

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BIOCHEMIE



**STUDIUM ASPARTÁTOVÝCH PROTEAS PATOGENNÍCH KVASINEK
A RETROVIRŮ**

HABILITAČNÍ PRÁCE

PRAHA 2018

RNDr. OLGA HEIDINGSFELD, CSc.

Obsah

Studium aspartátových proteas patogenních kvasinek a retrovirů	
Komentář k souboru publikací.....	1
Komentář k Bloku I - Retrovirové proteasy a „processing“ retrovirových polyproteinů	3
Komentář k Bloku II - Sekretované aspartátové proteasy patogenních kvasinek rodu <i>Candida</i>. ...	11
Komentář k Bloku III - Strukturní analýza sekretovaných aspartátových proteas patogenní kvasinky <i>Candida parapsilosis</i>	25
Komentář k Bloku IV - Vakuolární proteasy patogenní kvasinky <i>Candida albicans</i>	32
Komentář k Bloku V – Různé.	39
Závěr	47
Reference	49
Blok I Retrovirové proteasy a „processing“ retrovirových polyproteinů	54
I-1 Andreánsky,M., Hrušková-Heidingsfeldová,O., Sedláček,J., Konvalinka,J., Bláha,I., Ječmen,P., Hořejší,M., Štrop,P. and Fábry,M. (1991) High-level expression of enzymatically active bovine leukemia virus proteinase in <i>E.coli</i> . FEBS Lett. 287, 127-132.....	55
I-2 Hrušková-Heidingsfeldová,O., Andreánsky,M., Fábry,M., Bláha,I., Štrop,P. and Hunter,E. (1995) Cloning, bacterial expression and characterization of the Mason Pfizer monkey virus proteinase. J. Biol. Chem. 270, 15053-15058.....	60
I-3 Hrušková-Heidingsfeldová,O. (1995) Proteins of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia viruses. Folia Biologica (Prague) 41, 201-212.....	67
I-4 Konvalinka,J., Heuser,A.-M., Hrušková-Heidingsfeldová,O., Vogt,V.M., Sedláček,J., Štrop,P. and Krausslich,H.-G. (1995) Proteolytic processing of particle-associated polyprotein by homologous and heterologous viral proteinases. Eur. J. Biochem. 228, 191-198.....	80
I-5 Hrušková-Heidingsfeldová,O., Bláha,I., Urban,J., Štrop,P. and Pichová,I (1997). Substrates and inhibitors of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proteinase. Leukemia 11, S3.....	89

I-6 Zábranský,A., Andreánsky,M., Hrušková-Heidingsfeldová,O., Havlíček,V., Hunter,E., Ruml,T. and Pichová,I. (1998). Three active forms of aspartic proteinase from Mason-Pfizer Monkey virus. *Virology* 245, 250-256.....**93**

I-7 Snášel, J., Schoeman,R., Hořejší,M., Hrušková-Heidingsfeldová,O., Sedláček,J., Ruml,T. and Pichová,I. (2000). Cleavage of vimentin by different retroviral proteases. *Arch.Biochem.Biophys.* 377, 241-245.....**101**

Blok II – Sekretované aspartátové proteasy patogenních kvasinek rodu *Candida*107

II-1 Hrušková-Heidingsfeldová, O., Dostál, J., Hamal, P., Pazlarová, J., Ruml,T. and Pichová, I. (2001) Enzymological characterization of secreted proteinases from *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 1707-1719.....**108**

II-2 Pichová,I., Pavlíčková,L., Dostál,J., Dolejší,E., Hrušková-Heidingsfeldová,O., Weber,J., Ruml,T. and Souček,M. (2001).Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 268, 2669-2677.....**122**

II-3 Dostál, J., Hamal, P., Pavlíčková, L., Souček, M., Ruml, T., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2003) Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J. Clin. Microbiol.* 41, 712-716.....**132**

II-4 Hamal, P., Dostál, J., Raclavský, V., Krylová, M., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2004) Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. *Folia Microbiol.* 49, 491-496..... **138**

II-5 Dostál, J., Dlouhá, H., Maloň, P., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2005) The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol. Chem.* 386, 791-799..... **145**

II-6 Merkerová, M., Dostál, J., Hradilek, M., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2006) Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res.* 6, 1018-1026.....**155**

II-7 Majer, F., Pavlíčková, L., Majer, P., Hradilek, M., Dolejší, E., Hrušková-Heidingsfeldová, O. and Pichová, I. (2006) Structure-based specificity mapping of secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis* using peptidomimetic inhibitors and homology modeling. *Biol.Chem.* 387, 1247-1254.....**165**

II-8 Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2008) Secreted proteins of <i>Candida albicans</i> . Front Biosci 13, 7227-42.....	174
II-9 Hrušková-Heidingsfeldová, O., Dostál, J., Havlíková, J., Hradilek, M. and Pichová, I. (2009) Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast <i>Candida parapsilosis</i> differ in the expression pattern and catalytic properties. Biol. Chem. 390, 259-268.....	191
II-10 Vinterová, Z., Bauerová, V., Dostál, J., Sychrová, H., Hrušková-Heidingsfeldová, O. and Pichová, I. (2013) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> can secrete Sapp1p proteinase of <i>Candida parapsilosis</i> but cannot use it for efficient nitrogen acquisition. J. Microbiol 51, 336-344.....	202
II-11 Dostál, J., Merkerová, M., Vinterová, Z., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2015) Two <i>SAPP2</i> gene homologs are present in <i>Candida parapsilosis</i> genome. Folia Microbiol. 60, 373-374.....	212
Blok III- Strukturní analýza sekretovaných aspartátových proteas patogenní kvasinky <i>Candida parapsilosis</i>	215
III -1 Dostál, J., Brynda, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Siegllová, I., Pichová, I. and Řezáčová, P. (2009) The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from <i>Candida parapsilosis</i> in complex with pepstatin A. J. Struct. Biol. 167, 145-152.....	216
III- 2 Dostál, J., Brynda, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Páchl, P., Pichová, I. and Řezáčová, P. (2012) The crystal structure of protease Sapp1p from <i>Candida parapsilosis</i> in complex with the HIV protease inhibitor ritonavir. J. Enz. Inhibit. Med Chem. 27, 160-165.....	226
III- 3 Dostál, J., Pecina, A., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Marečková, L., Pichová, I., Řezáčková, P., Lepšík, M. and Brynda, J. (2015) Atomic resolution crystal structure of Sapp2p, a secreted aspartic protease from <i>Candida parapsilosis</i> . Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 71, 2494-2504.....	233
III-4 Vinterová, Z., Šanda, M., Dostál, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O. and Pichová, I. (2011) Evidence for the presence of proteolytically active secreted aspartic proteinase 1 of <i>Candida parapsilosis</i> in the cell wall. Protein Sci. 20, 2004-2012.....	246
Blok IV – Vakuolární proteasy patogenní kvasinky <i>Candida albicans</i>	256

IV-1	Bauerová, V., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2012) Nitrogen source and growth stage of <i>Candida albicans</i> influence expression level of vacuolar aspartic protease Apr1p and carboxypeptidase Cpy1p. <i>Can.J.Microbiol.</i> 58, 678-681.....	257
IV-2	Bauerová, V., Hájek, M., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2014) Intracellular aspartic proteinase Apr1p of <i>Candida albicans</i> is required for morphological transition under nitrogen-limited conditions but not for macrophage killing. <i>Folia Microbiol.</i> 59, 485-93.....	262
IV-3	Bauerová, V., Vinterová, Z., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2011) Intracellular and extracellular aspartic proteinases of pathogenic <i>Candida</i> species: Can their inhibitors be further developed? <i>Current Enzyme Inhibition</i> 7, 125-129.....	272
IV-4	Bauerová, V., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2013) Fungal gene-encoded peptidase inhibitors. <i>Curr. Med. Chem.</i> 20, 3041-3048.....	278
Blok V - Různé		286
V-1	Zheng, B., Halperin, T., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Adam, Z. and Clarke, A.K. (2002) Characterization of chloroplast Clp proteins in <i>Arabidopsis</i> : Localization, tissue specificity and stress responses. <i>Physiol. Plantarum</i> 114, 92-101.....	287
V-2	Bednářová, L., Palacký, J., Bauerová, V., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Pichová, I. and Mojžeš, P. (2012) Raman microspectroscopy of the yeast vacuoles. <i>Spectroscopy: An International Journal</i> 27, 503-507.....	298
V-3	Buček, A., Matoušková, P., Sychrová, H., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2014) Δ 12-fatty acid desaturase from <i>Candida parapsilosis</i> is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids. <i>PLoS ONE</i> 9(3): e93322. doi:10.1371/journal.pone.0093322.....	304

Studium aspartátových proteas patogenních kvasinek a retrovirů

Komentář k souboru publikací

Proteosyntéza v přírodě probíhá podle našich dosavadních znalostí jen jedním způsobem: translací mRNA na ribosomech. K degradaci proteinů však dochází mnoha způsoby a na mnoha místech. Mohou ji zajišťovat jednotlivé enzymy, proteolytické kaskády, anebo komplex složený z mnoha podjednotek a využívající ATP – proteasom. Podstatou štěpení peptidových vazeb je sice vždy nukleofilní atak, ale konkrétní katalytické mechanismy se liší. V literatuře jsou enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu označovány jako proteasy, proteinasy nebo peptidasy. V následujícím textu se přidržím termínu proteasa.

Souhrnné informace o proteasách jsou shromážděny v databázi MEROPS. Její vydání z 24. 5. 2017 uvádí, že při klasifikaci podle katalytického mechanismu můžeme rozlišit 9 rodin proteas: aspartátové, cysteinové, glutamátové, serinové, treoninové, asparagínové, metaloproteasy, proteasy se smíšeným katalytickým mechanismem a proteasy s nejasným mechanismem účinku. Proteasy dále dělíme podle toho, štěpí-li uprostřed nebo od konce peptidového řetězce, na endo- a exo-peptidasy, a ty pak na aminopeptidasy a karboxypeptidasy.

Za hlavní úlohu proteas byla dlouho považována degradace proteinů coby nutrientů. Jejich význam je však mnohem širší. Podílejí se například na řízeném odstraňování poškozených proteinů, udržování či přestavbách proteomu, na „turnoveru“ proteinů v buňce a na dynamice extracelulární matrix. Proteolytické štěpení má v řadě případů také regulační roli. Známým příkladem je aktivace peptidových hormonů nebo aktivace jednotlivých článků hemokoagulační kaskády. Proteolytické štěpení lze také chápat jako předávání signálu. Jedná se ovšem o signál založený na ireverzibilní změně.

Proteasy mohou hrát roli digestivní nebo procesivní, tj. buď nespecificky degradovat proteiny na směs krátkých peptidů, nebo štěpit konkrétní proteiny či peptidy ve zcela specifických místech a tím měnit jejich vlastnosti. Proteasy jsou nezbytné pro fungování veškerých organismů a dokonce virů. V lidském genomu představují geny pro proteasy asi 2 % kódujících sekvencí. U infekčních organismů (bakterie, viry, paraziti) je to zpravidla 1-5 %. Kontrola exprese proteas nebo jejich enzymové aktivity může být místem terapeutického zásahu, což je jeden z hlavních důvodů intenzivního studia těchto enzymů.

Předkládaná práce se zabývá zejména aspartátovými proteasami retrovirů a patogenních kvasinek. Jedná se o soubor 29 publikací vzniklých v letech 1991-2015, rozdělených do pěti

tematických bloků. Aspartátové proteasy hrají zásadní roli při vzniku virových či kvasinkových infekcí. Hrají ji však velmi rozdílným způsobem. Retrovirové proteasy, jimž je věnován **Blok I**, katalyzují specifické štěpení konkrétních vazeb ve virových polyproteinech. Výsledkem je vznik funkčních proteinů, schopných vytvořit zralé virové částice. Publikace zahrnuté v **Bloku I** se týkají především heterologní exprese a následné charakterizace proteas viru hovězí leukemie, viru lidské leukemie T-buněk a Masonova-Pfizerova opičího viru.

Patogenní kvasinky mají rodiny sekretovaných proteas, jejichž specifita je naopak velmi široká, takže a mohou hydrolyzovat téměř libovolné proteiny v okolí kvasinkových buněk. Tím jednak zajišťují kvasince přísun nutrientů a jednak přispívají k degradaci bariér bránících v proliferaci. **Blok II** je věnován především enzymologické charakterizaci, případně analýze exprese sekretovaných aspartátových proteas patogenních kvasinek rodu *Candida*. V **Bloku III** jsou pak shrnuty výsledky strukturní analýzy dvou sekretovaných proteas kvasinky *Candida parapsilosis*.

Kvasinky však mají také vakuolární aspartátové proteasy, které jsou důležité v průběhu autofágie, účastní se recyklace nutrientů a adaptace na stres. Buňky patogenních kvasinek jsou vystaveny nutričnímu stresu například uvnitř makrofágů hostitele, a funkční vakuoly jim umožňují obrannou reakci hostitele přežít. **Blok IV** obsahuje dvě publikace týkající se vakuolární proteasy Apr1p patogenní kvasinky *Candida albicans*. Tento blok dále zahrnuje dva přehledové články zaměřené na intracelulární proteolýzu patogenních kvasinek.

Blok V je souborem tří prací, které se aspartátových proteas přímo netýkají, ale navazují na mnohaleté studium patogenních kvasinek nebo proteolýzy v obecném smyslu slova. První publikace **Bloku V** je věnována protease serinové, ATP-dependenční, lokalizované v chloroplastech rostlin. Poslední dvě publikace v předkládané práci se týkají desaturasy mastných kyselin kvasinky *Candida parapsilosis* a analýzy chemického obsahu vakuol kvasinky *Candida albicans* pomocí Ramanovy mikrospektroskopie.

Cílem překládaného souboru publikací je tedy shrnout výsledky mnohaleté práce, na níž jsem se podílela, zasadit je do kontextu současného poznání a ukázat, kde, zejména v oblasti studia patogenních kvasinek, otvírají předkládané výsledky cestu k dalšímu bádání.

Blok I - Retrovirové proteasy a „processing“ retrovirových polyproteinů

I-1 Andreánsky, M., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Sedláček, J., Konvalinka, J., Bláha, I., Ječmen, P., Hořejší, M., Štrop, P. and Fábry, M. (1991) High-level expression of enzymatically active bovine leukemia virus proteinase in *E.coli*. FEBS Lett. 287, 127-132.

Autorský podíl: 25 %

Purifikovala jsem proteázu, měřila kinetické konstanty a připravila odpovídající části publikace.

I-2 Hrušková-Heidingsfeldová, O., Andreánsky, M., Fábry, M., Bláha, I., Štrop, P. and Hunter, E. (1995) Cloning, bacterial expression and characterization of the Mason Pfizer monkey virus proteinase. J.Biol.Chem. 270, 15053-15058.

Autorský podíl: 33%

Podílela jsem se na přípravě vektoru, expresi, purifikaci a charakterizaci proteázy, měření kinetických konstant a přípravě publikace.

I-3 Hrušková-Heidingsfeldová, O. (1995) Proteins of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia viruses. Folia Biologica (Prague) 41, 201-212.

Autorský podíl: 100% (review)

I-4 Konvalinka, J., Heuser, A.-M., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Vogt, V.M., Sedláček, J., Štrop, P. and Krausslich, H.-G. (1995) Proteolytic processing of particle-associated polyprotein by homologous and heterologous viral proteinases. Eur.J.Biochem. 228, 191-198.

Autorský podíl: 10%

Připravila jsem některé proteázy použité ke štěpení virových polyproteinů.

I-5 Hrušková-Heidingsfeldová, O., Bláha, I., Urban, J., Štrop, P. and Pichová, I (1997) Substrates and inhibitors of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proteinase. Leukemia 11, S3.

Autorský podíl: 40 %

Purifikovala a aktivovala jsem proteázu, změřila kinetické konstanty a podílela se na přípravě publikace.

I-6 Zábranský, A., Andreánsky, M., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Havlíček, V., Hunter, E., Ruml, T. and Pichová, I. (1998) Three active forms of aspartic proteinase from Mason-Pfizer Monkey virus. *Virology* 245, 250-256.

Autorský podíl: 10%

Připravila jsem vzorky proteázy.

I-7 Snášel, J., Schoeman, R., Hořejší, M., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Sedláček, J., Ruml, T. and Pichová, I. (2000) Cleavage of vimentin by different retroviral proteases. *Arch.Biochem.Biophys.* 377, 241-245.

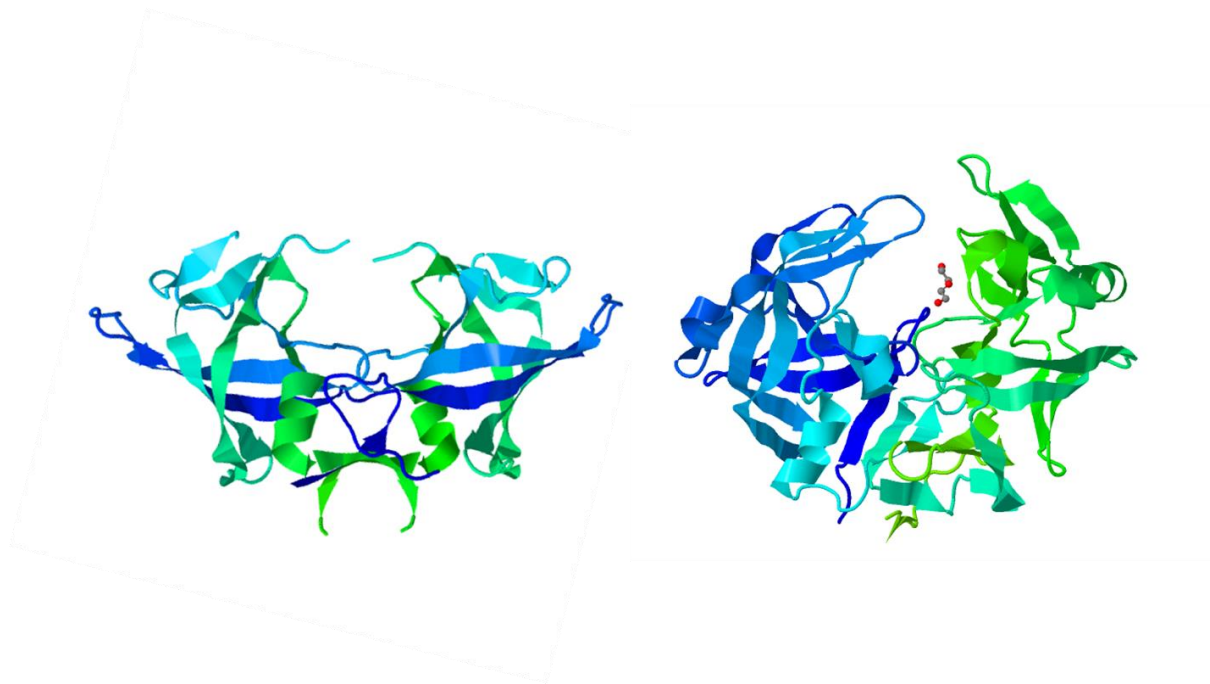
Autorský podíl: 10%

Připravila jsem vzorky proteáz.

Retrovirové proteasy dnes patří k nejlépe prostudovaným enzymům planety. Hrají klíčovou roli při vzniku zralých virových částic. Pokud proteasa správným způsobem nerozštěpí virové polyproteiny, vzniknou nezralé virové částice, které nedokážou další buňky infikovat. Inhibitory proteasy HIV jsou součástí kombinační terapie označované jako HAART (highly active antiretroviral therapy), spolu s inhibitory reverzní transkriptasy. Součástí této léčby mohou být i inhibitory dalšího retrovirového enzymu, integrasy. Dnešní situace je výsledkem mimořádného úsilí, které je v mnoha laboratořích po celém světě dlouhodobě věnováno studiu HIV i dalších retrovirů. Ve svých začátcích se výzkum HIV mohl opřít o znalosti získané zkoumáním ptačích retrovirů, které byly známy dříve než první lidský retrovirus.

Dnes eviduje strukturní databáze Protein Data Bank (PDB) přes 200 struktur proteasy HIV1, většinou v komplexu s různými inhibitory. Strukturní analýze byly podrobeny i proteasy z dalších retrovirů. Na návrhy, syntézu a testování inhibitorů retrovirových proteas byly v akademické i firemní sféře soustředěny značné kapacity. Podrobně bylo studováno štěpení retrovirových polyproteinů a také role retrovirových proteas v degradaci proteinů hostitelských buněk. Zdá se téměř neuvěřitelné, že v 90. letech 20. století, kdy jsem se touto tématikou zabývala, nebylo snadné získat retrovirové proteasy v množství dostatečném k jejich studiu. Protokoly pro expresi a purifikaci bylo teprve třeba zavést a optimalizovat.

Retrovirové proteasy patří do rodiny aspartátových proteas. Jsou tvořeny dvěma stejnými podjednotkami spojenými nekovalentně a předpokládá se, že byly evolučními předky savčích aspartátových proteas, které jsou monomerní – dvoudomérová struktura se vytváří na jednom aminokyselinovém řetězci (Obr.1) (Tang et al., 1978). Mnohé savčí aspartátové proteasy mají širokou substrátovou specifitu umožňující degradovat proteiny nesespecificky, za vzniku krátkých oligopeptidů. Role retrovirových proteas naproti tomu souvisí s faktem, že proteiny nezbytné pro vznik infekčního virionu jsou syntetizovány jako součást delších aminokyselinových řetězců, polyproteinů. Retrovirové proteasy rozpoznávají a hydrolyzují místa na rozhraní jednotlivých proteinů. Anglický termín *processing*, který se pro tento děj používá v literatuře, je obtížné přeložit do češtiny. Také pro popis specifity proteas se termíny nehledaly snadno, protože štěpená místa se od sebe liší, pokud jde o aminokyselinovou sekvenci, a spojuje je spíše strukturní podobnost (retrovirové proteasy rozeznávají úsek 7-8 aminokyselin v okolí štěpené vazby). Substrátová specifita retrovirových proteas tak bývá označována jako promiskuitní, degenerovaná nebo kombinační.

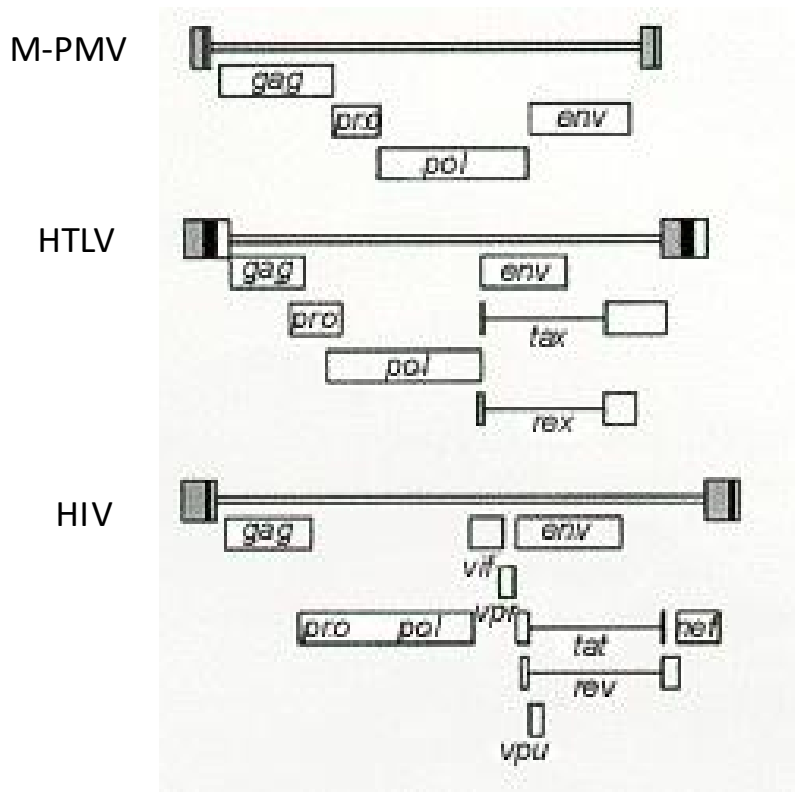


Obrázek 1. Porovnání trojrozměrných struktur retrovirové a eukaryotické aspartátové proteasy. Vlevo proteasa viru Rousova sarkomu (záznam v PDB: 2RSP; Jaskolski et al., 1990), vpravo proteasa Sapp2p kvasinky *Candida parapsilosis* v komplexu s pepstatinem, obecným inhibitorem aspartátových proteas (záznam v PDB: 4YBF; práce III-3 - Dostál et al., 2015). Obrázky upraveny s využitím souborů v Protein Data Bank.

Retrovirové polyproteiny jsou kódovány geny *gag*, *pol* a *env*, které tvoří podstatnou část genomu retrovirů. Gen *gag* kóduje polyprotein obsahující strukturní proteiny které interagují s retrovirovou RNA a vytvářejí vnitřní strukturu virové částice, „core“. Gen *pol* kóduje enzymy nutné pro virovou replikaci: reverzní transkriptasu, integrasu a proteasu. Gen *env* kóduje proteiny, které po vzniku virové částice budou na jejím povrchu. Polyprotein Env však retrovirová proteasa neštěpí. Mezi geny *gag* a *pol* je v některých případech stop-kodon a gen *pol* je překládán po jeho pročetí, jako součást polyproteinu Gag-Pol. U jiných retrovirů je k expresi genu *pol* zapotřebí posunu čtecího rámce (translational frameshift). Genomy různých retrovirů se od sebe liší nejen uspořádáním uvedených genů, ale také přítomností genů dalších, které kódují proteiny bez enzymové aktivity nebo strukturní role, jež však interagují s hostitelskými faktory a usnadňují replikaci viru (Strebel 2013).

Kódující sekvence pro proteasu bývá součástí genu *pol*, ale jsou i retroviry, které mají tuto sekvenci umístěnou ve vlastním čtecím rámci *pro* (Obr.2). K její translaci také dochází v důsledku posunu čtecího rámce, čímž vznikají polyproteiny Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol.

Projekty, jichž jsem se účastnila, se týkaly proteas virů hovězí leukemie (bovine leukemia virus; BLV), lidské leukemie T-buněk (human T-cell leukemia virus; HTLV) a Mason-Pfizerova opičího viru (Mason-Pfizer Monkey Virus; M-PMV). Jejich společným rysem je právě kódování proteasy ve vlastním čtecím rámci *pro*. Jinak se ovšem tyto viry v mnohém liší.



Obrázek 2. Schéma genomu některých retrovirů.

Převzato a upraveno z knihy *Retroviruses* vydané Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Editoři J.M. Coffin, S.H. Hughes a H. Varmus.

BLV a HTLV jsou si evolučně blízké retroviry s onkogenním účinkem a při klasifikaci retrovirů jsou vyčleňovány do vlastní, oddělené skupiny zvané deltaretroviry. BLV způsobuje chronickou leukémií dobytka, napadá B-lymfocyty a negativně ovlivňuje také funkci T-lymfocytů. Přenáší se krví a mlékem. Infekce jsou často asymptomatické, onemocní zhruba 30-40% nakažených zvířat (Barez et al., 2015).

Virem HTLV je nakaženo zhruba 10 milionů lidí, nejčastěji v Tichomoří a v Karibské oblasti. Virus se přenáší krví, pohlavním stykem nebo mateřským mlékem. Existují viry HTLV1 a

HTLV2, u každého z nich je pak známo několik subtypů. HTLV1 způsobuje leukémii T-buněk (adult T-cell leukemia; ATL) a neurodegenerativní onemocnění zvané spastická paraparesa (HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HAM/TSP). Tato onemocnění propukají jen asi u 3% nakažených a až po dlouhé, i 20 let trvající době latence (Tsukasaki and Tobinai, 2014). HTLV2 způsobuje také myelopatii a nejčastěji se vyskytuje u uživatelů drog. Jsou známy také případy koinfekce HIV1 a některým z virů HTLV (Kozłowski et al., 2016).

Opičí virus M-PMV patří mezi jednoduché retroviry. Poprvé byl izolován z biopsie prsního nádoru samičky makaka (*Macaca mulatta*), zjistilo se však, že nádory přímo nezpůsobuje (Chopra and Mason, 1970). M-PMV je původcem imunodeficiencí, podobně jako jiný opičí retrovirus SIV (simian immunodeficiency virus). Nejsou však vzájemně příbuzné. M-PMV je retrovirus typu D, jehož polyproteiny vytvářejí nezralé virové částice už v cytoplasmě infikovaných buněk. Tyto nezralé částice jsou transportovány k plasmatické membráně a pučí z buňky ven. M-PMV se stal modelovým zástupcem tohoto typu virů. SIV je naproti tomu retrovirus typu C a jeho nezralé částice se skládají přímo na cytoplasmatické membráně a současně pučí ven. Podle novější klasifikace je M-PMV řazen mezi betaretroviry.

Cílem níže popsaných prací nebylo pokusit se o vývoj léku proti těmto virům, ale přispět k pochopení vlastností retrovirových proteas. Proteasy BLV a MPMV jsme připravovali expresí v *E. coli* s využitím T7 systému, proteasu HTLV chemickou syntézou. Ve všech případech jsme pak testovali substrátovou specifitu a možnosti inhibice těchto enzymů pomocí série oligopeptidů a peptidomimetických inhibitorů připravených na UOCHB.

Proteasa BLV, jejíž expresi pojednává práce **I-1**, byla již dříve purifikovaná z virionů a byl experimentálně určen její N- a C-konec (Yoshinaka et al., 1986). Expresní vektor, který připravili Dr. Milan Fábry a Dr. Martin Andreánsky, byl tedy konstruován tak, aby monomerní jednotka maturní proteasy byla na N- konci prodloužena o 42 a na C-konci o 26 aminokyselin. Nevěděli jsme ale, kde přesně dochází k posunu čtecího rámce a jak přesně náš prekursor odpovídá polyproteinům Gag-Pro a Gag-Pro-Pol. Ale chtěli jsme zachovat štěpná místa, aby se proteasa mohla autokatalyticky aktivovat. K tomu skutečně došlo během renaturace proteinu, který se v průběhu exprese uložil do inkluzních tělísek. Získali jsme protein, jehož N-koncová sekvence odpovídala očekávané (LSIPL-). Rekombinantní proteasa BLV byla aktivní, což umožnilo testovat její substrátovou specifitu pomocí peptidových substrátů připravených Dr. Ivo Bláhou. Příslušný expresní a purifikační systém jsme pak použili pro získání většího množství proteasy pro další studie.

Podobný postup jsme použili také v práci **I-2**, pro získání proteasy M-PMV. Její prekursor o molekulové hmotnosti 26kDa se akumuloval v inkluzních těliscích, která jsme solubilizovali v nasyceném roztoku močoviny a dialyzovali proti pufru o pH 7,5. Během této procedury došlo k autokatalytickému štěpení prekursoru. Výsledkem ovšem byly dva produkty, 17 kDa a 12 kDa (p17 a p12). Purifikací na katextu došlo k oddělení těchto produktů, zároveň jsme však získali i jejich směs, která pravděpodobně byla heterodimerem p17/p12. Všechny tyto varianty byly proteolyticky aktivní a při testování s chromogenním peptidovým substrátem nevykazovaly podstatné rozdíly v aktivitě. Produkty processingu p17 a p12 měly shodný N-konec, lišily se v C-koncové části. Lze si představit, že proteasa je z prekursoru vyštěpena rychle na N-konci, zatímco na C-konci je štěpení postupné. Existence dvou variant monomerních podjednotek proteasy M-PMV byla asi nejpřekvapivějším zjištěním této studie.

Tyto poznatky byly dále rozvinuty v práci **I-6**, kde jsme se zabývali kinetikou processingu p17, tedy delší formy proteasy M-PMV. Vzhledem k tomu, že částice M-PMV vznikají už v cytoplasmě a v nezralé formě doputují k plasmatické membráně, musí být aktivita virové proteasy přísně regulována. Výsledky této studie ukázaly, že postupné štěpení na C-konci proteasy je pravděpodobně součástí tohoto regulačního mechanismu. Štěpení purifikovaného p17 na p12 probíhalo zhruba 30 dní. V přítomnosti inhibitoru proteasy se výrazně zpomalilo. Detekovali jsme ovšem ještě meziprodukt p13. K postupnému processingu p17 dochází i ve virionech, ale konečným produktem je zde právě p13.

Přípravou purifikovaných proteas BLV a M-PMV jsem přispěla k práci **I-4**, ve které byly tyto enzymy použity ke štěpení polyproteinů HIV1 a viru ptačí leukemie (ALV). Proteasa BLV štěpila oba polyproteiny efektivně, M-PMV jen velmi neochotně.

Práce **I-5** se zabývá proteasou HTLV1. Její monomer sestává ze 125 aminokyselin a připravil ho Dr. Ivo Bláha metodou peptidové syntézy na pevné fázi. Nebyla to první synteticky připravená retrovirová proteasa. V roce 1988 publikovali Schneider a Kent totální syntézu proteasy HIV1, jejíž monomer se skládá z 99 aminokyselin. Tatáž laboratoř později připravila proteasu HIV1 z D-aminokyselin (Milton et al., 1992). Oba uvedené enzymy byly aktivní, přičemž D-proteasa vyžadovala substráty z D-aminokyselin. Tyto studie ukázaly, že připravit plně syntetickou proteasu je možné, takže jsme pokusili o podobný postup. Lyofilizovaný materiál připravený Dr. Bláhou obsahoval řetězce o 125 aminokyselinových zbytcích, tedy nikoli prekursor jako v případě exprese proteas v *E. coli*. Bylo potřeba najít podmínky, za nichž se tento materiál rozpustí, řetězce získají správnou strukturu a vytvoří funkční dimery. Nakonec se podařilo

aktivní proteasu získat a pomocí série substrátů a inhibitorů testovat její specifitu, která se ukázala být podobná specifitě proteasy BLV.

Práce I-7 vycházela z faktu, že proteasa HIV1 štěpí i řadu hostitelských proteinů, z nichž mnohé jsou součástí cytoskeletonu. Štěpení cytoskeletálních proteinů jinými retrovirovými proteasami však před vznikem této publikace nebylo testováno. Použili jsme tedy nejen proteasy HIV1 a HIV2, ale také proteasu BLV, M-PMV (varianta 12kDa) a proteasu ptačího retroviru MAV (myeloblastosis associated virus), včetně jejích dvou mutantů a testovali, jak štěpí vimentin. HIV1 PR degradovala vimentin nejefektivněji, za vzniku několika produktů. BLV PR štěpila vimentin jen v jednom místě. Aby došlo ke štěpení vimentinu proteasami M-PMV PR a MAV, bylo nutno výrazně zvýšit koncentraci solí v reakční směsi. Přítomnost 2 M NaCl naopak snižovala efektivitu štěpení oběma proteasami HIV. Degradace vimentinu jednotlivými proteasami byla ovlivněna také pH. Tyto experimenty ukázaly, že přes značnou strukturní podobnost se jednotlivé retrovirové proteasy značně liší, pokud jde o substrátovou specifitu a požadavky na reakční podmínky. Za podmínek optimálních pro každou jednotlivou proteasu byl vimentin štěpen během několika minut. Výjimkou byla M-PMV PR, která poskytla detekovatelné produkty štěpení vimentinu až zhruba po 10 hodinách.

Práce s proteasami leukemických virů mě přiměla přemýšlet a studovat literaturu i o jejich dalších proteinech a shrnout tyto poznatky do přehledové publikace I-3.

Blok II – Sekretované aspartátové proteasy patogenních kvasinek rodu *Candida*

II-1 Hrušková-Heidingsfeldová, O., Dostál, J., Hamal, P., Pazlarová, J., Ruml, T. and Pichová, I. (2001) Enzymological characterization of secreted proteinases from *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Collect. Czech. Chem. Commun. 66, 1707-1719.

Autorský podíl: 33%

Kultivovala jsem kvasinky, podílela se na purifikaci proteáz a napsala jsem publikaci.

II-2 Pichová, I., Pavličková, L., Dostál, J., Dolejší, E., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Weber, J., Ruml, T. and Souček, M. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur. J. Biochem. 268, 2669-2677.

Autorský podíl: 15%

Podílela jsem se na kultivaci kvasinek, purifikaci enzymů a přípravě publikace.

II-3 Dostál, J., Hamal, P., Pavličková, L., Souček, M., Ruml, T., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2003) Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. J. Clin. Microbiol. 41, 712-716.

Autorský podíl: 33%

Navrhla a koordinovala jsem většinu experimentů, podílela jsem se na kultivaci kvasinek a přípravě médií, napsala jsem publikaci.

II-4 Hamal, P., Dostál, J., Raclavský, V., Krylová, M., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2004) Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. Folia Microbiol. 49, 491-496.

Autorský podíl: 25%

Podílela jsem se na koordinaci studie, kultivaci kvasinek a psaní publikace.

II-5 Dostál, J., Dlouhá, H., Maloň, P., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2005) The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. Biol. Chem. 386, 791-799.

Autorský podíl: 40%

Navrhla a koordinovala jsem většinu experimentů, podílela jsem se na analýzách štěpení prekursoru proteázy, napsala jsem publikaci.

II-6 Merkerová, M., Dostál, J., Hradilek, M., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2006) Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase from *Candida parapsilosis*. FEMS Yeast Res. 6, 1018-1026.

Autorský podíl: 25%

Navrhla a koordinovala jsem většinu experimentů a napsala jsem publikaci.

II-7 Majer, F., Pavličková, L., Majer, P., Hradilek, M., Dolejší, E., Hrušková-Heidingsfeldová, O. and Pichová, I. (2006) Structure-based specificity mapping of secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis* using peptidomimetic inhibitors and homology modeling. Biol.Chem. 387, 1247-1254.

Autorský podíl: 15%

Podílela jsem se na přípravě proteáz a psaní publikace.

II-8 Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2008) Secreted proteins of *Candida albicans*. Front Biosci 13, 7227-42.

Autorský podíl: 100% (review)

II-9 Hrušková-Heidingsfeldová, O., Dostál, J., Havlíková, J., Hradilek, M. and Pichová, I. (2009) Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in the expression pattern and catalytic properties. Biol. Chem. 390, 259-268.

Autorský podíl: 40%

Navrhla a koordinovala jsem většinu experimentů, analyzovala jsem expresi studovaných genů, napsala jsem publikaci.

II-10 Vinterová Z, Bauerová V, Dostál J, Sychrová H, Hrušková-Heidingsfeldová O and Pichová I (2013) *Saccharomyces cerevisiae* can secrete Sapp1p proteinase of *Candida parapsilosis* but cannot use it for efficient nitrogen acquisition. J. Microbiol 51, 336-344.

Autorský podíl: 20%

Podílela jsem se na návrhu a koordinaci experimentů a na přípravě publikace.

II-11 Dostál, J., Merkerová, M., Vinterová, Z., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2015) Two *SAPP2* gene homologs are present in *Candida parapsilosis* genome. *Folia Microbiol.* 60, 373-374.

Autorský podíl: 60%

Navrhla jsem koncepci práce, podílela jsem se na *in silico* analýzách, napsala jsem publikaci.

Kvasinky, jednobuněčné eukaryotické heterotrofní mikroorganismy řazené do říše Fungi, lze nalézt v nejrůznějších biotopech. Taxonomická studie z roku 2011 uvádí zhruba 1500 známých druhů kvasinek (Kurtzman *et al.*, 2011). V přírodě jich však pravděpodobně existuje řádově více a literatura uvádí odhady sahající od jednoho do pěti milionů druhů (Casaregola *et al.*, 2011; Perez-Nadales *et al.*, 2014). Přestože o většině existujících kvasinek zatím nevíme vůbec nic, několik druhů těchto mikroorganismů je lidem naopak důvěrně známo už mnoho let. Jde především o pekařské droždí *Saccharomyces cerevisiae*, považované za „domestikovaný mikroorganismus“, bez něž by náš každodenní život vypadal zcela jinak, a o některé další kvasinky využívané v potravinářství a biotechnologiích (např. *Kluyveromyces Lactis*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus oryzae*). *S. cerevisiae* jsou dlouhodobě používány také jako modelový eukaryotický organismus. Hrály a nadále hrají zásadní roli při výzkumu některých obecných dějů jako je regulace buněčného cyklu, reparace DNA, sekrece proteinů, stárnutí, autofagie a mnohé jiné. U řady proteinů důležitých z hlediska humánní medicíny byly nejprve známy a charakterizovány jejich kvasinkové homology. *S. cerevisiae* byl první eukaryotický organismus, jehož genom byl sekvenován a publikován (Goffeau *et al.*, 1996).

Existují ovšem i kvasinky, vůči nimž se snažíme bránit. Fytopatogenní kvasinky a nižší houby působí značné hospodářské škody (Egan a Talbot, 2008) a kvasinky patogenní pro člověka jsou původci široké škály onemocnění, od povrchových mykóz až po systémové infekce ohrožující život. Onemocnění způsobená kvasinkami začala být závažným problémem až během 20. století. Důvodem je účinnější léčba bakteriálních infekcí, stoupající počet imunosuprimovaných pacientů a častější užívání katetrů a dalších plastových pomůcek zasahujících do těla pacienta (Brown and Weig, 2007; Casadevall and Pirofski 2015). Ačkoli pro imunosuprimované pacienty představuje možnou hrozbu téměř každý mikroorganismus v okolí, k nejčastějším původcům

mykotických infekcí patří zástupci rodů *Candida*, *Aspergillus* a *Cryptococcus*. A právě některé kvasinky rodu *Candida*, jejich proteasy a další enzymy jsou předmětem **Bloku II**.

Označení *Candida* nese víc než 300 druhů kvasinek, ale jen zhruba 15 z nich je patogenních (Perez-Nadales et al., 2014). Jedná se především o *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* a *C. krusei*. Chovají se jako takzvané oportunní patogeny, to znamená, že mohou být součástí běžné mikroflóry zdravých jedinců, aniž by jim způsobily jakoukoli újmu. Dojde-li však k narušení imunity, poranění nebo k výrazným změnám hostitelského mikrobiomu, mohou kandidy způsobit onemocnění, kandidózu, různého stupně závažnosti. Povrchové kandidózy neohrožují život, ale snižují jeho kvalitu. Jedná se o kožní nebo vaginální infekce, případně o infekce ústní dutiny související s používáním zubní protézy, která se může stát rezervoárem patogenních kvasinek (Nobile and Johnson, 2015). Vaginální mykózy zažije až 75 % žen, většina z nich opakovaně (Chew and Than 2016). Mnohem závažnější jsou však systémové infekce, postihující jedince s výrazně narušenou imunitou, např. pacienty po transplantaci orgánů či chemoterapii, případně pacienty trpící AIDS. Průvodním znakem systémových infekcí je kandidémie, neboli přítomnost kandid v krevním oběhu. Kvasinky se rozšíří do vnitřních orgánů a způsobují jejich selhání, nebo může dojít k septickému šoku. Léčba stávajícími antimykotiky není v těchto případech vždy úspěšná. Mortalita způsobená systémovými kandidózami se pohybuje v desítkách procent, např. přehled z roku 2012 uvádí 46-75 % (Brown et al., 2012). Vzhledem k tomu, že se kandidy mohou vyskytovat v hostitelském prostředí jako komenzálové, mohou kandidózy být nejen exogenního, ale i endogenního původu. U pacientů se závažnými diagnózami často dochází také k nosokomiálnímu přenosu patogenních kvasinek. Jedním z rizikových faktorů pro vznik systémových kandidóz je tak pobyt na jednotkách intenzivní péče a používání katetrů, protože kandidy vytvářejí biofilmy i na abiotických povrchích a právě infikované katetry jsou častou vstupní branou kvasinek do oslabeného organismu (Nobile and Johnson, 2015). Na jednotkách intenzivní péče v Evropě a v USA je *Candida albicans* druhým nejčastějším původcem nosokomiálních infekcí (nejčastější je *Staphylococcus aureus*). Léčba kandidóz zároveň zvyšuje náklady na zdravotní péči o těžce nemocné pacienty. Zvládnutí těchto infekcí vyžaduje co nejlepší možnosti včasné diagnózy a vývoj nových léků. K tomu je nezbytná podrobná znalost těchto kvasinek, pochopení principů jejich interakce s hostitelem a znalost mechanismu vzniku rezistence vůči antimykotikům.

Patogenní kvasiny rodu *Candida* vděčí za svůj biologický úspěch souhře více faktorů. Dokážou růst v podmínkách značně různorodých, pokud jde o dostupnost živin či pH, např. na kůži a sliznicích, ve sputu, v krvi či v gastrointestinálním traktu. Přejít z jednoho prostředí do

druhého vyžaduje adaptaci metabolismu, která je spojena se změnou transkripčního programu kvasinky a často též s aktivací virulenních faktorů (Brown et al., 2014). Za faktory umožňující patogenním kandidám způsobovat onemocnění je považována schopnost účinně přilnout k povrchu hostitele zprostředkovaná adhesiny a dalšími proteiny buněčné stěny, dále schopnost tento povrch narušit a proniknout do hostitelských tkání. Pro tuto fázi infekce jsou klíčové hydrolytické enzymy, které patogenní kandidy produkují. Jedná se o proteasy, lipasy a fosfolipasy, které kvasinky sekretují do okolí. Genomy patogenních kandid zpravidla obsahují celé rodiny genů kódujících tyto hydrolasy, čímž se liší např. od genomu *S. cerevisiae* (Butler et al., 2009). Za virulenní faktor je považována i schopnost kandid efektivně získávat z hostitelského organismu železo. V konkrétním případě *C. albicans* je pak důležitým virulenním faktorem schopnost morfologické změny, kterou ostatní zástupci tohoto rodu mají jen v omezené míře. Buňky *C. albicans* mohou reverzibilně přecházet z kvasinkové formy na vláknitou – hyfální. Zatímco kvasinkové buňky se snáze šíří krevním řečištěm, hyfy se podílejí na penetraci hostitelských tkání (Mayer et al., 2013). Nedávno byl u *C. albicans* identifikován další významný virulenní faktor, peptidový toxin candidalysin, který je produktem štěpení proteinu Ecelp. Je sekretován do extracelulárního prostoru a poškozuje epitelální membrány zejména při infekcích sliznic (Moyes et al., 2016).

Na poškození epitelu a pronikání kvasinky do hostitelských tkání se, jak zmíněno výše, významně podílejí sekretované proteasy. Sekrece proteas různého katalytického mechanismu není u mikroorganismů neobvyklá. V případě kvasinek rodu *Candida* se jedná o proteasy aspartátové, označované jako Sap (sekretované aspartátové proteasy). Svou strukturou a některými vlastnostmi se podobají pepsinu. Podílejí se nejen na degradaci hostitelských bariér, ale také na zajištění nutrientů. Kvasinky dokáží internalizovat a využít peptidy sestávající ze sedmi a méně aminokyselinových zbytků. Takové peptidy často vznikají štěpením proteinů v okolí kvasinky sekretovanou proteasou. Patogenní kvasinky zpravidla disponují rodinami genů/izoenzymů těchto proteas, což umožňuje jejich regulaci už na transkripční úrovni, v závislosti na vnějších podmínkách jako jsou pH, teplota či hladiny nutrientů.

Pro sekretované aspartátové proteasy kandid se postupně začalo užívat názvosloví vycházející ze zkratky Sap. Proteasy sekretované nejstudovanější kvasinkou *C. albicans* jsou označovány prostě Sap a číslem odlišujícím jednotlivé izoenzymy. Názvy příslušných genů se zapisují velkými písmeny a kurzívou (*SAP1*, *SAP2*...) U proteinů bývá zvykem přidat na konec zkratky písmeno "p" (Sap2p). V případě proteas dalších kandid se ke zkratce přidává ještě první písmeno

druhového jména. Proteasy sekretované *C. tropicalis* se označují Sap_{txp}, u *C. parapsilosis* Sap_{pxp} a jsou kódovány geny *SAPT_x*, respektive *SAPP_x*.

Od přelomu devadesátých a nultých let, kdy jsme s výzkumem těchto proteas začali, došlo v poznání patogenních kandid, stejně jako v mnoha jiných oblastech vědy, k výraznému posunu. V roce 2008, tedy asi v polovině sledovaného období, jsem napsala přehledový článek o sekretovaných proteinech *C. albicans* (zde po číslem **II-8**), v němž je sekreci proteas a jejich vlastnostem věnováno poměrně dost prostoru. Od té doby víme mnohem více zejména o proteasách dalších patogenních kandid. Naše laboratoř přispěla především studiem proteas sekretovaných kvasinkou *C. parapsilosis*.

Ačkoli dnes tvoří kvasinky největší soubor příbuzných eukaryotických organismů, jejichž genomy byly sekvenovány a jsou veřejně dostupné, v době, kdy jsme se začali sekretovanými aspartátovými proteasami kandid zabývat, nebyly ještě genomové sekvence k dispozici. Nebylo také zřejmé, zda, pokud jde o sekreci aspartátových proteas, existují podstatné rozdíly mezi vzorky kandid získaných od různých pacientů případně zdravých dobrovolníků. Enzymologických informací o sekretovaných aspartátových proteasách patogenních kandid bylo na začátku tisíciletí také velmi málo. V první fázi výzkumu v této oblasti jsme se tedy zaměřili jednak na jejich enzymologickou charakterizaci, jednak na porovnání jejich sekrece v rámci větších souborů klinických izolátů kandid.

Druhy patogenních kandid, které proteasy sekretují, mají vždy jeden izoenzym, jehož produkce je indukována přítomností proteinu jako jediného zdroje dusíku. Historicky byl právě tento izoenzym objeven u *C. albicans* jako první (Staib, 1965) a později dostal označení Sap_{2p}. I ve studiích, jichž jsem se účastnila, jsme se přednostně zabývali izoenzymy indukovatelnými exogenním proteinem, protože je poměrně snadné získat jich v laboratorních podmínkách větší množství. Kromě toho se tyto izoenzymy často výrazně podílejí degradaci proteinů důležitých z hlediska integrity tkání (kolagen, keratin, fibronectin, laminin). Používali jsme tekutá či pevná média obsahující hovězí sérový albumin nebo hemoglobin. Exogenní protein je sekretovanou proteasou degradován, takže se proteasa postupně stane majoritním proteinem v médiu. Izolace proteasy po ukončení kultivace spočívá především v odstranění zbytků degradačních produktů albuminu či hemoglobinu jedním či dvěma chromatografickými kroky.

V práci **II-1** jsme takto získali a charakterizovali proteasy z kvasinek *C. parapsilosis* (Sap_{1p}) a *C. lusitaniae* (Sap_{1p}). Obě štěpily chromogenní peptidový substrát navržený pro pepsin, Lys-Pro-Ala-Glu-Phe*Phe(NO₂)-Ala-Leu v místě naznačeném hvězdičkou (Phe(NO₂)) je p-

nitrofenylalanin) a vykazovaly pH optimum v kyselé oblasti. Teplotní optimum Sap1p leželo v rozmezí 27-40°C, pro Sapp1p bylo překvapivě zhruba 45°C. Obě proteasy také vykazovaly pozoruhodnou stabilitu.

Dále jsme testovali interakci sekretovaných proteas z *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *C. lusitaniae* s inhibitory odvozenými od pepstatinu, které byly připraveny v laboratoři Dr. Milana Součka. Proteasa Sap2p z *C. albicans* byla v té době studována už poměrně intenzivně a byla publikována její krystalová struktura v komplexu s pepstatinem a s dalším pseudopeptidovým inhibitorem (Cutfield et al., 1995; Abad-Zapatero et al., 1996). Taktéž byla publikována struktura proteasy Sapt1p z *C. tropicalis* (Symersky et al., 1997), ale enzymologických a kinetických dat o této protease bylo mnohem méně. Proteasy Sapp1p z *C. parapsilosis* a Sap1p z *C. lusitaniae* nebyly do té doby příliš zkoumány. Pro proteasu t *C. lusitaniae* to ostatně platí dodnes. Údaje publikované v našich studiích jsou jedny z mála, které jsou pro tento enzym k dispozici. Sap1p byla většinou testovaných látek inhibována lépe než zbývající tři proteasy.

Výsledky rozsáhlé inhibiční studie shrnuté v práci **II-2** ukazují, že látky odvozené od pepstatinu jsou zpravidla dobrými inhibitory všech čtyř studovaných proteas. Inhibiční konstanty byly většinou nanomolární. Záměna jednoho či obou statinových zbytků za fenylstatin nepřinesla zásadní změny v inhibičních vlastnostech testovaných látek. Záměna prvního statinového zbytku za cyklohexylstatin však vedla ke vzniku inhibitoru s odlišnými K_i pro různé proteasy. Výrazně se lišila zejména Sapt1p, pro kterou byl inhibitor s cyklohexylstatinovým zbytkem horší než pro ostatní enzymy. Jednotlivé proteasy také rozdílně reagovaly na zkrácení řetězce inhibitoru, přičemž nejvyšší hodnoty inhibičních konstant pro kratší inhibitory vykazovala opět Sapt1p. Překvapivým zjištěním bylo, jak velký vliv na inhibiční vlastnosti studovaných látek může mít konfigurace fenylstatinových zbytků. Změna konfigurace na hydroxyly (3-OH) centrálního fenylstatinu z původního 3*S*,4*S* na 3*R*, 4*R* vedla k výraznému zhoršení inhibice všech čtyř proteas. Tatož změna na C-koncovém fenylstatinu naopak dala vzniknout jednomu z nejlepších inhibitorů celé testované série.

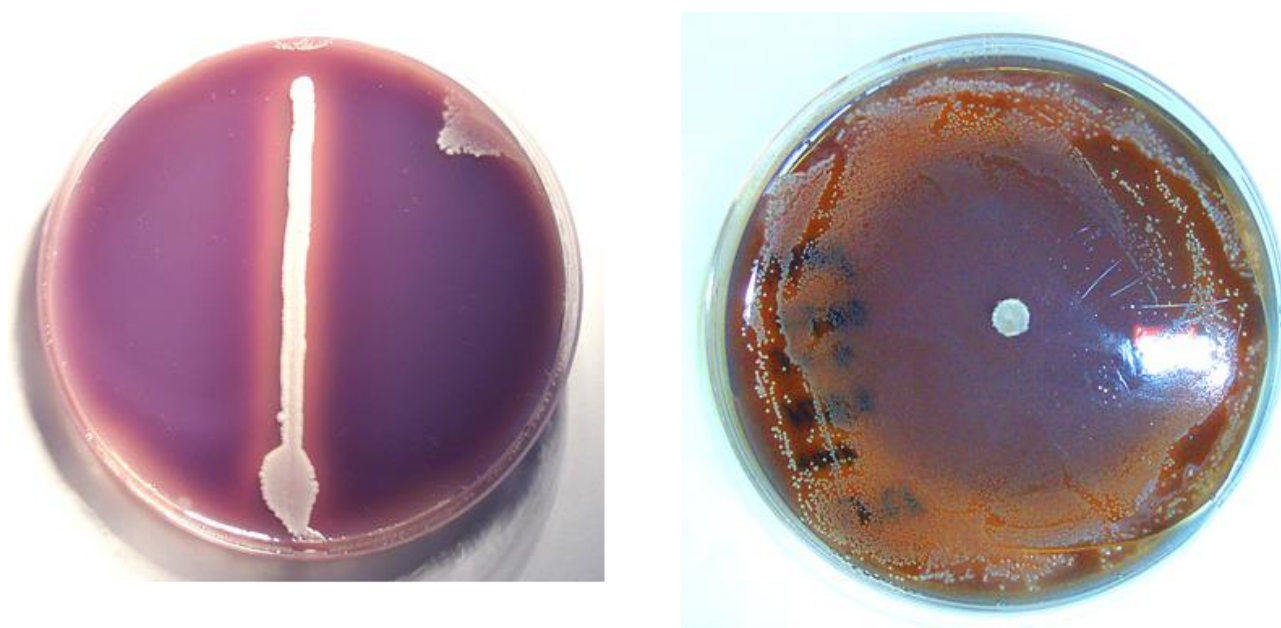
Studované látky nebyly selektivní a kromě kvasinkových proteas inhibovaly například i pepsin nebo katepsin D. Pokud by se uvažovalo o jejich terapeutickém využití, muselo by jít o zevní aplikaci, což by ale v řadě případů dávalo smysl.

Testovali jsme také, jsou-li sekretované proteasy kandid inhibovány inhibitory proteasy HIV. Ze čtveřice zkoumaných látek byly účinné je dvě, ritonavir a saquinavir. Jejich inhibiční konstanty

se pohybovaly v mikromolárních hodnotách. Indinavir inhiboval pouze Sapt1p, nelfinavir pak žádnou ze studovaných proteas.

Pokračování a rozšíření inhibiční studie představuje práce **II-7**, ve které byly analogy pepstatinu modifikovány tak, že obsahovaly pouze jeden derivát statinu. Odebrání jednoho statinového zbytku nezhoršilo účinky inhibitorů, pokud v polohách mezi P3 a P3' byly objemnější hydrofobní zbytky. Ani tentokrát jsme nezaznamenali velké rozdíly ve specifitě jednotlivých proteas, v tomto případě jen tří - Sap2p, Sapt1p a Sapp1p.

Proteasy, jejichž inhibici jsme studovali, jsou sekretovány v podmínkách, kdy jsou kandidy kultivovány v přítomnosti exogenního proteinu jako jediného zdroje dusíku. Tuto vlastnost jsme využili pro vytvoření metody testování inhibitorů v přítomnosti celých buněk, tedy bez nutnosti proteasy izolovat. Metoda pro přibližné hodnocení extracelulární proteolýzy kandid existovala již dříve a byla založena na použití pevných kultivačních médií obsahujících hovězí sérový albumin (BSA) jako zdroj dusíku. Kolem kolonií nebo nátěru kvasinek vykazujících extracelulární proteolýzu se pak vytvářely transparentní zóny, jejichž velikost bylo možno přibližně porovnat. V práci **II-3** jsme tento postup modifikovali tak, že jsme místo BSA použili hemoglobin. Navíc jsme do média přidávali bromfenolovou modř, protože dochází-li k sekreci proteas, kvasinka své okolí acidifikuje. Výchozí médium tedy bylo tmavě modré a proteolytické zóny kolem nátěru kvasinek světle žluté (Obr.3). Díky výraznému vizuálnímu kontrastu se velikost proteolytických zón snáze porovnává. Metodu lze použít i naopak, pokud misku s tímto médiem pokryjeme rovnoměrným nátěrem buněčné suspenze a na ni položíme disky obsahující roztok inhibitorů (Obr.3). Kolem disků se pak vytvoří modrá inhibiční zóna, zatímco zbytek misky má světle žlutou barvu. Průměr inhibičních zón závisí na koncentraci inhibitoru, takže je možno účinnost jednotlivých inhibitorů vůči rostoucí kvasinkové kultuře porovnat. Zavedli jsme konstantu ICP_{50} definovanou jako koncentraci inhibitoru, která je nutná k tomu, aby se hydrolytická zóna zmenšila na polovinu po třech dnech kultivace ve 30°C. Měření inhibičních zón v rostoucí kultuře není přesné, a konstanty ICP_{50} získané v opakovaných experimentech byly zatíženy chybou zhruba 30%. Přesto byly konstanty ICP_{50} pro inhibitory publikované ve studii **II-2** a pro kvasinky *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis* v souladu s daty získanými měřeními inhibice purifikovaných proteas. Inhibitory, které měly nanomolární K_i , vykazovaly většinou mikromolární ICP_{50} . Inhibitory s vyššími K_i včetně inhibitorů proteasy HIV se při testování s rostoucí buněčnou kulturou jeví jako neúčinné.



Obrázek 3. Testování extracelulární proteolýzy kvasinek pomocí média s hemoglobinem a bromfenolovou modří. Vlevo nátěr kvasinkové kultury se světlou proteolytickou zónou v jeho okolí. Vpravo miska s kvasinkovou kulturou rozetřenou po celé ploše, do jejíhož středu byl umístěn terčík s inhibítorem. Tmavá inhibiční zóna se rozšiřuje od středu ke kraji misky.

Sledování extracelulární proteolýzy pomocí pevného média s hemoglobinem a bromfenolovou modří jsme využili také pro analýzu rozsáhlého souboru kandid pocházejícího z mykologické sbírky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. V práci **II-2** jsme takto analyzovali 245 kmenů kandid získaných od pacientů s různými diagnózami. V práci **II-4** pak dalších 646 klinických izolátů kvasinek a 64 vzorků získaných od zdravých dobrovolníků, u nichž se kandidy vyskytovaly jako neškodní komenzálové. Dnes, kdy jsou přečtené a veřejně dostupné genomy řady patogenních kandid, už nepřekvapí, že se například *C. glabrata* v těchto testech jevila jako neproteolytická. *C. glabrata* sice extracelulární proteasy má, nejsou však plně sekretovány do okolí, ale zůstávají spojeny s povrchem buněk glykofosfatidylinositolovou kotvou. Vždy proteolytické byly naopak izoláty *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*. Nenašli jsme však žádný přesvědčivý vztah mezi úrovní extracelulární proteolýzy a diagnózou pacienta, případně lokalitou, z níž byla daná kvasinka odebraná. Rozdíly v míře extracelulární proteolýzy mezi různými klinickými izoláty jednoho a téhož druhu ovšem stojí za povšimnutí. Stálo by za úvahu, vrátit se k této studii dnes a s pomocí pokročilejších molekulárních nástrojů se pokusit zjistit, čím

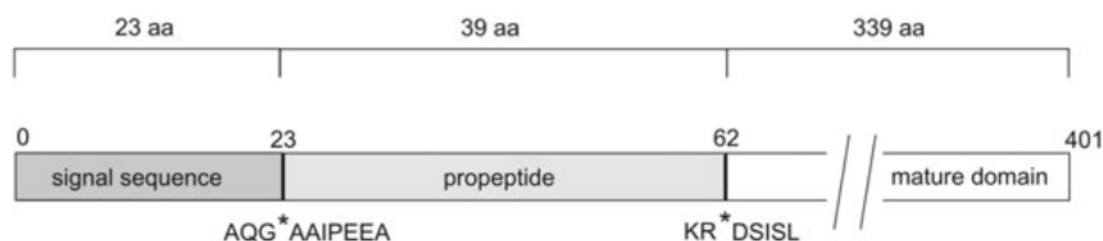
jsou tyto rozdíly způsobeny. Jde-li např. o mutace v genech kódujících proteasy nebo transkripční faktory, které je regulují, případně jedná-li se o epigenetické modifikace nebo o regulaci až na úrovni posttranslační.

Sekretované aspartátové proteasy jsou syntetizovány v podobě inaktivních zymogenů, čímž se nijak neliší od většiny známých proteas. Zymogen, prekursor proteasy, někdy též označovaný jako pre-pro-enzym, obsahuje kromě vlastní proteolytické části také signální sekvenci (pre-sekvenci) a propeptid (propart, aktivační peptid). Propeptid interaguje s aktivním místem proteasy, blokuje ho. Teprve po odštěpení propeptidu může být proteasa aktivní. Signální peptid a propeptid zpravidla tvoří N-koncovou část zymogenu (Obr.4).

Aktivace proteasy, tedy odštěpení propeptidu, může probíhat buď autokatalyticky nebo za asistence jiné proteasy či více proteas. Aktivační dráhy zdokumentované pro různé proteasy v přírodě se liší, v některých případech vyžaduje aktivace více kroků zahrnujících jak štěpení *in trans*, tak autokatalytické štěpení. Postupná aktivace proteas spolu s jejich lokalizací hraje důležitou roli v kontrole proteolytické aktivity a degradace proteinů.

Položili jsme si otázku, kde a jak je aktivována proteasa Sapp1p kvasinky *C. parapsilosis*. V práci II-5 jsme připravili prekursor Sapp1p expresí v *E. coli* a analyzovali možnosti jeho štěpení *in vitro*. Věděli jsme, že N-koncovému zbytku aktivní Sapp1p bezprostředně předchází motiv arginin-lysin (KR), který je rozpoznáván serinovými proteasami kexinové rodiny. U některých sekretovaných proteas *C. albicans* záviselo odštěpení propeptidu právě na protease tohoto typu, označované Kex2 (Newport and Agabian, 1997). Na druhou stranu byla však popsána i autokatalytická aktivace těchto izoenzymů v kyselém prostředí (Koelsch et al., 2000). Zjistili jsme, že pro proteasu Sapp1p fungují obě možnosti: jak autokatalytická aktivace v kyselém prostředí, tak štěpení prekursoru proteasou membránové frakce v neutrálním pH. Aktivita i substrátová specifita proteasy byla stejná, bez ohledu na to, jestli se aktivovala autokatalyticky nebo *in trans*. Molekuly se přesto lišily. Jen proteasa získaná štěpením prekursoru *in trans* měla očekávanou N-koncovou sekvenci odpovídající autentické Sapp1p (DSISL-). Autokatalytickým štěpením vzniká protein zkrácený o jednu aminokyselinu (SISL-). Pokusy o autokatalytickou aktivaci v přítomnosti pepstatinu vedly k molekule Sapp1p prodloužené na N-konci o 5 aminokyselin. Tato extenze tedy zjevně není dost dlouhá na to, aby mohla blokovat aktivní místo a zabránit vstupu pepstatinu. V téže práci jsme ukázali, že propeptid hraje důležitou roli při správném sbalování Sapp1p. Pro proteasu exprimovanou bez propeptidu se nám vůbec nepodařilo najít podmínky, kdy by získala strukturu a aktivitu.

V práci **II-10** jsme exprimovali celý zymogen Sapp1p (pre-pro-Sapp1p) v *S. cerevisiae*. Saccharomycéty proteasy nesekretují, takže se dobře hodí pro heterologní expresi a analýzu sekretovaných proteas z jiných kvasinek. Když byla pre-pro-Sapp1p exprimována v laboratorním kmeni BW31, detekovali jsme v kultivačním médiu aktivní proteasu odpovídající autentické Sapp1p (N-konec: DSISL-). V mutantním kmeni postrádajícím gen *KEX2* ($\Delta kex2$) došlo pouze k odštěpení signální sekvence, nikoli k odštěpení propeptidu. Do média byl sekretován protein delší o 39 aminokyselin. Takto jsme zjistili, že signální sekvence Sapp1p je dlouhá 23 aminokyselinových zbytků (Obr. 4) a že odštěpení propartu není, přinejmenším v *S. cerevisiae*, podmínkou sekrece. K odštěpení propartu ještě před úplnou sekrecí v *C. parapsilosis* nicméně dochází, jak jsme ukázali v práci **III-4**.



Obrázek 4. Schématické znázornění molekuly proteasy Sapp1p, které zároveň ilustruje obecné rysy molekulárního uspořádání proteas: na N-konci maturní domény je propeptid a signální peptid, které jsou postupně odštěpeny (viz též publikace **II-10**).

Kvasinku *C. parapsilosis* jsme si vybrali nejen pro hlubší studium vlastností proteasy Sapp1p, ale také pro analýzu exprese jednotlivých izoenzymů Sapp. Předpokládalo se totiž, že *C. parapsilosis* má pouze dva geny kódující tyto enzymy, na rozdíl od *C. albicans* s desetičlennou a *C. tropicalis* se čtyřčlennou genovou rodinou. Dnes víme přinejmenším tolik, že situace je mnohem komplikovanější. Genom *C. parapsilosis* byl sekvenován v Sangerově institutu, první soubory dat byly zveřejněny v polovině nultých let. Po přečtení celého genomu trvalo nezvykle dlouho, než byl anotován. Anotace, která je dnes k dispozici v *Candida* Genome Database se ale nakonec opírala hlavně o sekvenci RNA *C. parapsilosis* kultivované v hypoxických podmínkách (Guida et al., 2011). Ukázalo se totiž, že genom obsahuje mnoho duplikací, které analýzu dat

získaných sekvenováním DNA komplikují (Geraldine Butler, osobní sdělení). To se týká i proteasy Sapp1p. bylo zjištěno, že gen *SAPP1* je v genomu přítomen ve čtyřech kopiích (Horváth et al, 2012). Ještě před zveřejněním anotace byla publikována studie, jejíž autoři v tehdy dostupných sekvenčních datech hledali úseky potenciálně kódující aspartátové proteasy. Nalezli jich 14 (Parra-Ortega et al, 2009). Dosud ale není jasné, které z těchto sekvencí jsou skutečně transkribovány a translatovány.

Když jsme se začali proteasami *C. parapsilosis* zabývat, o komplexitě genomu nebylo mnoho známo. Vycházeli jsme z práce, která identifikovala dvě tandemově uspořádané sekvence potenciálně kódující aspartátové proteasy, přičemž jen jeden z těchto genů byl schopen funkčně nahradit proteasu v mutantním kmeni *C. tropicalis*, který proteasy nesekretoval (de Viragh et al., 1993). Tento gen kódující prokazatelně funkční proteasu *C. parapsilosis* byl později označen *SAPP1*.

O protease Sapp2p tedy panovaly pochybnosti, gen *SAPP2* byl považován za pseudogen. Protein odpovídající Sapp2p byl sice nalezen v médiu po kultivaci *C. parapsilosis* jako minoritní frakce vedle Sapp1p (Fusek et al., 1993), ale toto pozorování se nepodařilo potvrdit v dalších studiích včetně naší práce **II-1**. Rozporuplnost výsledků nás přivedla k tomu, že jsme proteasu Sapp2p připravili expresí v *E. coli*, abychom mohli její aktivitu ověřit. Tomu je věnována studie **II-6**. Postupovali jsme obdobně jako v předchozí práci **II-5**, ovšem v tomto případě jsme měli méně informací o N-konci maturní proteasy. Dalo se předpokládat, že N-koncový zbytek maturního enzymu bude vzdálen 31 aminokyselin od první katalytické triády (Asp-The-Gly) a bude za motivem Arg-Lys (KR*SSPSSPL-). Expresní vektor jsme připravili tak, aby výsledný prekursor obsahoval kromě předpokládané maturní proteasy ještě 29 aminokyselin, které ji na N-konci předcházejí. Purifikovaný prekursor jsme se pokusili aktivovat několika způsoby. Autokatalytická aktivace v kyselém pH trvala víc než 24 hodin a jejím produktem byl protein obsahující na N-konci 8 aminokyselin navíc proti předpokládané maturní protease. Trypsin a proteasa typu Kex2 štěpily prekursor v očekávaném místě (Obr.5). Proteasa aktivovaná *in trans* hydrolyzovala proteiny výrazně rychleji než varianta získaná autokatalyticky. To podporuje představu, že Sapp2p je v reálných podmínkách aktivována pouze za pomoci proteasy typu Kex2.



Obrázek 5. Sekvence pre-pro-Sapp2p. Rekombinantní prekursor neobsahoval prvních 33 aminokyselin, jeho N-konec je vyznačen šipkou. Vyznačena jsou místa autokatalytického štěpení (Sapp2p⁺⁸) a štěpení *in trans* (Sapp2p).

Chromogenní substrát používaný pro proteasy pepsinového typu Lys-Pro-Ala-Glu-Phe*Phe(NO₂)-Ala-Leu se pro testování aktivity Sapp2p nehodil, protože byl štěpen s velmi nízkou konverzí, navíc ve dvou místech. Proto jsme analyzovali, která místa štěpí Sapp2p v BSA a podle jejich sekvencí jsme navrhli několik fluorogenních peptidů. Našli jsme i takový, který je štěpen proteasami Sapp2p a Sapp1p za vzniku různých produktů a hodí se tudíž k jejich rozlišení. Zjistili jsme také, že teplotní a pH optima obou proteas se poněkud liší.

V navazující studii **II-9** jsme si položili otázku, jak je možné, že Sapp2p není běžně detekována v kultivačních médiích *C. parapsilosis*. Testovali jsme transkripci genu *SAPP2* za různých podmínek, zejména v přítomnosti různých zdrojů dusíku. Souběžně jsme analyzovali přítomnost proteas v kultivačním médiu. Pro detekci Sapp2p jsme již měli citlivější nástroje než dříve, a sice protilátky a výše zmíněný fluorogenní substrát, obojí umožňující rozlišit mezi Sapp1p a Sapp2p v kultivačním médiu. Podařilo se nám ukázat, že gen *SAPP2* je transkribován bez ohledu na typ zdroje dusíku a ani změny pH jeho transkripci příliš neovlivňují. Transkripce *SAPP1* je naproti tomu indukována proteinem použitým jako jediný zdroj dusíku v médiu. Pokud byla kvasinka kultivována v přítomnosti jiných, nízkomolekulárních zdrojů dusíku, transkripci *SAPP1* jsme nedetkovali. Například v běžně používaném bohatém médiu YPD (kvasničný extrakt, pepton, glukosa) je přepisován jen gen *SAPP2*, nikoli *SAPP1*. Proteasa Sapp2p je ale sekretována v mnohem menších množstvích než Sapp1p. V médiu obsahujícím BSA jako jediný zdroj dusíku byla Sapp1p asi v osmdesátinásobné převaze. Když jsme z tohoto média proteasy purifikovali a

separovali je chromatofokusací, byl výtěžek Sapp2p zhruba 0,4 mg z 1 litru kultury. V jiných podmínkách bylo proteasy Sapp2p ještě méně. Autentická Sapp2p měla skutečně N-koncovou sekvenci SSPSSPL-.

Proteasy Sapp1p a Sapp2p se poněkud liší substrátovou specifitou a katalytickou účinností. Sapp1p má specifitu širší a testované substráty štěpila rychleji. Na základě studií **II-6** a **II-9** je tedy možno soudit, že *C. parapsilosis* za většiny podmínek sekretuje malé množství méně účinné proteasy (Sapp2). Pokud se však dostane do situace, kdy jediným zdrojem dusíku je exogenní protein, začne vytvářet řádově větší množství proteasy s širší specifitou a vyšší účinností (Sapp1p).

Práce **II-11** neobsahuje nová experimentální data, nýbrž zhodnocení předchozích, z nichž vyplývá, že se v genomu *C. parapsilosis* vyskytují dva paralogy *SAPP2*, lišící se na 3'-konci. Navzdory pokročilým sekvenčním a anotačním technikám asi ještě nějakou dobu potrvá, než bude struktura genomu *C. parapsilosis* pro badatele přehledná.

**Blok III- Strukturní analýza sekretovaných aspartátových proteas patogenní kvasinky
*Candida parapsilosis***

III -1 Dostál, J., Brynda, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Siegllová, I., Pichová, I. and Řezáčová, P. (2009) The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A. *J. Struct. Biol.* 167, 145-152.

Autorský podíl: 15%

Podílela jsem se na přípravě proteázy a psaní publikace

III- 2 Dostál, J., Brynda, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Pachel, P., Pichová, I. and Řezáčová, P. (2012) The crystal structure of protease Sapp1p from *Candida parapsilosis* in complex with the HIV protease inhibitor ritonavir. *J. Enz. Inhibit. Med Chem.* 27, 160-165.

Autorský podíl: 15%

Podílela jsem se na přípravě proteázy a psaní publikace

III- 3 Dostál, J., Pecina, A., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Marečková, L., Pichová, I., Řezáčková, P., Lepšík, M. and Brynda, J. (2015) Atomic resolution crystal structure of Sapp2p, a secreted aspartic protease from *Candida parapsilosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71, 2494-2504.

Autorský podíl: 15%

Podílela jsem se na přípravě proteázy a psaní publikace

III-4 Vinterová, Z., Šanda, M., Dostál, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O. and Pichová, I. (2011) Evidence for the presence of proteolytically active secreted aspartic proteinase 1 of *Candida parapsilosis* in the cell wall. *Protein Sci.* 20, 2004-2012.

Autorský podíl: 25%

Navrhla a koordinovala jsem většinu experimentů a podílela se na psaní publikace.

Blok III zahrnuje práce, které se týkají strukturní analýzy sekretovaných aspartátových proteas kvasinky *Candida parapsilosis*. Rentgenostrukturní analýzy byly provedeny ve spolupráci se skupinou Dr. Pavlína Řezáčové. Výpočty interakčních energií mezi proteasami a inhibitory provedli Dr. Martin Lepšík a Dr. Adam Pecina. Hmotnostní spektroskopii, která hrála důležitou roli v práci **III-4**, prováděl Dr. Miloslav Šanda.

Proteasy pro strukturní studie jsme získávali izolací přímo z kultivačních médií *C. parapsilosis*. V případě Sapp1p šlo o relativně snadný proces, protože produkce této proteasy kvasinkou je indukována přítomností proteinu jako jediného zdroje dusíku v médiu. Za těchto podmínek lze získat přibližně 3 mg purifikované proteasy z litru kultivačního média.

Získat podobným způsobem dostatek izoenzymu Sapp2p bylo obtížnější. Podle našich zjištění je pravděpodobně konstitutivní, nebo přinejmenším jeho exprese nezávisí na typu zdroje dusíku (viz též II-9). Testovali jsme různé možnosti přípravy Sapp2p a nakonec se nejvíc osvědčilo využití stejných podmínek jako pro přípravu Sapp1p, tj. kultivace *C. parapsilosis* v médiu o pH 4, obsahujícím BSA jako jediný zdroj dusíku. Proteasy Sapp1p a Sapp2p sekretované do média jsme pak rozdělili chromatofokusací. Obvykle jsme takto získali 0,2 – 0,4 mg Sapp2p z litru média. Abychom získali dostatek Sapp2p pro krystalizaci, museli jsme sice zpracovat velké množství kultivačního média, ale vedlejším produktem byla Sapp1p v takovém přebytku, že bylo možno ji využít ke krystalizaci se sérií peptidomimetických inhibitorů připravených na UOCHB (viz **Blok II**, publikace 2 a 7) Získali jsme tak 31 struktur komplexů Sapp1p, které teprve čekají na publikaci.

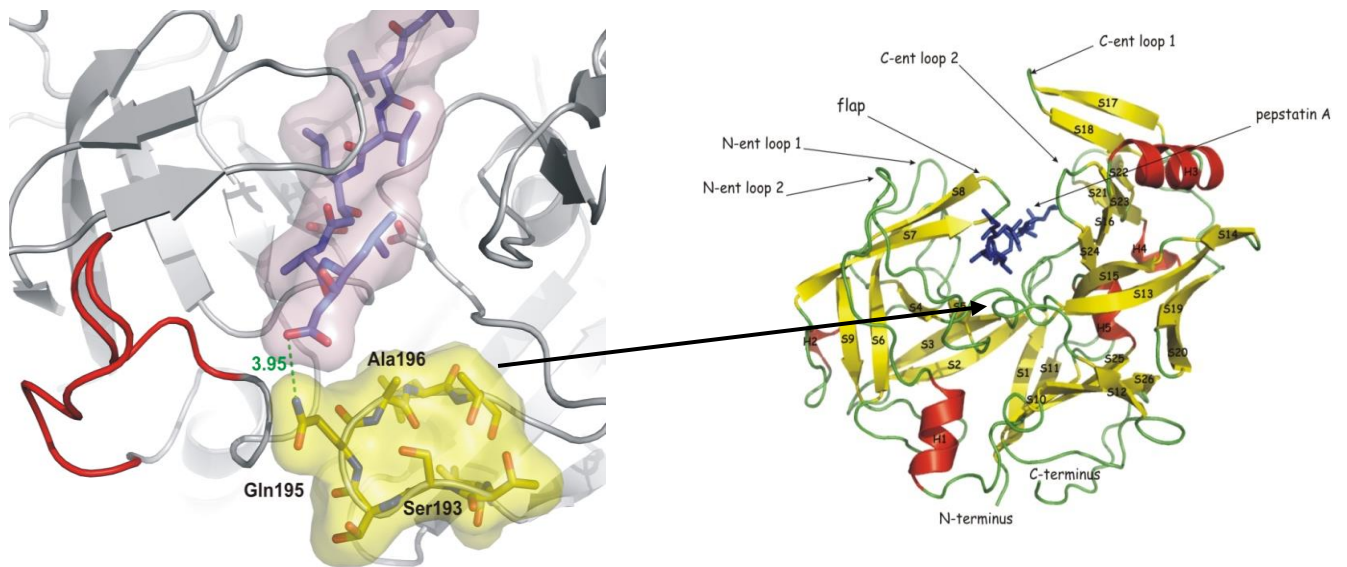
Publikovali jsme struktury dvou izoenzymů sekretovaných proteas *C. parapsilosis* v komplexu s klasickým inhibitorem aspartátových proteas Pepstatinem A (publikace **III-1** a **III-3**) a strukturu Sapp1p v komplexu s inhibitorem proteasy HIV1 ritonavirem (publikace **III-2**). Celková architektura obou proteinů je podobná a podobá se i struktuře savčích pepsinů, které jsou v rámci klasifikace proteas řazeny do rodiny A1. Enzymy této rodiny jsou tvořeny dvěma topologicky podobnými doménami, v nichž převažují β -listy (Obr.6). V hluboké vazebné dutině mezi doménami se nachází aktivní místo, do nějž každá z domén poskytuje jeden zbytek kyseliny asparagové, klíčový pro katalýzu. Důležitou součástí aktivního místa je tzv. chlopeň, flexibilní struktura nad aktivním místem podobná smyčce. Je jedním z charakteristických rysů aspartátových proteas a podílí se na interakci enzymu se substrátem či inhibitorem. V našich strukturách chlopeň aktivní místo s navázanými inhibitory uzavírá. Struktura Sapp1p a Sapp2p

je stabilizovaná dvěma disulfidickými můstky, jejichž topologie je u obou studovaných proteas podobná.

Porovnání struktur obou proteas z *C. parapsilosis* a struktur Sap z *C. albicans* a *C. tropicalis* ukazuje, že nejvýraznější rozdíly mezi jednotlivými enzymy jsou v oblasti „vstupních smyček“ (entrance loops), které tvoří vstup do aktivního místa a ovlivňují charakter vazebné dutiny. Jde o čtyři smyčky, které jsou u jednotlivých proteas různě dlouhé.

Sapp1p a Sapp2p obsahují po jednom serinovém zbytku, který je kódován ambivalentním kodónem CUG. Ve standardním genetickém kódu je triplet CUG překládán jako leucin. V některých kvasinkách je však CUG překládán buď jako leucin nebo jako serin, přičemž serin je častější možností; zpravidla víc než 95% tripletů CUG je přeloženo jako serin. To je dáno strukturou tRNA_{CAG}, která umožňuje, aby se na tuto tRNA navázal jak serin, tak leucin (Ohama et al. 1993, Miranda et al. 2006). Kvasinky s touto vlastností jsou souhrnně označovány jako klad CUG (nebo CTG; CTG clade). Nejde „jen“ o změnu významu, ale především o ambivalenci, jejímž důsledkem je nestabilita proteomu. Ačkoli teoreticky může mít záměna leucinu za serin významné důsledky, u většiny dosud zkoumaných proteinů, jejichž kódující sekvence obsahovala CUG kodon, byly příslušné seriny/leuciny lokalizovány tak, že záměna neovlivnila funkci (Cutfield et al., 2000). Výjimkou je translační iniciační faktor 4E, u nějž byl vliv záměny serinu a leucinu na funkci prokázán (Feketová et al., 2010). Důsledky záměny leucinu za serin však byly zatím zkoumány jen u malého počtu proteinů.

V případě sekretovaných proteas *C. parapsilosis* nemá záměna leucinu a serinu vliv na aktivitu. V nepublikované studii jsme analyzovali strukturu a enzymovou aktivitu Sapp1p získané expresí v *E. coli*, kde je CUG překládán standardně jako leucin. Vlastnosti této heterologní Sapp1p se nijak nelišily od vlastností autentické Sapp1p, která měla ve stejné pozici serin. Je nicméně zajímavé, že serin kódovaný CUG se v Sapp1p a Sapp2p vyskytuje na topologicky podobných, byť sekvenčně rozdílných smyčkách. V sekretovaných aspartátových proteasách *C. albicans* a *C. tropicalis*, totiž umístění těchto zbytků nevykazuje sebemenší známky podobnosti (Obr.6).



Obrázek 6. Struktura Sapp1p v komplexu s pepstatinem A. V pravé části obrázku je struktura Sapp1p s vyznačenými vstupními smyčkami (Ent loops) a chlopní (Flap). V levé části je detail aktivního místa a smyčky obsahující Ser193 kódovaný kodómem CUG.

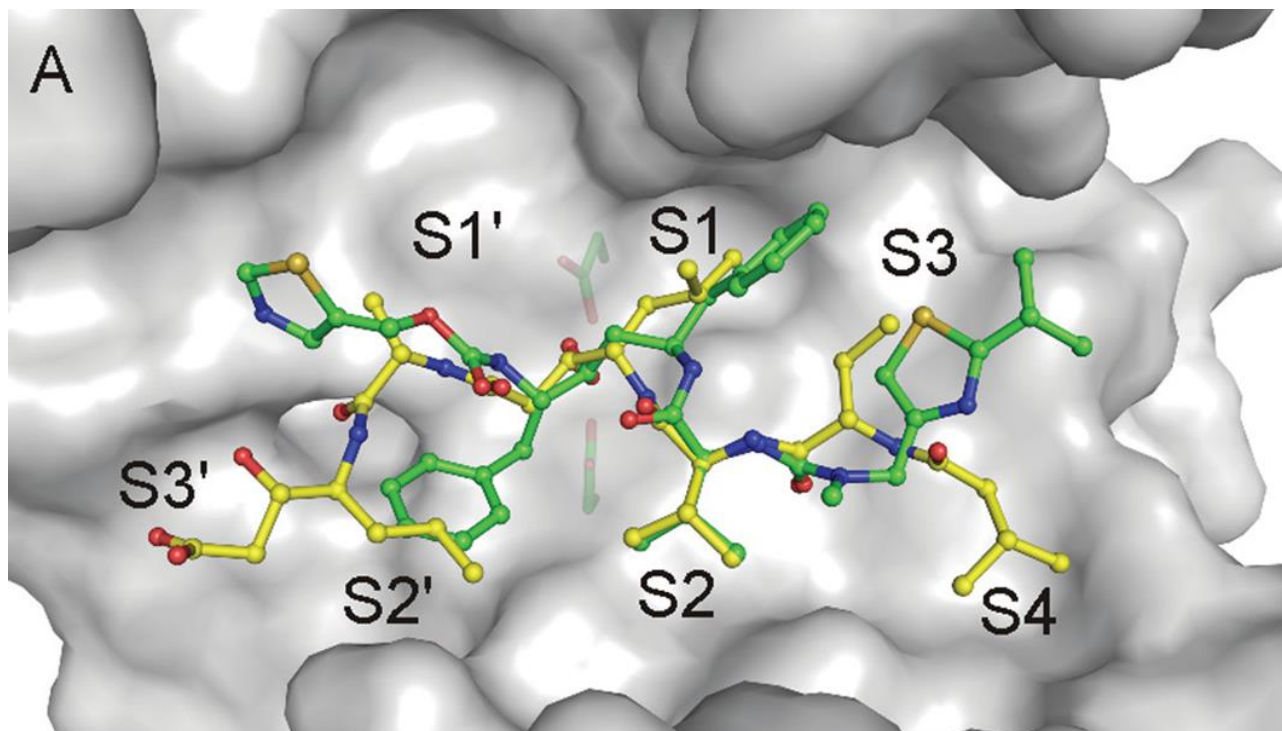
V době, kdy jsme začínali analyzovat strukturu Sapp1p, byly publikovány struktury homologických proteas z *C. albicans* a *C. tropicalis* (Cutfield et al., 1995; Abad-Zapatero et al., 1996; Symersky et al., 1997). Struktury dalších proteas z *C. albicans*, Sap3 a Sap5 byly zveřejněny v době, kdy už jsme první práci o struktuře Sapp1p připravovali k publikaci (Boreli et al., 2007; 2008). V práci Dostál et al. 2009 byla prezentována ve své době teprve druhá struktura proteinu z *C. parapsilosis*. Navíc šlo o protein autentický, získaný z přirozeného zdroje. Vůbec první strukturní studie proteinu z *C. parapsilosis* byla publikována o rok dříve a týkala se NADPH-dependentní karbonylreduktázy získané expresí v *E. coli* (Zhang et al., 2008). V současné době (duben 2016) obsahuje Protein Data Bank 12 struktur proteinů z *C. parapsilosis*.

Publikace **III-2** analyzuje vazbu ritonaviru k Sapp1p. Ritonavir je inhibitor proteasy HIV využívaný v kombinační terapii HIV/AIDS. Naše práce byla v tomto případě motivována tvrzením, které se opakovaně vyskytlo v literatuře i osobní komunikaci, a sice že inhibitory HIV PR mají antimykotický účinek u povrchových kandidóz, protože pravděpodobně inhibují rovněž

sekretované aspartátové proteasy kandid. Naše vlastní měření přitom ukazovala, že inhibitory HIV PR vykazují vůči Sap poměrně vysoká K_i , v řádu jednotek μM a vyšší. Mikromolární koncentrace inhibitorů HIV PR se někdy skutečně vyskytují v plasmě pacientů podstupujících léčbu označovanou jako HAART (highly active antiretroviral therapy; jedná se o kombináční terapii založenou na současném použití několika látek, které účinkují proti různým virovým cílům). Možný antimykotický účinek inhibitorů HIV PR nelze vyloučit, zůstává ovšem otázkou, nakolik je způsoben inhibicí proteas kandid a nedochází-li také k interakci těchto inhibitorů s jinými proteiny patogenních kvasinek.

Ze čtyř inhibitorů HIV PR, které jsme testovali, byl ritonavir nejlepším inhibitorem Sap, zatímco nelfinavir a indinavir nebyly vůči proteasám kandid účinné (práce II-2). K_i pro ritonavir a Sapp1p bylo $1,9 \mu\text{M}$.

Struktura komplexu Sapp1p s inhibitorem ukazuje, že centrální hydroxyl ritonaviru interaguje s katalyckými aspartáty podobně jako je tomu v případě pepstatinu. Ritonavir však mnohem hůře zaplňuje jednotlivá podmísta vazebné dutiny, což vysvětluje jeho horší inhibiční vlastnosti (Obr.7).



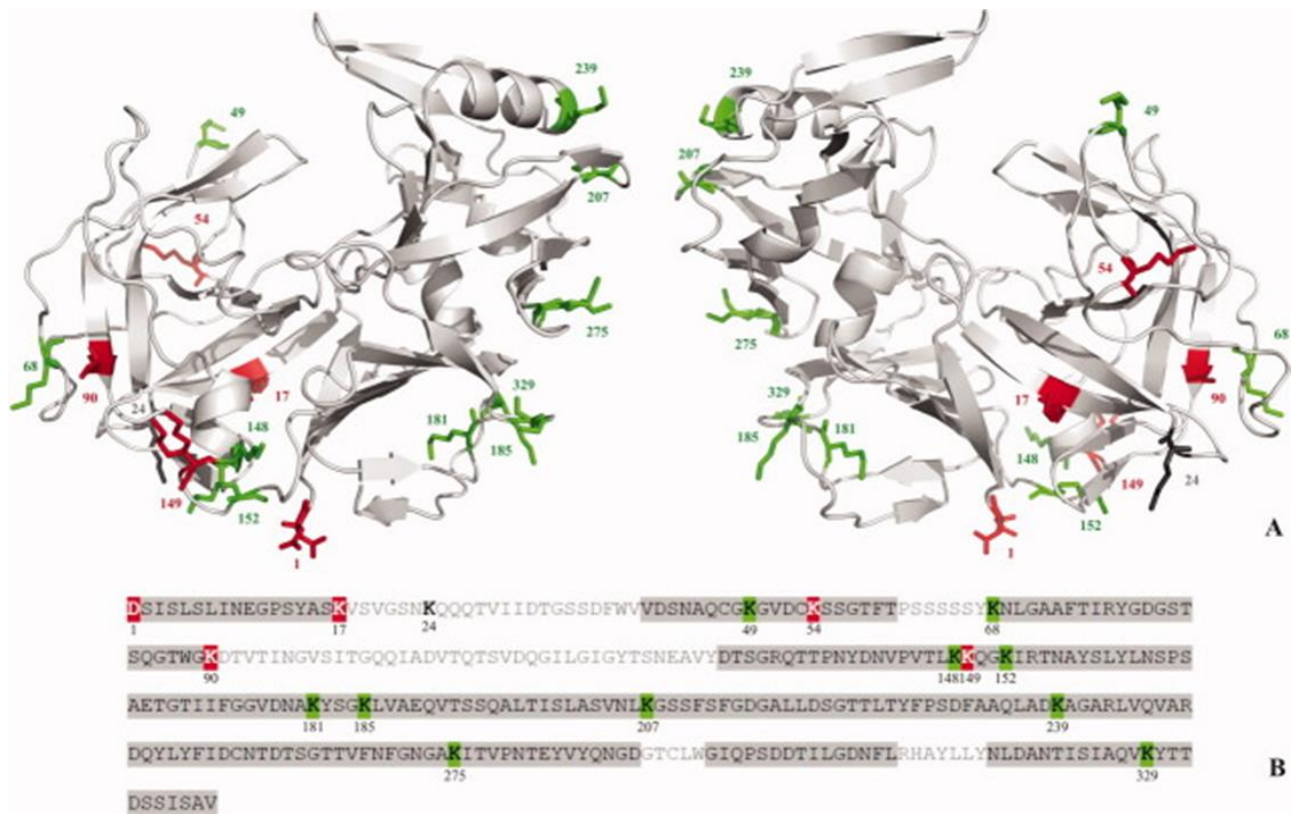
Obrázek 7. Porovnání vazby ritonaviru a pepstatinu do aktivního místa Sapp1p. Uhlíková kostra ritonaviru je znázorněna zeleně, pepstatinu žlutě. Atomy kyslíku jsou vyznačeny červeně, atomy dusíku modře, atomy síry zlatě. Jsou vyznačena podmísta S4-S3' vazebního místa enzymu a mezi podmísty S1 a S1' jsou naznačeny katalytické aspartáty.

Na strukturní studii Sapp1p navazuje i práce **III-4**, a proto jsem ji zařadila do tohoto bloku, ačkoli se v pravém smyslu slova o strukturní studii nejedná. Znalost struktury Sapp1p nám však umožnila zkoumat, jakým způsobem jsou molekuly této proteasy orientovány během závěrečné fáze své sekrece, při průchodu buněčnou stěnou. Zajímalo nás, v jaké podobě se Sapp1p během sekrece v buněčné stěně vyskytuje, tedy především jestli je ještě v podobě prekursoru nebo už aktivovaná, případně jaké je její strukturní uspořádání.

Zjistili jsme, že je možno Sapp1p uvolnit z buněčné stěny pomocí β -merkapt ethanolu nebo 1% roztoku SDS, a to už v maturní podobě. Chromogenní peptidový substrát byl štěpen během půlhodinové inkubace s promytými buňkami *C. parapsilosis*, což ukázalo, že Sapp1p je proteolyticky aktivní ještě před úplným uvolněním do média.

Pro analýzu topologie Sapp1p na rozhraní mezi buněčnou stěnou a extracelulárním prostorem jsme použili biotinylační činidla sulfo-NHS-biotin a sulfo-NHS-LC-biotin, která nepronikají buněčnou stěnou a naváží se tedy jen na NH_2 skupiny exponované na povrchu buněk. Nejprve jsme ověřili, že se v purifikované Sapp1p se tato činidla vážou na všech 15 lysinů, které tato molekula obsahuje. Všechny lysiny byly biotinylací dostupné, ale NH_2 skupina N-koncové aminokyseliny (aspartátu) nikoli. Pak jsme s biotinylačními činidly inkubovali celé, promyté buňky *C. parapsilosis*. Z nich jsme extrahovali Sapp1p pomocí β -merkapt ethanolu a uvolněnou proteasu analyzovali pomocí hmotností spektroskopie.

Analyticky dostupné byly všechny lysiny s výjimkou K24, který se nevyskytl v žádném z peptidových fragmentů získaných během opakovaných experimentů. Některé z lysinů byly biotinylovány vždy, na některých jsme biotin našli jen v některých experimentech. Lysinové zbytky, které byly vždy biotinylovány, jsou lokalizovány v C-koncové doméně Sapp1p. Ačkoli je buněčná stěna složitý a dynamický systém, svědčí tento výsledek o existenci významné populace molekul Sapp1p, které se vynořují z buněčné stěny nejprve C-koncovou doménou, a část N-koncové domény je poslední částí molekuly, která buňku opouští. Model vytvořený na základě znalosti struktury Sapp1p ukazuje, jak může být aktivní místo enzymu přístupné ještě předtím, než se celá molekula uvolní do extracelulárního prostoru (Obr.8).



Obrázek 8. Pozice lysinových zbytků v trojrozměrné a primární struktuře Sapp1p.

Lysiny, které byly biotinylovány před extrakcí proteasy z buněčné stěny, jsou vyznačeny zeleně. Lysiny, které biotinylovány nebyly, jsou vyznačeny červeně. Lysin 24, který se nepodařilo analyzovat, je vyznačen černě. Fragменты Sapp1p určené hmotnostní spektrometrií jsou v proteinové sekvenci vyznačeny šedě.

Jednou z nezodpovězených otázek zůstává, k jakým interakcím dochází mezi Sapp1p a složkami buněčné stěny. Fakt, že proteasu lze uvolnit pomocí β -merkптоethanolu by ukazoval na roli S-S vazeb. Ale čtyři cysteinové zbytky, které Sapp1p obsahuje, významně přispívají ke stabilitě trojrozměrné struktury enzymu a není pravděpodobné, že by byly zapojeny do interakce s buněčnou stěnou ve chvíli, kdy je protein už sbalený a aktivní. Kromě toho bylo možno uvolnit Sapp1p z buněčné stěny i bez β -merkптоethanolu, pomocí 1 % roztoku dodecylsírany sodného.

Vlastnosti buněčné stěny *C. parapsilosis* si nepochybně vyžadají další analýzy, už jen proto, že tato kvasinka vyniká svými schopnostmi adherovat na různé, biotické i abiotické povrchy.

Blok IV – Vakuolární proteasy patogenní kvasinky *Candida albicans*

IV-1 Bauerová, V., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2012) Nitrogen source and growth stage of *Candida albicans* influence expression level of vacuolar aspartic protease Apr1p and carboxypeptidase Cpy1p. *Can.J.Microbiol.* 58, 678-681.

Autorský podíl: 45%

Podílela jsem se na návrhu koncepce celé studie, koordinaci experimentů, izolacích RNA, purifikaci Apr1p a Cpy1p a napsala jsem publikaci.

IV-2 Bauerová, V., Hájek, M., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2014) Intracellular aspartic proteinase Apr1p of *Candida albicans* is required for morphological transition under nitrogen-limited conditions but not for macrophage killing. *Folia Microbiol.* 59, 485-93.

Autorský podíl: 40%

Podílela jsem se na návrhu koncepce celé studie, připravila jsem mutantní kmen *C. albicans*, napsala jsem publikaci.

IV-3 Bauerová, V., Vinterová, Z., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2011) Intracellular and extracellular aspartic proteinases of pathogenic *Candida* species: Can their inhibitors be further developed? *Current Enzyme Inhibition* 7, 125-129.

Autorský podíl: 80%

Review, napsala jsem většinu textu.

IV-4 Bauerová, V., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2013) Fungal gene-encoded peptidase inhibitors. *Curr.Med.Chem.* 20, 3041-3048.

Autorský podíl: 80%

Review, napsala jsem většinu textu.

Candida albicans je v současnosti nejrozšířenější a nejlépe prostudovaný kvasinkový patogen. Na rozdíl od jiných kvasinek, které lze obvykle izolovat z různých prostředí, kolonizuje *C. albicans* téměř výhradně teplokrevné živočichy, u nichž za určitých podmínek může způsobit infekce různého rozsahu a závažnosti. Přestože je takto specializovaná, vykazuje *C. albicans*

značnou metabolickou plasticitu, která je jedním z faktorů jejího biologického úspěchu. I při kolonizaci teplokrevných živočichů je totiž kvasinka vystavena vlivu prostředí, která se velmi liší, pokud jde např. o pH nebo dostupnost živin a musí se na ně adaptovat. *C. albicans* se může vyskytovat na povrchu kůže, na sliznicích, v ústní dutině, ve střevech, ve sputu či v krvi. U zdravých jedinců je *C. albicans* často součástí mikrobiomu gastrointestinálního traktu, kde je koncentrace nutrientů poměrně vysoká, ale soutěží o ně více mikroorganismů. Naopak systémová kandidóza je provázena výskytem *C. albicans* v krvi, kde je sice dostupná glukosa, ale kvasinky jsou fagocytovány neutrofily a makrofágy. Fagocytické buňky vystavují kvasinky oxidačnímu stresu a hladovění. Uvnitř makrofágů tedy *C. albicans* přepne z glykolýzy na glukoneogenezi a aktivuje glyoxylátový cyklus (Lorenz et al., 2004). Tato metabolická adaptace je součástí strategie úniku kvasinek z makrofágů. V souboji mezi *C. albicans* a makrofágy hrají roli i další faktory, např. morfologická změna z kvasinkové na hyfální formu, která umožní kvasinkám z makrofágů „prorůst“ ven. Během systémové kandidózy se buňky *C. albicans* vyskytují prakticky ve všech orgánech hostitele, a tím i v prostředích s rozdílnou dostupností, resp. s různými typy nutrientů. Metabolické přizpůsobení zároveň souvisí s virulencí. Například nutnost využít hostitelské proteiny jako zdroj dusíku vede k indukci sekretovaných proteas, které se podílejí na destrukci hostitelské tkáně (viz **Blok II**).

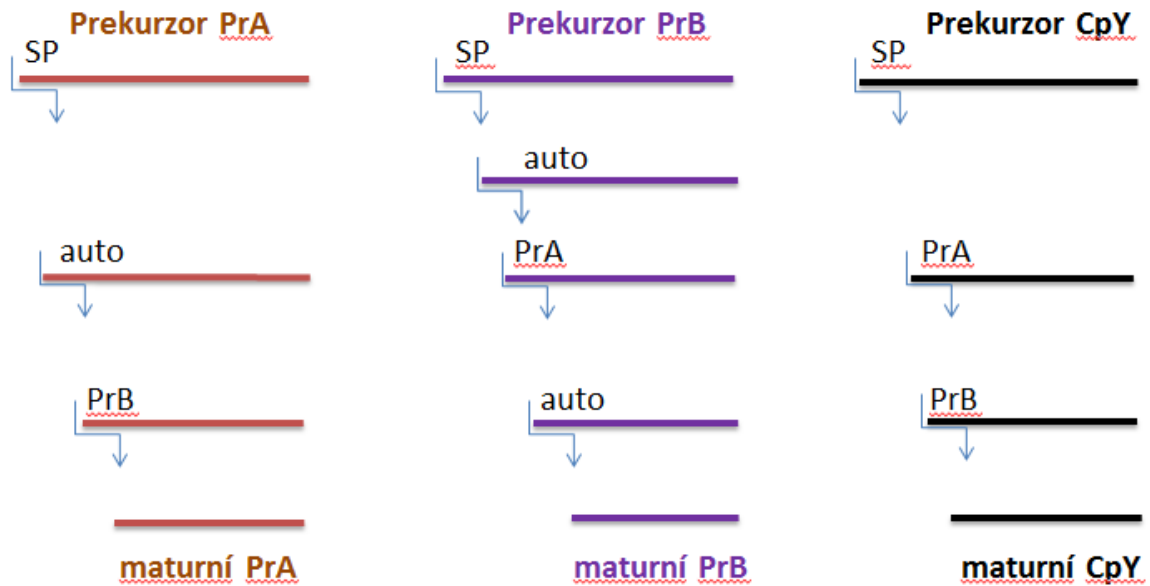
Důležitou roli v metabolické adaptaci na změnu prostředí hrají vakuoly. Pomáhají regulovat buněčnou homeostázi, jsou úložištěm iontů a metabolitů, podílejí se na degradaci a recyklaci buněčných komponent. Pro přežití kvasinek v nutričně chudých prostředích je nezbytné omezit biosyntetické děje na minimum a co nejlépe využít vnitřní zdroje. V takových situacích dochází k tzv. autofágii, procesu masivní, nespecifické degradace cytoplasmatického materiálu, který je transportován do vakuol. V krajním případě jsou degradovány i celé organely. Buňka tak dočasně získá životně důležité nutriety, které může recyklovat a využít pro syntézu látek pro přežití zcela nezbytných (Richards et al., 2010).

Vakuoly jsou spolu s proteasomy hlavními místy proteolýzy v kvasinkových buňkách. Proteasom je spojen především s hydrolyzou poškozených, špatně sbalených, či nepotřebných proteinů, které jsou k němu transportovány po označení ubiquitinem. Ačkoli ubiquitin může hrát roli i při transportu proteinů do jiných buněčných kompartmentů včetně vakuol, většina materiálu určeného k degradaci se do vakuol dostává prostřednictvím autofágie. V minulosti byl podrobně charakterizován vakuolární proteolytický systém *S. cerevisiae*. Zahrnuje 6 peptidas vakuolárního lumen: 2 endopeptidasy (proteínasy A a B; PrA a PrB), dvě karboxypeptidasy (CpY a CpS) a dvě aminopeptidasy (ApI a ApCo). Ve vakuolární membráně je pak vázána

dipeptidylaminopeptidasa B. Jedná se o poměrně nespecifické enzymy sloužící k odbourávání mnoha různých proteinů. Tyto peptidasy byly použity jako modelové molekuly pro studium transportu proteinů do vakuol a dobře je prostudována i jejich aktivační kaskáda (Jones, 1991).

Během poměrně dlouhé doby, kdy byly vakuolární proteasy *S. cerevisiae* předmětem zájmu badatelů, se měnilo i jejich označení. Proteinasa A tedy můžeme najít v literatuře i databázích pod názvy PrA, ysc A, Pho9, YPL154C nebo saccharopepsin. Proteinasa B se vyskytuje pod názvy PRB1, yscB, CVT1. Karboxypeptidasa Y bývá označována jako CPY1, PRC1, případně YMR297W. Ačkoli je zvykem psát označení genů velkými písmeny a kurzívou (*PEP4*, *PRB1*) a označení proteinů s prvním písmenem velkým, dalšími malými a na konci uvádět „p“ (Pep4p, Prb1p), v literatuře není tento úzus vždy dodržován. V dalším textu budu používat označení *PEP4*, *PRB1* a *CPY1* pro geny kódující proteiny A, B a karboxypeptidasu Y; proteiny budu označovat Pep4p, Prb1p a Cpy1p.

Pep4p, Prb1p, Cpy1p a aminopeptidasa ApI jsou do vakuol transportovány v podobě zymogenů, sestávajících z peptidasové domény a N-koncové extenze, která obsahuje signál pro transport do vakuol a jejíž odštěpení je nutné k tomu, aby tyto enzymy mohly hydrolyzovat jiné proteiny. V případě Pep4p, Prb1p a Cpy1p je nejprve odštěpen signální peptid signální peptidasou; aminopeptidasa ApI obvyklou signální sekvenci nemá. Aktivace zymogenů Pep4p a Prb1p dále zahrnuje jak autokatalytické kroky, tak štěpení jedné proteasy druhou. Pep4p i Prb1p se následně podílejí na aktivaci Cpy1p (Obr.9). Pep4p je zodpovědná za aktivaci dalších vakuolárních hydrolas, například ApI, alkalické fosfatasy, trehalasy, či RNasy. Přesto žádná z vakuolárních peptidas není nepostradatelná, přinejmenším za dobrých životních podmínek. Mutanty, kterým chybí Pep4p jsou životaschopné, avšak jsou-li vystaveny stresu, jejich odolnost je výrazně nižší než u divokých typů. Pep4p se podílí na degradaci proteinů poškozených oxidativním stresem, takže mutanty *pep4Δ* rychleji stárnou (Marques et al., 2006). V podmínkách nedostatku dusíku a dalších živin dochází u *pep4Δ* rychle k buněčné smrti (Teichert et al., 1989).



Obrázek 9. Aktivace některých vakuolárních proteas v *S. cerevisiae*. Upraveno podle Jones, E.W. (1991).

Pep4p se svou dvoudoménoú strukturou podobná savčím aspartátovým proteasám, pepsinu a lysozomálnímu kathepsinu D. Aktivní místo je tvořeno dvěma triádami DTG, každá z nich je součástí jedné domény. Aktivní místo pojme úsek substrátu sestávající nejméně z 8 aminokyselinových zbytků. I když je substrátová specifita Pep4p poměrně široká, přednostně jsou štěpeny vazby obsahující Phe, Leu nebo Glu v pozici P1 a Phe, Ile, Leu nebo Ala v pozici P1'. Na afinitu substrátu k enzymu mají pak vliv i aminokyselinové zbytky v dalších pozicích substrátu, které jsou v kontaktu s vazebnou dutinou proteasy (Parr et al., 2007).

Pep4p stejně jako většina aspartátových proteas je inhibována pepstatinem, 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propanem (EPNP) a methylesterem diazoacetyl-D,L-norleucinu (DAN). Kromě toho má však také svůj zcela specifický polypeptidový inhibitor zvaný IA3, který se vyskytuje v cytoplasmě *S. cerevisiae*. Byl to první popsán inhibitor aspartátové proteasy kódovaný genem a vyskytující se navíc v témže organismu jako proteasa sama. Skládá se z 68 aminokyselin a váže se jen na Pep4p a inhibuje ji v subnanomolárních koncentracích. Jiné proteasy ho štěpí jako substrát. Struktura komplexu Pep4p-IA3 ukazuje neobvyklý typ interakce, kdy aminokyselinové zbytky 2-32 polypeptidu IA3 vytváří helix, který blokuje vstup do aktivního místa. Všechny

peptidové vazby v inhibitoru jsou v tomto uspořádání dostatečně vzdáleny od aspartátů v aktivním místě, takže nemůže dojít k jejich hydrolyze. IA3 nabývá této konformace jen v kontaktu s Pep4p. Sám o sobě se v roztoku chová jako nestrukturovaný protein (Li et al., 2000). Fyziologická role IA3 zůstává nejasná.

Je zřejmé, že vakuoly *S. cerevisiae* jsou dobře prostudovány a jejich proteolytický systém včetně vlastností jednotlivých proteas byl podrobně popsán. To však nelze říci o vakuolách patogenních kvasinek. Role vakuol pro přežití *C. albicans* uvnitř makrofágů byla přitom opakovaně potvrzena. Postrádá-li *C. albicans* viditelnou a funkční vakuolu, není schopna zabít makrofágy a přežít při nedostatku dusíku (Palmer et al., 2005). Vakuola tedy může být vhodným terapeutickým cílem. Ani jednotlivé vakuolární proteasy patogenních kvasinek nebyly dosud charakterizovány, což překvapí zejména u *C. albicans* a ve srovnání s pozorností, která byla věnována aspartátovým proteasám sekretovaným touto kvasinkou do extracelulárního prostoru.

Zaměřili jsme se proto na vakuolární aspartátovou proteasu Apr1p v *C. albicans*, která je homologická s Pep4p. Práci jsme postupně rozšířili o Cpy1p, karboxypeptidasu Y, která s Apr1p kopurifikovala v průběhu pokusů o její izolaci přímo z *C. albicans*. V publikaci IV-1 jsme popsali regulaci genů *APRI* a *CPYI* během růstu *C. albicans* v různých tekutých médiích lišících se typem a koncentrací zdroje dusíku. Transkripce *APRI* i *CPYI* se v rostoucích buňkách *C. albicans* postupně zvyšuje, současně s tím, jak se zvětšuje objem vakuol. Na syntézu Apr1p má však značný vliv právě dostupnost dusíku. V nutričně bohatém médiu jsme na úrovni proteinu detekovali pouze Cpy1p. Apr1p byla přítomna jen v buňkách kultivovaných za podmínek dusíkové limitace, ať už šlo o „dobrý“ zdroj v nízké koncentraci (např. amonné ionty), nebo obtížně metabolizovatelný zdroj (např. prolin). Vakuolární aspartátová proteasa je tedy regulována na úrovni transkripce i translace. Také se nám podařilo částečně purifikovat oba studované enzymy a určit jejich N-konce: KGGKYDA- pro Apr1p, STPKDL- pro Cpy1p. Tím jsme identifikovali štěpná místa v jejich prekursorech, která byla do té doby pouze odhadována na základě podobnosti s proteasami jiných kvasinek.

Studie IV-2 navazuje na předchozí práci a hledá odpovědi na otázky spojené s významem genů *APRI* a *CPYI* pro zvládnutí nutričního stresu a pro infektivitu *C. albicans*. Vycházeli jsme z faktu, že produkce Apr1p je stimulována omezenou dostupností dusíku a že transkripce *APRI* a *CPYI* je zvýšena po ingesci kvasinek fagocytickými buňkami (Fradin et al. 2005; Lorenz et al. 2004). Předpokládali jsme, že přinejmenším *apr1Δ*, tedy mutantní kmen *C. albicans* postrádající obě alely genu *APRI*, nedokáže makrofágy zabít; naopak, bude mít problém v makrofázích

přežít. Použili jsme mutanty *apr1Δ* a *cpy1Δ*, které jsme získali z laboratoří Prof. Samuela A. Lee na Universitě v San Antoniu v USA a Prof. Daniela Kornitzera na Technionu v Haifě v Izraeli. Sami jsme pak připravili kontrolní kmen revAPR1 tak, že jsme do *apr1Δ* vrátili jednu alelu *APR1*. Proteasa Apr1p je nezbytná pro tvorbu hyf v podmínkách hladovění na dusík. Je-li k dispozici dostatek nutrietů, buňky *apr1Δ* reagují na morfologické stimuly (např. přítomnost séra) stejně jako buňky divokého typu. Vakuolární aspartátová proteasa je však evidentně nezbytná pro mobilizaci vnitřních zdrojů dusíku v situacích, kdy se jich nedostává v okolí. Buňky *apr1Δ* v nutričně limitujících podmínkách morfologickou přestavbu nezvládnou. Bylo však překvapivé, že schopnost kmene *apr1Δ* zabít makrofágy nebyla ve srovnání s rodičovským kmenem nijak omezena. Možným vysvětlením je, že nutriční stres uvnitř makrofágů je menší, než jaký jsme navodili v laboratorních podmínkách.

Při práci s delečními mutanty jsme si všimli, že aktivace Cpy1p patrně nezávisí na Apr1p, což je překvapivý rozdíl oproti *S. cerevisiae* (viz výše). Buňky *apr1Δ* i buňky divokého typu totiž obsahovaly Cpy1p srovnatelné molekulové hmotnosti a srovnatelného množství. Toto pozorování vycházelo z opakované analýzy buněčných lysátů pomocí Western blotu a protilátek proti Cpy1p. Bohužel se nepodařilo připravit vzorek, který by bylo možné spolehlivě analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie a potvrdit tak tento výsledek s definitivní platností. Nebyl by to však jediný případ, naznačující, že procesy, kterých se účastní Apr1p a Pep4p nejsou identické a že znalosti získané studiem vakuolární proteolýzy v *S. cerevisiae* nelze jednoduše přenést na *C. albicans*. Protein Rbt5, který v obou zmíněných kvasinkách váže hemoglobin a podílí se na získávání železa, je v *S. cerevisiae* degradován proteasou Pep4p, zatímco v *C. albicans* se homologická proteasa Apr1p na jeho štěpení nepodílí (Weissman et al., 2008).

Studium vakuolárních proteas *C. albicans* a dalších patogenních kvasinek může ještě přinést mnohá překvapení a stojí za to v něm pokračovat. Tento názor jsme se pokusili představit v širších souvislostech ve dvou přehledových článcích, zde uvedených jako publikace **IV-3** a **IV-4**.

Práce **IV-3** je stručným souhrnem informací o aspartátových proteasách patogenních kvasinek. Zatímco většina přehledových článků s podobnou tematikou se - přinejmenším při pohledu z roku 2011- soustředila na sekretované solubilní proteasy, snažili jsme se v tomto textu upozornit také na aspartátové proteasy vázané k buněčné stěně nebo plasmatické membráně glykosylfosfatidylinositolovou kotvou, a dále právě na existenci vakuolární aspartátové proteasy a její porovnání s Pep4p z *S. cerevisiae*.

Jaký terapeutický potenciál mají inhibitory těchto proteas a zda lze navrhnout polypeptidové inhibitory vakuolárních proteas inspirované strukturou IA3 z *S. cerevisiae* je jednou z otázek, kterou jsme se zabývali v přehledovém článku **IV-4**. Publikace obsahuje přehled polypeptidových inhibitorů proteas různých nižších hub, jejichž repertoár v těchto organismech je poměrně široký a různorodé jsou i mechanismy jejich účinku. Je pozoruhodné, že některé polypeptidové inhibitory proteas mají ještě jinou funkci, např. TFS1, inhibitor karboxypeptidasy Y v *S. cerevisiae*, inhibuje taky aktivátor GTPáz Ira2p. Jiným příkladem je I2B, inhibitor serinové endopeptidasy Prb1p v *S. cerevisiae*, který hraje podstatnou roli při fúzi vakuolárních membrán. Analýza těchto polypeptidů je tedy zajímavé i z evolučního hlediska.

Blok V - Různé

V-1 Zheng, B., Halperin, T., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Adam, Z. and Clarke, A.K. (2002) Characterization of chloroplast Clp proteins in *Arabidopsis*: Localization, tissue specificity and stress responses. *Physiol. Plantarum* 114, 92-101.

Autorský podíl: 25%

Začínala jsem celý projekt, hledala vhodné experimentální uspořádání pro studium stresu v *A. thaliana*, isolovala jsem RNA a proteiny.

V-2 Bednářová, L., Palacký, J., Bauerová, V., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Pichová, I. and Mojzeš, P. (2012) Raman microspectroscopy of the yeast vacuoles. *Spectroscopy: An International Journal* 27, 503-507.

Autorský podíl: 25%

Podílela jsem se na návrhu koncepce celé studie, koordinaci experimentů, kultivaci kvasinek a psaní publikace.

V-3 Buček, A., Matoušková, P., Sychrová, H., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2014) $\Delta 12$ -fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids. *PLoS ONE* 9(3): e93322. doi:10.1371/journal.pone.0093322

Autorský podíl: 20%

Podílela jsem se na návrhu koncepce celé studie, koordinaci experimentů a psaní publikace.

Studium proteolýzy u virů a kvasinek mě dovedlo i k dalším projektům, které s výchozími tématy souvisely spíše volně, ale umožnily mi metodicky se posunout. Tři publikace, které jsou výsledkem těchto odboček od tématu aspartátových proteas, jsou shrnuty v **Bloku V**. Týkají se buď proteolýzy v jiném biologickém systému (Publikace V-1), nebo dalších vlastností patogenních kvasinek, tj. nikoli proteas (Publikace V-2 a V-3).

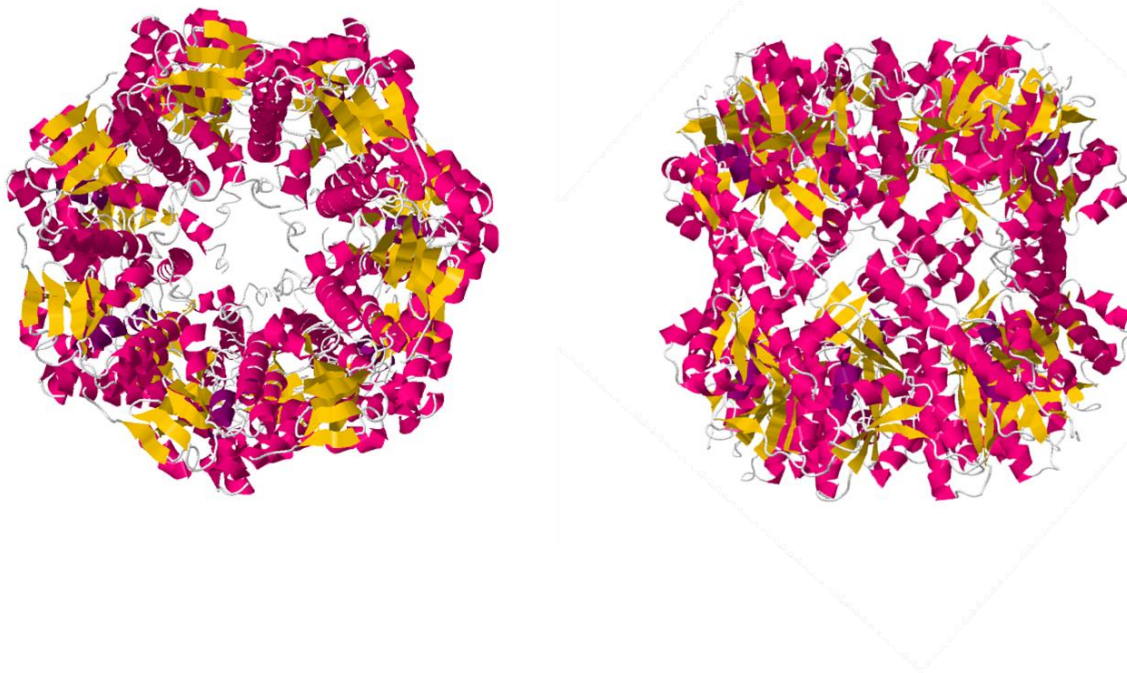
Práce **V-1**, chronologicky první z tohoto bloku, se zabývá proteiny Clp v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Clp proteiny jsou ATP-dependentní serinové proteasy složené se dvou

složek, proteolytické ClpP a regulační, která má ATPasovou aktivitu a funguje jako molekulární chaperon. Ačkoli zkratka Clp vychází ze slov *caseinolytic protease*, používá se jakou součást označení i pro ty podjednotky proteolytického komplexu, které samy o sobě proteolytickou aktivitu nemají.

Studie Clp proteinů v chloroplastech *Arabidopsis* jsem se účastnila během své stáže na universitě v Umeå (Umeå Universitet) ve Švédsku, na Katedře fyziologie rostlin v laboratoři Prof. Adriana Clarka. Podílela jsem se zejména na nastavení podmínek kultivace *A. thaliana* a jednotlivých stresů, kterým byly rostliny vystaveny. Izolovala jsem RNA a celkové proteiny z listů *A. thaliana* a analyzovala jsem expresi jednotlivých proteinů Clp pomocí Southern a Western blotů. Southern blot byl později nahrazen analýzou pomocí PCR v reálném čase.

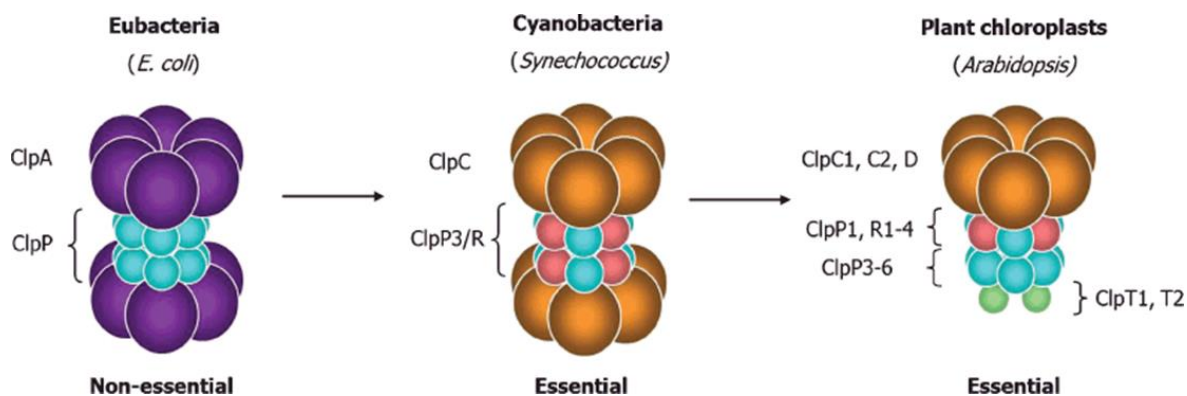
V době, kdy jsem se k projektu připojila, byla známa struktura ATP-dependentní proteasy ClpP z *E. coli* (Wang et al., 1997). Ta má, stejně jako většina známých ATP-dependentních proteas, architekturu dutého válce složeného ze dvou oligomerních částí: ATPasové, kterou tvoří proteiny ClpA nebo ClpX a proteolytické tvořené dvěma heptamerními kruhy z podjednotek ClpP (Obr.10). Celá proteasa ClpP má tedy 14 aktivních míst tvořených katalytickou triádou serin – histidin – kyselina asparagová (v případě ClpP z *E. coli* S97-H122-D171). ATPasy, které jsou součástí tohoto komplexu, se řadí do rodiny Hsp100/Clp a ta do širší rodiny zvané AAA+ (ATPases Associated with various Activities). Vyskytují se v řadě organismů od bakterií po savce, nejen jako chaperony, ale často právě jako regulační složky proteas typu Clp.

Substráty interagují nejprve s chaperonovým komplexem, přičemž dojde k jejich rozbalení, denaturaci a pak jsou posunuty do proteolytické části, kde jsou degradovány na krátké peptidy, které difundují z proteolytického komplexu ven. Chaperonová část s ATPasovou aktivitou je tedy klíčová pro substrátovou specifitu celé proteasy. Samotná proteolytická složka ClpP je schopná proteolýzy i nezávisle, dokáže však štěpit jen peptidy kratší než pět aminokyselinových zbytků.



Obrázek 10. Struktura ATP-dependenční proteasy ClpP z *E. coli* ze dvou různých úhlů pohledu. Převzato a upraveno ze záznamu v PDB: 1TYF (Wang et al., 1997).

Trojrozměrná struktura proteasy ClpP z chloroplastů vyšších rostlin nebyla určena dodnes, ale na základě dosud známých poznatků lze zkonstruovat model tohoto složitého systému (Obr.11). Vzhledem k endosymbiotickému původu chloroplastů se předpokládá určitá podobnost chloroplastové ClpP s homologickou proteasou ze sinic. Zároveň je však zřejmé, že ClpP v chloroplastech vyšších rostlin je mnohem složitější než v ostatních organismech. Dodnes není zcela vyjasněna funkce jednotlivých podjednotek v systému a rovněž není přesně známo, které proteiny v chloroplastech jsou proteasou ClpP hydrolyzovány (bylo jich identifikováno pouze několik) a jakým způsobem jsou ke komplexu ClpP nasměrovány. Na druhou stranu dnes již víme, že ClpP je nejdůležitější proteasou z hlediska kontroly kvality proteinů ve stroma chloroplastů a že funkční ClpP je pro funkci chloroplastu a celkovou životaschopnost rostliny nezbytná (Olinares et al. 2011).



Obrázek 11. Schematické znázornění vývoje ATP-dependentních Clp proteas od bakterií k chloroplastům vyšších rostlin. Převzato z Clarke (2012).

V době, kdy projekt probíhal, byly známé a veřejně dostupné pouze některé části genomu *A. thaliana*. Celý genom a jeho anotace byly zveřejněny později. V dostupných sekvencích jsme však *in silico* našli homolog ClpC, obsahující signální peptid pro lokalizaci v chloroplastu a také části sekvencí kódujících izomery Clp3-6. Jejich sekvenování bylo v rámci tohoto projektu dokončeno. V další práci jsme analyzovali expresi ClpC, ClpD a pěti proteinů ClpP: 1, 3-6. ClpP2 kódovaný jadernou DNA je lokalizován v mitochondriích a nebyl do této studie zahrnut. Kódující sekvence pro ClpP1 je součástí plastidového genomu.

Analýza exprese jednotlivých Clp na úrovni mRNA a proteinu ukázala, že nově identifikované izomery ClpP kódované jadernými geny jsou transportovány do chloroplastů a lokalizovány ve stroma, spolu s ClpP1-6, ClpC a ClpD. Rostliny *Arabidopsis* jsme pak vystavili celé řadě stresů: suchu, vysoké koncentraci chloridu sodného, tepelnému šoku, extrémně intenzivnímu světlu a zranění. Hladiny mRNA i proteinu pro jednotlivé izofomy Clp zůstávaly za všech uvedených podmínek stejné, s jedinou výjimkou – snížení exprese ClpP3 při zranění.

To bylo překvapivé zjištění, protože jsme předpokládali, že se proteiny Clp účastní bezprostřední reakce na vnější stres a očekávali jsme tudíž, že se jejich exprese bude v důsledku stresu měnit. Fakt, že se chovají jako konstitutivní, ukazuje spíše na jejich roli v dlouhodobější aklimatizaci.

Tato práce otevřela cestu rozsáhlejšímu studiu Clp proteinů ve vyšších rostlinách. V současné době se zkoumá jejich struktura, jejich přirozené substráty, role, kterou hrají při vývoji plastidů a také evoluční proces, který vedl od jednodušších bakteriálních Clp ke složitým komplexům, jaké nacházíme v chloroplastech.

Ke studii V-2 nás přivedla práce s vakuolárními proteasami *C. albicans*. Poté, co jsme si všimli závislosti exprese Apr1p na dostupnosti zdroje dusíku, začali jsme se zajímat o chemické složení vakuol *C. albicans* v různých nutričních podmínkách. Ideálním způsobem, jak analyzovat chemické složení buněčných kompartmentů přímo v živých buňkách je Ramanova mikrospektroskopie, využívající spojení Ramanova spektrometru s konfokálním mikroskopem. Ramanova spektroskopie na rozdíl od infračervené může bez omezení pracovat se vzorky ve vodném prostředí. A díky vývoji v oblasti laserů je možno použít paprsky o vlnové délce vyhovující danému experimentálnímu uspořádání. Jde o nedestruktivní metodu, která nevyžaduje použití značek. Studie V-2 byla provedena ve spolupráci s Dr. Lucií Bednárovou z UOCHB AV ČR a s týmem Doc. Petera Mojzeše na Matematicko-fyzikální fakultě UK, kde byl k dispozici Ramanův mikrospektrometr LabRam HR800 (Horiba). Projekty podobného typu stojí na spolupráci odborníků z oblasti fyziky, chemie a biologie. Bez této spolupráce není možno zvládnout celý proces od formulace otázek, přes přípravu vzorků a měření, až po interpretaci fyzikální i biologickou, a vypořádat se s technickými obtížemi.

Otázka, již jsme si položili, zněla, zda jsme vůbec schopni provádět měření obsahu vakuol v živých buňkách, tedy zdali a) jsme schopni zajistit, že buňky budou živé po celou dobu měření; b) že dokážeme během experimentu rozlišit vakuolu od dalších částí buňky.

Buňky je třeba imobilizovat tak, aby se po dobu měření nehýbaly, ale zároveň zůstaly živé. Používali jsme podložní i krycí sklíčka s nízkou autofluorescencí a osvědčilo se nám pokrývat je poly-L-lysinem. Kvůli autofluorescenci média bylo nutné před měřením promýt buňky vodou, čímž jsme je vystavili osmotickému stresu. Abychom co nejméně měnili fyziologický stav buněk, snažili jsme se provádět manipulaci se vzorky a měření co nejrychleji. Buňky tedy byly ve vodě a mezi sklíčky celkem nanejvýš 90 minut. Paralelně připravenou suspenzi buněk ve vodě jsme po 90 minutách rozetřeli na misky s kompletním pevným médiem (YPD), abychom zkontrolovali, zda buňky přežili a narostou z nich kolonie. Pro ověření životaschopnosti buněk jsme používali také komerční barvivo FUN1 (Molecular Probes), v souladu s návodem výrobce. Téměř 100 % buněk inkubaci ve vodě po dobu 90 minut přežilo.

K měření jsme nejprve zvolili argonový laser o vlnové délce 514 nm. Buňky vystavené tomuto paprsku však příliš rychle umíraly, proto jsme začali používat heliový-neonový laser o vlnové délce 632 nm.

V kompartmentu, který jsme považovali za vakuolu, se objevoval spektrální pás o vlnové délce 1154 cm^{-1} , který odpovídá polyfosfátu. Změřením Ramanova spektra čistého polyfosfátu jsme

tento předpoklad ověřili. Podle literatury by se polyfosfát měl vyskytovat právě ve vakuolách jako aniont kompenzující náboj kationtů kovů, které jsou ve vakuole často ukládány (např. Zn^{2+} , Mg^{2+}). Pás odpovídající polyfosfátu se nevyskytoval v jiných buněčných kompartmentech. Polyfosfát je tedy možno považovat za spektrální vakuolární marker. Ramanova mikrospektroskopie umožňuje polyfosfát kvantifikovat. V rámci našich experimentů se tato koncentrace měnila v rozsahu od několika desítek do několika stovek mM/l a předpokládáme, že odráží fyziologický stav buněk.

Podářilo se nám tedy rozvinout techniku analýzy obsahu vakuol pomocí Ramanovy mikrospektroskopie, od přípravy a imobilizace vzorku po vyhodnocení spekter. Tento projekt nadále pokračuje – využíváme Ramanovu mikrospektroskopii k analýze vakuol v buňkách vystavených různým typům nutričního stresu.

Publikace **V-3** je výsledkem propojení dvou tématik rozvíjených na UOCHB AV ČR, a sice studia patogenních kvasinek a hmyzích feromonů.

V průběhu práce s *C. parapsilosis* jsme si uvědomili, jak málo je tento mikroorganismus studován. I dnes, kdy je genom *C. parapsilosis* již anotován, je ověřena funkce u méně než 1 % čtecích rámců (léto 2016). A protože v rámci mnohaletého studia hmyzích feromonů jsou na UOCHB studovány mimo jiné desaturasy mastných kyselin různých druhů hmyzu, rozhodli jsme se spojit zkušenosti a charakterizovat geny, u nichž jsme předpokládali, že v *C. parapsilosis* kódují právě desaturasy mastných kyselin (Fatty Acid Desaturases, FAD).

FAD katalyzují vznik dvojných vazeb v mastných kyselinách. Specifita je určena pozicí nově vznikající dvojných vazeb buď vzhledem ke karboxylu (Δx) anebo k prvnímu methylu (ωx) mastné kyseliny. Příslušné enzymy označujeme jako Δx , nebo ωx desaturasy. Substrátem pro vznik polynenasycených mastných kyselin jsou mastné kyseliny, které už alespoň jednu dvojnou vazbu mají. Další dvojná vazba je pak zaváděna na specifickou pozici vzhledem k dvojným vazbám již existujícími. Nová dvojná vazba bývá od předchozí často vzdálena tři uhlíkové atomy ($n+3$). FAD jsou membránové proteiny a svou aktivitou se na utváření charakteru membrán podílejí. Vznik dvojných vazeb nebo jejich izomerizace se má vliv na fluiditu membrán. Lipidy obsahující nasycené mastné kyseliny vytvářejí těsné, rigidní uspořádání. Dvojných vazeb však způsobují zalomení řetězců mastných kyselin, které těsné uspořádání znemožňuje a fluidita membrán se v důsledku toho zvyšuje. Desaturace mastných kyselin je jedním z mechanismů, který pomáhá mikroorganismům adaptovat se na nízké teploty.

Saccharomyces cerevisiae obsahují jednu desaturasu mastných kyselin, Ole1p. Jde o stearyl-CoA desaturasu (EC 1.14.99.5), která katalyzuje vznik $\Delta 9$ mastných kyselin a je lokalizovaná v membránách endoplasmatického retikula. Desaturasy katalyzující vznik polynenasycených mastných kyselin se v *S. cerevisiae* nevyskytují. *S. cerevisiae* tedy mohou být využity jako nástroj pro charakterizaci desaturas katalyzujících vznik polynenasycených mastných kyselin, protože a) mastná kyselina $\Delta 9$, která v *S. cerevisiae* přirozeně vzniká, může sloužit jako jejich substrát; b) polynenasycené mastné kyseliny nemohou v *S. cerevisiae* vzniknout jinak než účinkem heterologních desaturas.

C. albicans, na rozdíl od *S. cerevisiae*, obsahuje nejen desaturasu $\Delta 9$ označovanou rovněž Ole1p, ale také desaturasy Fad2p a Fad3p, katalyzující vznik polynenasycených mastných kyselin $\Delta 12$ a $\Delta 15$ které obsahují dvě, resp. tři dvojně vazby. Nenasycené mastné kyseliny s alespoň jednou dvojnou vazbou jsou důležité pro filamentaci, která významně přispívá k virulenci *C. albicans*. Bez genu *OLE1* není *C. albicans* životaschopná, stejně jako *S. cerevisiae* (Krishnamurty et al., 2004). Delece genů *FAD2* a *FAD3* však nevedla k výrazné změně fenotypu v laboratorních podmínkách, ani ke snížení virulence v myším modelu. Vlákniťá forma *C. albicans* však obsahuje více polynenasycených mastných kyselin než kvasinková, takže desaturasy katalyzující jejich vznik se pravděpodobně na morfologických změnách *C. albicans* podílejí (Murayama et al., 2006). Lze předpokládat, že desaturasy $\Delta 12$ a $\Delta 15$ představují pro *C. albicans* výhodu, např. z hlediska dlouhodobého přežití v nepříznivých podmínkách. Tento předpoklad však teprve čeká na experimentální ověření.

Z desaturas *C. parapsilosis* byl před počátkem této studie charakterizován jen gen *OLE1* kódující desaturasu $\Delta 9$, Ole1p. Delece *OLE1* v *C. parapsilosis* měla za následek vznik auxotrofního kmene, který rostl jen v médiu s obsahem nenasycených mastných kyselin. Tento kmen nebyl schopen vytvořit pseudohyfy, vykazoval zvýšenou citlivost vůči SDS nebo peroxidu vodíku a sníženou virulenci v myším modelu (Nguyen et al., 2011). Geny kódující desaturasy polynenasycených mastných kyselin nebyly charakterizovány a genom *C. parapsilosis* ještě nebyl anotován. Bylo tedy nutno provést nejprve analýzu *in silico*, během níž jsme identifikovali sekvence homologické s geny *FAD2* a *FAD3* v *C. albicans* a dalších kvasinkách. Abychom potvrdili, že skutečně kódují desaturasy mastných kyselin, vložili jsme tyto sekvence do vektoru pYES, exprimovali je v *S. cerevisiae* a pak analyzovali extrakty lipidů z těchto kvasinek, označných jako *CpFAD2* a *CpFAD3*. Ve srovnání s kmenem *S. cerevisiae*, který byl transformován jen prázdným vektorem, obsahoval kmen *CpFAD2* kyselinu linolovou ($\Delta 9, \Delta 12-18:2$) a kyselinu hexadekadienovou ($\Delta 9, \Delta 12-16:2$), jejichž vznik byl nepochybně katalyzován

desaturasou CpFad2p. Nalezli jsme také menší množství osmnáctiuhlíkaté mastné kyseliny s dvěma dvojnými vazbami v pozicích 11 a 14 ($\Delta 11, \Delta 14-18:2$), která pravděpodobně vznikla elongací kyseliny 9,12-hexadekadienové. Ve vzorcích z kmene *CpFAD2* byla přítomna také kyselina linolenová ($\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15-18:3$). Domníváme se, že vznikla desaturací kyseliny linolové, díky $\Delta 15$ -desaturasové aktivitě, kterou, jak se ukázalo, desaturasa CpFad2p také má. U tohoto enzymu jsme prokázali také hydroxylační aktivitu.

Kmen *CpFAD3* za běžných podmínek neprodukoval polynenasycené mastné kyseliny, což bylo v souladu s předpokladem, že desaturasa CpFad3p katalyzuje tvorbu dalších dvojných vazeb jen v dvojnenasycených mastných kyselinách. Když jsme však do média přidávali kyselinu linolovou, vznikla linolenová. I v případě genu *CpFAD3* jsme tedy potvrdili, že kóduje desaturasu mastných kyselin.

Závěr

Předkládaná práce je souborem publikací, které vznikaly v letech 1991-2015. Tento dlouhý časový úsek umožňuje nahlédnout, jak se studované tématiky v průběhu let vyvíjely a jak naše práce k tomuto vývoji přispěla. Retrovirové proteasy dnes patří k nejlépe prostudovaným enzymům planety, ale v 90. letech, kdy jsem se jimi zabývala, bylo obtížné získat dostatečné množství materiálu pro podrobnější analýzy. Rozvoj metod souvisejících s přípravou rekombinantních proteinů měl ve své době zásadní význam.

Tématika proteas patogenních kvasinek prošla vývojem možná méně bouřlivým, zato zcela zásadním. Na začátku mé práce na tomto poli nebylo snadné zjistit, kolik izoenzymů proteas ta která kvasinka sekretuje. Dnes je možné porovnávat celé genomy patogenních i nepatogenních kvasinek a zamýšlet se nad evolucí jednotlivých virulenčních faktorů. Posun do post-genomové éry nám umožnil analyzovat transkripci genů vybraných proteas a také některé z příslušných proteinů připravit bakteriální expresí v *E. coli*.

Řadu výsledků uváděných v této práci považuji navzdory rychlému pokroku stále za důležité.

V oblasti retrovirových proteas jde především o tato zjištění:

- Proteasa M-PMV podléhá postupnému processingu za vzniku více variant monomerních podjednotek.
- Proteasu HTLV, jejíž podjednotky byly připraveny chemickou syntézou, bylo možno aktivovat a použít k dalšímu studiu. Ačkoli to není jediný případ svého druhu, syntetických proteinů nebylo publikováno mnoho a tato práce tak zůstává zajímavá z metodického hlediska.
- Proteasy HTLV a BLV byly ve srovnání s jinými retrovirovými proteasami studovány málo. Výsledky, které jsou součástí této práce, jsou proto stále relevantní.

V oblasti proteas patogenních kvasinek je to především:

- Pevné médium vhodné k fenotypovému testování extracelulární proteolýzy nebo její inhibice přímo na kvasinkových buňkách.
- Dlouhodobá systematická charakterizace sekretovaných aspartátových proteas *C. parapsilosis*, od transkripční a enzymologické analýzy až po trojrozměrné struktury.
- Popis průchodu proteasy Sapp1p buněčnou stěnou *C. parapsilosis*, ukazující, že pro většinu molekul Sapp1p není tento proces náhodný. Proteasa je již v buněčné stěně

aktivována, má správnou konformaci a je orientována tak, aby její aktivní místo bylo dostupné ještě předtím, než buňku úplně opustí.

V souboru publikací jsou však také práce, které přináší nové otázky a otvírají cestu dalšímu výzkumu. Jde zejména o analýzu exprese vakuolární proteasy *C. albicans* Apr1p. Ukázali jsme, že tato proteasa je syntetizována jen v podmínkách dusíkové limitace a její exprese je řízena na úrovni transkripce i translace. Regulace na úrovni translace není v *C. albicans* příliš studována a naše výsledky tak mohou být impulsem k její podrobnější a obecnější analýze.

Zjistili jsme, že *C. albicans* potřebuje proteasu Apr1p pro tvorbu hyf v podmínkách hladovění, nikoli však pro zabíjení makrořágů, přestože i uvnitř makrořágů je kvasinka nutričnímu stresu vystavena. To ukazuje, že význam vakuolárních hydrolas patogenních kvasinek pro přežití těchto mikroorganismů v různých typech prostředí by měl být podrobněji zkoumán. Součástí takového výzkumu by měla být i analýza chemického obsahu vakuol, přičemž postupy pro analýzu pomocí Ramanovy mikrospektroskopie jsme publikovali a dále rozvíjíme.

Závěrem bych ráda poděkovala všem, kteří napomohli vzniku této práce. Vzhledem k tomu, že většina prací obsažených v habilitační práci vznikla na UOCHB AV ČR, děkuji především spolupracovníkům ze skupin, za jejichž spolupráce publikace tvořící habilitační spis vznikly. Zejména pak vedoucím těchto skupin, Dr. Petru Štropovi a Dr. Ivě Pichové. Mé poděkování patří nejen celé řadě pracovníků oddělení, ale i spolupracovníkům z pracovišť našich i zahraničních (oddělení hmotnostní spektroskopie a laboratoř rentgenostrukturní analýzy UOCHB AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci, Matematicko-fyzikální fakulta UK, katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, University of Alabama at Birmingham, Alabama, Umeå Universitet, Švédsko). Vděčím jim za inspiraci a za společně prožívanou radost z práce.

V neposlední řadě mé díky patří studentům z Přírodovědecké fakulty UK a VŠCHT Praha. Těm jsem zavázána nejen za spolupráci v laboratoři, ale také za inspirativní myšlenky a podnětné otázky, s nimiž přicházeli.

Nakonec bych ráda poděkovala svým blízkým, zejména svým dětem Viktorovi a Arance, za pochopení a podporu. Mnohé mě naučili a nedopustili, abych se svého profesního úsilí vzdala.

Reference

- Abad-Zapatero, C., R. Goldman, S.W. Muchmore, C. Hutchins, K. Stewart, J. Navaza, C.D. Payne, and T.L. Ray, 1996. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. *Protein Sci* 5, 640-52.
- Barez, P.Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutierrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.R., Perike, S., Neelature Sriramareddy, S., Renolte, N., Staumont, B., Reichert, M., Trono, K. and Willems, L. (2015) Recent advances in BLV research. *Viruses* 7, 6080-8.
- Borelli, C., Ruge, E., Schaller, M., Monod, M., Korting, H.C., Huber, R. and Maskos, K. (2007) The crystal structure of the secreted aspartic proteinase 3 from *Candida albicans* and its complex with pepstatin A. *Proteins* 68, 738-48.
- Borelli, C., Ruge, E., Lee, J.H., Schaller, M., Vogelsang, A., Monod, M., Korting, H.C., Huber, R., and Maskos, K. (2008) X-ray structures of Sap1 and Sap5: Structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*. *Proteins* 72, 1308-1319.
- Brown A.J.P. and Weig, M. (2007) Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends Microbiol* 15, 310-317.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G. and White, T.C. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine* 4:165rv13.
- Brown, A.J.P., Brown, G.D., Netea, M.G. and Gow, N.A.R. (2014) Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol* 22, 614-622.
- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, et al. (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657-62.
- Casadevall. A and Pirofski, L. (2015) What Is a Host? Incorporating the microbiota into the damage response framework. *Infect Immun* 83, 2-7.
- Casaregola, S. Weiss, S. and Morel, G. (2011) New perspectives in hemiascomycetous yeast taxonomy. *CR Biol* 344, 590-598.
- Chew, S.Y. and Than, L.T. (2016) Vulvovaginal candidosis: contemporary challenges and the future of prophylactic and therapeutic approaches. *Mycoses* 59, 262-273.
- Clarke, A.K. (2012) The chloroplast ATP-dependent Clp protease in vascular plants – new dimensions and future challenges. *Physiol Plant* 145, 235-244.

- Chopra H.C. and Mason, M.M. (1970) A new virus in a spontaneous mammary tumor of a rhesus monkey. *Cancer Res* 30, 2081-2086
- Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Anderson, B.F., Moody, C.P., Marshall, C.J., Sullivan, P.A. and Cutfield, J.F. (1995) The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. *Structure* 3, 1261-71.
- Cutfield, J.F., Sullivan, P.A. and Cutfield, S.M. (2000) Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. *Protein Eng* 13, 735-8.
- Daniel, H.M., Lachance, M.A. and Kurtzman, C.P. (2014) On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 67-84.
- Egan, M.J. and Talbot, N.J. (2008) Genomes, free radicals and plant cell invasion: recent developments in plant pathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* 11, 367-372.
- Feketová, Z., Mašek, T., Vopálenký, V and Pospíšek, M. (2010) Ambiguous decoding of the CUG codon alters the functionality of the *Candida albicans* translation initiation factor 4E. *FEMS Yeast Res.* 10, 558-569.
- Fradin, C., DeGroot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C. and Hube, B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 56,397–415.
- Fusek, M., Smith, E.A., Monod, M., and Foundling, S.I. (1993) *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 327, 108-112.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldman, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274, 546-567.
- Guida, A., Lindstädt, C., Maguire, S.L., Ding, C., Higgins, D.G., Corton, N.J., Berriman, M., Butler, G. (2011) Using RNA-seq to determine the transcriptional landscape and the hypoxic response of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *BMC Genomics* 12, 628
- Horváth, P., Nosanchuk, J.D., Hamari, Z., Vágvölgyi, C., and Gácsér, A. (2012) The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. *J. Infect. Dis.* **205**, 923-933.
- Jaskolski, M., Miller, M., Rao, J.K., Leis, J. and Wlodawer, A. (1990) Structure of the aspartic protease from Rous sarcoma retrovirus refined at 2-Å resolution. *Biochemistry* 29, 5889-5898.

- Jones, E.W. (1991) The proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 266, 7963-7966.
- Koelsch, G., Tang, J., Loy, J.A., Monod, M., Jackson, K., Foundling, S.I., and Lin, X. (2000) Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 1480, 117-131.
- Kozłowski, A.G., de Matos, M.A., Carneiro, M.A.S., Lopez, C.L.R., Teles, S.A., Vicente, C.P. and Martins, R.M.B. (2016) Seroprevalence of HTLV in a population of HIV1-infected patients in midwestern Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.
- Krishnamurthy, S., Plaine, A., Albert, J., Prasad, T., Prasad, J. and Ernst, J. (2004) Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. Microbiology 150, 1991-2003.
- C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (Eds.), The yeasts, fourth edition: a taxonomic study, Elsevier, Amsterdam (2011)
- Li, M., Phylip, L. H., Lees, W.E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodawer, A., Kay, J., and Gustchina, A. (2000) The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. Nat Struct Biol 7, 113–117.
- Li, S.C. and Kane, P.M. (2009) The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. Biochim Biophys Acta 1793, 650-663.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A. and Fink, G.R. (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. Eukaryot Cell 3, 1076-1087.
- Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M.A., Almeida, T., Hohman, S., Moradas-Ferreira, P and Costa, V. (2006) The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but *PEP4* overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 152, 3595-3605.
- Milton, R.C., Milton, S.C. and Kent, S.B. (1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. Science 256, 1445-1448.
- Mayer, F.L., Wilson, D. and Hube B. (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 4, 119-128.
- Miranda, I., Silva, R. and Santos, M.A. (2006) Evolution of the genetic code in yeasts. Yeast 23: 203-13.

- Moyes, D.L., Wilson, D., Richardson, J.P., Mogavero, S. et al. (2016) Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 532, 64-68.
- Murayama, S.Y., Negishi, Y., Umeyama, T., Kaneko, A., Oura, T., Niimi, M., Ubukata, K. and Kajiwara, S. (2006) Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology* 152, 1551-1558.
- Newport, G. and Agabian, N. (1997) KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J. Biol. Chem.* 272, 28954–28961.
- Nguyen, L.N., Gacser, A. and Nosanchuk, J.D. (2011) The stearyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect Immun* 79, 136-145.
- Nobile, C.J. and Johnson, A.D. (2015) *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol* 69, 71-92.
- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K. and Nakase, T. (1993) Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Res* 21: 4039-45.
- Olinares P.D.B., Kim, J. and van Wijk, K.J. (2011) The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta* 1807, 999-1011.
- Palmer, G.E., Kelly, M.N., Sturtevant, J.E. (2005) The *Candida albicans* vacuole is required for differentiation and efficient macrophage killing. *Eukaryot Cell* 4, 1677–1686.
- Parr, C. L., Keates, R. A., Bryksa, B. C., Ogawa, M. and Yada, R. Y. (2007) The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* 24, 467-480.
- Parra-Ortega, B., Cruz-Torres, H., Villa-Tanaca, L., Hernández-Rodríguez, C. (2009) Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 505-512.
- Perez-Nadales, E., Almeida Nogueira, M.F., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., Lengeler, K., Marchegiani, E., Mehrorta, P.V., Moretti, M., Naik, V., Osés-Ruiz, M., Oskarsson, T., Schaefer, K., Wasserstrom, L., Brakhage, A., Gow, N.A.R., Kahman, R., Lebrun, M.H., Perez-Martin, J., Di Pietro, A., Talbot, N., Toquin, V., Walther, A. and Wendland, J. (2014) Fungal model systems and elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 70, 42-67.
- Richards, A., Veses, V. and Gow, N.A.R. (2010) Vacuole dynamics in fungi. *Fungal Biol Rev* 24, 93-105.

- Schneider, J. and Kent, S.B. (1988) Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV1 PR. *Cell* 54, 363-368.
- Staib F. (1965) Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 4, 187-193.
- Strebel K. (2013) HIV Accessory Proteins versus Host Restriction Factors. *Curr Opin Virol* 3, 692-699.
- Symersky, J., Monod, M. and Foundling, S.I. (1997) High-resolution structure of the extracellular aspartic proteinase from *Candida tropicalis* yeast. *Biochemistry* 36, 12700-10.
- Tang, J., James, M.N., Hsu, I.N., Jenkins, J.A. and Blundell, T.L. (1978) Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* 271, 618-621.
- Teichert, U., Mechler, B., Muller, H. and Wolf, D. H. (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem* 264, 16037–16045.
- Tsukasaki, K. and Tobinai, K. (2014) Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia-lymphoma: new directions in clinical research. *Clin Cancer Res* 20, 5217-5225.
- van den Hazel, H.B., Kielland-Brandt, M.C. and Wither, J.R. (1992) Autoactivation of proteinase A initiates activation of yeast vacuolar zymogens. *Eur J Biochem.* 207, 277-283.
- Wang J., Hartling, J.A. and Flanagan, J.M (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 14, 447-456 .
- Weiss, S., Samson, F., Navarro, D. and Casaregola, S. (2013) YeastIP: a database for identification and phylogeny of ascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* 13,117-125
- Weissman, Z., Shemer, R., Conibear, E. and Kornitzer, D. (2008) An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 69, 201–217.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D., Smythers, G.W. and Oroszlan, S. (1986) Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis, and in vitro processing of gag precursor polyproteins. *J. Virol.* 57, 826-832.
- Zhang R, Zhu G, Zhang W, Cao S, Ou X, Li X, Bartlam M, Xu Y, Zhang XC, Rao Z (2008) Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Sci.* 17, 1412-1423.