

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

### GŁÓWNE PROTEAZY PRZYWR — CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I ROLA W BIOLOGII TYCH PASOŻYTÓW

MICHAŁ JARZĄBKOWSKI

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

**ABSTRACT. Significant proteases of flukes – molecular characteristic and their biological functions.** Proteases (peptide hydrolases) aside from known catabolic functions and protein processing play numerous roles in many tasks imposed by a parasitic life cycle; this includes parasite immunoevasion, excystment/encystment, tissue penetration and digestion of host tissue for nutrition. They have been identified in biological systems from viruses to vertebrates. Proteases are divided into four major groups on the basis of the catalytic mechanism used during the hydrolytic process – serine, aspartic, cysteine and metalloproteinases; other 'undefined' or cryptic proteases may also exist. There are a number of excellent reviews covering general parasite proteinases but by far the largest number of papers in the literature report on enzymes belonging to the papain superfamily of cysteine proteinases. It turns out, however, that although many different proteases have been characterized in parasitic helminths many of them have yet to be discovered.

**Key words:** cathepsin, fasciola, fluke, protease, schistosoma.

#### WSTĘP

Pasożytnictwo wielokrotnie występuje w ewolucji nawet bardzo odległych gatunków, lecz od zawsze spotyka na swej drodze podobne wyzwania. Pierwszym z nich jest inwazja żywiciela, następnie migracja do swoistego miejsca bytowania, co często wiąże się z pokonywaniem wielu przeszkód, takich jak przechodzenie przez tkanki żywiciela, zewnątrzkomórkową macierz czy ściany naczyń krwionośnych i limfatycznych. Przez cały czas swego życia pasożyt zużywa substancje produkowane przez żywiciela musząc jednocześnie radzić sobie z fizykochemicznymi oraz immunologicznymi barierami rozwiniętymi przez żywiciela. Mechanizmy prezentowane przez różne pasożyty zadziwiają swoją odmiennością, jednak środki, którymi się posługują są, ze swej natury, silnie ograniczone. W tym świetle zupełnie nie dziwi fakt rozwinięcia przez pasożyty szeregu proteaz, głównych enzymów komórkowych procesów katabolicznych, w celu podołania wyzwaniom pasożytniczego stylu życia, czyli penetracji tkanek, trawienia tkanek w celach odżywczych

oraz unikania odpowiedzi immunologicznej (Tort i wsp. 1999).

Proteazy (hydrolazy peptydowe), enzymy katalizujące rozpad wiązania peptydowego w makrocząsteczkach białek oraz oligomerach peptydowych, zostały wykryte we wszystkich organizmach począwszy od wirusów a kończąc na kręgowcach. Bez biologicznego katalizatora, jakim są te enzymy, hydroliza wiązania peptydowego zajęłaby setki lat; w porównaniu proteaza jest w stanie przeprowadzić około miliona takich reakcji na sekundę. Rozmiary proteaz różnią się znacznie – od monomerów o masie ok. 10 kDa po wielocząsteczkowe kompleksy o masach dochodzących do kilkuset kDa. Ze względu na umiejscowienie katalizy można wyróżnić endoproteazy (rozpad wiązania następuje wewnątrz łańcucha peptydowego) oraz egzoproteazy (hydrolizują wiązania na N-terminalnym bądź C-terminalnym końcu łańcucha). Ze względu na mechanizm katalizy proteazy dzieli się na cztery główne grupy – proteazy cysteinowe, serynowe, aspartyłowe oraz metaloproteazy (Sajid i McKerrow 2002).

Wobec wciąż nasilającego się zjawiska lekooporności pasożytów nie dziwi fakt wielkiego zainteresowania protezami pasożytów jako celu nowej generacji chemioterapeutyków, bądź rozwinięcia skutecznych metod zapobiegania inwazjom przy użyciu nowej generacji szczepionek. Istnieje szereg doskonałych opracowań dotyczących ogólnie proteaz pasożytniczych lub koncentrujących się na danym gatunku pasożyta. W niniejszym artykule skoncentrowano się na głównych protezach pasożytniczych płazińców.

#### PROTEAZY CYSTEINOWE

Proteazy cysteinowe pasożytów zostały podzielone na dwie główne gałęzie nazywane klanami, CA oraz CD. Pierwsza proteaza cysteinowa została wyizolowana w roku 1879 z owocu papai (*Carica papaya*). Wraz z odkryciem nowych proteaz o podobnej sekwencji, grupa została nazwana papainami a obecnie proteazami klanu CA, który także dzieli się na rodziny. Pasożytnicze proteazy o trudnym do przeniesienia znaczeniu znajdują się głównie w rodzinie C1 (katepsyny B i katepsyny L) oraz w rodzinie C2 (kalpainy). Wśród innych klanów wyróżnia się klany CB i CC (proteazy wirusowe) oraz klan CD (rodzina C13, leguminy). Przynależność do klanu i rodziny określa się na podstawie podobieństw w sekwencji, posiadania pętli peptydowych oraz biochemicznej specyficzności wobec małych substratów peptydowych (Sajid i McKerrow 2002).

#### Katepsyny B

U *Schistosoma mansoni* najbardziej obficie występującą proteazą z rodziny papain jest katepsyna B (SmCB1, SjCB1 u *Schistosoma japonicum*) wykrywana zarówno w jelicie jak i w somatycznych ekstraktach. Gen SmCB1 koduje sekwencję

sygnałową, proregion oraz domenę katalityczną (łącznie 340 aminokwasów). Natywny zymogen zostaje poddany obróbce do aktywnego enzymu o masie 31 kDa (250 aminokwasów). Do aktywacji enzymu jest niezbędna katepsyna D (SmAE – endopeptydaza asparaginylowa) aktywująca SmCB1 w pozycji *in trans*. Wydzielany jest do światła jelita dorosłych pasożytów jak i znajdujący w komórkach gastrodermalnych. SmCB1 występuje w dwóch izoformach: SmCB1.1 (GeneBank AJ506157) oraz SmCB1.2 (GeneBank AJ506158). W optymalnym pH 5,5-6,0 trawi hemoglobinę (główne źródło aminokwasów dorosłych schistosom) w kilku miejscach, z których głównym jest tak zwany „region zawiasowy” stabilizujący tetrameryczną strukturę hemoglobiny. Oprócz tego trawione są albuminy surowicy, przeciwciała IgG oraz  $\alpha$ -2 makroglobulina (Sajid i wsp. 2003).

Obecność katepsyny B u *Fasciola hepatica* została po raz pierwszy potwierdzona przez McGinty'ego i wsp. w 1993. Wilson i wsp. (1998) stwierdzili, że choć głównymi proteazami sekrecyjnymi postaci dorosłych są katepsyny L, w przypadku NEJ (newly excysted juvenile) główna aktywność proteolityczna opiera się na katepsynie B o masie 29 kDa i optymalnym pH 7,5. Enzym zlokalizowano w komórkach epitelialnych jelita NEJ (Creaney i wsp. 1996). Biologiczne funkcje tej proteazy u *F. hepatica* pozostają niejasne, jednakże obserwacje stwierdzające wydzielanie FhCatB we wczesnym stadium migracyjnym motylcy wątrobowej i trwające aż do piątego tygodnia po inwazji sugerują zaangażowanie jej w proces ekscytacji i/lub migrację formy młodocianej poprzez tkanki żywiciela (Wilson i wsp. 1998).

Proenzym liczy 339 aminokwasów, forma aktywna zawiera 254 aminokwasy i cechuje się wysokim podobieństwem do pasożytniczych i ssaczych katepsyn B, jakkolwiek stwierdzono brak jednej z dwóch konserwatywnych histydyn wymaganych do aktywności egzopeptydazy. Porównanie sekwencji wskazuje na brak histydyny w pozycji 111 (Law i wsp. 2003).

Dwa fakty wskazują na istotność tego enzymu w procesach zasiedlania żywiciela. Po pierwsze ekspresja FhCatB zostaje zatrzymana u młodocianych form motylcy atenuowanych metodą radiacyjną (Creaney i wsp. 1996). Po drugie inkubacja młodocianych motylic z inhibitorem katepsyny B zabija pasożyta w ciągu 24 godzin (Beckham i wsp. niepublikowane). Wobec powyższego FhCatB może być istotnym elementem do opracowania nowoczesnych terapii zapobiegających infekcji.

## Katepsyny L

*Schistosoma masoni*, zarówno jak i *Schistosoma japonicum*, syntetyzuje i wydziela dwie różne proteazy cysteinowe zaliczane do grupy katepsyn L biorące udział w odżywianiu tych pasożytów. Aktywność tych enzymów, nazwanych SmCL1 i SmCL2 w przypadku *S. masoni* oraz SjCL1 i SjCL2 dla drugiego gatunku, jest dominująca w ekstraktach z jaj, miracydiów, schistosomul i postaci doro-

słych, i jest ponad dwukrotnie większa w optymalnym pH (5,2-6,2) niż aktywność katepsyny B. Ponadto specyficzna aktywność katepsyn L w przypadku ekstraktów z samic jest 50-100 % większa niż w przypadku osobników męskich. Oba enzymy wykazują niewielkie podobieństwo do siebie (44%), przy czym SmCL2 wykazuje większe podobieństwo (52%) do ludzkiej katepsyny B (Dalton i wsp. 1996).

Kompletny transkrypt w przypadku SmCL1 koduje preproenzym o długości 319 aminokwasów wliczając w to 96 pozycji peptydu sygnałowego i 215 dla dojrzałego enzymu, którego masa wynosi 24,3 kDa. Jakkolwiek optymalne pH mieści się w zakresie 5,2-6,2 aktywność tej proteazy może zostać zmierzona w pH znacznie niższym (ok. 4,5), gdy aktywność katepsyny B znacznie spada (Dalton i wsp. 1996)

Preprokatepsyna SmCL2 składa się z 330 aminokwasów z czego 18 stanowi peptyd sygnałowy, 97 to propeptyd, natomiast dojrzały enzym zawiera 215 aminokwasów o łącznej masie 24,3 kDa. Optymalne pH, podobnie jak w przypadku SmCL2, wynosi 5,2 – 6,2 (Dalton i wsp. 1996).

Biorąc pod uwagę wysoki poziom różnic w sekwencji obu enzymów jak i posiadania przez nie potencjalnych miejsc glikozylacji (trzy dla SmCL1 i żadnego dla SmCL2) sugerowano, że pełnią one zupełnie różne funkcje (Dalton i wsp. 1996). Późniejsze badania nad specyficznością substratową wykazały jednak, że ogromne różnice w sekwencji (Rys 1) nie przekładają się na tak wyraźne zróżnicowanie profili enzymatycznych (Brady i wsp. 2000).

Katepsyny L są głównymi enzymami proteolitycznymi syntetyzowanymi przez dorosłe formy *Fasciola hepatica*. Biorą one udział w trawieniu tkanek żywiciela, odżywianiu oraz unikaniu odpowiedzi immunologicznej. W wypadku form młodocianych wydaje się, że ekspresja jest ograniczona do dwóch tylko genów, natomiast u form dorosłych co najmniej siedem różnych katepsyn L ulega ekspresji, a wśród nich wyróżnia się dwie główne: FheCL1 (27 kDa) oraz FheCL2 (29,5 kDa) (Dalton i wsp. 2003). Charakteryzują się one dużym zakresem optymalnego pH (3,0-8,0) i wykazują się wysoką stabilnością – po inkubacji w 37°C przez 24 godziny FheCL1 zachowuje 100% swojej aktywności (Dowd i wsp. 2000). Stwierdzono różnice w specyficzności substratowej – FheCL2 jest w stanie trawić substraty z proliną w pozycji P<sub>2</sub> w odróżnieniu od FheCL1 (Dowd i wsp. 1994, 1997). Doświadczenia immunolokalizacyjne jak i hybrydyzacja *in situ* wykazały, że praktycznie całość ekspresji genów tych enzymów odbywa się w komórkach epitelialnych jelita, a następnie produkty ulegają sekrecji do światła jelita, gdzie odbywa się trawienie spożytych tkanek i krwi żywiciela (Tort i wsp. 1999). Zawartość ślepego jelita motyli cy jest opróżniana średnio co trzy godziny, w związku z tym wydzielane proteazy wchodzą w kontakt z tkankami żywiciela biorąc udział w powstaniu traktu migracyjnego. Wykazano, iż katepsyny L motyli cy wątrobowej efektywnie trawią fibronektynę, laminę oraz natywny kolagen (Berasain i wsp. 1997). Zostało także dowiedzione, że enzymy te precyzyjnie trawią immunoglobuliny w regionie zawiasowym (oddzielając fragment Fc od fragmentów Fab), przez co zapobiegają przyleganiu

1	60						
	SmCL1		VVVQAAPN	EKPQ-FEPFS	<b>DELIHYINEK</b>	SGASWKAAPS	SRFINIEHFK
	SmCL2	MLTSILCIAS	LITFLEAHIS	<b>VKNEKFEPLS</b>	<b>DDIISYINEH</b>	PNAGWRAEKS	NRFHSLDDAR
	FheCL1		MRLFILA	<b>VLTVGVLSGN</b>	<b>DDLWHQWKRM</b>	YNKEYNGADD	<b>QHRRNWEKN</b>
	FheCL2		MRCFVLA	<b>VLTVGVYASN</b>	<b>DDLWHQWKRI</b>	YNKEYNGADD	<b>EHRRNWGN</b>
	khrtl	MTPLL	LLAVLCLGTA	LATPKFDQTF	<b>NAQWHHWKST</b>	HRRLYGTNEE	<b>EWRRAVWEKN</b>
	hum	VMNPTL	ILAAFCLGIA	SATLTFDHSL	<b>EAQWTKWKAM</b>	HNRLYGMNEE	<b>GWRRAVWEKN</b>
	61						120
	SmCL1	<b>QHLGLEETP</b>	EERQTRRPTV	RYNVSDNDLP	<b>ESFDAREKWP</b>	LCRSIRQIPD	<b>QSSCGSCWAV</b>
	SmCL2	<b>IQMGARREEP</b>	DLRRKRRPTV	DHNDWNVEIP	<b>SNFDSRKKWP</b>	<b>GCKSIATIRD</b>	<b>QSRCGSCWSF</b>
	FheCL1	<b>VKHIQEHNLR</b>	HDLGLVTTYL	GLNQFTDMTF	<b>EEFKAKYLTE</b>	MSRA-----S	DILSHGVPE
	FheCL2	<b>VKHIQEHNLR</b>	HDLGLVTYKL	GLNQFTDLTF	<b>EEFKAKYLIE</b>	IPRS-----S	ELLSRGIPFK
	khrtl	<b>MRMIQLHNGE</b>	YSNGKHGFTM	EMNAFGDMTN	<b>EEFRQ--IVN</b>	<b>GYRH-----Q</b>	<b>KHKKGRLFQE</b>
	hum	<b>MKMIELHNQE</b>	YREGKHSFTM	AMNAFGDMTS	<b>EEFRQ--VMN</b>	<b>GFQN-----R</b>	<b>KPRKGKVFQE</b>
	121						180
	SmCL1	<b>AGVGAMSDRV</b>	CIHSNGMMQP	ELSAIDLVSC	<b>CSYCGNGCQG</b>	GSPPAAWDYW	WRNGIVTGGT
	SmCL2	<b>GAVEAMSDRS</b>	CIQSGGKQNV	ELSAVDLLTC	<b>CESCGLGCEG</b>	GILGPAWDYW	VKEGIVTASS
	FheCL1	<b>ANNRAVPDKI</b>	DWRESGYVTE	<b>VKDQGNCGSC</b>	<b>WAFSTTGME</b>	GQYMKNERTS	<b>ISFSEQQLVD</b>
	FheCL2	<b>ANKLAVPESI</b>	DWRDYYYVTE	<b>VKNQGQCGSC</b>	<b>WAFSTTGAVE</b>	GQFRKNERAS	<b>ASFSEQQLVD</b>
	khrtl	<b>PLMLQIPKTV</b>	DWREKGCVTP	<b>VKNQGQCGSC</b>	<b>WAFSASGLE</b>	GQMFLKTGKL	<b>ISLSEQNLVD</b>
	hum	<b>PLFYEA PRSV</b>	DWREKGYVTP	<b>VKNQGQCGSC</b>	<b>WAFSATGALE</b>	GQMFRTGRL	<b>ISLSEQNLVD</b>
	181						240
	SmCL1	<b>LENPTGCLPY</b>	PFPQCRHPSG	RSQLNPCPRY	TYPTPSCYPY	<b>CQAGYDKTYE</b>	<b>KDKVYGKTSY</b>
	SmCL2	<b>KENHTGCEPY</b>	PFPKCEHH-T	KGKYPPCGSK	IYNTPRCKQT	<b>CQRKYKTPYT</b>	<b>QDKHRGKSSY</b>
	FheCL1	<b>CSRPGWNGC</b>	GGGLMENAYQ	<b>YLKQFG-LET</b>	<b>ESSYPYTAVG</b>	<b>GQCRYNKQLG</b>	<b>VAKVTGYTIV</b>
	FheCL2	<b>CPRDLGNYGC</b>	GGGYMENAYE	<b>YLKHNG-LET</b>	<b>ESYYPYQAVE</b>	GPCQYDGRLA	<b>YAKVTGYTIV</b>
	khrtl	<b>CSHDQGNQGC</b>	NGGLMDFAFQ	<b>YIKENGLDS</b>	<b>EESYPYEAKD</b>	GSCKYRAEYA	<b>VANDTGFVDI</b>
	hum	<b>CSGPQNEGC</b>	NGGLMDYAFQ	<b>YVQDNGGLDS</b>	<b>EESYPYEATE</b>	ESCKYNPKYS	<b>VANDTGFVDI</b>
	241						300
	SmCL1	<b>NVDRHEYTIM</b>	EEIMKNGPVE	AGFIV-YTDF	<b>AVYKSGIYHH</b>	VSGRYAG-KH	<b>AIRIIGWVE</b>
	SmCL2	<b>NVKNDEKAIQ</b>	KEIMKYGPVE	ASFTV-YEDF	<b>LNKSGIYKH</b>	ITGEALG-GH	<b>AIRIIGWVE</b>
	FheCL1	<b>Q-SGSEVELK</b>	NLIGSEGPSA	<b>VAVDV-ESDF</b>	<b>MMYRSGIYQS</b>	QTCSPLRVNH	<b>AVLAVGYGTQ</b>
	FheCL2	<b>H-SGDEIELK</b>	NLVGTEGPAA	<b>VALDA-DSDF</b>	<b>MMYQSGIYQS</b>	QTCLPDRLTH	<b>AVLAVGYGSQ</b>
	khrtl	<b>P-Q-QEKALM</b>	KAVATVGPIS	<b>VAMDASHPSL</b>	<b>QFYSSGIYYE</b>	PNCSSKLDH	<b>GVLVVGYGYE</b>
	hum	<b>P-K-QEKALM</b>	KAVATVGPIS	<b>VAIDAGHESF</b>	<b>LFYKEGIYFE</b>	PDCSSEDMDH	<b>GVLVVGYGFE</b>
	301						357
	SmCL1	<b>----NGVKYW</b>	LTANSWNVGW	<b>GENGYFRILR</b>	GT-DECRIES	IVVAGMPRLQ	KNITNHH
	SmCL2	<b>----NKTPYW</b>	LIANSWNEDW	<b>GENGYFRIVR</b>	GR-DECSIES	EVIAGRIN	
	FheCL1	<b>----GGTDYW</b>	IVKNSWGLSW	<b>GERGYIRMVR</b>	NRGNMCGIAS	LASLPMVARF	P
	FheCL2	<b>----DGTDYW</b>	IVKNSWGTWW	<b>GEDGYIRFAR</b>	NRGNMCGIAS	LASVPMVARF	P
	khrtl	<b>GTDSNKDKYW</b>	LVKNSWGKEW	<b>GMDGYIKIAK</b>	DRNNHCGLAT	AASYPIVN	
	hum	<b>STESDNNKYW</b>	LVKNSWGEW	<b>GMGGYVKMAK</b>	DRNNHCGLAT	AASYPTV	

Rys. 1 Porównanie sekwencji aminokwasowej proteaz z rodziny katepsyn L (SmCL1 i SmCL2 – proteazy *Schistosoma masoni*, FheCL1 oraz FheCL2 – proteazy *Fasciola hepatica*, khrtl – proteaza szczura, hum – katepsyna L człowieka). Aminokwasy o wysokim podobieństwie zostały wyróżnione czcionką pogrubioną. Porównanie zostało wykonane przez autora z wykorzystaniem programu MultiAlign (Multiple Sequence Alignment by F. Corpet 1988) dostępnego pod adresem: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

eozynofili do powierzchni pasożyta, pomagając tym samym w obronie przed atakiem immunologicznym (Carmona i wsp. 1993, Smith i wsp. 1993, Berasain i wsp. 1997). Ostatnio Dalton i wsp. (2003) wykazali udział wydzielanych katepsyn L w supresji i/lub modulacji odpowiedzi immunologicznej Th1-zależnej oraz wzbudzaniu nieprotekcynnej odpowiedzi zależnej od Th2.

#### PROTEAZY ASPARTYLOWE/ASPARAGINIANOWE

##### Katepsyny D

Schistosomy używają hemoglobiny zawartej w erytrocytach jako głównego źródła aminokwasów, ale rola poszczególnych proteaz w degradacji hemoglobiny pozostaje wciąż niejasna i jest sprawą dość kontrowersyjną. Od dłuższego czasu główną rolę w tym procesie przypisywano katepsynie B oraz proteazie asparaginylowej, jednakże wyniki ostatnich badań podważają to założenie. Po pierwsze aktywność hemoglobinolityczna odnosząca się do proteazy aspartylowej zdecydowanie przeważa w ekstraktach w środowisku kwaśnym; po drugie powinowactwo katepsyny B jest dość niskie, natomiast specyficzna aktywność proteazy asparaginylowej jest zdecydowanie zbyt niska, aby podołać rozkładowi tak wielkiej ilości erytrocytów, które pasożyt pożera (Brindley i wsp. 2001).

Katepsynę D wyizolowano i scharakteryzowano zarówno u *Schistosoma japonicum* jak i *Schistosoma mansoni*. Gen pierwszej z nich koduje zymogen o długości 424 aminokwasów, na który składa się peptyd sygnałowy o długości 14 i propeptyd posiadający 37 aminokwasów – dojrzały enzym to 373 aminokwasy. Homologiczny enzym u *S. mansoni* posiada 428 aminokwasów (peptyd sygnałowy – 14, propeptyd – 37, dojrzały enzym – 377 aminokwasów). Masa obydwu homologów jest podobna i wynosi około 41 kDa (Wong i wsp. 1997).

Immunolokalizacja katepsyny D u dorosłych form schistosom wykazała jej obecność w komórkach gastrodermalnych wyściełających jelito pasożytów; zdecydowanie większą ekspresję wykryto u samic w porównaniu z samcami. Aktywność hemoglobinolityczną stwierdzono w pH 2,5-5,1 przy optimum w pH 3,6, gdzie hemoglobina zostaje strawiona na kilkanaście różnej długości oligopeptydów (SjAsp trawi hemoglobinę w 13 miejscach natomiast SmAsp w 15). Wydaje się, że hemoglobina jest naturalnym substratem dla katepsyny D, jakkolwiek konieczny jest późniejszy udział innych enzymów proteolitycznych (Brindley i wsp. 2001).

Pomimo starań autor nie odnalazł ani jednej wzmianki o proteazach aspartylowych motylicy wątrobowej.

#### PROTEAZY SERYNOWE

Jednym z dominujących białek znajdujących się w wydzielinach cercarii (*Schi-*

*stosoma* sp.) jest proteaza serynowa (zwana elastazą) wydzielana przez komórki acetabularne w odpowiedzi na kontakt z lipidami skórnymi. Jest to enzym o masie od 28 kDa (Ghendler i wsp. 1996) do 30 kDa (McKerrow i wsp. 1985) o punkcie izoelektrycznym wynoszącym 8 i wykazujący maksymalną aktywność w pH 9. Elastaza wykazuje aktywność wobec elastyny, fibronektyny, keratyny oraz kolagenu typu czwartego (McKerrow i wsp. 1985). Znanych jest kilka specyficznych inhibitorów elastazy; z ich wykorzystaniem przeprowadzane są badania mające na celu zablokowanie penetracji skóry przez cerkarie (Kee-Chong i wsp. 1999).

Dotychczas nie wyizolowano proteaz serynowych motylicy wątrobowej. Dlatego też w Zakładzie Parazytologii i Inwazjologii SGGW prowadzone są obecnie prace nad klonowaniem proteaz serynowych i metaloproteaz tej przywry.

#### PODZIĘKOWANIA

Autor dziękuje prof. dr hab. Halinie Wędrychowicz za wskazanie tematu i weryfikację manuskryptu.

#### LITERATURA

- Berasin P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J.P., Frangione B., Carmona C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Parasitology* 83: 1-5.
- Brady C.P., Brinkmorth R.I., Dalton J.P., Dowd A.J., Verity Ch.K., Brindley P.J. 2000. Molecular modeling and substrate specificity of discrete cruzipain-like and cathepsin L-like cysteine proteinases of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 380: 46-55.
- Brindley P.J., Kalinna B.H., Wong J.Y.M., Bogitsh B.J., King L.T., Smyth D.J., Verity Ch.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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112: 103-112.
- Carmona C., McGonigle S., Dowd A.J., Smith A.M., Dalton J.P. 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* *in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62: 9-18.
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890.
- Creaney J., Wilson L., Dosen M., Sandeman M., Spithill T.W., Parson J.C. 1996. *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology* 83: 202-215.
- Dalton J.P., Cough K.A., Jones M.K., Brindley P.J. 1996. Characterization of the cathepsin-like proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity* 64: 1328-1334.
- Dalton J.P., Neill S.O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moire N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A.G., Donnelly S.M. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal of Parasitology* 33: 1173-1181.
- Dowd A.J., Dooley M., Fagain C., Dalton J.P. 2000. Stability studies on the cathepsin L proteinase of

- the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. *Enzyme Microbiology Technology* 27: 599-604.
- Dowd A.J., Smith A.M., McGongle S., Dalton J.P. 1994. Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the trematode *Fasciola hepatica*. *European Journal of Biochemistry* 223: 91-98.
- Dowd A.J., Tort J., Roche L., Ryan T., Dalton J.P. 1997. Isolation of cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88: 163-174.
- Ghendler Y., Parizade M., Arnon R., McKerrow J.H., Fishelson Z. 1996. *Schistosoma mansoni*: evidence for a 28-kDa membrane-anchored protease on schistosomula. *Experimental Parasitology* 83: 73-82.
- Kee-Chong L., Sun E., Bahgat M., Bucks D., Guy R., Hinz R.S., Cullander Ch., McKerrow J.H. 1999. Blockage of skin invasion by schistosome cercariae by serine protease inhibitors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 487-492.
- Law R.H.P., Smooker P.M., Irving J.A., Piedrafita D., Ponting R., Kennedy N.J., Whisstock J.C., Pike R.N., Spithill T.W. 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infection and Immunity* 71: 6921-6932.
- McGinty A., Moore M., Halton D.W., Walker B. 1993. Characterization of the cysteine proteinases of the common liver fluke *Fasciola hepatica* using novel, active-site directed affinity labels. *Parasitology* 106: 487-493.
- McKerrow J.H., Pino-Heiss S., Lindquist R., Werb Z. 1985. Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* 260: 3703-3707.
- Sajid M., McKerrow J.H. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 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 Ch., 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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 131: 65-75.
- Smith A.M., Dowd A.J., Heffernan M., Robertson C.D., Dalton J.P. 1993. *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *International Journal for Parasitology* 23: 977-983.
- 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.
- Wilson L.R., Good R.T., Panaccio M., Wijffels G.L., Sandeman R.M., Spithill T.W. 1998. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology* 88: 85-94.
- Wong J.Y.M., Harrop S.A., Day S.R., Brindley P.J. 1997. Schistosomes express two forms of cathepsin D. *Biochimica et Biophysica Acta* 1338: 156-160.