ (LTB₄) a leukotrien C₄ (LTC₄), které mohou fungovat jako vasokonstriktory (Back, 2007; Back, 2002).

2.2.1.4. Oxid dusnatý a syntázy oxidu dusnatého

NO je plynný mediátor účastnící se různých fyziologických procesů, včetně nervové komunikace. Na vzniku NO se podílí syntázy oxidu dusnatého (NOS). Tyto enzymy jsou vysoce reaktivní, procházejí skrz membránu volnou difúzí a velice rychle podléhají degradaci. NO, který je toxický pro mnoho patogenů, vzniká a je uvolňován několika typy efektorových buněk imunitního systému. Z hlediska vasoaktivity NO vychází z endoteliálních buněk, uvolňuje cévy hladké svaloviny a tím způsobí vasodilataci (Da'dara a Skelly, 2011).

Imunoreaktivní NOS byly detekovány u dospělců *S. mansoni* (Kohn et al., 2001; Long et al., 2004) a to zejména v hlavních nervových drahách, v periferním nervovém systému a v senzorických neuronech. NOS byly také nalezeny v části gastrointestinálního traktu a povrchu parazita (Kohn et al., 2001), což naznačuje že by se mohly podílet na hostitelsko - parazitárních interakcích, například přijímání NO od hostitele.

V důsledku toho, že mohou schistosomy působit v cévách překážky, dochází k narušení proudění krve, včetně zvýšené rychlosti toku kolem endotelia. To vede ke stimulu uvolňování NO endoteliálními buňkami a NO jako vasodilátátor pomáhá obnovit průtok krve (Guyton a Hall, 2006).

2.2.1.5. Vaskulární řízení ionty a produkty metabolismu

Mezi vasoaktivní ionty patří například vápník, jehož zvýšená koncentrace může způsobit vasokonstrikci (Guyton a Hall, 2006). Na druhé straně zvýšení draselných iontů, iontů hořčíku nebo koncentrace vodíkových iontů může způsobit vasodilataci a to převážně utlumením kontrakcí hladké svaloviny. Také zvýšená koncentrace CO₂ může způsobit vasodilataci (Guyton a Hall, 2006). Z produktů metabolismu patří mezi vasodilátory například laktát (Hein et al., 2006), adenosin (Gebremedhin et al., 2010) a acetylcholin (Treiber et al., 2005). Uvolnění velkého množství laktátu a vodíkových iontů do okolí parazita může mít také silný vasodilatační účinek. Činnost sodno-draselné ATPázy může mít kromě své primární funkce také lokální vasodilatační efekt (Skelly a Wilson, 2003). Podobně také přítomnost tegumentálních fosfatáz, které podněcují vznik adenosinu a jeho uvolňování do okolí a podporují tak vasodilataci (Bhardwaj a Skelly, 2009). Přítomnost aktivní acetylcholinesterázy na povrchu parazita pravděpodobně ovlivňuje lokální koncentraci acetylcholinu (Camacho et al., 1996) s možnými následky na vaskulární tonus.

Další velice důležitou skupinou bioaktivních molekul parazita jsou proteázy, které se účastní hostitelsko-parazitárních interakcí. Tyto molekuly mohou též sloužit jako instrumentální pro farmakologický výzkum. Proteázám je věnována následující kapitola.

3. Proteázy

Proteázy (proteolytické enzymy, peptidázy, peptidové hydrolázy) jsou nezbytnou součástí všech živých organismů. Tyto enzymy patří mezi hydrolázy a dělí se podle příslušného katalytického mechanismu peptidové vazby na serinové, cysteinové, aspartátové a metaloproteázy (Williamson et al., 2003). Účastní se velké škály biologických procesů parazita, např. usnadňují penetraci kůže hostitele, účastní se procesu příjmu živin, pomáhají parazitovi vyhnout se zničení imunitním systémem hostitele degradací protilátek vázaných na Fc receptor na povrchu schistosomuly a pomáhají chránit schistosomulu před zničením komplementem (Marikovsky et al., 1988). Další hypotézou je, že některé proteázy (zejména serinové) modulují odpověď imunitního systému hostitele a regulují syntézu IgE (Cocude et al., 1999). V případě hematofágních parazitů, mezi něž patří schistosoma, mají výrazný podíl na degradaci hemoglobinu, který je degradován kaskádou proteáz zažívacího traktu (Williamson et al., 2003).

3.1. Aspartátové proteázy

Aspartátové proteázy jsou nejvíce konzervovanou skupinu proteáz. Patří mezi ně mimo jiné v lysosomu působící cathepsin D. U hematofágních parazitů jako je například plazmodium nebo klíšťata se cathepsin D výrazně podílí na degradaci hostitelských proteinů krve (Delcroix et al., 2006, Caffrey et al., 2004). Ve schistosomách jsou aspartátové proteázy odpovědné za první krok v degradaci hostitelova hemoglobinu (Delcroix et al., 2006). Cathepsin D je exprimován v gastrodermis dospělců, více u samic schistosom, pravděpodobně tak pokrývá zvýšené metabolické požadavky na produkci vajíček.

3.2. Cysteinové proteázy

Cysteinové proteázy jsou charakterizovány přítomností cysteinu, histidinu a asparaginu v místě katalytického jádra (Rawlings a Barret, 2004). Podílí se na esenciálních fyziologických procesech parazita jako např. penetrace kůže hostitele, digesce proteinů hostitele a únik před imunitní odpovědí. Vyskytují se často ve velké míře v ESP (excretory-secretory products), proto jsou považovány za nadějně serodiagnostické markery a kandidáty na přípravu vakcíny nejen proti schistosomóze (McKerrow et al., 2006). U schistosom jsou převážně charakterizovány v souvislosti se střevním metabolismem (Caffrey et al., 2004). Jsou zde např. cathepsiny L, F, B, C patřící do papainové rodiny, asparaginylové endoproteázy (Delcroix et al., 2006) a dále již zmiňované calpainy.

3.3. Metaloproteázy

Tyto enzymy jsou závislé na přítomnosti kovů - nejčastěji ionty zinku a mědi. U *S. mansoni* byla detekována leucyl aminoproteáza (LAP). LAPs mohou pravděpodobně participovat na trávení hemoglobinu a na reorganizaci povrchové membrány, jejich aktivita je též spojená s vajíčky parazita (McCarthy et al., 2004). Podle MEROPS databáze existuje dipeptidyl proteáza III (DPP III), jejíž sekvence byla zatím pouze nalezena v genomové databázi *S. mansoni* (Kašný et al., 2009).

3.4. Serinové proteázy

Serinové proteázy jsou u plathelminthů méně obvyklé, u savců běžné. Ve schistosomách byly serinové proteázy detekovány v cercáriích, schistosomulách a dospělcích. Serinové proteázy participují v mnoha fyziologických procesech (Verwaerde et al., 1986; 1988). Skládají se ze tří domén: katalytické domény, substrát vázající domény a zymogenové aktivační prodomény. Katalytické jádro je složené z katalytické triády histaminu, asparaginu a serinu

(Kašný et al., 2009). Jsou syntetizovány jako neaktivní prekurzory, zymogeny. K aktivizaci enzymu je nutné odštěpení zymogenové prodomény (N terminální prodloužení).

Serinové proteázy nebyly u trematod doposud příliš popsány, výjimku tvoří cercáriová elastáza, kterou se zabývalo několik desítek studií.

3.4.1. Cercáriová elastáza

Cercáriová elastáza patří do skupiny "chymotrypsin-like" proteázy (Kašný et al., 2009). Dokáže štěpit základní komponent kůže - elastin (Salter et al., 2000). Elastázy z preacetabulárních penetračních žláz cercárie hrají stěžejní roli při penetraci cercárie do hostitele (Curwen a Wilson, 2003). Cercáriová elastáza je nejhojněji sekretovaný enzym cercárií *S. mansoni*. Byla zjištěna též u *S. douthitti* a *S. haematobium*. Nebyla identifikována u *S. japonicum* (Dvořák et al., 2008). Bylo prokázáno, že cercáriová elastáza hraje důležitou roli při úniku před imunitním systémem hostitele a to štěpením hostitelských imunoglobulinů (Darani et al., 1997).

3.4.2 Serinové proteázy trypsinového typu

Trypsinové proteázy *S. mansoni*, jinak nazývané kallikrein-like proteázy, sdílí významné sekvenční homologie se savčím plazmovým kallikreinem. Savčí kallikreiny jsou běžné serinové endoproteázy, které se účastní dějů jako např. zpracování bioaktivních peptidů, srážení krve a zvýšení míry glykosylace IgE vázajících faktorů. V MEROPS databázi je okolo 142 záznamů pro trypsinové proteázy, převážně lidských, myších a krysích (Kašný et al., 2009). Jedinou částečně popsanou serinovou proteázou trypsinového typu u trematod je *S. mansoni* serine protease 1 (SmSP1) (Sm GeneDB, <http://www.genedb.org/genedb/smansoni>, 18.3. 2012).

3.4.2.1. SmSP1

Identifikace

Cocude a kol. (1997) izolovali část sekvence serinové proteázy (SmSP1), která byla získána pomocí metody PCR z genomové DNA použitím degenerovaných oligonukleotidových primerů na základě konzervovaného aktivního místa těchto enzymů. SmSP1 byla identifikována na úrovni mRNA v dospělých, cercáriích a schistomulách *S. mansoni* metodou RT-PCR.

Molekulární charakterizace

Sekvence aminokyselin (156 AA) vykazovala podobnosti s mnoha serinovými proteázami, zejména se savčím plazmovým kallikreinem. Analýzou sekvencí bylo prokázáno, že SmSP1 je více příbuzná savčímu kallikreinu (42 % podobnost s netopýřím tkáňovým plazminogen aktivátorem) než cerkárivé elastáze (26% podobnost). Na základě porovnání sekvencí aminokyselin vykazovala SmSP1 s myším plazmovým kallikreinem 35% podobnost. SmSP1 byla též sekretována do kultivačního média. Část molekuly byla vyprodukována rekombinantně a byla použita k vytvoření protilátek. Metodou Western blot bylo potvrzeno, že antisérum proti rSmSP1 specificky vyvolalo reakci s antigenem o velikosti 30 kDa, což je předpokládaná velikost této serinové proteázy (Cocude et al., 1997). K ověření sekvenční homologie SmSP1 a savčího kallikreinu bylo použito křížové imunoreaktivity. Kallikrein získaný z prasečí slinivky byl rozpoznán protilátkami proti rSmSP1. Z toho vyplývá, že je tento protein schopný tvořit křížové reaktivní protilátky (Cocude et al., 1997). Celý gen kóduje chimerickou molekulu matriptázového typu s jednou CUB extracelulární doménou, jedním LDL vázajícím receptorem a trypsinovou doménou na C konci molekuly. Obecně matriptázy mají netypickou N terminální transmembránovou část, cubulin sekreční doménu (CUB) a LDL vázající doménu (LDLr) domény a trypsinovou doménu. Matriptázy jsou u savců exprimovány v tkáních epitelálního původu a mají podíl na mnoha biologických procesech, kde je uplatněna proteolýza - např. degradace extracelulární matrix, aktivace plazminogenu a hepacytového růstového faktoru přes urokinázy atd. To se uplatňuje v mnoha procesech jako je koagulace, buněčná proliferace, vývoj, morfogeneze, obnova tkání a rakovinná proliferace (Cocude et al., 1999).

Homologie se serinovými proteázami

Sekvence SmSP1 vykazuje jistou podobnost s regulačními serinovými proteázami, plazmovým kallikreinem, plazminogenem a lidským komplement faktorem I (Dvořák, osobní sdělení). Podobná je pouze část ORF a zahrnuje pouze "lehký řetězec" kódující proteolytickou doménu. Nejvýraznější homologie obklopují zbytky katalytického jádra (His, Asp, Ser), včetně několika cysteinových, glycinových a prolinových zbytků. SmSP1 sekvence trypsinové domény je sama o sobě dostačující k vytvoření aktivního enzymu (Cocude et al., 1999).

Podle Cocude a kol. (1999) podobnosti sekvence SmSP1 s plazmovým kallikreinem souvisí pravděpodobně s modulací imunity. Kallikreinová aktivita hraje úlohu v aktivaci B

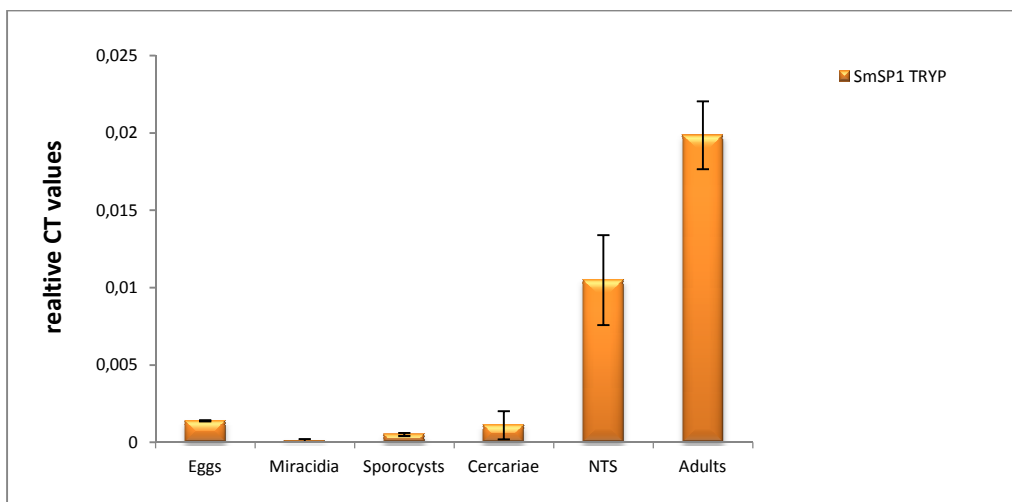
lymfocytů nebo v jejich diferenciaci. Kallikrein-like faktor, označovaný jako faktor, který přispívá k vyšší míře glykosilace, pravděpodobně indukuje IgE-potentiating faktor, který usnadňuje diferenciaci paměťových B lymfocytů (Ishizaka et al., 1985). Kallikrein může představovat ε receptor modulating protein-like aktivitu a je tak schopný zvýšit množství produkovaných IgE a IgG1 stimulováním B lymfocytů (Matsushita a Katz, 1993). Podle této hypotézy je SmSP1 schopný regulovat syntézu IgE, proto by snad tato proteáza mohla mít potenciální imunomodulační vlastnosti.

Další hypotetická funkce SmSP1 souvisí se sekvenční homologií s lidským komplement faktorem I, proto by mohl být zahrnut v regulaci drah komplementu (Cocude et al., 1999).

Taktéž část ORF (open reading frame) o rozsahu 165 bp, jak již bylo uvedeno, sdílí podobnost s repetitivní sekvencí pro lidský LDL receptor třídy A, který je přítomný v extracelulárních doménách (Yamamoto et al., 1984). Tato opakující se struktura je složená z 6 cysteinových zbytků, které se také nachází v těžkém řetězci faktoru I a fragmentu komplementu C9 (Catterall et al., 1987).

Lokalizace

Použitím krysího antiséra proti rekombinatní SmSP1 molekule (rSmSP1) byla proteáza detekována na povrchu samců a parenchymu obou pohlaví. To naznačuje, že by mohla SmSP1 být sekretována do externího prostředí (Cocude et al., 1999). SmSP1 je vývojově regulovaná. SmSP1 je exprimovaná ve všech životních stádiích *S. mansoni*. Maximální exprese tohoto genu byla detekována v dospělých (Obr. 4) (Dvořák, dosud nepublikováno). Množství SmSP1v SRP (schistosomula released products) podporuje hypotézu, že SmSP1 by mohla fungovat jako elastáza při pronikání do tkání hostitele a také se účastnit ochrany před odpovědí imunitního systému hostitele.



Obr.4: Expresa SmSP1 během životního cyklu *S. mansoni* (NTS = *in vitro* transformované schistosomuly) (Zdroj: Dvořák, dosud nepublikováno).

SmSP1 je vylučována schistosomulou a je tak potenciálním cílem pro imunitní odpověď. Metodami Western blot a ELISA nebylo získáno pozitivních výsledků na přítomnost specifických protilátek proti SmSP1, což koreluje s nízkou imunoreaktivitou proti jiným serinovým proteázám *S. mansoni* (Cocude et al., 1999).

3.4.2.2. Enzym sK1 s kallikreinovou aktivitou

Podle Carvalho et al. (1998) byl izolován z homogenátu dospělců *S. mansoni* enzym sK1 (66 kDa), který dokáže odštěpit bradykinin z krysího plazmového kininogenu a hydrolyzovat kallikreinový d-Pro-Phe-Arg-*p*-nitroanilidový substrát. Bradykinin a jemu podobné látky jsou silné vasodilátory, které dokážou způsobit hypotenzi. Účastníci se procesů kardiovaskulárního systému, jako je např. kapilární propustnost, regulace tekutinové a elektrolytické rovnováhy (Cuthbert a Margolius, 1982) a zánětlivých reakcí (Sharma a Mohsin, 1990). Vznikají v krvi a tkáňovém moku reakcí kallikreinu, který rozštěpuje malé polypeptidy z kininogenu v α -2 globulinyvých frakcích (Fiedler, 1979). Přítomnost kinin produkujících enzymů *S. mansoni* je důležitá pro migraci parazita v cévách hostitele. Dospělci *S. mansoni* jsou mnohonásobně větší než průměr cév, proto je potřeba molekul, které mají vasodilatační účinek.

Podle fyzikálních a chemických vlastností molekuly sK1 se usuzuje, že se jedná o serinovou proteázu trypsinového typu. sK1 je součástí povrchu tegumentu a jeho aktivita je mnohonásobně vyšší v samcích než v samicích schistosomy. Samice žijí v canalis gynaecophorus samce a kromě kladejí vajíček se nepohybují hostitelovou vaskulaturou. V

krysím laboratorním modelu má periferní vasodilatační účinek, který může mít efekt i na svého přirozeného hostitele a umožňovat tak parazitům snazší pohyb vaskulaturou hostitele (Carvalho et al., 1998).

3.4.2.3. Plazmin-like proteáza

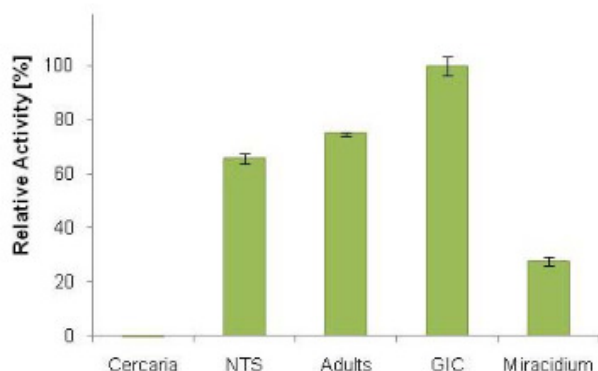
Vajíčka schistosom mají vliv na agregaci a aktivaci krevních destiček v krvi hostitele. Krevní destičky interagují s vajíčky během jejich exkrece (Ngaiza a Doenhoff, 1990). Aktivace krevních destiček je způsobena trombinem, který přeměňuje fibrinogen na fibrinové monomery (De Gaetano a Cerletti, 2002). Podle Doenhoffa a kol. (2003) obsahuje extrakt z vajíček *S. mansoni* fibrinolytickou aktivitu. Podobná aktivita nebyla zjištěna v cercariích ani v dospělých schistosomy. Nalezený proteolytický enzym (27 kDa) je svojí fibrinolytickou aktivitou spíše podobný lidskému plazminu než jiným serinovým proteázám – trypsinu, chymotrypsinu a elastáze. Ukázalo se, že antisérum proti lidskému fibrinogenu obsahuje protilátky, které reagují s myším fibrinogenem. Tento enzym se pravděpodobně podílí na změnách metabolismu fibrinogenu hostitele, které vznikají jako důsledek infekce parazitem. Fibrinolytická aktivita vajíček pravděpodobně vyrovnává jejich thrombogenický potenciál (Doenhoff et al., 2003). Další hypotézou je, že modulace metabolismu fibrinogenu je faktor v nedávno objeveném antiatherogenního účinku, který vyvolávají schistosomy (Doenhoff et al., 2002).

3.4.3. Prolyl-like proteázy

Prolyl endoproteázy (POP) jsou serinové endoproteázy s vysokou substrátovou specifitou pro vnitřní peptidické dělení na C terminální straně prolinového zbytku. POP jsou hojně rozšířeny mezi organismy, včetně člověka, kde je jejich největší koncentrace v mozku (Gass a Khosla, 2007). Mají schopnost hydrolyzovat bioaktivní neuropeptidy (Cunningham a O'Connor, 1997). Přesná funkce však není zatím známá. Výskyt těchto enzymů byl potvrzen i u *Trypanosoma cruzi*, která způsobuje Chagasovu chorobu (Morty et al., 1999). Tc80 je zahrnutá v invazi parazita do hostitele, důkazem je snížená schopnost pronikání trypanosomy do hostitelských buněk po působení specifických Tc80 inhibitorů (Bastos et al., 2005). Z tohoto důvodu je považován za perspektivní cílovou molekulu pro vývoj léčiv.

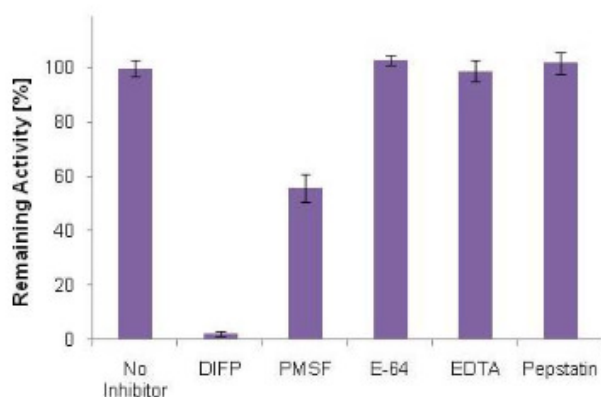
POPs mají atomovou hmotnost 70-80 kDa a se skládají se ze dvou hlavních domén: z katalytické peptidázové domény s α/β hydrolázovým foldem a katalytickým jádrem a typické " β -propeller" domény s cylindrickým tvarem, který kryje aktivním místo (Fulop et al., 1998). V genomové databázi byla nalezena sekvence Smp_011590, která by mohla být

homologem Tc80 a savčích POPs. Usuzuje se tak podle profilování její aktivity (viz Obr. 4) (Dvořák, osobní komunikace).



Obr. 4: Graf znázorňující relativní aktivitu POPs v jednotlivých životních stádiích schistosomy (NTS = *in vitro* transformované schistosomuly) (Zdroj: Horn a Dvořák, dosud nepublikováno).

Z grafu je patrné, že se aktivita SmPOP, která je obsažena v extraktech schistosomy, mění během životních stádií *S. mansoni*. Nejvyšší aktivitu má extrakt získaný z dospělců a *in vitro* transformované schistosomuly (NTS).



Obr. 5: Graf znázorňující vztah relativní aktivity POPs v závislosti na specifických proteázových inhibitech (zdroj: Dvořák, dosud nepublikováno).

Inhibice POP aktivity pomocí specifických inhibitorů serinových proteáz - diisopronylfluorofosfát (DIFP) a fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) (Obr. 5), potvrzují původ a specifitu enzymatické reakce.

3.4.3 Enterokinase-like proteáza

Enterokinase-like proteáza byla nalezena u *S. mansoni* a *S. japonicum* v schistosomulách a dospělých (Liu et al., 2006). AA sekvence tohoto enzymu *S. mansoni* sdílí 91% podobnost s enterokinase-like peptidase *S. japonicum*. Důležitý je fakt, že v MEROPS databázi je pouze jeden záznam pro enterokinázu *Homo sapiens* (Rawlings et al., 2008). U schistosom může fungovat jako zymogenový procesor, pravděpodobně i při aktivizaci trávicích proenzymů v střevě parazita (Kašný et al., 2009).

3.4.4. Nové perspektivy

Díky GeneDB bylo detekováno mimo výše zmiňované dalších pět potenciálních proteáz trypsinového typu. Alespoň tři z nich mají funkční trypsinové S1 katalytické jádro složené z histaminu, asparaginu a serinu a typické vazebné místo se specifitou pro Arg a Lys v P1 vazebné pozici. Tyto tři zmiňované proteázy jsou sekvenčně podobné kallikreinům (Smp_141450), savčím epiteliálním transmembránovým proteázám (Smp_103680), plazminogenu a antikoagulačnímu faktoru – proteinu C (Smp_129230) (Dvořák, nepublikováno). Hypoteticky by tyto molekuly by mohly participovat na interakcích mezi parazitem a jeho definitivním hostitelem a proto reprezentují atraktivní molekuly pro farmakologický výzkum. Laboratoř pod vedením Jana Dvořáka pracuje na molekulárně biologických analýzách těchto proteinů, na identifikaci protilátek a přípravě rekombinantních enzymů. Výzkum dosud nepopsaných enzymů má ambice přispět k obecnému poznání fenoménu parazitismu, mohl by mít přínos pro farmakologii a přispět k vývoji léčiv a dosud neexistujících vakcín.

4. Závěr

Jak již bylo v této práci několikrát zdůrazněno, schistosomóza postihuje více než 200 milionů lidí v 74 zemích světa, proto se řadí mezi nejzávažnější helmintózy lidské populace (McManus a Loukas, 2008). Během společné evoluce schistosom a jejího definitivního hostitele parazit vyvinul řadu mechanismů, které umožňují únik před imunitním systémem nebo dokonce imunitní systém hostitele modulovat. Zablokováním těchto mechanismů pomocí specifických léčiv nebo vakcíny by mohlo vést k eliminaci nákazy. Zatím existuje pouze jeden druh terapie proti schistosomárním nákazám - praziquantel, který působí na všechna stadia schistosomy. V poslední době bylo popsáno několik rezistentních izolátů *S. mansoni* u pacientů, kteří žijí v endemických oblastech a byli tímto léčivem opakovaně léčeni (Ismail et al., 1999).

Parazit se dokáže aktivně maskovat před imunitní odpovědí hostitele tím, že naváže na svůj povrch tegumentu hostitelské antigeny - např. faktory komplementu, které mu umožňují vyhnout se aktivaci alternativních drah komplementu. Imunomodulace se účastní jednak molekuly se strukturní funkcí (paramyosin, některé tetraspaniny, superoxid dismutáza a jiné) a také bioaktivní molekuly. Mezi bioaktivní molekuly schistosom jsou zařazené mimo jiné i vasoaktivní molekuly, které mají vliv na vasodilataci cév a umožňují tak helmintům snazší pohyb vaskulaturou hostitele.

Pro výzkum naší laboratoře je důležitý fakt, že parazit si vyvinul řadu proteolytických mechanismů a některé z nich se zřejmě účastní hostitelsko-parazitárních interakcí (McKerrow et al., 1988). Participují na celé škále biologických procesů jako např. penetrace kůže hostitele, líhnutí, excystace, střevní metabolismus atd. U lékařsky a veterinárně významných druhů trematod jsou proteázy studovány jako kandidáti pro vývoj specifických vakcín a léčiv (McManus a Loukas, 2008). Jako dominantní antigeny jsou proteázy vhodné taktéž jako serodiagnostické markery (Li et al., 1996). Proteázy, které se podílí na trávicích procesech (cysteinové a aspartické cathepsiny) a invazi hostitele (cerkáriová elastáza), jsou aktivně zkoumány jako nadějně parazitární molekuly vhodné pro chemo- a imunoterapii.

Serinové proteázy u schistosom byly doposud opomíjeny a ne příliš studovány (kromě cerkáriové elastázy). Zajímavé je, že sdílí nápadné sekvenční podobnosti se savčími regulačními serinovými proteázami. To zřejmě vzniklo v průběhu koevoluce parazita se savčím hostitelem a potřebami aktivně interagovat a modifikovat fyziologické procesy jako jsou např. koagulace, vasodilatace a imunomodulace. Dosud nejlépe popsany zástupce této

skupiny - SmSP1 má sekvenční podobnost s myším plazmovým kallikreinem více než 34 %. Kallikreinová aktivita se účastní aktivace a diferenciace B lymfocytů. Kallikrein je schopný zvýšit množství produkovaných a IgE a IgG1 stimulováním B lymfocytů (Matsushita a Katz, 1993). Další jeho úloha souvisí s lidským komplement faktorem I, se kterým sdílí 32% podobnost. Proto by mohl být zahrnut do regulace drah komplementu (Cocude et al., 1999). Exprese genu SmSP1 je vývojově regulovaná během životního cyklu *S. mansoni*. Vysoká koncentrace byla nalezena v čerstvě transformovaných schistosomulách, nejvyšší pak v dospělých (Dvořák, dosud nepublikováno). Pravděpodobně by SmSP1 mohla mít funkci při pronikání do tkání hostitele a zároveň chránit schistosomu před imunitní odpovědí hostitele. Její přítomnost byla detekována v tegumentální oblasti. Gen kódující SmSP1 má strukturu odpovídající matriptázám s CUB extracelulární doménou, LDLr a trypsinovou doménou na C konci molekuly. Avšak pouze u vajec je přítomen celý transkript, zatímco u ostatních stádií jsou tyto domény exprimovány samostatně (Dvořák a Franta, nepublikováno).

Bylo též popsáno, že proteinová frakce ze solubilního extraktu *S. mansoni* obsahuje kallikreinovou aktivitu, která je schopná hydrolyzovat kininogen *in vitro* a indukovat silnou vasodilataci *in vivo* (Carvalho et al., 1998). Vasodilatace je nutná k pohybu parazitů krevním řečištěm hostitele vzhledem k malému průměru kapilár. Vliv na fyziologické procesy, mezi které se řadí i vasodilatace, se projevuje na průběhu jiných chorob jako jsou nemoci autoimunitní nebo vaskulární (Doenhoff et al., 2002).

Mezi další schopnosti modulace patří fibrinolytická aktivita enzymu nalezeného ve vajíčkách schistosomy. Enzym je svoji aktivitou spíše podobný lidskému plazminu než ostatním serinovým proteázám. Podílí se pravděpodobně na modulacích metabolismu fibrinogenu hostitele.

Dalšími, z hlediska vývoje léčiv, perspektivními molekulami jsou prolyl endopeptidázy. Jejich funkce ještě není u *S. mansoni* přesně definovaná. O jejich homologu u *T. cruzi* je známo, že se účastní invaze do hostitele. Působením specifických inhibitorů bylo docíleno snížené schopnosti pronikání trypanosomy do hostitele (Bastos et al., 2005). Totéž by teoreticky mohlo platit i u *S. mansoni*.

Díky GeneDB bylo detekováno několik dalších potenciálních proteáz *S. mansoni*. I u nich byly nalezeny jisté sekvenční homologie se savčím kallikreinem, epiteliálními transmembránovými proteázami a antikoagulačním faktorem - proteinem C (Dvořák, osobní komunikace). Pravděpodobně by mohly participovat na hostitelsko-parazitárních interakcích

a podílet se na imunomodulaci hostitele a mohly být nadějnými molekulami pro vývoj léčiv proti schistosomóze nebo pro vývin dosud neexistující vakcíny. Výzkum může přispět nejen k vývoji léčiv, ale i k prozkoumání fenoménu parazitismu a poznání nemoci celkově, které tak může napomoci k vývoji nových léčebných a profylaktických postupů. Tyto proteázy by mohly též sloužit jako „instrumentální molekuly“ sloužící k objasnění hostitelských fyziologických procesů a interakcí s hostitelem.

5. Seznam použité literatury

- Abdulla, M., Lim, K., Sajid, M., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R. (2007). Schistosomiasis mansoni: Novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor, PLoS Medicine 4, 130-138.
- Ahmad, G., Zhang, W., Torben, W., Damian, R. T., Wolf, R. F., White, G. L., Chavezsuarez, M., Kennedy, R.C., Siddiqui, A.A. (2009). Protective and antifecundity effects of Sm-p80-based DNA vaccine formulation against Schistosoma mansoni in a nonhuman primate model. Vaccine 27, 2830-2837.
- Ali, P.O., Jeffs, S.A., Meadows, H.M., Hollyer, T., Owen, C.A., Abath, F.G., Allen, R., Hackett, F., Smithers, S.R. and Simpson, A.J. (1991). Structure of Sm25, an antigenic integral membrane glycoprotein of adult Schistosoma mansoni. Molecular and Biochemical Parasitology 45, 215–222.
- Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A. (2001). Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. Journal of Experimental Medicine 193, 1135–1147.
- Attwood, S. W., Panasoponkul, C., Upathame, S., Meng, X. H., Southgate, V. R. (2002). Schistosoma ovuncatum n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from northwest Thailand and the historical biogeography of Southeast Asian Schistosoma Weinland, 1858. Systematic Parasitology 51, 1–19.
- Back, M. (2007). Leukotriene receptors: crucial components in vascular inflammation. Scientific World Journal 7, 1422–1439.
- Back, M., (2002). Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. Life Science 71, 611–622.
- Banerjee, R., Liu J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., Goldberg, D.E. (2002). Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine. Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 99, 990–995.
- Bastos, I.M., Grellier, P., Martins, N.F., Cadavid-Restrepo, G. de Souza-Ault, M.R, Augustyns, K., Teixeira A.R, Schrevel, J., Maigret, B. da Silveira, J.F, Santana, J.M. (2005). Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of Trypanosoma cruzi (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. Biochemical Journal 388, 29-38.
- Blanton, R.E., Licate, L.S., Aman, R.A. (1994). Characterization of a native and recombinant Schistosoma haematobium serine protease inhibitor gene product. Molecular Biochemical of Parasitology 63, 1–11.
- Bennett, J.L., Bueding, E. (1973). Uptake of 5-hydroxytryptamine by Schistosoma mansoni. Molecular Pharmacology; 9,311–9.

- Braschi, S., Wilson, R.A. (2005) Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Molecular and Cellular Proteomics* 5,2, 347-356.
- Brindley, P.J., Sher, A. (1987). The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *Journal of Immunology* 139, 215–220.
- Bhardwaj, R., Skelly, P.J. (2009). Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? *Trends in Parasitology* 25, 256–260.
- Brown, A. Burleigh, J.M., Billett, E.E., Pritchard, D.I. (1995). An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology* 110, 555–563.
- Brito, C. F., G. C. Oliveira, S. C. Oliveira, M. Street, S. Riengrojpitak, R. A. Wilson, A. J. Simpson, and R. Correa-Oliveira. (2002). Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35,377–381.
- Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P., Sajid, M. (2004). Blood ‘n’ guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends in Parasitology* 20, 241-248.
- Caffrey, C.R., Secor, W.E. (2011). Schistosomiasis: from drug deployment to drug development. *Current Opinion in Infectious Diseases* 5, 410-417.
- Camacho, M, Alsford, S, Agnew, A. (1996). Molecular forms of tegumental and muscle acetylcholinesterases of *Schistosoma*. *Parasitology* 112, 199–204.
- Carvalho, W.S., Lopes, C.T., Juliano, L., Coelho, P.M.Z., Cunha-Melo, J.R., Beraldo, W.T. (1998). Purification and partial characterization of kininogenase activity from *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology* 117, 311–319.
- Catterall, C. F., Lyons, A., Sim, R. B., Day, A. J. and Harris, T. J. R. (1987). Characterization of the primary amino acid sequence of human complement control protein Factor I from an analysis of cDNA clones. *The Biochemical Journal* 242, 849-856.
- Cocude, C., Pierrot, C., Cetre, 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., Cetre, 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.
- Curwen, R.S., Wilson, R.A. (2003). Invasion of skin by schistosome cercariae: Some neglected facts. *Trends in Parasitology* 19, 63–66.
- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Sundaralingam, S., Wilson, R.A. (2006). Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 835–844.

- Cuthbert, A. W., Margolius, H. S. (1982). Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. *British Journal of Pharmacology* 75, 587-598.
- Cunningham, D.F., O'Connor, B. (1997). Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1343, 160-186.
- Darani, Y.H., Curtis, R.H.C., McNeice, C., Price, H.P., Sayers, J.R., Doenhoff, M.J. (1997). *Schistosoma mansoni*: Anomalous immunogenic properties of a 27 kDa larval serine protease associated with protective immunity. *Parasitology* 115, 237-247.
- Da'dara, A.A., Skelly, P.J., Wang, M.M. and Harn, D.A. (2001). Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine* 20, 359-369.
- Da'dara, A.A., Skelly, P.J. (2011). Manipulation of vascular function by blood flukes? *Blood Reviews* 25, 175-179.
- Dessein, A., Samuelson, J.C., Butterworth, A.E., Hogan, M., Sherry, B.A., Vadas, M.A. and David, J.R. (1981). Immune evasion by *Schistosoma mansoni*: loss of susceptibility to antibody or complement-dependent eosinophil attack by schistosomula cultured in medium free of macromolecules. *Parasitology* 82, 357-374.
- Doenhoff, M. J., Stanley, R. G., Griffiths, K. and Jackson, C. L. (2002). An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology* 125, 415-421.
- Doenhoff, M. J., Stanley, R. G., Pryce, D., Curtis, R.C.H., Griffiths, K., Jackson, C.L., Parry, H. (2003). Identification of a fibrinolytic enzyme in *Schistosoma mansoni* eggs and modulated blood fibrinogen metabolism in *S. mansoni*-infected mice. *Parasitology* 126, 231-234.
- De Bont J., Vercruysse J. (1997). The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology Today* 13, 255-262.
- Delcroix, M., Sajid M., Caffrey, C.R., Lim, K., Dvořák, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J.H. (2006). A Multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *Journal of Biological Chemistry* 281, 51, 39316-39329.
- Dvořák, J, Mashiyama, S.T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G.M., Hansell, E., Kee-Chong Lim, Hsieh, I., Bahgat, M., Mackenzie, B., Medzihradsky, K.F., Babbitt, P.C., Caffrey, R.C., McKerrow, J.H. (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae, *Biochimie* 90, 345-358.
- El-Shehabi, F, Ribeiro, P. (2010). Histamine signalling in *Schistosoma mansoni*: Immunolocalisation and characterisation of a new histamine-responsive receptor (SmGPR-2). *International Journal for Parasitology* 12, 1395-406.
- El-Shehabi F, Vermeire JJ, Yoshino TP, Ribeiro P. (2009) Developmental expression analysis and immunolocalization of a biogenic amine receptor in *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*; 122,17-27.

Fallon, P. G. (2000). Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology Today* 21, 29–35.

Fiedler, F. (1979). Enzymology of glandular kallikreins. In *Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, Handbook of Experimental Pharmacology* 25, ed. Erdos, E. G., 103-161, Springer-Verlag, Berlin.

Fulop, V., Bocskei, Z., and Polgar, L. (1998). Prolyl oligopeptidase: an unusual betapropeller domain regulates proteolysis. *Cell* 94, 161-170.

Förstl, M., Kolářová, L., Veselský, Z., Macek, P., Dvořák, P. (2003). Schistosomóza (bilharzióza) močového traktu, *Urologie pro praxi* 1, 45-48.

Gass, J., Khosla, C. (2007). Prolyl endopeptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 345-355.

Giles, H., Leff, P. (1988). The biology and pharmacology of PGD₂. *Prostaglandins* 35, 277–300.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (2006) *Textbook of Medical Physiology*. 11 ed. Philadelphia: Elsevier.

Gebremedhin, D., Weinberger, B., Lourim, D., Harder, D.R. (2010). Adenosine can mediate its actions through generation of reactive oxygen species. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 1777–1790.

Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx, and L. Kestens. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106–1118.

Hamdan, F.F., Ribeiro, P. (1999). Characterization of a stable form of tryptophan hydroxylase from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21746–21754.

Havercroft, J.C., Smith, A.L. (1993). Localization of the A1.12/9 antigen family to the neurones, putative sensory receptors and tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* 15, 361–371.

Harn, D.A., Mitsuyama, M., Huguenel, E.D., David, J.R. (1985). *Schistosoma mansoni*: detection by monoclonal antibody of a 22,000-dalton surface membrane antigen which may be blocked by host molecules on lung stage parasites. *Journal of Immunology* 135, 2115–2120.

Hedstrom L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews* 102, 4501–4523.

Hernandez, M.G., Hafalla, J.C., Acosta, L.P., Aligui, F.F., Aligui, G.D., Ramirez, B.L., Dunne, D.W. and Santiago, M.L. (1999). Paramyosin is a major target of the human IgA response against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunology* 21, 641–647.

- Hein, T.W., Xu, W., Kuo, L. (2006). Dilation of retinal arterioles in response to lactate: role of nitric oxide, guanylyl cyclase, and ATP-sensitive potassium channels. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 47, 693–699.
- Horák, P., Kolářová, L. (2001): Bird schistosomes: do they die in mammalian skin?, *Trends in Parasitology* 17, 66-69.
- Hu, W., Yan, Q., Shen, D.K., Liu, F., Zhu, Z.D., Song, H.D., Xu, X.R., et al. (2003). Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nature Genetics* 35, 139–147.
- Ishizaka, T., Iwata, M. and Ishizaka, k. (1985). Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin. *Journal of Immunology* 146, 1180-1187.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao L., Day, T.A., Bennett, J.L. (1999). Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 932-935.
- Irving, J.A., Steenbakkens, P.J., Lesk, A.M., Op den Camp, H.J., Pike, R.N., Whisstock, J.C., (2002). Serpins in prokaryotes. *Molecular Biology E* 19, 1881–1890.
- Iwata, M., Munoz, J.J., Ishizaka, K. (1983). Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor IV. Identification of glycosylation-enhancing factor as a kallikrein-like enzyme. *Journal of Immunology* 131, 1954–1960.
- 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). Peptidases of trematodes, *Advances in Parasitology* 69, 205-297.
- Khalil, L. F. (2002). Family Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898. In *Keys to the Trematoda* (ed. Gibson, D. I., Jones, A. & Bray, R. A.), 419–432. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Kemp, W.M., Damian, R.T., Greene, N.D. and Lushbaugh, W.B. (1976). Immunocytochemical localization of mouse alpha 2-macroglobulinlike antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* adults. *Journal of Parasitology* 62, 413–419.
- King, C. L., Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J.H. Kazura, J.W. (1998). B-cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *Journal of Immunology* 160, 3578–3584.
- Kruger, F.J. and Wolmarans, C.T. (1990). Host cellular components adhering to the tegument of schistosomes from cattle, buffalo, hippopotamus and lechwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 57, 137–139.

Kohn, A.B., Moroz, L.L., Lea, J.M., Greenberg, R.M. (2001). Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the nervous system and peripheral tissues of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 122, 87–92.

Kolářová L., Horák P. Cerkářiová dermatitida stále aktuální – spektrum patogenních agens a jejich vývoj v nespecifickém hostiteli. *Remedia – Klinická mikrobiologie* 3(8) 1999.

Li, Y.L., Idris, M.A., Corachan, M., Han, J.J., Kirschfink, M., Ruppel, A. (1996). Circulating antigens in schistosomiasis: detection of 31/32-kDa proteins in sera from patients infected with *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, or *S. intercalatum*. *Parasitol Research* 82, 14–18.

Liu, F., Lu, J., Hu, W., Wang, S.Y., Cui, S.J., Chi, M., et al. (2006). New perspectives on host–parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathogens* 2, 268–281.

Lockyer, A.E., Olson, P., Ostergaard, P., Rollinson, D., Johnston, 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., Littlewood, T.J. (2003). The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology* 126, 203–224.

Long, X.C., Bahgat, M., Chlichlia, K., Ruppel, A., Li, Y.L. (2004). Detection of inducible nitric oxide synthase in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*. *Journal of Helminthology* 78, 47–50.

Loukas, A., Jones, M.K., King, L.T., Brindley, P.J., McManus, D.P. (2001). Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infection and Immunity* 69, 3646–3651.

Loukas, A., Tran, M., Pearson M.S. (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *International Journal of Parasitology* 37, 257–263.

Maecker, H.T., Todd, S.C. and Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB Journal* 11, 428–442.

Matsushita, S. and Katz, D. H. (1993). Biphasic effect of kallikrein on IgE and IgG1 synthesis by LPS IL4 stimulated B cells. *Cellular Immunology* 146, 210–214.

McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S.M., Doyle, S., Mann, V.H., Brindley, P.J. (2004). Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *International Journal of Parasitology* 34, 703–714.

McKerrow, J. H. and Doenhoff, M. J. (1988). Schistosome proteases. *Parasitology Today* 4, 334–340.

McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annual Reviews of Pathology* 1, 497–536.

McLaren, D.J. and Incani, R.N. (1982). *Schistosoma mansoni*: acquired resistance of developing schistosomula to immune attack in vitro. *Experimental Parasitology* 53, 285–298.

McManus, D.P., Loukas, A. (2008). Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 225-242.

Malhotra, I., Ouma, J., Wamachi, A., Kioka, J., Mungai, P., Omollo, A., Elson, L., Koech, D., Kazura, J.W., King, C.L. (1997). In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. *Journal of Clinical Investigation* 99, 1759–1766.

Marikovsky, M., Arnon, R., Fishelson Z. (1988). Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* 141, 273-278.

Modha, J. and Doenhoff, M. J. (1994). Complex formation of human alpha-1-antitrypsin with components in *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasite Immunology* 16, 447-450.

Morty, R.E., Lonsdale-Eccles, J.D., Morehead, J., Caler, E.V., Mentele, R., Aurswald, E.A., Coetzer, T.H.T., Andrews, N.W., Burleigh, B.A. (1999). Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 26149-26156.

Nagy, B.A., File, S.K., Smith, J.H. (1981). Changes in the enteric vasculature of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30, 999–1009.

Norden, A.P., Aronstein, W.S. and Strand, M. (1982). *Schistosoma mansoni*: identification, characterization, and purification of the spine glycoprotein by monoclonal antibody. *Experimental Parasitology* 54, 432–442.

Ngaiza, J. R., Doenhoff, M. J. (1990). Blood platelets and schistosome egg excretion. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 193, 73–79.

Patocka, N., Ribeiro, P. (2007). Characterization of a serotonin transporter in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*: cloning, expression and functional analysis. *Molecular Biochemical Parasitology* 154, 125–133.

Pearce, E.J., James, S.L., Dalton, J., Barrall, A., Ramos, C., Strand, M., Sher, A. (1986). Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. *Journal of Immunology* 137, 3593–3600.

Pearce, E.J., Hall, B.F. and Sher, A. (1990). Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. *Journal of Immunology* 144, 2751–2756.

Pearce, E.J., MacDonald A.S. (2002). The Immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews* 2, 499-511.

Pollak, K. (1973). *Medicína dávných civilizací*. Orbis, Praha 1973, 130-135.

- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. (2004). Introduction: The clans and families of cysteine peptidases. In: Barrett, Rawlings, Woessner, (Eds.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1051–1071.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., Barrett, A.J. (2008). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research* 36, 320–325.
- Ross, A. G., P. B. Bartley, A. C. Sleight, G. R. Olds, Y. Li, G. M. Williams, D. P. McManus. (2002). Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine* 346, 1212–1220.
- Salafsky, B., Fusco, A.C. (1987). *Schistosoma mansoni*: a comparison of secreted vs nonsecreted eicosanoids in developing schistosomulae and adults. *Experimental Parasitology* 64, 361–367.
- Salter, J.P., Choe, Y., Albrecht, H., Franklin, C., Lim, K.C., Craik, C.S. (2002). Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 24618–24624.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 275, 38667–38673.
- Skelly, P. J., Wilson, R. A. (2003): Making sense of the schistosome surface. *Advances in Parasitology* 63, 187–288.
- Shi, F., Zhang, Y., Ye, P., Lin, J., Cai, Y., Shen, W., Bickle, Q.D. and Taylor, M.G. (2001). Laboratory and field evaluation of *Schistosoma japonicum* DNA vaccines in sheep and water buffalo in China. *Vaccine* 20, 462–467.
- Simurda, M. C., H. van Keulen, D. M. Rekosh, P. T. LoVerde. (1988). *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Experimental Parasitology* 67, 73–84.
- Sharma, J. N., Mohsin, S. S. J. (1990). The role of chemical mediators in the pathogenesis of inflammation with emphasis on the kinin system. *Experimental Pathology* 38, 73–96.
- Sauma, S.Y., Strand, M. (1990). Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Molecular and Biochemical Parasitology* 38, 199–209.
- Smithers, S.R., Hackett, F., Ali, P.O. and Simpson, A.J. (1989). Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. *Parasite Immunology* 11, 301–318.
- Smithers, S.R., Terry, R.J. and Hockley, D.J. (1969). Host antigens in schistosomiasis. *Proceedings of the Royal Society of London (B) Biological Sciences* 171, 483–494.
- Tavares, C.A., Soares, R.C., Coelho, P.M. and Gazzinelli, G. (1978). *Schistosoma mansoni*: evidence for a role of serum factors in protecting artificially transformed schistosomula against antibody-mediated killing in vitro. *Parasitology* 77, 225–243.

Treiber, G., Csepregi, A., Malfertheiner, P. (2005). The pathophysiology of portal hypertension. *Digestive Diseases* 23, 6–10.

Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H., Dalton, J.P. (1999) Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Advances in Parasitology* 43, 161–266.

Toy, L., Pettit, M., Wang, Y. F., Hedstrom, R. and McKerrow, J. H. (1987). The immune response to stage specific proteolytic enzymes of *Schistosoma mansoni*. In *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, vol. 60, *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*, 85-103. Alan R. Liss, Inc. N.Y.

Tran, M.H., Pearson, M.S., Bethony, J.M., Smyth D.J., Jones M.K., Duke M., Don T.A., McManus D.P., Correa-Oliveira R., Loukas A. (2006) Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis, *Natural Medicine* 12, 835-840.

Takahashi, T., Dehdarani, A.H., Yonezawa, S., Tang, J. (1986). Porcine spleen cathepsin B is an exopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 261, 9375–9381.

van Balkom, B.W., van Gestel, R.A., Brouwers, J.F., Krijgsveld, J., Tielens, A.G., Heck, A.J., van Hellemond, J.J. (2005). Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. *Journal of Proteome Research* 4, 958–966.

Wilson, R.A., Barnes, P.E. (1974b). The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. *Parasitology* 68, 239–258.

Wilson, R.A., Barnes, P.E. (1974a). An in vitro investigation of dynamic processes occurring in the schistosome tegument, using compounds known to disrupt secretory processes. *Parasitology* 68, 259–270.

Wilson, R.A., Draskau, T., Miller, P., Lawson, J.R. (1978). *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. *Parasitology* 77, 57–73.

Wright, M.D., Henkle, K.J. and Mitchell, G.F. (1990). An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *Journal of Immunology* 144, 3195–3200.

Waine, G.J., Alarcon, J.B., Qiu, C. and McManus, D.P. (1999). Genetic immunization of mice with DNA encoding the 23kDa transmembrane surface protein of *Schistosoma japonicum* (Sj23) induces antigen-specific immunoglobulin G antibodies. *Parasite Immunology* 21, 377–381.

Williamson, A.L., Brindley, P.J., Knox, D.P., Hotez, P.J., Loukas, A. (2003). Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology* 19, 417-423.

Yamamoto, T., Geodffrey Davis, C., Brown, M. S., Shneider, W. J., Caset, M. L., Goldstein, J. L. and Russel, D. W. (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39, 27-38.