

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

INTERAKCIA HOSTITEĽ – PATOGÉN U
VYBRANÝCH MYKOTICKÝCH INFEKCIÍ

DIZERTAČNÁ PRÁCA

Mgr. Alena Vráblíková

Školiteľ: doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

Školiace pracovisko: Ústav imunologie, LF UP Olomouc

Študijný obor: Lékařská imunologie

Olomouc 2014

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som dizertačnú prácu vypracovala samostatne a všetka použitá literatúra je riadne uvedená.

V priebehu štúdia bola práca podporovaná grantami: MSM6198959223, MSM6198959216 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, OP RD&I grantom č. ED0007/01/01 Centra regionu Haná pro Biotechnologický a Zemědělský výzkum , grantom Evropské Strukturální Fondy CZ.1.07/2.3.00/20.0164 a internými grantami Lékařské Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci LF_2012_11 a LF_2014_20.

.....

Mgr. Alena Vráblíková

V Olomouci dňa

Pod'akovanie:

Ďakujem svojmu školiteľovi doc. MUDr. Mgr. Milanovi Raškovi, PhD. za odbornú pomoc, cenné rady a pripomienky v priebehu celého môjho postgraduálneho štúdia.

Moje pod'akovanie patrí i doc. RNDr. Jířimu Kunertovi, Dr.Sc. a spolupracovníkom z Ústavu imunologie LF UP a Biochemie PĚF UP za spoluprácu pri realizácii jednotlivých pokusov.

Obsah

1.	Úvod	8
1.1	Dermatofyty.....	8
1.1.1	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	8
1.1.1.2	Anamorfizmus verzus teleomorfizmus.....	9
1.1.1.3	Pleomorfizmus u <i>T. mentagrophytes</i>	10
1.2	Zloženie bunkovej steny	11
1.2.2.	Glukány a manány	12
1.2.3.	Chitín	12
1.3.	Interakcia hostiteľa s patogénom	13
1.4.	Imunitná odpoveď na trichofytózu.....	14
1.4.1.	Prirodzená imunitná odpoveď	14
1.4.2.	Antigénne špecifická imunitná odpoveď	19
1.5.	Najčastejšie typy trichofytóz	21
1.6.	Terapia trichofytóz	23
2.	Úloha cystein dioxygenázy u dermatofytov	26
2.1	Zloženie keratínu	26
2.2	Mechanizmus degradácie keratínu	27
2.3	Štruktúra cystein dioxygenázy.....	30
2.4	Mechanizmus CDO funkcie a regulácie	31
3.	Ciele dizertačnej práce	33
4.	Materiál a metódy	34
4.1	Izolácia celkovej RNA a prepis do cDNA	34
4.2	Amplifikácia Cdo cDNA	34
4.3	Klonovanie Cdo cDNA do vektoru pCR II Blunt TOPO	36
4.4	Klonovanie Cdo cDNA do expresných vektorov Champion TM pET101 D-TOPO a pCDNA 3.1 D/V5-His TOPO.	36

4.5	Príprava rekombinantného proteínu rCDO	37
4.5.1	Purifikácia proteínu za denaturačných a natívnych podmienok	38
4.5.2	Identifikácia CDO pomocou MALDI-TOF analýzy	39
4.6	Stanovenie enzymatickej aktivity CDO.....	39
4.6.1	Stanovenie vplyvu kultivačných podmienok na mieru expresie CDO.....	40
4.7	Príprava CDO DNA vakcíny.....	40
4.8	Imunizácia experimentálnych myší.....	40
4.9	Afinitná purifikácia protilátok zo séra imunizovaných myší	42
4.10	Stanovenie transkripčnej aktivity Cdo mRNA pomocou real-time PCR.....	42
4.11.1	Izolácia RNA a real-time PCR analýza	43
4.11	Porovnanie koncentrácie Cdo mRNA a CDO proteínu po vystavení L-cystínu.....	45
4.11.1	Izolácia celkových proteínov a Western blot analýza	45
5.	Výsledky	47
5.1	Ligácia Cdo cDNA do klonovacieho vektora pCR II Blunt TOPO a sekvenčná analýza 47	
5.2	Purifikácia rekombinantného proteínu rCDO.....	49
5.3	Stanovenie enzymatickej aktivity rCDO	50
5.3.1	Stanovenie vplyvu kultivačných podmienok na mieru expresie a enzymatickú aktivitu rekombinantného CDO exprimovaného v <i>E. coli</i>	51
5.4	Stanovenie transkripčnej aktivity Cdo mRNA v <i>T. mentagrophytes</i> pomocou real-time PCR	52
5.5	Analýza expresie CDO na úrovni proteínu	54
6.	Diskusia.....	56
7.	Záver	62
8.	Literatúra	64
9.	Zoznam skratiek	79

Súhrn

Táto práca je zameraná na metódy izolácie RNA a cDNA z vláknitej huby *Trichophyton mentagrophytes* a na analýzu profilu expície cystein dioxygenázy na mRNA a proteínovej úrovni.

CDO bola amplifikovaná pomocou PCR s použitím primerov navrhnutých na základe vysokej sekvenčnej podobnosti CDO popísaných u iných húb. PCR produkt bol klonovaný a sekvenovaný.

His-tag obsahujúci rekombinantný proteín bol pripravený v expresnom systéme *Escherichia coli*. Proteín bol afinitne purifikovaný a identifikovaný pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF.

Enzymatická aktivita bola stanovená monitorovaním produkcie cystein sulfínátu pomocou ESI-MS.

Kultivačné podmienky výrazne ovplyvňujú enzymatickú aktivitu CDO. Všetky CDO, produkované za natívnych podmienok boli enzymaticky aktívne.

Transkripčná aktivita *Cdo* mRNA bola monitorovaná pomocou RT Real-Time PCR s použitím β -aktínu ako normalizačného konštitutívne exprimovaného génu. Doplnenie kultivačného média o keratín (ľudské vlasy) alebo L-cystín zvýšilo normalizovanú hladinu *Cdo* mRNA približne osem krát.

Detailná analýza efektu L-cystínu na aktivitu CDO na úrovni mRNA (monitorovanú pomocou Real-Time PCR) a na proteínovej úrovni (monitorovanú pomocou SDS-PAGE a Western Blot s použitím afinitne purifikovanej sérovej protilátky špecifickej k CDO, pripravenej imunizáciou myší pomocou His-tag obsahujúceho rekombinantného CDO proteínu) odhalila, že u *T. mentagrophytes* je *Cdo* mRNA konštantne exprimovaná na nízkej hladine a CDO proteíny sú po translácii rýchlo degradované. V neprítomnosti L-cystínu môže byť translácia blokovaná.

U *T. mentagrophytes* sa uplatňuje regulácia CDO aktivity na úrovni transkripcie i posttransalčných úprav

Summary

This work is focused on the methods of isolation of RNA and cDNA from the fungus *Trichophyton mentagrophytes* and the analysis of the expression profile of cysteine dioxygenase at mRNA and protein levels.

CDO was amplified by PCR using the primer pair designed on the basis of high sequence conservancy of CDO described in other fungi. PCR product was cloned into plasmid vector and sequenced.

Escherichia coli expression system was used for production of recombinant His-tagged CDO protein. Protein was affinity purified and identity was confirmed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF).

Enzymatic activity was assayed by monitoring the cysteine sulphinate production using Electrospray Mass Spectrometry (ESI-MS).

Cultivation conditions of CDO-expressing *E. coli* markedly influenced CDO enzymatic activity. All CDO purified from *E. coli* under native conditions were confirmed to be enzymatically active.

The transcriptional activity of *Cdo* mRNA was monitored by RT Real-Time PCR using β -actin as a housekeeping gene. Supplementation of cultivation medium with human hairs or L-cystine increases normalized *Cdo* mRNA level for about eight times.

The detailed analysis of the effect of L-cystine on the activity of CDO at mRNA level (monitored by Real-Time PCR) and protein level (monitored by SDS-PAGE and western blot with the use of the antibody affinity purified from the serum of mice immunized by recombinant His-tag CDO protein) revealed that in *T. mentagrophytes* the *Cdo* mRNA is constantly expressed at low level and after translation the CDO protein is rapidly degraded. Translation may be blocked until the L-cystine is not supplemented.

In *T. mentagrophytes* both transcriptional and post-translational regulations of CDO takes place.

1. Úvod

1.1 Dermatofyty

Dermatofyty patria medzi pravé patogénne huby infikujúce človeka. Skupinu dermatofytov reprezentujú tri rody: *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Približne jedna tretina Európskej populácie je infikovaná dermatofytmi (Burzykowski, et al. 2003). Chronické dermatofytózy, pre ktoré je charakteristická slabšia zápalová reakcia, sú spôsobené antropofilnými druhmi dermatofytov, zatiaľ čo akútne zápalové infekcie zoofilnými alebo geofilnými druhmi.

1.1.1 *Trichophyton mentagrophytes*

Rod *Trichophyton* spp. reprezentuje huby infikujúce keratinizované štruktúry ľudského tela ako sú vlasy, nechty a koža. Komplex *Trichophyton mentagrophytes* má niekoľko anamorfných druhov (teleomorfy, ak sú známe, sú uvedené v zátvorkách) (Nenoff, et al. 2007):

- var. *interdigitale* – antropofilný (*Arthroderma vanbreuseghemii*)
- var. *mentagrophytes* – zoofilný, príležitostne antropofilný (*A. simii*)
- var. *erinacei* – zoofilný (*A. benhamiae*)
- var. *nodulare* – antropofilný (synonymum *T. krajdenei*)
- var. *goetzii* – antropofilný
- var. *quinckeanum* – zoofilný
- var. *granulosum* – zoofilný

U imunokompromitovaných alebo imunosuprimovaných jedincov je schopný penetrovať do hlbších vrstiev kože (Nir-Paz, et al. 2003; Ogawa, et al. 1998), alebo

vyvolať systémové infekcie (Tateishi, et al. 2004). Chronická dermatofytóza (trichofytóza) môže byť tiež asociovaná s atopickými (Woodfolk, et al. 1996), alebo alergickými ochoreniami (Ward, et al. 1989; Ward, et al. 1999).

Zatiaľ čo v rokoch 1987-1998 infekcie druhom *T. mentagrophytes* tvorili v Českej republike približne len 1,9 %, v roku 2010 vzrástli na 3,5 % (Tab. č. 1) (Kuklova, et al. 2012).

Tabuľka č. 1: Percentuálne zastúpenie jednotlivých dermatofytov vo vzorkách získaných na Dermatovenerologickej klinike 1. LF UK s VFN v Prahe (upravené podľa Kuklova 2012).

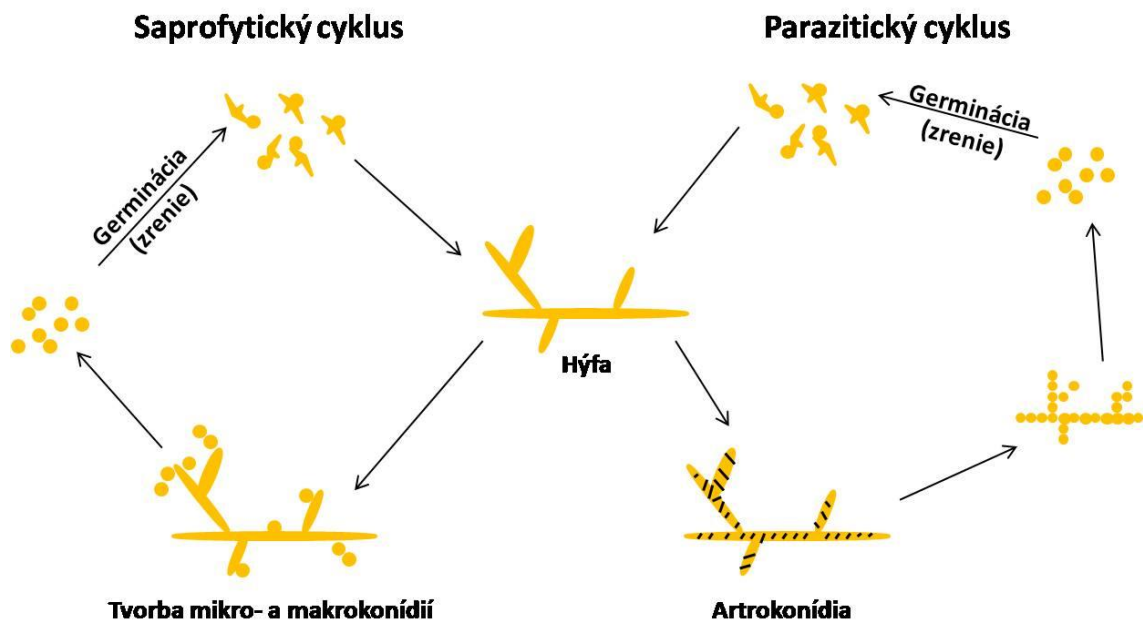
Rok	<i>T. rubrum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. canis</i> a <i>E.floccosum</i>
1987-98	90,2%	4,7%	1,9%	3,2%
2010	86%	6%	3,5%	3,3%

1.1.1.2 Anamorfizmus verus teleomorfizmus

Trichophyton spp. reprezentuje anamorfný, tj. asexuálny typ dermatofyta, schopný jednoduchého rozmnožovania sporuláciou pomocou mikrospór, makrospór alebo artrospór. U niektorých druhov komplexu *T. mentagrophytes* je známa teleomorfná forma patriaca do rodu *Arthroderma*.

V závislosti na životných podmienkach je *Trichophyton* spp. schopný podstupovať dva odlišné životné cykly – saprofytický a parazitický (Obr. č. 1). V saprofytickom životnom cykle vznikajú konídiá, ktoré sa na základe morfológických podmienok rozdeľujú na jednobunkové mikrokonídiá a viacbunkové makrokonídiá. Môžu byť produkované i dermatofytmi rastúcimi na odvrhnutých epiteliách alebo vypadaných vlasoch, ale nie na rastúcich vlasoch. Môžu byť mediátormi prenosu ochorenia na človeka. V stave parazitizmu je ich produkcia nahradená tvorbou

parazitických artrokonídií. Tie sú tvorené segmentáciou a následnou fragmentáciou hýf (Hashimoto 1991).



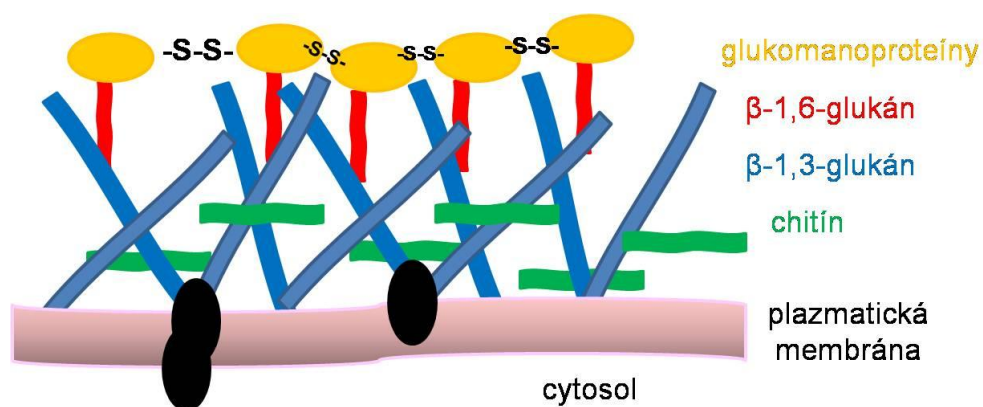
Obr. č. 1: Asexuálny životný cyklus *Trichophyton mentagrophytes*. Za saprofytických podmienok hýfy proliferujú, apikálne a laterálne sa predlžujú za tvorby mikro- a makrokonídiogénnej hýfy. Za parazitických podmienok sú hýfy segmentované a fragmentujú na artrokonídiá (upravené podľa Hashimoto 1991).

1.1.1.3 Pleomorfizmus u *T. mentagrophytes*

Pleomorfizmom označujeme nestabilitu kultúr, pozorovanú u laboratórnych kmeňov dermatofytov. Je charakteristická tvorbou bielych vzdušných nesporulujúcich hýf na povrchu kolónií. Pri prenose jednotlivých nesporulujúcich hýf do nového média dochádza k tvorbe morfológicky odlišných kolónií, líšiacich sa od pôvodnej parentálnej kolónie produkciou konídií, pigmentáciou a rýchlosťou rastu (Bistis 1960). Kľúčovým faktorom, stimulujúcim aktiváciu pleomorfizmu, je modifikácia nutričných podmienok, napr. dodanie polysacharidov, neopeptónu, glutamovej kyseliny alebo dusíkatých zlúčenín do kultivačného média (Bistis 1960; Klein 1965).

1.2 Zloženie bunkovej steny

Bunková stena húb je komplexná dynamická trojvrstvová štruktúra, zložená z chitínu, glukánov, manánov, glykoproteínov a lipidov (Obr. č. 2). Vo vonkajšej vrstve dominuje komplex glykoproteínov a lipidov, stredná vrstva je bohatá na polysacharidy, zatiaľ čo vnútorná vrstva na amorfné glukány a miktorfibrilárny chitín (Wu-Yuan and Hashimoto 1977). Bunková stena je nevyhnutná k udržaniu integrity bunky, zabezpečuje odolnosť k osmotickému tlaku, uplatňuje sa pri raste a delení buniek a pri interakcii s okolitým prostredím. Zloženie bunkovej steny sa mení v závislosti na životných podmienkach a rastovom štádiu buniek. Jednotlivé zložky sú vzájomne prepletené a tvoria tak komplexnú ochrannú sieť bunky.



Obr. č. 2: Zloženie bunkovej steny *T. mentagrophytes*. Bunková stena je zložená z 36% glukánov, 30% chitínu, 12% manánov a 7-10% proteínov.

1.2.1 (Glyko)proteíny

Proteíny tvoria približne 7-10% bunkovej steny u *T. mentagrophytes* (Katajima and Nozawa 1977). Okrem stavebných proteínov bunkovej steny sa vyskytujú i tzv. intracelulárne proteíny, previazané s bunkovou stenou, ako sú proteíny tepelného šoku a glykolytické enzýmy (Bowman, et al. 2006; Lopez-Ribot and Chaffin 1996). Najčastejšie sa vyskytujú ako *N*- alebo *O*-glykoproteíny, tj. proteíny s enzymaticky pripojenými cukornými reťazcami. Mnohé z intracelulárnych proteínov obsahujú

anchor glykozylfosfatidylozitol (GPI), ktorý sa uplatňuje pri smerovaní alebo lokalizácii proteínov v plazmatickej membráne a bunkovej stene (Bowman and Free 2006). Proteíny bunkovej steny sa uplatňujú pri udržiavaní tvaru bunky, adherencii, migrácii a fúzii, pri absorpcii molekúl, pri extra-intracelulárnej signalizácii a pri syntéze a remodelovaní komponentov bunkovej steny.

1.2.2. Glukány a manány

Dominujúcou zložkou bunkovej steny húb sú glukány, tvoriace približne 36% suchej hmotnosti bunkovej steny *T. mentagrophytes* (Katajima and Nozawa 1977). Syntéza glukánov je zabezpečená glukán sytnázou preferenčne v rastových zónach bunky a je nevyhnutná pre správne formovanie a vývoj bunky. Dominujúcou formou sú β -1,6 a β -1,3-glukány, ktoré sa zosieťujú spolu s chitínom a manoproteínmi a vytvárajú tak pevnú bunkovú stenu.

Manány tvoria približne 12% bunkovej steny *T. mentagrophytes* (Katajima and Nozawa 1977). Dominujúcimi formami sú 1,6-, 1,2- a 1,3-galaktomanány. Obsah galaktózy v galaktomanánoch sa líši v závislosti na druhu dermatofyta. Obvykle tvorí 12-33% galaktomanánu (Gander 1974). Manány sa výrazne uplatňujú pri interakcii patogéna s hostiteľským organizmom.

1.2.3. Chitín

Chitín je nevyhnutnou stavebnou zložkou bunkovej steny húb. Je to homopolymér β -1,4-pripojených *N*-acetylglukosamínových reziduí, tvoriaci približne 30% suchej hmoty bunkovej steny *T. mentagrophytes* (Katajima and Nozawa 1977; Wu-Yuan and Hashimoto 1977). Je nevyhnutný k udržaniu integrity bunky – inaktivácia chitin syntázy vedie k malformácii a osmotickej nestabilite buniek (Specht, et al. 1996). Asi dve tretiny z celkového obsahu chitínu v bunkovej stene artrospór a v septách hýf *T. mentagropytes* sú tvorené mikrofibrilárnym chitínom, citlivým k chitinázam – zvyšná jedna tretina sa vyskytuje v nefibrilárnej forme rezistentnej k chitinázam (Pollack, et al. 1983).

1.3. Interakcia hostiteľa s patogénom

Adherencia dermatofyta k hostiteľskému tkanivu je zabezpečená glykomanoproteínmi bunkovej steny (Ogawa, et al. 1998). Dôležitú úlohu v adherencii hrá tiež proteín hydrofobín HypA, ktorý je súčasťou vonkajšej vrstvy bunkovej steny konídií. Delécia génu *hypA* vedie k strate schopnosti adherovať k hostiteľským bunkám a zvyšuje aktivitu imunokompetentných buniek, ako sú neutrofilny, granulocyty a dendritické bunky a to zvýšením produkcie cytokínov IL-6, IL-8, IL-10 a TNF α (Heddergott, et al. 2012).

Po adherovaní artrokonídiá zrejú (germinujú) a vyvíjajú sa v hýfy, ktoré prenikajú do tkaniva. Germinácia je zabezpečená stimuláciou expresie celej rady génov (Yang, et al. 2007), kódujúcich enzýmy, uplatňujúcich sa pri degradácii keratínu, proteínov, lipidov a DNA (Kaufman, et al. 2005; Monod, et al. 2005). Tieto kroky sú závislé na dostatku živín, produkcii štrukturálnych proteínov, permeáz a hydrolytických enzýmov, ako sú proteázy (keratinázy) a nukleázy (Vermout, et al. 2008). Nevyhnutnou zložkou pre morfológické zmeny dermatofytov sú sulfhydrylové skupiny obsiahnuté v aminokyseline cysteín. Uplatňujú sa i pri bunkovom delení a inhibícii prechodu z kvasinkovej na myceliálnu formu u dimorfných húb (Nickerson and van Rij 1949). Cysteín sa tiež uplatňuje pri diferenciácii a mitochondriálnej respirácii. Množstvo voľného cysteínu je v bunke regulované enzýmom cystein dioxygenáza (CDO, EC 1.13.11.20).

V priebehu infekcie hostiteľských tkanív je zvýšená aktivácia metabolických enzýmov, ako sú izocitrát lyáza a malát syntáza (Grumbt, et al. 2011). Inaktivácia génov kódujúcich tieto enzýmy vedie k rastovým defektom dermatofytov.

Ďalšími potenciálnymi faktormi virulencie sú thioredoxín a celulázový homológ, ktorých expresia je stimunovaná proteínmy extracelulárnej matrix v koži (Kaufman, et al. 2005). Thioredoxín sa pravdepodobne uplatňuje pri aktivácii proteáz a odolnosti voči oxidatívne stresu. V priebehu infekcie tiež dochádza k funkčným a štrukturálnym zmenám epidermis (Jensen, et al. 2007), pravdepodobne pod vplyvom zápalových faktorov a redukovanej schopnosti viazať vodu.

1.4. Imunitná odpoveď na trichofytózu

V imunitnej odpovedi na trichofytózu sa uplatňujú nešpecifické i špecifické imunitné mechanizmy, ktoré eliminujú dermatofyta, alebo bránia jeho invázii do hlbších vrstiev tkaniva. Jednotlivé zložky imunitného systému vzájomne interagujú, dopĺňajú sa a sú nevyhnutné pre celkovú obranu voči infekcii. Vo všeobecnosti je imunitná odpoveď závislá na veku, pohlaví, zdravotnom stave hostiteľa, medikácii a genetických dispozíciach jedinca (Faergemann, et al. 2005; Tosti, et al. 2005).

1.4.1. Prirodzená imunitná odpoveď

1.4.1.1 Kožný imunitný systém

Fyzikálne i chemické zloženie kože predstavuje prirodzenú bariéru, brániacu rozvoju hubovej infekcie. *Stratum corneum* je neustále obnovovaná keratinizáciou epidermálnych buniek, sprevádzaná odvrhovaním vrchných vrstiev odumretých buniek, čím prirodzene dochádza k odstraňovaniu patogéna z kože. Proliferácia epidermálnych buniek je teda dôležitým obranným mechanizmom kože. Zápalová reakcia v mieste infekcie navyše proliferáciu epidermálnych buniek zvyšuje.

Prvým krokom v indukcii imunitnej odpovede na dermatofyta je interakcia huby s korneocytmi (mŕtvymi bezjadrovými keratinocytmi) *stratum corneum*. Interakciou s keratinocytmi a v odpovedi na antigény dermatofyta, napr. trichophytin, keratinocyty produkujú IL-8 a IL-16, ktoré sa tak uplatňujú pri indukcii akútnej zápalovej odpovede lákaním polymorfonukleárných (PMNs) buniek do miesta infekcie (Almeida 2008). Trichophytin tiež slúži ako atraktant neutrofilov a ďalších fagocytov do miesta infekcie. Po prekonaní *stratum corneum* dermatofyt atakuje hlbšie vrstvy epidermis. Mononukleárne bunky spoločne so zložkami komplementu opsonizujú a zabíjajú spóry, ale nie hýfy a spomaľujú tak rast huby (Dahl and Carpenter 1986). Oxidatívny mechanizmus neutrofilov je schopný zabíjať *Trichophyton* spp. *in vitro* (Calderon and Hay 1987).

1.4.1.2. Rozpoznanie antigénnych štruktúr dermatofyta

Trichophyton spp. obsahuje evolučne konzervované štruktúry, označované ako molekulárne vzory asociované s patogénmi (PAMPs), rozpoznávané receptormi pre príslušné vzory (PRRs) na povrchu buniek hostiteľa. Príkladom PRR sú Toll-like receptory (TLRs) a glukánové receptory. I keď úloha TLRs v aktivácii prirodzenej imunitnej odpovede na mikrobiálnu infekciu bola popísaná (Kopp and Medzhitov 2003), niekoľko štúdií naznačuje, že huby môžu suprimovať imunitnú odpoveď hostiteľa aktiváciou produkcie IL-10 a regulačných T lymfocytov prostredníctvom TLR2 resp. TLR4 (Netea, et al. 2004; Sing, et al. 2002).

Manány bývajú rozpoznávané mnohými receptormi hostiteľských buniek, predovšetkým manózovým receptorom MR, DC-SIGN alebo SIGN-R1, Galectin-3, Dectin-2, TLR4, Mincle, alebo receptormi z rodiny kollektínov, napr. manózu viažuci lektín MBL, SP-A, SP-D, Pentraxín-3 (Latge 2010). Niektoré z týchto receptorov, napr. manózový receptor, langerín a kollektíny, sú multivalentné, t.j. viažu oligosacharidy s terminálnym manózovým, fukózovým alebo *N*-acetylglukozamínovým reziduom (Latge 2010). Tieto receptory môžu byť transmembránové (napr. MR, DC-SIGN, Dectin-2), povrchovo viazané (napr. SP-A, SP-D) alebo sekretované (napr. MBL, Pentraxíny) (Kerrigan and Brown 2009).

β -glukány bunkovej steny húb sú rozpoznávané β -glukánovými receptormi makrofágov a dendritických buniek. Zatiaľ čo Dectin-1 preferenčne rozpoznáva β -glukány konídií, Dectin-2 rozpoznáva a viaže β -glukány hýf, obsahujúce vyššie množstvo manánov (Sato, et al. 2006). Stimulácia týchto receptorov vedie k fosforylácii tyrozínových reziduí v ITAM motíve, aktivácii Syk signálizačnej dráhy (Latge 2010), aktivácii transkripčného faktoru NF- κ B a sekrécii antagonistických TNF α a IL-1 receptorov (Sato, et al. 2006).

Chitín je rozpoznávaný receptormi TLR2, TLR4, a chitín väzbovými proteínmi Ym1, lektínom C-Typu RegIIIg, FIBCD1, chitinázovým alebo manózovým receptorom (Latge 2010).

1.4.1.3. Keratinocyty

Keratinocyty predstavujú prvú obrannú líniu buniek pri infekcii dermatofytmi. Tieto bunky priamo interagujú s patogénom, alebo produkujú celý rad cytokínov, uplatňujúcich sa pri aktivácii ďalších imunokompetentných buniek. Keratinocyty exprimujú rôzne receptory, napr. TLRs, ktoré po naviazaní mikrobiálnych zložiek aktivujú signálne dráhy vedúce k stimulácii prirodzenej imunitnej odpovede (Netea, et al. 2006). Pri degradácii keratínu dochádza k uvoľňovaniu defenzínov, napr. β -defenzínu 2 (Jensen, et al. 2007; Kawai, et al. 2006) a antimikrobiálnych peptidov. Keratinocyty a mononukleárne bunky v odpovedi na dermatofyta produkujú prozápalové cytokíny $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8 a IL-16 (Koga, et al. 2001; Nakamura, et al. 2002; Shiraki, et al. 2006), ktoré sa uplatňujú v zápalovej odpovedi na dermatofytovú infekciu.

1.4.1.4. Langerhansove bunky

Antigény dermatofyta sú v koži pravdepodobne rozpoznávané a pohlcované Langerhansovými bunkami (LCs) epidermis. Tieto bunky tvoria približne 2 až 5% z celkového počtu epidermálnych buniek. Pod vplyvom cytokínov, produkovaných keratinocytmi a mononukleárnymi bunkami, dochádza k aktivácii LCs a ich migrácia z epidermis do dreňových lymfatických uzlov. V lymfatických uzloch LCs prezentujú komplex antigénu a MHC-glykoproteínov receptorom naivných T lymfocytov. Pod vplyvom pomocného signálu produkovaného LCs, napr. IL-1 a/alebo B7, dochádza k stimulácii, klonálnej expanzii a následnej migrácii T lymfocytov do dermis a epidermis. Po stimulácii ďalšími antigén prezentujúcimi bunkami (APCs), napr. dermálnymi dendritickými bunkami alebo keratinocytmi, dochádza opäť ku klonálnej expanzii a produkcii efektorových buniek (Obr. č. 3), uplatňujúcich sa pri eliminácii patogéna (Wagner and Sohnle 1995) spoločne s tvorbou pamäťových lymfocytov.

1.4.1.5. Fagocitárne bunky

Prirodzená, alebo nešpecifická imunitná odpoveď, je zabezpečená profesionálnymi fagocytárnymi bunkami, ako sú neutrofily, makrofágy a dendritické bunky, funkciou natural killer (NK) buniek a komplementu. Tieto bunky sú schopné inhibovať rast huby alebo fagocytovať bunky, prezentovať antigény T bunkám a aktivovať akútnu zápalovú reakciu sekréciou prozápalových cytokínov, napr. tumor nekrotického faktoru α (TNF α), interleukínu 12 (IL-12) a chemokínov, alebo priamo zabíjať bunky huby. Neutrofily sú navyše schopné tvoriť tzv. neutrofilové extracelulárne pasce (NETs), pomocou ktorých zachytávajú konídie a priamo ich likvidujú (Heddergott, et al. 2012). Neutrofily v priebehu aktivácie uvoľňujú granulóne proteíny, chromatín a enzýmy ako neutrofilárna elastáza, katepsín G a myeloperoxidáza, ktoré spolu s extracelulárnymi vláknami viažu bunky huby, degradujú ich virulénne faktory a zabíjajú tak parazita. Základom NET je chromatín, hystóny a DNA a preto patogény produkujúce DNázy NET rýchlo degradujú (Brinkmann, et al. 2010; Brinkmann, et al. 2004). Po germinácii konídií v hýfy, môžu hýfy uniknúť procesu fagocytózy a to vďaka schopnosti indukovať tzv. bunkovú smrť neutrofilov - „NETózu“ (Heddergott, et al. 2012). Tento proces je odlišný od apoptózy resp. nekrózy a je závislý na produkcii reaktívnych kyslíkatých radikálov NADPH oxidázou (Brinkmann, et al. 2010). V priebehu NETózy dochádza k rozrušeniu membrán jadra a cytoplazmatických granúlí a uvoľneniu obsahu jadra bunky do cytoplazmy. Následne dochádza k rozrušeniu plazmatickej membrány a uvoľneniu chromatínu a granulárnych proteínov do extracelulárneho prostredia a k smrti bunky (Kaplan and Radic 2012).

1.4.1.6. Aktivácia antigénne špecifickej imunitnej odpovede

Jednou zo subpopulácií T lymfocytov, aktivovaných LCs, sú cutaneous lymphocyte antigen pozitívne (CLA⁺) T lymfocyty. Tieto bunky pod vplyvom adhéziu CLA preferenčne migrujú do epidermis (Fuhlbrigge, et al. 1997) i keď posledné práce naznačujú oveľa širšiu tkanivovú distribúciu CLA pozitívnych T lymfocytov (Ni and Walcheck 2009). CLA viaže endoteliálnu leukocytovú adhezívnu molekulu (ELAM-1), čo spúšťa extravazáciu T lymfocytov z krvného riečiska do kože (Picker, et al. 1991).

CLA⁺ T bunky môžu byť CD4⁺ alebo CD8⁺ a akonáhle sú aktivované, produkujú Th1 špecifické cytokíny IFN γ a IL-2, alebo Th2 špecifické cytokíny IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13. CLA⁺ T bunky sa po rozpoznaní antigénu aktivujú a spúšťajú príslušnú T bunkovú odpoveď.

1.4.1.7. Potlačenie imunitnej odpovede hostiteľa

Glukány a manány bunkovej steny môžu maskovať PAMPs patogéna a blokovat' tak rozvoj PAMPs-indukovanej imunitnej odpovede hostiteľa. Podobnú funkciu má u húb pravdepodobne i pigment melanín (Chai, et al. 2010). Manány majú navyše schopnosť inhibovať lymfoproliferatívnu odpoveď mononukleárných buniek *in vitro* (Blake, et al. 1991) a fagocytárnu funkciu makrofágov inhibíciou produkcie IL-12, kostimulačných molekúl CD80 a CD54, produkcie oxidu dusnatého a znížením expriéie MHC-II molekúl, vedúcich k smrti makrofágov (Campos, et al. 2006).

Mnohé proteíny dermatofytov obsahujú tzv. LysM domény, umožňujúce väzbu proteínov k peptidoglykánom ich bunkovej steny (Martinez, et al. 2012). U húb, infikujúcich rastliny, bola popísaná schopnosť týchto domén maskovať chitín na povrchu hýf a zabraňovať tak rozpoznaníu hýf imunitným systémom hostiteľa (Mentlak, et al. 2012). LysM domény môžu suprimovať chitínom aktivovanú imunitnú odpoveď pomocou dvoch mechanizmov: a) vytvorením LysM diméru, ktorý do väzbového žliabku viaže GlcNAc jednotky oligoméru chitínu pomocou vodíkových mostíkov a ďalších nekovalentných interakcii; b) väzbou oligomérov chitínu, rozpoznaných monomérmymi receptormi imunitného systému, pomocou LysM monoméru a zablokovaním produkcie imunitných receptorových komplexov hostiteľa (Sanchez-Vallet, et al. 2013). Podobný mechanizmus majú pravdepodobne i LysM domény u dermatofytov.

1.4.2. Antigénne špecifická imunitná odpoveď

Oba typy antigénne špecifickej imunitnej odpovede – humorálna i bunkami sprostredkovaná (CMI), sa uplatňujú v boji voči dermatofytóze.

Hostiteľ produkuje celý rad protilátok voči antigénom dermatofyta. Humorálna imunita pravdepodobne nehrá významnú úlohu pri eliminácii infekcie (Dahl 1987). Niektoré protilátky však môžu mať priamy fungistatický efekt, daný schopnosťou opsonizácie, neutralizácie toxínov, blokovaním adherencie patogéna, aktivovaním komplementu alebo aktiváciou bunkovej cytotoxicity závislej na protilátkach (Polonelli, et al. 2000). Pre efektívnosť ochrany má veľký význam aj množstvo, špecifickosť, izotypy a idiotypy protilátok (Casadevall, et al. 2002).

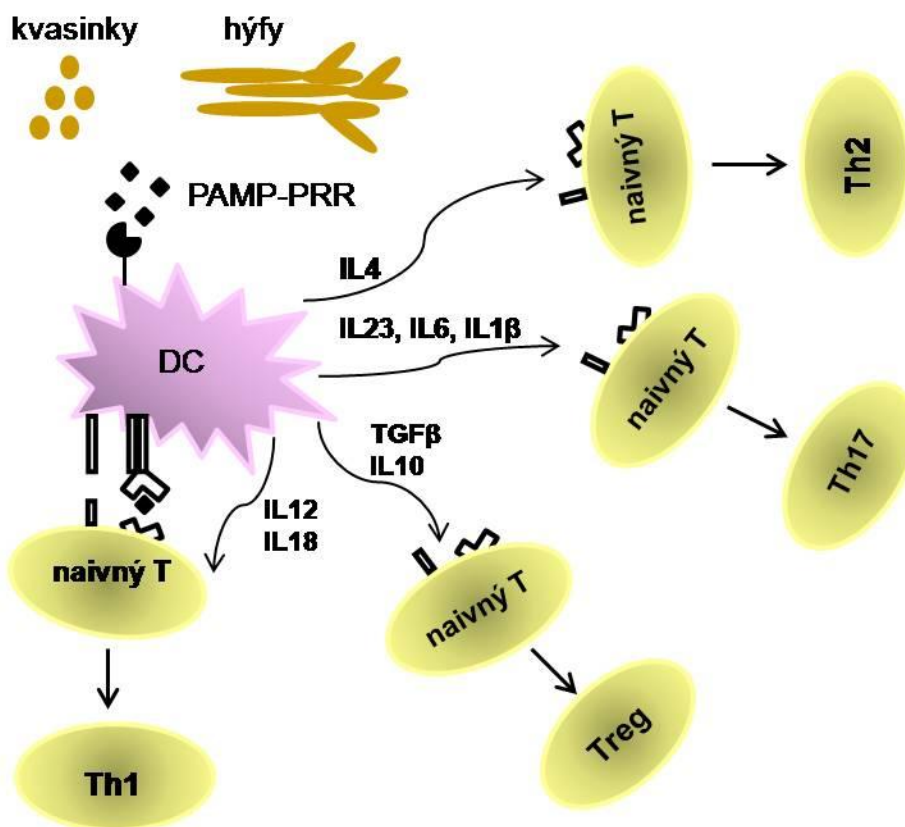
U pacientov s chronickou dermatofytózou je často detegovaný pozitívny test okamžitej precitlivelosti (IH) na extrakty z dermatofyta mediovaný IgE.

Typickou antigénne špecifickou imunitnou odpoveďou na dermatofytózu je bunkami sprostredkovaná imunitná odpoveď, predovšetkým oneskorený typ precitlivelosti (DTH) (Almeida 2008; Vermout, et al. 2008). Táto reakcia je charakterizovaná aktiváciou makrofágov a produkciou prozápalových cytokínov v mieste infekcie. Stupeň zápalovej reakcie sa líši u jednotlivých patogénov a je ovplyvnený i fyziologickým stavom jedinca (Vermout, et al. 2008). Pozitívna DTH reakcia k dermatofytovým extraktom sa vyznačuje nižším titrom IgG protilátok voči dermatofytovým antigénom a absenciou IgE a IgG4 protilátok, charakteristických pre IH reakciu (Woodfolk, et al. 1996). DTH reakcia sa vyvíja počas akútnej infekcie (Almeida 2008), zatiaľ čo IH reakcia je typická pre chronické infekcie, často s rozvojom alergie (Vermout, et al. 2008).

Dermatofytická infekcia je tiež asociovaná s aktiváciou Th1 imunitnej odpovede a s produkciou CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytov. Vo vrchnej vrstve dermis a epidermis bolo detegované vyššie množstvo CD1a⁺ a CD68⁺ buniek a tiež IFN γ ⁺ buniek (Koga, et al. 2001). CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty sú tiež schopné priamo zabíjať *T. mentagrophytes*

a *T. rubrum* deštrukciou hýf a spór (Waldman, et al. 2010). Táto anti-mikrobiálna aktivita je založená na priamom bunkovom kontakte a exocytóze obsahu cytoplazmatických granúlí do okolia bunky. Hlavnou zložkou sú granulyzín a perforín. Granulyzín interaguje s lipidovými zložkami mikrobiálneho povrchu, aktivuje lipidy-degradujúce enzýmy ako glukozylceramidázu a sfingomyelinázu a indukuje tvorbu pórov v membráne bunky. Tieto póry vedú k rozrušeniu bunkovej membrány, uvoľneniu obsahu a smrti bunky (Krensky 2000). Cytotoxické $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty teda vykazujú priamu anti-mikrobiálnu aktivitu.

Obr. č. 3: Aktivácia antigénne špecifickej imunitnej odpovede. Po rozpoznaní antigénov dermatofyta pomocou špecifických receptorov dendritických buniek (DCs), dochádza k aktivácii DCs a jej interakcii s naivným T lymfocytom. T lymfocyt je aktivovaný ku klonálnej expanzii a migruje do miesta infekcie. Pod vplyvom ďalšieho aktivačného signálu od APC je stimulovaná klonálna expanzia s tvorbou príslušných efektorových T lymfocytov.



1.5. Najčastejšie typy trichofytóz

Trichofytózy sa na základe miesta infekcie rozdeľujú do niekoľkých skupín:

Tinea pedis – infekcia nohy, predovšetkým chodidla a priestoru medzi prstami. Akútna zápalová infekcia s tvorbou vezikúl je často spôsobená *T. mentagrophytes*. Chronická infekcia môže byť spôsobená ako *T. mentagrophytes* tak *T. rubrum*. Rizikovými faktormi zodpovednými za rozvoj tinea pedis je i vek (incidencia sa zvyšuje s vekom jedinca) a typ obuvi.

Tinea cruris – infekcia v oblasti slabín, najčastejšie u dospelých mužov žijúcich v teplom a vlhkom prostredí. Hlavným pôvodcom býva *T. rubrum*.

Tinea corporis – infekcia rozsiahlej oblasti kože trupu, horných a dolných končatín, predovšetkým u imunodeficientných pacientov. Vyskytuje sa predovšetkým u ľudí žijúcich v horúcom podnebí. Pôvodcom môže byť ktorýkoľvek druh dermatofyta rodu *Trichophyton* (Weitzman and Summerbell 1995).

Tinea imbricata – podtyp tinea corporis s chronickým priebehom, rozšírená v oblasti Pacifiku, Oceánie, Južnej Ázie, Mexika a Centrálnej a Južnej Ameriky. Jediným etiologickým agens je *T. concentricum* (Weitzman and Summerbell 1995).

Tinea barbae – infekcia v oblasti brady u mužov, často s miernejším priebehom. Vzácnnejšie dochádza k rozsiahlej folikulitíde, predovšetkým pri infekcií zoofilnými druhmi, ako je *T. verrucosum* a *T. mentagrophytes*.

Tinea unguium – infekcia nechtových platničiek (onychomykóza). Hlavnými pôvodcami infekcii nechtov sú *T. rubrum* a *T. mentagrophytes*. Rizikovými faktormi je vek, problém s cirkuláciou krvi, diabetes, typ obuvi a pod.

Tinea capitis – infekcia vlasov a pokožky hlavy predovšetkým u detí. Môže mať mierny priebeh so slabším erytémom, alebo dochádza k rozsiahlemu zápalu s folikulitídou.

Tinea favosum – podtyp tinea capitis, pri ktorej dochádza k rozvoju chrasty označovanej ako „scutula“. Pôvodcom ochorenia býva *T. schoenleinii* a je rozšírené v Euroázii a Afrike (Weitzman and Summerbell 1995).

Klinický prejav dermatofytózy je vysoko variabilný. Je ovplyvnený niekoľkými faktormi, napr. stavom imunitného systému hostiteľa, druhom a virulenciou dermatofyta, environmentálnymi faktormi vrátane anatomickej lokalizácie a karatinizácie miesta infekcie (Degreef 2008; Pierard, et al. 1996).

1.6. *Terapia trichofytóz*

Terapia trichofytóz je založená predovšetkým na lokálnej aplikácii antifungálnych liečiv. V prípade pretrvávajúcej alebo chronickej infekcie, resp. pri rezistencii sa aplikujú systémové antifungálne liečivá. Vo väčšine prípadov je efekt liečby vysoko individuálny a ovplyvnený druhom infekčného agens. U tinea unguium a tinea pedis sa používa chemické odstránenie postihnutých častí pomocou pasty, obsahujúcej ureu a následné ošetrenie nechťového lôžka a kože pomocou fungistatických agens (Elewski, et al. 2004; Seebacher, et al. 2007).

K liečbe sa najčastejšie používajú:

- azolové liečivá, napr. intrakonazol, ketokonazol, flukonazol, ekonazol, mikonazol, izokonazol, bifonazol alebo klotrimazol
- allylamínové liečivá, napr. terbinafín, naftifín
- hydroxypyridóny, napr. cyklopyroxolamín (Radovic-Kovacevic, et al. 1990)
- antibiotiká, napr. nystatín, natamycín a amfotericín B

Terapia pomocou vakcín je zavedená len vo veterinárnej medicíne. Obvykle sa používajú inaktivované vakcíny, obsahujúce konídiá príslušných zástupcov rodu *Trichophyton* spp. (Wawrzkievicz and Wawrzkievicz 1992), alebo živé atenuované vakcíny (Lund and Deboer 2008; Rybnikar, et al. 1998), ale i proteínové a DNA vakcíny, napr. odvodené od proteínu tepelného šoku s molekulovou hmotnosťou 60 kDa (Hsp60) (Raska, et al. 2004).

V Českej republike sú dostupné dve komerčné vakcíny voči trichofytóze dobytka a to živá atenuovaná vakcína Trichoben a inaktivovaná vakcína Trichobin (Bioveta, Ivanovice na Hané a.s.). Obe vakcíny majú výrazný protektívny efekt voči rôznym zástupcom rodu *Trichophyton* spp.

Prvá terapeutická vakcína v humánnej medicíne bola vytvorená už v roku 1902 (Neisser 1902). Táto vakcína obsahovala trichophytin a nemala preukazateľnú terapeutickú hodnotu. Neefektívne, alebo s častým relapsom, boli i ďalšie vakcíny obsahujúce trichophytin (Traub and Tolmach 1935), vakcíny pripravené z rozdrveného mycélia (Strickler 1915) alebo tzv. claso-vakcíny pripravené hydrolýzou mycélii pomocou kyseliny dusičnej a následnou neutralizáciou pomocou sódy (Jausion and Sohier 1930). V roku 1959 Huppert and Keeney popísali profilaktický účinok krému, obsahujúceho prášok z rozdrvených mycélii *T. mentagrophytes*, ktorý bránil následnému rozvoju tinea pedis týmto dermatofytom (Huppert and Keeney 1959).

Sľubnou vakcinačnou stratégiou je príprava zmienených DNA vakcín, odvodených od proteínov tepelného šoku. Pretože DNA vakcíny sú produkované v bakteriálnom systéme, sú obohatené o nemetylované CpG motívy a vykazujú imunomodulačný efekt, spojený s indukciou Th1 imunitnej odpovede (Raska, et al. 2004). Práve tento typ odpovede vykazuje protektívny efekt voči trichofytózam. U DNA vakcíny, odvodenej od proteínu Hsp60 *T. mentagrophytes*, bol popísaný veľmi dobrý efekt i keď nie tak výrazný ako u komerčne dostupných vakcín Trichoben a Trichobin (Raska, et al. 2004).

Ďalšou možnou stratégiou prípravy atenuovaných vakcinačných kmeňov je knock-out génov, zapojených do metabolizmu cysteínu a detoxifikácie dermatofytov, ako sú gény pre cysteín dioxygenázu a sulfit efluxné pumpy. Inaktivácia týchto génov totiž znemožňuje rast dermatofytov *in vitro* v prítomnosti L-cysteínu a keratínu (Grumbt, et al. 2013) (viz. kapitola 6.).

Bola tiež popísaná neschopnosť *T. rubrum* rásť na ľudských nechtoch po delécii génu *Mdr2* (Multidrug Resistant 2 P-glycoprotein), kódujúceho ATP-Binding Cassette (ABC) transportér (Maranhao, et al. 2009). Tento transportér je zapojený do rôznych metabolických dráh. Ovplyvňuje schopnosť dermatofyta využiť dostupné živiny, rásť na keratinizovaných štruktúrach a odstraňovať pre dermatofyta toxické zlúčeniny, ako sú antimykotiká. Knock-out génu vedie k zvýšeniu citlivosti k terbinafinu, 4-nitroquinolín *N*-oxidu a etídiu bromidu (Fachin, et al. 2006). Podobne delécia génu *pacC*, kódujúceho pH-regulovaný transkripčný regulátor PacC, vedie k zníženej sekrécii keratinolytických proteáz a neschopnosti mutanta rásť na ľudských vlasoch *in vitro* (Ferreira-Nozawa, et al. 2006).

Popísané proteíny by mohli byť sľubným cieľom pre prípravu účinných profilaktických alebo terapeutických vakcín. Doposiaľ však nebola účinná vakcína, použiteľná v humánnej medicíne, vytvorená.

2. Úloha cystein dioxygenázy u dermatofytov

Schopnosť dermatofytov využívať keratín ako zdroj živín je daná ich jedinečnou schopnosťou produkovať celú radu keratináz, permeáz a nukleáz. Keratinázy sú schopné degradovať keratín až po rozrušení disulfidických väzieb medzi proteínmi bohatými na aminokyselinu cysteín. Aminokyselina cysteín sa navyše uplatňuje v procesoch bunkového delenia a morfológického prechodu z kvasinkovej na myceliálnu formu u húb (Nickerson 1949) a pravdepodobne i v bunkovej diferenciácii a mitochondriálnej respirácii (Maresca, et al. 1981). Intracelulárna koncentrácia voľného cysteínu u dermatofytov je regulovaná enzýmom cystein dioxygenáza (Kasperova, et al. 2011), ktorej expresia je u dimorfných húb zvýšená v kvasinkovej fáze rastu a predstavuje tak dôležitý faktor diferenciácie a virulencie. (Klein and Tebbets 2007).

2.1 Zloženie keratínu

Ako keratín označujeme rodinu cytoskeletálnych proteínov, tvoriacich intermediálne filamentá keratínového typu v epiteliálnych štruktúrach (Bragulla and Homberger 2009; Denger, et al. 2006; Moll, et al. 2008). Keratín má jedinečné fyzikálno-chemické vlastnosti. Je odolný k degradácii proteolytickými enzýmami a nerozpustný v polárnych a nepolárnych rozpúšťadlách. Je však menej odolný k oxidačným a redukčným agens, ktoré destabilizujú jeho disulfidové mostíky (Hill, et al. 2010; Horvath 2009).

Keratín môžeme rozdeliť na tzv. tvrdý keratín, prítomný vo vlasoch, nechtoch a rohovine a mäkký keratín, prítomný v *stratum corneum* epidermis. Tvrdý keratín je tvorený zväzkami paralelne usporiadaných filament s malým množstvom ne-keratínových proteínov a bez obsahu lipidov. Je bohatý na aminokyselinu cystín. Mäkký keratín tvoria filamentá usporiadané v rôznych smeroch v jednej rovine. Obsahuje veľké množstvo lipidov a ne-keratínových proteínov. Obsah cystínu je nízky – 2 až 4% v *stratum corneum* v porovnaní s 18% v niektorých vlasoch (Bragulla and Homberger 2009; Kunert 2000; Moll, et al. 2008).

Štruktúra keratínov je často tvorená keratínovými filamentami zasahujúcimi do amorfnej matrix. Keratínové filamentá sú vystavané z keratínových proteínov, tvoriacich superrodinu s minimálne 60 členmi u človeka.

Keratíny sa rozdeľujú na dva typy:

- typ I – kyslé proteíny – u človeka s molekulovou hmotnosťou od 40 do 57 kDa a izoelektrickým bodom od 4,8 do 5,4
- typ II – bázické a neutrálne keratíny – s vyššou molekulovou hmotnosťou (od 57 do 67 kDa) a izoelektrickým bodom (od 6,5 do 8,5)

V rôznych bunkách a tkanivách sa keratínové proteíny vyskytujú v rôznych kombináciách. Všetky keratíny sú filamentárne proteíny s centrálnou doménou s α -helikálnou štruktúrou a dvoma terminálnymi doménami. V priebehu formovania filament dochádza k párovaniu dvoch keratínových proteínov (kyslého so zásaditým) a tvorbe dimérov. Dva diméry sa postupne párujú do tetramérov a vyššie organizovaných štruktúr, tvoriacich intermediálne filamentá s viac ako 32 proteínmi (Bragulla and Homberger 2009; Langbein and Schweizer 2005; Moll, et al. 2008). Filamentá prechádzajú cez matrix zloženú z „proteínov asociovaných s keratínovými filamentami“ (KFAPs). KFAPs sú malé proteíny (Mr približne 20kDa) s heterogénnym aminokyselinovým zložením, spojené s keratínovými filamentami pomocou disulfidových mostíkov (Bruce Fraser and Parry 2012; Gong, et al. 2012; Rogers, et al. 2006).

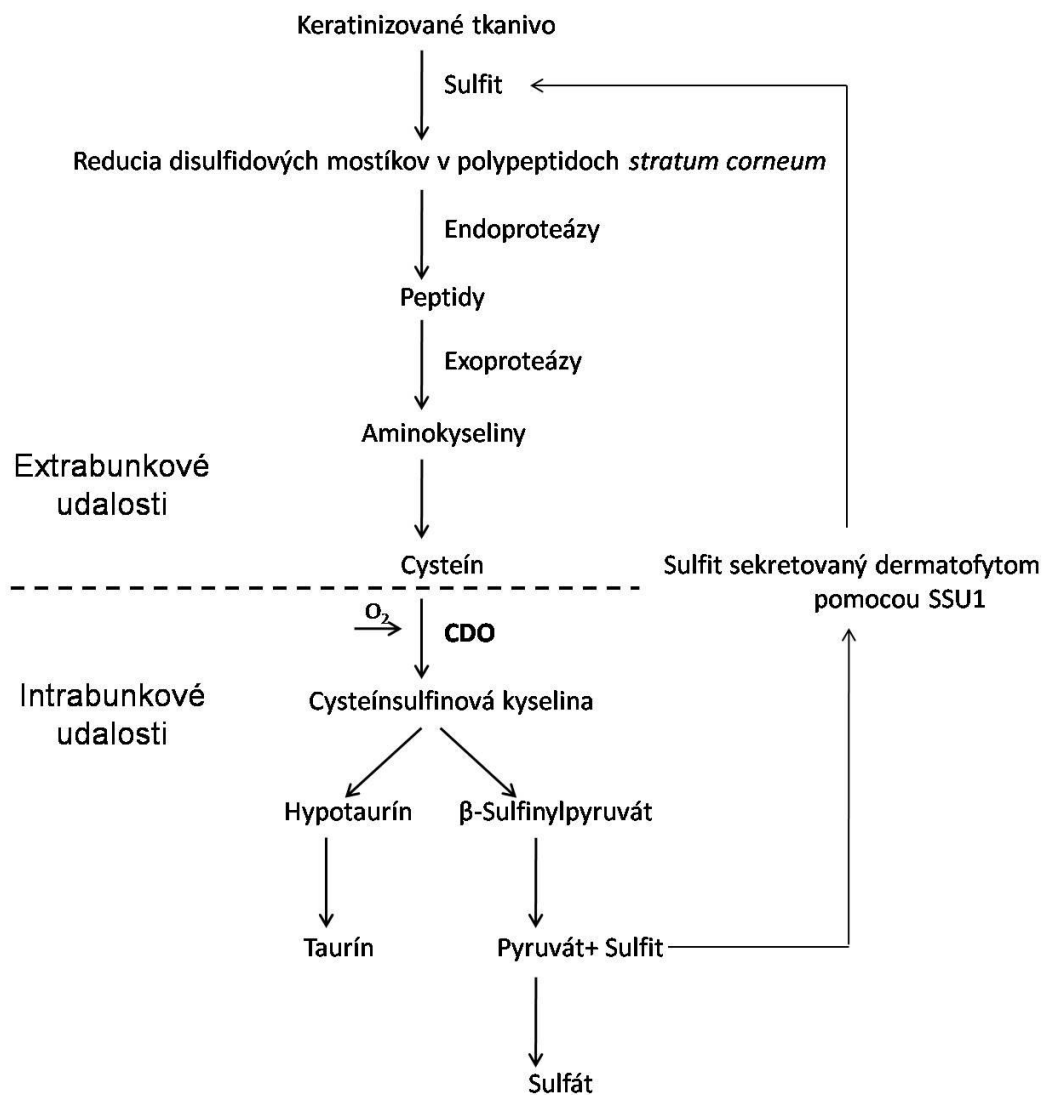
2.2 Mechanizmus degradácie keratínu

V priebehu infekcie je keratín postupne degradovaný na kratšie peptidy a aminokyseliny funkciou keratínáz a proteáz (Obr. č. 4). Tieto peptidy a aminokyseliny slúžia pre dermatofyty ako zdroj živín. Ničmenej, pred degradáciou disulfidových mostíkov nie sú proteázy dermatofytov schopné hydrolyzovať kompaktné

keratinizované tkanivo (Kunert 2000; Lechenne, et al. 2007; Monod 2008). Pre efektívnu degradáciu keratinizovaného tkaniva musí preto dermatofyt pred hydrolýzou keratínových proteínov redukovať disulfidové mostíky. Za vhodných životných podmienok, dermatofyty produkujú sulfít, uplatňujúci sa ako redukčné agens pri degradácii disulfidických mostíkov v keratíne. Sulfity štiepia voľný i v proteínoch viazaný cystín za produkcie cysteínu a S-sulfocysteínu v procese označovanom ako sulfitolýza (Kunert 2000). Metabolická dráha oxidácie cysteínu a produkcie sulfítov u dermatofytov je rovnaká ako u ostatných eukaryot a slúži k regulácii koncentrácie a k eliminácii nadbytku cysteínu (Kasperova, et al. 2013; Stipanuk, et al. 2006).

K produkcii sulfítov dermatofytom slúžia tzv. sulfít efluxné pumpy, napr. TruSSU1 u *T. rubrum*, patriace do Tellurite-resistance/Dicarboxylate transportérovej (TDT) rodiny (Lechenne, et al. 2007). I keď sulfít je súčasťou metabolizmu dermatofytov, je pre bunky toxický (Thomas and Surdin-Kerjan 1997). Sulfít efluxné pumpy tak reprezentujú alternatívnu cestu detoxifikácie dermatofytov v priebehu infekcie keratínových štruktúr. Navyše, procesy detoxifikácie sulfitu a sulfitolýza pravdepodobne prebiehajú súčasne, pretože priamo po sulfitolýze sú redukované proteíny ďalej degradované pomocou rôznych endo- a exoproteáz (Lechenne, et al. 2007). Časť sulfitu je ďalej oxidovaná sulfít oxidázou na sulfát, exkretovaný ako finálny produkt metabolizmu síry.

Degradácia keratínu je teda komplexný proces zabezpečený alkalizáciou prostredia (pomocou deaminácie aminokyselín a peptidov s produkciou amónnych iónov), degradáciou disulfidových väzieb tj. sulfitolýzou a degradáciou keratínu na rozpustné zložky tj. proteolýzou. Keratinolýza v priebehu infekcie je tiež ovplyvnená teplotou tela, obsahom vody, mikroaeróbnymi podmienkami, zložením séba, produkciou oxidu uhličitého živými bunkami a imunitným systémom hostiteľa (Kunert 2000).



Obr. č. 4: Úloha CDO pri degradácii keratínu u dermatofytov. Adherencia dermatofyta k *stratum corneum* stimuluje produkciu rozmanitých endoproteáz a exoproteáz, ktoré postupne štiepia polypeptidy až na aminokyseliny. CDO následne katalyzuje oxidáciu cysteínu vedúcu k produkcii cysteinsulfinovej kyseliny. CDO sa tiež uplatňuje pri produkcii sulfitu, nevyhnutného k degradácii disulfidových väzieb.

2.3 Štruktúra cystein dioxygenázy

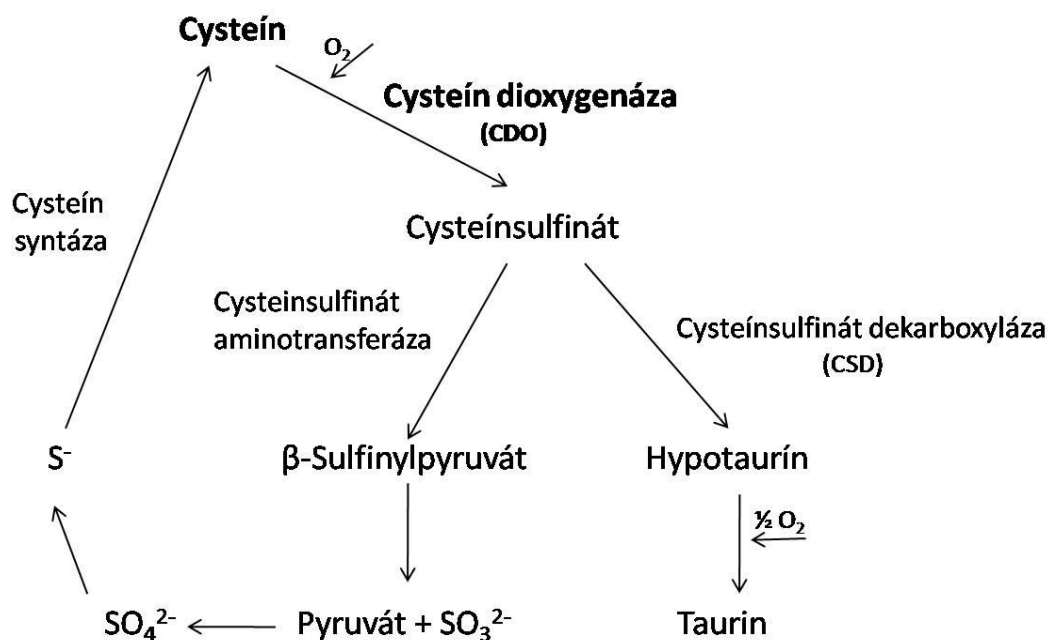
CDO je nehémový enzým patriaci do rodiny cupinových proteínov. Táto rodina zahŕňa celý rad funkčne odlišných enzýmov, ako sú dekarboxylázy, dioxygenázy, hydrolázy, izomerázy, epimerázy a ne-enzymatické proteíny. Členovia rodiny cupinov sa vyznačujú malou celkovou sekvenčnou podobnosťou (Dunwell, et al. 2001). Obsahujú konzervované sekvenčné motívy, GX₅HXHX₃₋₆EX₆G cupin motív 1 and GX₅₋₇PXGX₂HX₃N cupin motív 2. Oba motívy sú oddelené sekvenciou 15-50 aminokyselín (Stipanuk, et al. 2011). CDO je jedinečná tým, že konzervovaný glutamát v motíve 1 je nahradený cysteínom u eukaryotických CDO alebo glycínom u bakteriálnych CDO (Stipanuk, et al. 2011). CDO viaže železo ako kofaktor pomocou troch imidazolových skupín v histidínových reziduách (His86, His88 a His140 u človeka) za formovania triády (Dominy, et al. 2008; Kumar, et al. 2011). Tento systém je nevyhnutný pre správny proces dioxygenácie katalyzovaný CDO (Kumar, et al. 2012). Nahradenie His rezidua Asp zvyšuje reakčnú energetickú bariéru v prebehu procesu dioxygenácie a to zmenou v spinovom stave Fe(II)-superoxo (Fe^{II}-O-O) a Fe(IV)-oxo (Fe^{IV}=O) komplexov, slúžiacich ako donory kyslíka (Kumar, et al. 2012).

CDO je monomerný enzým s jedným atómom železa v molekule (Yamaguchi, et al. 1978) a jej aktivita je silne redukovaná chelatačnými činidlami ako sú Cu⁺ a Fe²⁺ (Sakakibara, et al. 1976).

Aktívne miesto enzýmu obsahuje tri väzbové miesta ligandu (Aluri and de Visser 2007). Väzbové miesta ligandu sú asociované s molekulárnym kyslíkom a substrátom – cysteínom, viažucim sa cez sulfhydrylové a amino-skupiny. Ďalšie aminokyseliny (Tyr157, Cys93 a His155 u človeka, resp. Tyr187, Cys114 a His182 u *T. mentagrophytes*) sú nevyhnutné k stabilizácii reakcie pomocou vodíkových mostíkov (McCoy, et al. 2006). Formovanie thio-éterovej väzby medzi Cys93 a Tyr157 u ľudskej CDO je striktné konzervované a je dôležité pre katalytickú aktivitu a/alebo štrukturálnu stabilitu enzýmu. Pretože v bakteriálnej CDO je Cys93 nahradený glycínom, bakteriálna CDO nie je schopná tvoriť Cys-Tyr väzbu a ani sulfoxidácie (Dominy, et al. 2006).

2.4 Mechanizmus CDO funkcie a regulácie

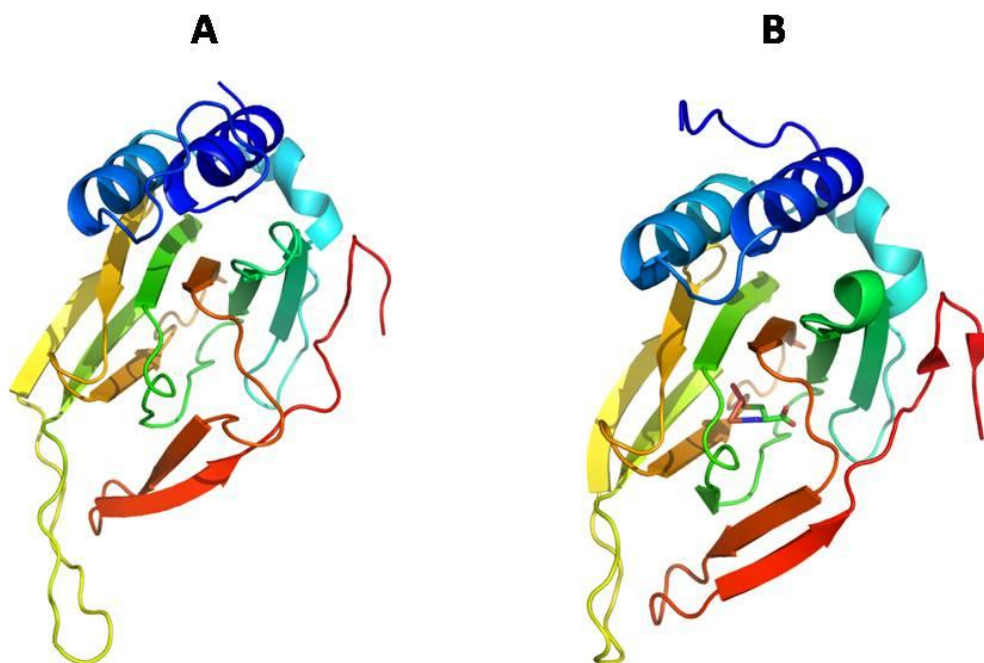
CDO je dôležitým enzýmom v homeostáze cysteínu v živých organizmoch. Zvýšená koncentrácia voľného cysteínu je totiž pre organizmus cytotoxická a neurotoxická (Stipanuk, et al. 2009). Mechanizmus CDO funkcie a regulácie je najlepšie popísaný u cicavcov. V prvom kroku katabolizmu cysteínu je cysteín oxidovaný pomocou CDO na cysteínsulfínovú kyselinu (Obr. č. 5). Tá je transaminovaná na 3-sulfinylpyruvát, ktorý sa spontánne degraduje na pyruvát a sulfit. Sulfit je následne čiastočne oxidovaný na sulfát pomocou sulfit oxidázy. Cysteínsulfínová kyselina môže tiež byť dekarboxylovaná na hypotaurín, ktorý je oxidovaný na taurín. Navyše hypotaurín a cysteínsulfínová kyselina môžu byť oxidované na príslušnú sulfonovú kyselinu nešpecifickými oxidačnými agens, ako sú hydroxylové radikály, singletový kyslík alebo peroxyinitrit (Fontana, et al. 2005; Green, et al. 1991).



Obr. č. 5: Možné cesty katabolizmu cysteínu u dermatofytov. CDO metabolizuje aminokyselinu cysteín na cysteínsulfínát, ktorý je metabolizovaný cysteínsulfínát dekarboxylázou na taurín, alebo cysteínsulfínát aminotransferázou na sulfit a ten následne na sulfát. Sulfity sú metabolizované sulfitreduktázou na sulfidy, ktoré môžu byť použité k opätovnej produkcii cysteínu pomocou cysteín syntázy.

Aktivita CDO bola dôkladne študovaná u hepatocytov laboratórneho potkana. Ukázalo sa, že je významne ovplyvnená dostupnosťou extracelulárneho cysteínu a regulovaná predovšetkým ubiquitiniláciou na úrovni proteínu (Bella, et al. 1999; Bella, et al. 1999). Intracelulárna koncentrácia cysteínu je ovplyvnená aktivitou CDO. Pri nízkej koncentrácii intracelulárneho cysteínu je CDO rýchlo ubiquitinilovaná a degradovaná pomocou 26S proteázomového systému. Naopak, ak je koncentrácia intracelulárneho cysteínu vysoká, ubiquitinilácia a degradácia CDO sú rýchlo reprimované (Stipanuk, et al. 2006; Stipanuk, et al. 2002). Štúdium zapojenia CDO do metabolizmu cysteínu u *T. mentagrophytes* ukázalo, že mechanizmy regulácie aktivity CDO sú zrejme evolučne značne konzervované, pretože sú veľmi podobné i tejto evolučne vzdialenej hube, ako bude detailne diskutované ďalej.

Obr. č. 6: Štruktúrny model CDO. A - model CDO *Trichophyton mentagrophytes*, B - model CDO *Rattus norvegicus*. Model bol vytvorený nástrojom SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) pomocou štruktúrného homológneho modelovania CDO z *Rattus norvegicus* v spolupráci s Katedrou Biochemie Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.



3. Ciele dizertačnej práce

1. Popísať sekvenciu cDNA cystein dioxygenázy z *Trichophyton mentagrophytes* a porovnať ju s ostatnými CDO.
2. Stanoviť vplyv keratínu a cystínu na transkripčnú aktivitu cystein dioxygenázy pomocou real-time PCR.
3. Pripraviť rekombinantný proteín CDO *T. mentagrophytes*.
4. Pripraviť DNA vakcínu kódujúcu proteín CDO *T. mentagrophytes* a izolovať hyperimúnne séra špecificky reagujúce s CDO *T. mentagrophytes*.
5. Charakterizovať vzťah medzi intenzitou transkripcie *Cdo* a hladinou CDO proteínu v závislosti na zmene extracelulárnej hladiny cystínu u myceliálnej kultúry *T. mentagrophytes*.

4. Materiál a metódy

4.1 Izolácia celkovej RNA a prepis do cDNA

Celková RNA bola izolovaná z kmeňa TM-10, popísaného skupinovú špecifikáciou ako *Trichophyton mentagrophytes*, získaného zo zbierky dermatofytov Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. *T. mentagrophytes* bol kultivovaný v Petriho miskách na Sabouraudovom glukóza-peptónovom agare (GP) 10 dní pri 28 °C. Mycélium bolo zozbierané a podrvené v tekutom dusíku.

Celková RNA bola izolovaná metódou Chomczynského (Chomczynski and Sacchi 1987). mRNA bola následne izolovaná z celkovej RNA pomocou Oligotex mRNA kítu (Qiagen, Hilden, Germany). Celková cDNA bola získaná reverznou transkripciou mRNA použitím Super Script III reverznej transkriptázy (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) a oligo-dT primeru (5' CTCGAGTTTTTTTTTTTTT 3').

4.2 Amplifikácia Cdo cDNA

Cdo cDNA bola amplifikovaná pomocou vysokopresnej polymerázy Phusion™ (Finzyme, Espoo, Finland) a syntetických primerov (Tabuľka č. 2, 3, 4), navrhnutých na základe porovnania homológnych úsekov sekvencií *Cdo* u iných členov rodu *Trichophyton* z genových databáz GenBank a CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre dostupných na serveroch <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> a <http://www.cbs.knaw.nl/Dermatophytes>.

Tabuľka č. 2: Sekvencia primerov pre amplifikáciu *Cdo* cDNA pomocou PCR.

Názov priemeru	Nukleotidová sekvencia
CDO-up	5'-ATGCCATTCATCGAAAACCA-3'
CDO-down	5'-CTACAGCTTCAGGCCCCG-3'

Po optimalizácii podmienok PCR, bola *Cdo* cDNA amplifikovaná 40 cyklami. Pri amplifikácii bol použitý termocyklér PTC 200 (MJ Research, Waltham, Massachusetts USA).

Tabuľka č. 3: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu *Cdo* cDNA.

Zložka roztoku	Objem	Finálna konc.
5x Phusion HF pufer	10 μ l	1x
2,5 mM dNTPs mix	4 μ l	200 μ M
CDO-up primer	1 μ l	0,5 μ M
CDO-down primer	1 μ l	0,5 μ M
DNA (0,1 μg)	0,5 μ l	-
Phusion polymeráza	0,5 μ l	0,02 U/ μ l
ddH₂O	33 μ l	-

Tabuľka č.4: Podmienky PCR reakcie použitej pri amplifikácii *Cdo* cDNA.

Názov cyklu	Počet cyklov	Teplota [°C]	Čas [min:sec]
Iniciálna denaturácia	1	98	00:30
Denaturácia	40	98	00:10
Aníling	40	55	00.30
Extenzia	40	72	00:30
Finálna extenzia	1	72	10:00
Chladienie	1	4	-

PCR produkt o veľkosti 660 bp, separovaný pomocou 1% agarózovej gélovej elektroforézy, bol vizualizovaný pomocou etídium bromidu pridaného k agarózovému gélu s finálnou koncentráciou 50 ng/ml v UV transluminátore. Záznam obrazu bol zabezpečený CCD kamerou (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany). *Cdo* cDNA bola izolovaná z gélu pomocou Qiaquick Gel Extraction kitu (Qiagen, Hilden, Germany) a eluovaná do ddH₂O.

4.3 *Klonovanie Cdo cDNA do vektoru pCR II Blunt TOPO*

Prečistený PCR produkt bol ligovaný do otvoreného klonovacieho vektoru pCR II Blunt TOPO (Invitrogen, Groningen, Netherlands) podľa protokolu výrobcu. Rekombinovaný plazmid bol následne transformovaný do chemicky kompetentných *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) s použitím tepelného šoku (30 sekúnd pri 42 °C) a bakteriálne kolónie boli selektované na LB agarových miskách s kanamycínom (50 µg/ml) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Z vybraných kolónií baktérií bola izolovaná plazmidová DNA pomocou QIAprep Spin Miniprep kítu (Qiagen) a analyzovaná pomocou restriktčných endonukleáz za podmienok podľa návodu výrobcu (New England Biolab, Inc.; Beverly, MA USA). Rekombinované plazmidy boli komerčne sekvenované (Generi Biotech s. r.o., Hradec Králové, ČR).

Nukleotidová sekvencia *Cdo* bola analyzovaná pomocou mnohonásobného aligmentu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) a programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Pomocou programu ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), dostupného na serveru NCBI, bol skontrolovaný otvorený čítací rámec ligovaného PCR produktu. Sekvencia CDO bola porovnaná pomocou globálneho aligmentu BLAST na serveru NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) s ostatnými CDO sekvenciami, dostupnými v databáze GenBank.

4.4 *Klonovanie Cdo cDNA do expresných vektorov ChampionTM pET101 D-TOPO a pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO.*

K preklonovaniu *Cdo* cDNA do prokaryotického expresného vektora ChampionTM pET101 Directional (D) TOPO (Invitrogen) a eukaryotického expresného vektora pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO (Invitrogen) boli navrhnuté nové primery. Primer z 5'-konca *Cdo* cDNA, obsahujúci Kozakovu sekvenciu, bol použitý pre oba plazmidy a primer z 3'-konca bez STOP kodónu pre prokaryotický expresný vektor a obsahujúci STOP kodón pre eukaryotický expresný vektor (Tabuľka č. 5).

Tabuľka č. 5: Sekvencia primerov pre amplifikáciu *Cdo* cDNA pomocou PCR pre klonovanie do expresných vektorov.

Vektor	Názov primeru	Nukleotidová sekvencia*
pET101 pcDNA 3.1	CDO-CACC	5'-C <u>ACC</u> ATGGACATCCAGAAGTTGATGGAGGGATA-3'
pET101	CDO-up	5'-CAGCTTCAGGCCCGGTT-3'
pcDNA 3.1	CDO-STOP	5'-CTACAGCTTCAGGCCCGGTT-3'

*Kozakova sekvencia (CACC) umožňujúca malej ribozomálnej podjednotke rozpoznanie a pevnú väzbu k správne mu iniciačnému kodónu.

Cdo cDNA bola amplifikovaná ako v predchádzajúcom prípade. Ako templát bola použitá plazmidová DNA (*Cdo* v pCR II Blunt TOPO). PCR produkt bol separovaný, prečistený a ligovaný do otvoreného prokaryotického alebo eukaryotického expresného vektora. Expresné vektory boli transformované do bakteriálnej línie *E. coli* TOP 10 (Invitrogen), amplifikované a identita bola potvrdená restričnou analýzou a sekvenovaním.

4.5 Príprava rekombinantného proteínu rCDO

Rekombinantný proteín (rCDO) bol exprimovaný z prokaryotického expresného vektoru Champion™ pET101/D-TOPO, transformovaného do expresnej bakteriálnej línie *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) nesúcej λ DE3 bakteriofágovú DNA kódujúcu T7 RNA polymerázu. Postup transformácie bol rovnaký ako v prípade TOP10 línie. Transformované baktérie boli vyočkované na selekčné LB agary s ampicilínom v koncentrácii 100 mg/ml. Po identifikácii transformovaných kolónií pomocou minipreparácie plazmidovej DNA a restričnej analýzy, boli vybrané kolónie vyočkované do tekutého LB média s ampicilínom a kultivované do absorbancie O.D.₆₀₀ 0,6. Následne bola indukovaná expresia proteínu pridaním β -galaktozidázového induktoru IPTG (izopropyl β -D thio galaktopyranozid) do LB média (finálna koncentrácia IPTG v médiu 1mM). Po 4 hod kultivácie pri 37 °C bola bakteriálna kultúra centrifugovaná (10 000xg 5 min 4 °C).

4.5.1 Purifikácia proteínu za denaturačných a natívnych podmienok

Bunková peleta bola lyzovaná denaturačným lyzačným pufrom (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6mM GuHCl, pH8), alebo natívnym lyzačným pufrom (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,1% Triton X-100, 0,5 mg/ml lysozym, 100 µM EDTA, pH8) s prídavkom inhibítorov proteáz (0,5 mM PMSF, 0,4 µg/ml leupeptín, 0,5 µg/ml aprotinín) miešaním 1 hod pri 22 °C (denaturačné podmienky) alebo 4 °C (natívne podmienky). Lyzát bol sonifikovaný 10x 10 sekúnd na ľade pomocou kavitačného sonikátoru (Hielscher UP 200S) a následne centrifugovaný (10 000xg 30 min 4 °C). CDO bola purifikovaná zo supernatantu pomocou afintnej chromatografie s Ni-NTA agarózou (Qiagen) podľa inštrukcií výrobcu v gravitačnom usporadaní. Po naviazaní proteínu na kolónu boli kotaminácie odmyté pomocou 6 objemov kolóny denaturačného premývacieho roztoku (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8mM Urea, pH8 a pH6,5) a CDO bola následne eluovaná z kolóny pomocou 3 objemov kolóny elučného roztoku (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8mM Urea, pH8 a pH4,5). Za natívnych podmienok bol použitý premývací roztok (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH8) a elučný roztok (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH8) s prídavkom inhibítorov proteáz. Purifikované proteíny boli uchované v elučných pufroch pri 4 °C.

Purifikovaná CDO a lyzát bakteriálnej pelety použité ako kontrola boli separované na 15% SDS-PAGE a farbené pomocou Coomassie Blue R-250, alebo po separácii na SDS-PAGE blotované na polyvinyliden difluoridovú (PVDF) membránu (Millipore, Bedford, MA USA). PVDF membrána s preblotovanými proteínmi bola blokována 12 hod pri 4 °C použitím 5% odtučneného mlieka s 0,05% Tween 20 v PBS a následne vyvíjaná pomocou anti-V5 protilátky konjugovanej s chrenovou peroxidázou riedenej 1:8 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo USA) 2 hod pri 22 °C. Membrána bola premytá pomocou PBS s 0,05% Tween 20 (4x 15 min) a PBS (2x 15 min), inkubovaná 5 min s chemiluminiscenčným detekčným činidlom Super Signal West Pico (Pierce, Rockford, IL USA) a exponovaná na X-ray film (Kodak, Rochester, NY USA).

CDO purifikovaná za denaturačných podmienok bola pre ďalšiu analýzu renaturovaná dialýzou proti renaturačnému roztoku L-arginínu (0,1 M Tris-HCl; 0,4 M L-arginín) a uchovaná pri 4 °C.

4.5.2 Identifikácia CDO pomocou MALDI-TOF analýzy

Identita CDO, separovanej na SDS-PAGE, bola určená pomocou peptidového hmotnostného fingerprintu použitím Microflex MALDI-TOF LRF20 hmotnostného spektrometra (Bruker Daltonik, Bremen, Nemecko) na Katedre biochemie Přírodovědecké fakulty, UP v Olomouci. Získané peptidové spektrá boli analyzované pomocou online verzie vyhľadávacieho softwaru Mascot (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) a porovnané s NCBI-nr proteínovou databázou programom ProFound.

4.6 Stanovenie enzymatickej aktivity CDO

Enzymatická aktivita CDO bola určená modifikáciou metódy Stipanuk et al. (Stipanuk, et al. 2008). His-tag obsahujúci CDO proteín, purifikovaný pomocou Ni-NTA agarózy za natívnych alebo denaturačných podmienok (po renaturácii) bol dialyzovaný proti roztoku 50 mM bikarbonátu amónneho pomocou dialyzačného čreva Spectra/Por m.w. cutoff 12-14 kDa (Spectrum Medical Industries, Inc. Los Angeles USA). 100 μ l predyalizovaného proteínu bolo zmiešaných so 100 μ l čerstvého 1,25 mM sulfátu železnatého a 100 μ l 200 mM acetátu amónneho. Reakcia bola naštartovaná pridaním 100 μ l čerstvo pripraveného 20 mM L-cysteínu. Po premiešaní boli vzorky inkubované v Eppendorf Termomixére pri 37 °C miešaním pri 300 rpm. Po 30 minútach bola reakcia zastavená pridaním 100 μ l 0,5% kyseliny mravčej a ochladením pomocou ľadu. Vzorky boli prefiltrované pomocou 10 kDa cutoff centrifugačnej filtračnej jednotky (Millipore) centrifugáciou pri 10 000xg 15 min pri 4 °C. Ako kontrola bola použitá vzorka, do ktorej bola pridaná kyselina mravčia okamžite po pridaní L-cysteínu. Hmotnostné spektrá vzoriek boli analyzované pomocou maXisTM ultra high resolution QTOF prístroja (Bruker Daltonik) doplneného o elektrosprejový iónový zdroj na Katedre Biochemie, Přírodovědecké fakulty, UP v Olomouci. Enzymatická aktivita CDO bola vyjadrená v nkat/mg proteínu – 1 nkat reprezentoval premenu 1nmol L-cysteínu na cysteín sulfinát za sekundu.

4.6.1 Stanovenie vplyvu kultivačných podmienok na mieru expresie CDO

Expresia rekombinantnej CDO v *E. coli* za rôznych teplôt bola stimulovaná pridaním IPTG do kultivačného média, ako bolo popísané v časti 4.5. Suspenzia buniek bola kultivovaná pri teplote 30 °C (3 a 6 hodín expresie), 20 °C (6 a 18 hodín expresie) a 4 °C (20, 28 a 40 hodín expresie). Proteíny boli purifikované za natívnych podmienok (viz. časť 4.5) a bola určená ich enzymatická aktivita.

4.7 *Príprava CDO DNA vakcíny*

Za účelom získania hyperimúnneho myšieho séra bola pripravená *Cdo* DNA vakcína ako najjednoduchší a experimentálne najrýchlejší spôsob navodenia špecifickej protilátkovej odpovede. Namnoženie vakcinačného eukaryotického expresného plazmidu bolo uskutočnené nasledujúco. Klon *E. coli* TOP 10 do ktorého bol vnesený rekombinovaný eukaryotický expresný vektor pcDNA 3.1 TOPO kódujúci *Cdo*, bol kultivovaný v 2L tekutého LB média s ampicilínom pri 37 °C 12 hodín. Peleta buniek bola získaná centrifugáciou pri 10 000xg 10 min po dobu 4 °C. Plazmidová DNA bola izolovaná pomocou Plasmid Maxi kítu (Qiagen) podľa protokolu výrobcu. Izolovaná plazmidová DNA bola rozpustená v endotoxin-free TE pufre na koncentráciu 1 µg/µl, overená reštrikčnou analýzou a sekvenovaním a uskladnená v alikvótoch pri -80 °C.

4.8 *Imunizácia experimentálnych myší*

Imunizačné experimenty boli schválené Etickou komisií Lékařské fakulty UP v Olomouci a Ministerstvom školství nládeže a tělovýchovy ČR (Odborná komisia

užívateľského zariadenia k projektu pokusov podľa § 11 vyhlášky č. 207/2004 Zb. o ochrane, chove a využití pokusných zvierat).

K experimentom boli použité samice BALB/c myši (BioTest s.r.o., Konárovice, ČR) staré 6 týždňov. Myši boli umiestnené v Ústave pro práci s laboratorními zvířaty LF UP Olomouc. Po každej vakcinácii boli experimentálne zvieratá kontrolované. Myši boli rozdelené do dvoch skupín – skupinu imunizovanú DNA vakcínou (5 myši) a skupinu imunizovanú rekombinantným proteínom (rCDO; 3 myši). Imunizácia bola prevedená v dvoch krokoch - indukcia imunitnej odpovede v deň 0 a preočkovanie (booster) v 21. deň.

DNA vakcína bola aplikovaná hydrodynamicky do ľavej postrannej chvostovej žily myši v dávke 100 µg/myš v 1.8 ml sterilného PBS na myš v priebehu 7 sekúnd. Vakcína, obsahujúca rekombinantný proteín rCDO, bola aplikovaná spolu s kompletným Freundovým adjuvans (Sigma-Aldrich) intradermálne (i.d.) v dávke 50 µg/myš. Krv bola odobraná z chvostovej žily v 18. a 39. deň po imunizácii. Po koagulácii bola krv centrifugovaná 2 000x g 5 min. Sérum bolo odobrané do nových skúmaviek a uskladnené pri -20 °C.

Tabuľka č. 6: Prehľad zloženia a dávky vakcín použitých k imunizácii myši.

Skupina	Indukcia		Booster	
	DNA vakcína	rCDO	DNA vakcína	rCDO
DNA vakcína	100 µg v 2ml	-	100 µg v 2ml	-
rCDO v PBS	-	50 µg (1 µg/ µl)	-	50 µg (1 µg/ µl)
CFA	-	50 µl	-	50 µl

4.9 Afinitná purifikácia protilátok zo séra imunizovaných myší

rCDO bola separovaná na 15% SDS-PAGE, preblotovaná na PVDF membránu a ofarbená pomocou Ponceau S (Serva, Heidelberg, Nemecko). Band, odpovedajúci rCDO, bol vystrihnutý z membrány a zablokovaný pomocou 5% odtučneného mlieka s 0,05% Tween 20 v PBS 1 hod pri 22 °C. Strip bol premytý pomocou PBS s 0,05% Tween 20 (4x 15 min) a PBS (2x 15 min) a inkubovaný O/N pri 4 °C so sérom imunizovaných myší. Po premytí stripu pomocou PBS s 0,05% Tween 20 (1x 15 min) a PBS (3x 15 min), boli protilátky eluované zo stripu pomocou 50 µl 100 mM glycínu pH2,5 20 minút. Eluát bol následne neutralizovaný pomocou 2,5 µl 100 mM Tris-Cl pH8.

4.10 Stanovenie transkripčnej aktivity *Cdo* mRNA pomocou real-time PCR

Kmeň *T. mentagrophytes* TM-10 bol kultivovaný na SGA médiu pri 28 °C. Po 10 dňoch kultivácie bola získaná suspenzia spór miešaním povrchu mycélia so sklenenými guľôčkami vo fyziologickom roztoku a následnou filtráciou cez sterilnú gázu.

K indukcii expresie CDO bola suspenzia spór (10^8 /ml) prenesená do kultivačného média (0,8% glukózy; 0,2% peptónu; 0,04% KH_2PO_4 ; pH6,5) s pridaním L-cystínu, rozpusteného v 1M HCl vo finálnej koncentrácii 0,7 g/L (L-GP médium). Médium bolo okamžite neutralizované pomocou 1 M KOH. Kontrolné GP médium s ekvivalentným množstvom HCl a KOH, ale bez pridanej L-cystínu, slúžilo ako kontrola. Obe média boli sterilizované filtráciou 0,22 µm.

Suspenzia spór bola následne kultivovaná pri 28 °C v tme.

Ďalej bola sledovaná zmena hladiny CDO pri raste mycélia na ľudských vlasoch ako model jedného zo základných štandardných prostredí rastu *T. mentagrophytes*. Ľudské vlasy boli omyté vodou, usušené a rozstrihané na malé kúsky veľkosti niekoľkých milimetrov. Vlasy boli sterilizované autoklávovaním (115 °C 20 min)

v Erlenmeyerových fľaškách (100 mg na 100 ml fľašku) bez pridania tekutiny. Následne bolo do fľašiek pridané 20 ml sterilného KH_2PO_4 (400 mg/L) a suspenzia spór ($10^8/\text{ml}$). Kultivácia prebiehala pri 28 °C v tme.

Po 3 a 7 dňoch kultivácie v L-GP médiu resp. GP médiu a po 21 dňoch kultivácie na ľudských vlasoch, bolo mycélium separované z fľašiek filtráciou cez papierový filter v Buchnerovom lieviku, rýchlo omyté destilovanou vodou a uskladnené v 15ml skúmavkách v tekutom dusíku.

4.11.1 Izolácia RNA a real-time PCR analýza

Celková RNA bola izolovaná z mycélií pomocou RNeasy Mini Plant kítu (Qiagen) podľa návodu výrobcu. Celková RNA bola následne prepísaná do cDNA pomocou Super Script III reverznej transkriptázy a RNázy H (Invitrogen) podľa návodu výrobcu.

Tabuľka č. 7: Zloženie reakčnej zmesi a podmienky reverznej transkripcie RNA.

Zložka roztoku	Objem	Fin. koncentrácia	Podmienky reakcie
Oligo (dT)₂₀	1 μl	50 μM	Inkubácia zmesi 5 min pri 65 °C, ochladenie na ľade 1 min, krátka centrifugácia.
Celková RNA	5 μl	5 μg	
2,5 mM dNTP mix	4 μl	200 μM	
ddH₂O	3 μl	-	
5x FirstStrand pufer	4 μl	-	Inkubácia 60 min pri 50 °C (po pridaní reagencii) a 15 min pri 70 °C. Krátka centrifugácia.
DTT	1 μl	0,1 M	
RNázaOUT	1 μl	40 U/ μl	
SuperScript III RT	1 μl	200 U/ μl	
RNázaH	1 μl	2 U/ μl	
			Inkubácia 20 min pri 37 °C.

Real-time PCR bola prevedená použitím SYBR Green I Master chemizmu (Roche, Mannheim, Germany) a prístroja LightCycler 480 (Roche) podľa návodu výrobcu (Tabuľka č. 8, 9). Ako housekeeping gén bol použitý β -aktín. Pre určenie transkripčnej aktivity *Cdo* mRNA bola použitá rovnica: $C_T \beta\text{-aktin} - C_T \text{Cdo} + 10$, kde C_T

odpovedá crossing pointu alebo tzv. crossing tresholdu (vypočítaný bod inflexie pre jednotlivé amplifikačné krivky) meranému pre daný primerový pár.

Tabuľka č. 8: Zloženie reakčnej zmesi real-time PCR reakcie.

Zložka roztoku	Objem	Finálna konc.
H ₂ O PCR čistoty	7 µl	-
Primerový mix	2 µl	1 µM
Master mix	10 µl	-
cDNA	1 µl (~0,3 µg)	-

Tabuľka č. 9: Podmienky real-time PCR reakcie.

Program	Počet cyklov	Mód analýzy	Teplota	Čas
Pre-inkubácia	1	-	95 °C	5 min
Amplifikácia	45	kvantifikácia	95 °C	10 s
			60 °C	20 s
			72 °C	10 s
Krivka topenia	1	krivka topenia	95 °C	5 s
			65 °C	1 min
Chladienie	1	-	4 °C	10 s

Tabuľka č. 10: Sekvencia primerov *Cdo* použitých v real-time PCR.

Názov primeru	Sekvencia primeru
CDO-TM-up	5'-GAACCACGAGGAGTGGCA-3'
CDO-TM-down	5'-TTGGTGACTGTCAGGGGG-3'
β-aktín-up	5'-CTACGAAGGTTTCGCTCTGC-3'
β-aktín-down	5'-ATGATGGCGTTGTAGGTGGT-3'

4.11 Porovnanie koncentrácie *Cdo* mRNA a CDO proteínu po vystavení *L*-cystínu

K detailnejšej časovej charakterizácii závislosti expresie *Cdo* mRNA a CDO proteínu bola suspenzia spór (10^8 /ml) prenesená z SGA média do želatínového média (Bacto želatína 15 g l^{-1} ; KH_2PO_4 0.5 g l^{-1} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mg l^{-1} ; NaCl 0.1 g l^{-1} ; FeCl_3 6 mg l^{-1} ; kvasinkový extrakt 50 mg l^{-1} ; pH 6,5) doplneného o $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (200 mg l^{-1}) v prípade kontrolného (GM) média alebo $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (240 mg l^{-1}) v prípade média s *L*-cystínom (GMC médium). Obe média boli neutralizované autoklávovaním. *L*-cystín bol pridaný pri príprave GMC média vo forme roztoku v 1M HCl na finálnu koncentráciu 3 mM a okamžite neutralizovaný 1M KOH. Ekvivalentné množstvo HCl a KOH bolo pridané i do kontrolného GM média. Inokulum bolo kultivované v GM a GMC médiu pri 28 °C v tme. 1, 2,5, 4,5, 8, 24 a 48 hodín po výmene média bolo mycélium zozbierané ako bolo popísané v časti 4.9 a uskladnené v tekutom dusíku. Z mycélia bola izolovaná celková RNA a prepísaná do cDNA. Real-time PCR bola vykonaná ako v predchádzajúcom prípade s použitím β -aktínu ako housekeeping génu. Transkripčná aktivita bola určená pomocou rovnice: $C_{T \beta\text{-aktín}} - C_{T \text{Cdo}} + 9$

4.11.1 Izolácia celkových proteínov a Western Blot analýza

Vzorky lyzované RLC pufrom (Qiagen, Hilden, Germany) boli zmiešané s ľadovým 90% EtOH v pomere 1:4 a inkubované 30 min pri -20 °C. Vzorky boli následne centrifugované 10 min pri 13 000x g. Pelety boli omyté 2x ľadovým 90% EtOH a resuspendované v 2x SDS-nanášacom pufre.

Pripravený proteínový extrakt bol separovaný na 10% SDS-PAGE a preblotovaný na PVDF membránu. Membrána bola blokováná cez noc pri 4 °C v blokačnom pufre obsahujúcom 10% FBS, 3% BSA a 0,1% Tween 20 v PBS. Po zablokovaní nešpecifických väzieb bola membrána inkubovaná so sérovou protilátkou, afinitne purifikovanou pomocou rekombinantného CDO proteínu (viz. časť 4.9) v riedení 1:5 000, alebo sérom myší, imunizovaných rekombinantným Hsp90 proteínom (rHsp90, 1:10 000) použitým ako kontrola (Raska, et al. 2008). Membrány boli

inkubované 4 hod pri 22 °C, premyté pomocou PBS s 0,05% Tween 20 (6x 15 min) a PBS (4x 15 min) a preblokované 2 hod pri 22 °C. Následne bola pridaná Anti-mouse Polyvalent Immunoglobulins (G, A, M) protilátka, konjugovaná s chrenovou peroxidázou (1:50 000). Po premytí boli membrány detegované pomocou Super Signal West Femto (Pierce) v prípade CDO blotu, alebo Super Signal West Pico (Pierce) v prípade rHsp90 blotu a exponované na X-ray film (Kodak).

5. Výsledky

5.1 Ligácia Cdo cDNA do klonovacieho vektora pCR II Blunt TOPO a sekvenčná analýza

Bol pripravený rekombinantný plazmid nesúci sekvenciu Cdo cDNA *T. mentagrophytes*. Správnosť ligovania bola overená reštrikčnou analýzou rekombinantného plazmidu a sekvenáciou. Sekvencia Cdo cDNA bola uverejnená v databáze GenBank (NCBI) pod číslom GU139238. Cdo cDNA sekvencia *T. mentagrophytes* bola porovnaná so sekvenciou ľudskej Cdo cDNA pomocou sekvenčného aligmentu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) a programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Na úrovni cDNA vykazujú obe sekvencie 35,3% zhodu.

Obr. č. 7: Sekvencia Cdo z *Trichophyton mentagrophytes*. Sekvencia bola použitá k príprave rekombinantného proteínu rCDO a DNA vakcíny.

```

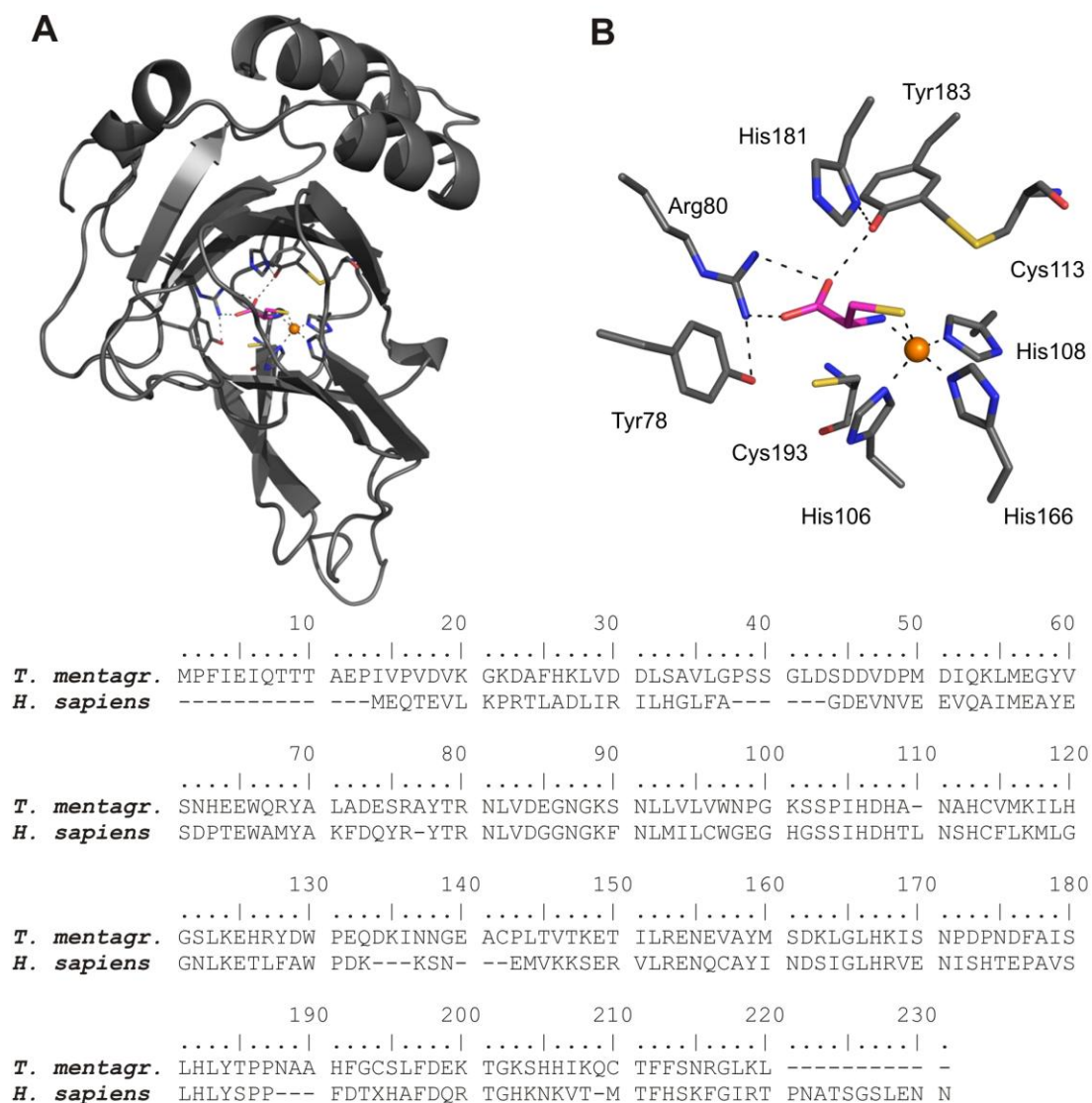
1  ATGCCATTCA TCGAAAACCA GACCACAACG GCAGAACCCA TCGTCCCAGT
51  GGACGTCAAG GGGAAAGATG CTTCCATAA GCTAGTAGAC GACCTCAGTG
101 CCGTCCTTGG ACCGTCGTCG GGCCTTGACT CTGACGACGT AGACCCCATG
151 GACATCCAGA AGTTGATGGA GGGATACGTA TCGAACCACG AGGAGTGGCA
201 GCGATATGCG TTGGCAGATG AGTCCAGAGC CTATAACCAGA AACCTCGTAG
251 ATGAGGGCAA CGGCAAGAGT AACTTGCTCG TCCTCGTTTG GAACCCGGGA
301 AAGTCCAGTC CAATCCACGA CCATGCTAAT GCTCATTGTG TAATGAAGAT
351 CCTGCATGGT TCGTTAAAAG AGCACAGATA CGACTGGCCA GAGCAGGACA
401 AAATCAACAA CGGCGAAGCC TGCCCCCTGA CAGTCACCAA GGAGACCATC
451 CTTCGGGAGA ACGAAGTGGC ATACATGTCC GATAAGCTTG GCCTGCATAA
501 GATCTCAAAC CCGGATCCAA ATGACTTTGC CATCTCTCTG CACTTGATA
551 TCCTTCCAAA CGCAGCCCAC TTTGGCTGTT CTCTGTTTGA TGAGAAGACA
601 GGCAAGTCTC ACCACATCAA GCAGTG TACC TTCTTCTCCA ACCGGGGCCT
651 AAGCTGTAG

```

cDNA bola preložená *in silico* do aminokyselinovej sekvencie pomocou programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Proteínová sekvencia CDO bola porovnaná s CDO u človeka (Obr. č. 8). V rámci dermatofytov je CDO sekvenčne výrazne konzervovaná (99% identita s CDO u *T. equinum* a 88% identita s CDO u *Microsporium*

canis), zatiaľ čo v rámci vyšších eukaryot vykazuje značné sekvenčné rozdiely (45% identita s CDO u *Salmo salar* a 35,3% identita s CDO u *Homo sapiens*).

Obr. č. 8: Porovnanie aminokyselínovej sekvencie CDO u *T. mentagrophytes* s CDO človeka. Štruktúrálny model CDO *T. mentagrophytes* bol vytvorený na základe kryštálovej štruktúry ľudskej CDO s použitím programu SWISS-MODEL v spolupráci s Katedrou biochemie Prírodovedecké fakulty, UP v Olomouci v rámci spoločného výskumného cieľa. A – celková štruktúra CDO *T. mentagrophytes* so zvýraznením reziduí v aktívnom mieste. B – detailný pohľad na aktívne miesto CDO. Možné vodíkové mostíky sú naznačené prerušovanou čiarou. Fe^{2+} je zobrazený oranžovou guľou a naviazaný cysteínový substrát je zvýraznený tmavo červenou farbou. Alignment oboch CDO bol spracovaný pomocou programu BioEdit 7.0.9.0.

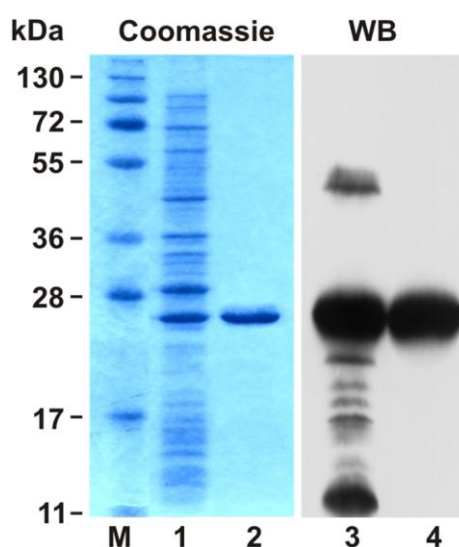


5.2 Purifikácia rekombinantného proteínu rCDO

Cdo cDNA bola následne preklonovaná do expresných vektorov. Zatiaľ čo cDNA ligovaná do eukaryotického expresného vektora pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO slúžila k príprave DNA vakcíny, cDNA ligovaná do prokaryotického expresného vektora pET101 bola použitá k purifikácii rekombinantného proteínu rCDO.

rCDO bol produkovaný v expresnej línii *E. coli* BL21 (DE3), následne afinitne purifikovaný pomocou Ni-NTA agarózy a analyzovaný SDS-PAGE a Western Blot analýzou (Obr. č. 9).

Obr. č. 9: Exprimácia a purifikácia rekombinantného proteínu CDO. CDO exprimovaná v prokaryotickom expresnom systéme bola afinitne purifikovaná z bunkového lyzátu pomocou Ni-NTA. Bunkový lyzát (1, 3) a elučná frakcia z Ni-NTA (2, 4) boli separované SDS-PAGE a ofarbené pomocou Coomassie blue alebo blotované na PVDF membránu a vyvíjané s anti-V5 protilátkou. (M) marker molekulovej hmotnosti.



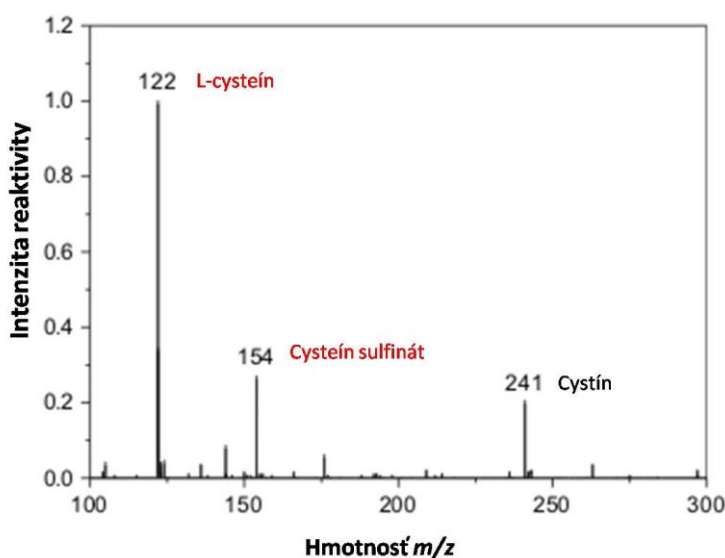
Identita rCDO proteínu bola overená pomocou MALDI-TOF analýzy v spolupráci s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty, UP v Olomouci. Band vyrezaný a prečistený z SDS-PAGE gélu (vzorka 2 v obrázku č. 9) bol identifikovaný ako *T. mentagrophytes* CDO na základe translácie *Cdo* cDNA v GenBank. Molekulová

hmotnosť CDO odpovedala 23061 Da, čo je v zhode s odpovedajúcimi známymi molekulovými hmotnosťami CDO. Štiepením pomocou trypsínu bolo pripravených 15 odpovedajúcich peptidových štepov so 71% pokrytím sekvencie.

5.3 Stanovenie enzymatickej aktivity rCDO

Enzymatická aktivita rCDO, purifikovaných za natívnych i denaturačných podmienok, bola analyzovaná stanovením formovania cysteín sulfinátu z L-cysteínu (Obr. č. 10) v spolupráci s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty, UP v Olomouci. Tandemová hmotnostná spektrometria identifikovala produkovaný cysteín sulfinát. Na obrázku odpovedá píkcom s m/z 136 ($-\text{H}_2\text{O}$), 108 ($-\text{CO}$ a H_2O), 88 ($-\text{SO}_2\text{H}_2$) a 74 ($-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{H}_2$) (Froelich and Reid 2009; Yague, et al. 2005). rCDO purifikovaná za natívnych podmienok vykazovala enzymatickú aktivitu 0,56 nkat/mg, zatiaľ čo proteín, purifikovaný za denaturačných podmienok, bol enzymaticky inaktívny.

Obr. č. 10: ESI-hmotnostná spektrometria cysteín dioxygenázovej reakčnej zmesi. Spektrum zobrazuje formovanie cysteín sulfinátu (m/z 154) z L-cysteínu oxidovaného cysteín dioxygenázou. Boli identifikované i ďalšie píky: m/z 122 (cysteín; $[\text{M} + \text{H}]^+$), 144 (cysteín; $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 176 (cysteín sulfinát; $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 241 (cystín; $[\text{M} + \text{H}]^+$) a 263 (cystín; $[\text{M} + \text{Na}]^+$). Reakčná zmes obsahovala 50 mM acetát amónny, 0,3 mM sulfit železnatý, 5 mM L-cysteín a 100 μg rCDO proteínu.



5.3.1 Stanovenie vplyvu kultivačných podmienok na mieru expriácie a enzymatickú aktivitu rekombinantného CDO exprimovaného v *E. coli*.

Rekombinantný CDO bol exprimovaný v *E. coli* za rôznych teplôt (30, 20, 4 °C) a po rôznu dobu (3, 6, 18, 28, 40 h) k stanoveniu vplyvu týchto podmienok na mieru expriácie a enzymatickú aktivitu rekombinantného CDO. rCDO bol purifikovaný pomocou Ni-NTA za natívnych podmienok a bola stanovená jeho enzymatická aktivita (Tabuľka č. 10). Všetky vzorky vykazovali enzymatickú aktivitu v rozsahu od 0,475 nkat/mg (vzorka exprimovaná 18 hod pri 20 °C) do 0,001 nkat/mg (vzorka exprimovaná 40 hodín pri 4 °C). Najvyššia enzymatická aktivita bola nameraná u vzorky rekombinantnej CDO exprimovanej v *E. coli* 18 hod pri 20 °C. Najvyšší výt'azok rCDO bol získaný pri kultivácii *E. coli* 6 hod pri 20 °C, najnižší pri kultivácii 20 hod pri 4 °C (Tabuľka č. 11).

Tabuľka č. 11: Efekt kultivačných podmienok na enzymatickú aktivitu rCDO. rCDO exprimované v *E. coli* BL21 (DE3) boli afinitne purifikované pomocou Ni-NTA za natívnych podmienok. Enzymatická aktivita bola stanovená meraním produkcie cysteín sulfínátu z L-cysteínu pomocou ESI MS.

Kultivačná teplota [°C]	Čas kultivácie [h]	Enzymatická aktivita [nkat/mg]	Množstvo vypurifikovanej rCDO [mg/L]
30	3	0.2982	2.012
30	6	0.075	2.0
20	6	0.05	4.12
20	18	0.475	1.13
4	20	0.021	0.494
4	28	0.0003	0.68
4	40	0.001	1.14

5.4 Stanovenie transkripčnej aktivity *Cdo* mRNA v *T. mentagrophytes* pomocou real-time PCR

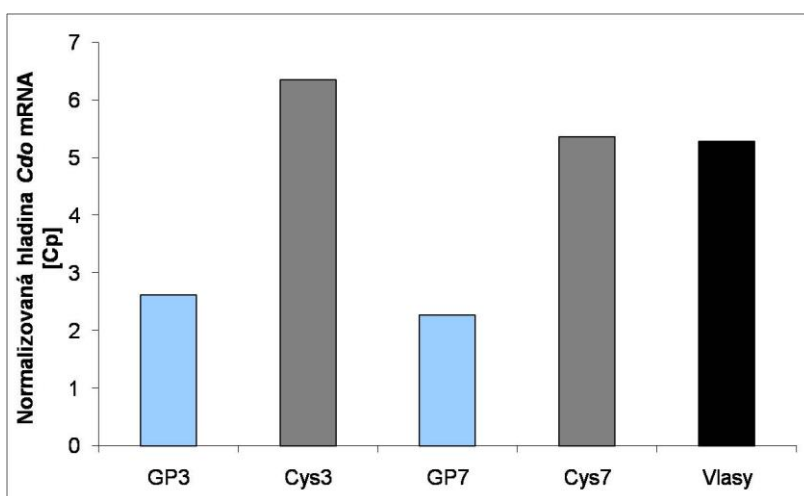
K stimulácii produkcie natívnej CDO u *T. mentagrophytes*, bola suspenzia spór prenesená z SGA média do GP, L-GP média alebo ľudské vlasy v roztoku KH_2PO_4 (400 mg l^{-1}) (ako zdroj keratínu). Z mycélií izolovaná RNA bola prepísaná na cDNA ktorá slúžila ako templát v real-time PCR reakcii. K normalizácii dát bol použitý housekeeping gén β -aktín. Dodanie L-cystínu alebo ľudských vlasov do GP média zvýšilo množstvo *Cdo* mRNA osem krát (približne 3 cykly) v porovnaní s kontrolou (Graf č. 1a). Z grafu je patrné, že ľudské vlasy sa rovnako ako L-cystín uplatňujú ako efektívne stimulatory produkcie CDO. Porovnateľná efektívnosť oboch zložiek je daná určením optimálneho množstva L-cystínu v predchádzajúcich experimentoch. Podobné výsledky boli získané i s použitím iných housekeeping génov a to MnSOD a ADP-ribozylačného faktoru v troch nezávislých experimentoch (Graf č.1b).

K detailnejšej analýze časovej závislosti vplyvu L-cystínu na transkripčnú aktivitu *Cdo* mRNA v *T. mentagrophytes*, bola v nasledujúcom experimente stanovená zmena koncentrácie mRNA 1, 2,5, 4,5, 8, 24 a 48 hodín po výmene pôvodného média GP (bez cystínu) za médium L-GP (s L-cystínom). Ako kontrola bolo použité mycélium rastúce na GP médiu bez L-cystínu. Transkripčná aktivita *Cdo* mRNA bola opäť analyzovaná pomocou real-time PCR s použitím β -aktínu ako housekeeping génu. Transkripčná aktivita *Cdo* bola určená pomocou rovnice: $C_{T \beta\text{-aktín}} - C_{T \text{Cdo}} + 9$.

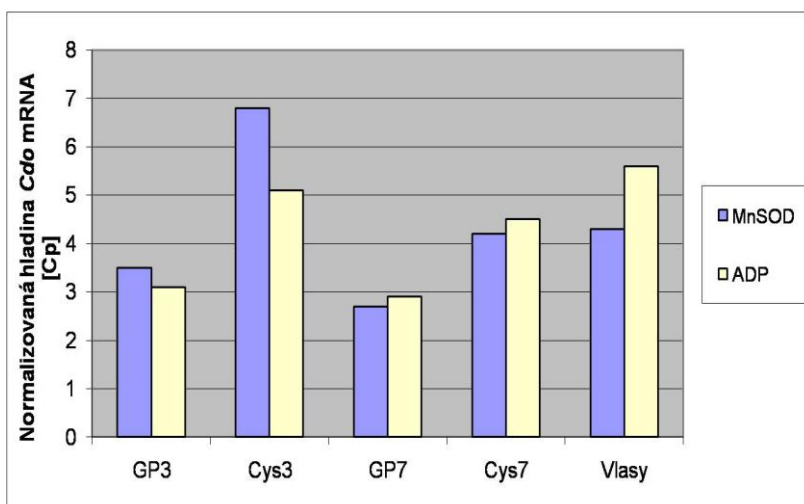
Prenesnie mycélia z média bez L-cystínu do média obsahujúceho L-cystín, výrazne zvýšila transkripčnú aktivitu *Cdo* mRNA. Už 2,5 hodiny po výmene média vzrástla aktivita *Cdo* približne osem krát v porovnaní s kontrolou (Graf č. 2).

Graf č. 1a), b): Oplyvnenie transkripčnej aktivity *Cdo* mRNA u *T. mentagrophytes* L-cystínom a ľudskými vlasmi. *T. mentagrophytes*, kmeň TM-10 bol kultivovaný na glukóza-peptónovom médiu, doplnenom o L-cystín (Cys3 odpovedá 3 dňom kultivácie a Cys7 odpovedá 7 dňom kultivácie) alebo ľudské vlasy (Vlasy; 21 dní kultivácie). Ako kontrola bolo použité mycélium rastúce na glukóza-peptónovom médiu (GP3 a GP7; 3 a 7 dní kultivácie). Transkripčná aktivita bola stanovená pomocou real-time PCR s použitím β -aktínu ako housekeeping génu. Transkripčná aktivita *Cdo* bola určená pomocou rovnice: $C_T \beta\text{-aktín} - C_T \text{Cdo} + 10$.

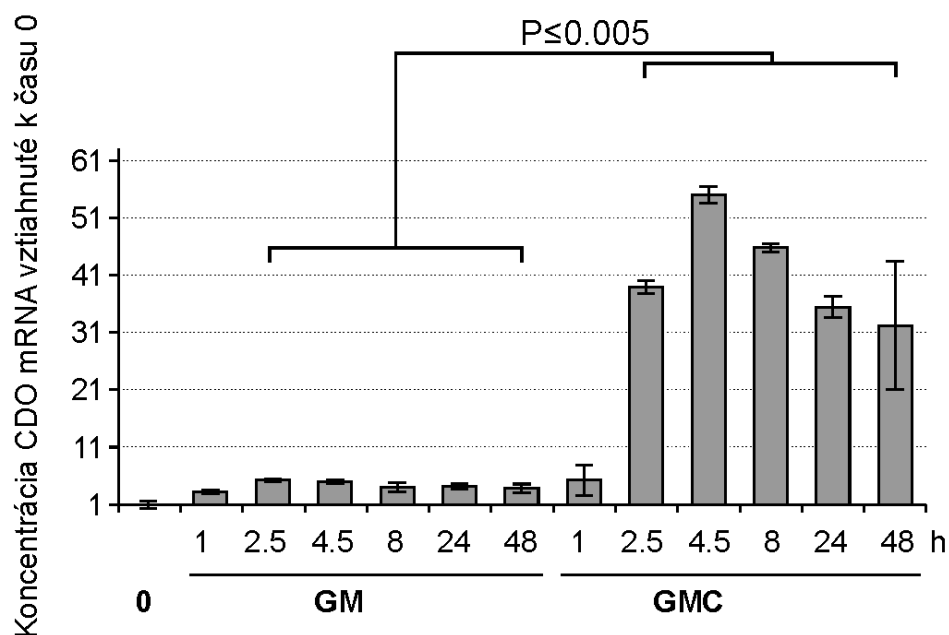
a)



b)



Graf č. 2: Stanovenie vplyvu L-cystínu na transkripčnú aktivitu *Cdo* mRNA. *T. mentagrophytes*, kmeň TM-10 bol kultivovaný na želatínovom médiu bez L-cystínu (GM) alebo s L-cystínom (GMC). Po 1, 2,5, 4,4, 8, 24 a 48 hodinách kultivácie bolo mycélium zozbierané. Transkripčná aktivita bola analyzovaná pomocou real-time PCR s použitím β -aktínu ako housekeeping génu. Transkripčná aktivita *Cdo* bola určená pomocou rovnice: $C_T \beta\text{-aktín} - C_T \text{Cdo} + 9$. Párový t-test vykazoval signifikantné rozdiely medzi GM a GMC skupinou.

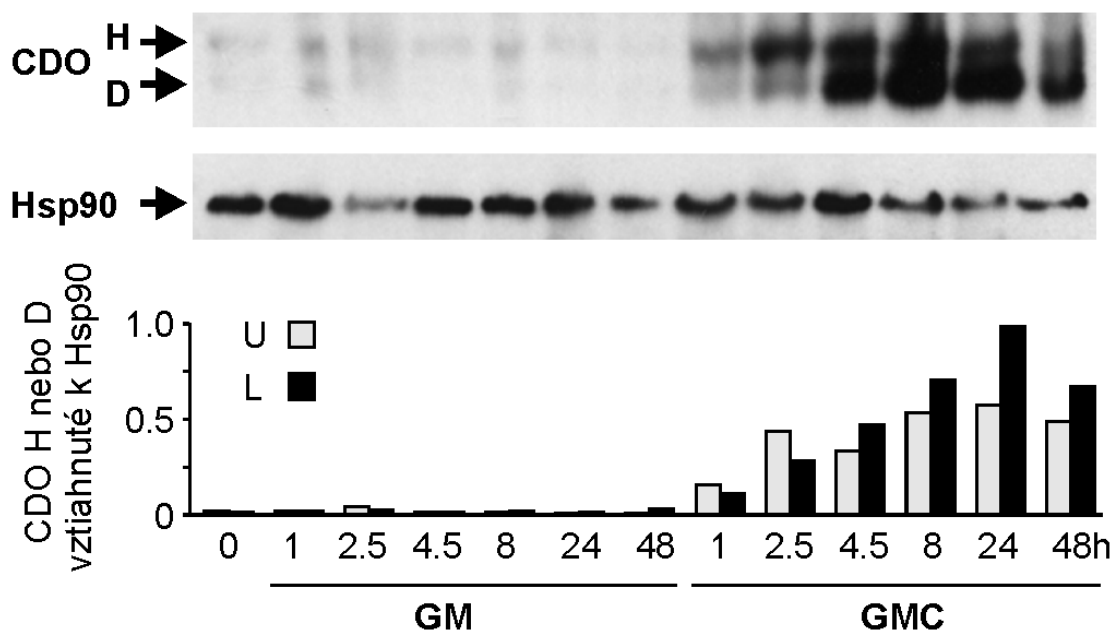


5.5 Analýza exprese CDO na úrovni proteínu

Z mycélii *T. mentagrophytes*, kultivovaných v predchádzajúcom experimente boli okrem RNA izolované i celkové proteíny. Proteíny boli separované na 15% SDS-PAGE a preblotované na PVDF membránu. Po zablokovaní nešpecifických väzieb boli k membráne pridané protilátky (anti-CDO afinitne prečistená sérová protilátka z myší, imunizovaných rCDO alebo *Cdo* DNA vakcínou, alebo sérum myší imunizovaných rHsp90 ako housekeeping proteín umožňujúci normalizáciu nanášky celkových proteínov). Exprezia CDO bola detegovaná pomocou komerčnej polyvalentnej protilátky špecificky reagujúcej s myším IgG, IgA a IgM. CDO bola detegovaná ako dvojband. CDO v spodnom bande obsahuje prepojený aminokyselinový kofaktor s dôležitou katalytickou a štrukturálnou úlohou.

Obr. č. 11: Analýza exprese CDO na proteínovej úrovni u *T. mentagrophytes* rastúcom na želatínovom médiu s a bez L-cystínu.

Mycéliá *T. mentagrophytes*, kmeň TM-10 rastúce na GM, boli prenesené do nového želatínového média s L-cystínom a kultivované 1; 2,5; 4,5; 8; 24 a 48 hodín. Celkové proteíny boli izolované z mycélií zrážaním EtOH, separované na SDS-PAGE a detegované Western Blot analýzou pomocou anti-CDO protilátky purifikovanej zo sér myši imunizovaných rCDO alebo *Cdo* DNA vakcínou, pomocou adsorpcie na rCDO. Detekcia Hsp90 proteínu u *T. mentagrophytes* pomocou séra myši, imunizovaných rHsp90, bola použitá k normalizácii nanášky celkových proteínov. CDO bola analyzovaná ako typický dvojbanded.



6. Diskusia

CDO bola po prvý krát u húb popísaná v roku 1983 (Kumar, et al. 1983). U *Histoplasma capsulatum* sa CDO uplatňuje pri morfológickom presune z myceliálnej na kvasinkovú formu (Maresca, et al. 1981; Sacco, et al. 1981) a u *Candida albicans* pri reverzibilnej zmene z White na Opaque fenotyp (Sudbery, et al. 2004; Valtavaara, et al. 1997). White reprezentujú pravidelne ohraničené vypuklé kolónie, Opaque nepravidelne ohraničené kolónie, tvorené zmesou kvasinkových a vláknitých buniek. CDO ako metaloenzým bola popísaná ako u prokaryot (Cook, et al. 2006; Dominy, et al. 2007; Dominy, et al. 2006), tak u eukaryot (Kasperova, et al. 2011; Kumar, et al. 1983; Stipanuk, et al. 2006; Stipanuk, et al. 2002).

U vyšších eukaryot je CDO životne dôležitý enzým – abnormálna aktivita alebo defekt v aktivite tohto enzýmu je spájaný s neurologickými ochoreniami (Perry, et al. 1985), autoimunitnými ochoreniami, ako je systémový lupus erythematosus a neurodegeneratívnymi ochoreniami, ako je reumatoidná artritída (Emery, et al. 1992; Gordon, et al. 1992), Alzheimerova a Parkinsonova choroba a chorobou motorických neurónov (Stipanuk, et al. 2009).

Úloha CDO u prokaryot nie je úplne jasná. U *Bacillus* a *Streptomyces* spp. je CDO exprimovaná vo vegetatívnom stave a jej aktivita sa zvyšuje po iniciácii sporulácie. Je tak možné, že sa uplatňuje pri regulácii koncentrácie cysteínu v bunkách a podporuje formovanie disulfidových mostíkov v obalových proteínoch spór (Dominy, et al. 2006). U baktérii nebola detegovaná dekarboxylázová aktivita. Je možné, že baktérie využívajú aspartát aminotranferázu k produkcii pyruvátu a sulfitu z cysteín sulfínátu (Dominy, et al. 2006), alebo spontánnu oxidáciu na cysteát a následne na sulfit alebo sulfát, pyruvát a amónne ióny (Denger, et al. 2006).

Aminokyselínová sekvencia CDO je v rámci dermatofytov značne konzervovaná. CDO u *T. mentagrophytes* je až 99% identická s CDO u *T. equinum* a 88% identická s CDO u *Microsporum canis*. V rámci eukaryot sú však sekvenčné rozdiely veľké – CDO u *T. mentagrophytes* je iba 35,3% identická s CDO u *Homo sapiens* (Kasperova, et al. 2011).

Rast dermatofytov na substrátoch bohatých na keratín je ovplyvnený produkciou proteáz, schopných degradovať keratín. Aktivita proteáz je závislá na redukcii disulfidových mostíkov pomocou sulfitu, produkovaného dermatofytom v priebehu keratinolýzy (Kunert 1972). Kľúčovým enzýmom zapojeným do produkcie sulfitu a následne do degradácie keratínu je cysteín dioxygenáza (Grumbt, et al. 2013; Kunert 2000).

K získaniu *Cdo* cDNA z *T. mentagrophytes* boli použité dva spôsoby izolácie celkovej RNA – izolácia RNA metódou Chomczynski (Chomczynski and Sacchi 1987), t.j. zrážaním kyslým fenolom, alebo použitím komerčne dostupného kítu (firma Qiagen). Obe metódy vyžadujú rozdrvenie mycélia v tekutom dusíku a následnú lýzu bunkovej steny pomocou silného lyzačného činidla – guanidín hydrochloridu. Ten okrem iného denaturuje RNázy a zabezpečuje tak bezpečnú izoláciu RNA s jej minimálnou degradáciou a maximálnym výťažkom. Získaná RNA bola dostatečne čistá k prepisu do cDNA, jej amplifikáciu a ligáciu do klonovacieho vektora, alebo k priamemu prepisu do cDNA (izolácia RNA pomocou komerčného kítu) a amplifikáciu a analýzu transkripčnej aktivity na úrovni RNA pomocou real-time PCR. Význam postupu pre získanie kvalitnej mRNA je kľúčový pre efektívny prepis mRNA do cDNA. To je možné ľahko demonštrovať pomocou detekcie tvorby cDNA s použitím rádioaktívne značeného thymidínu. Nečistoty ako napríklad polysacharidy, sú schopné úplne inhibovať reverznú transkripciu, ako bolo už skôr demonštrované v našom laboratóriu. Preto pri izolácii mRNA z húb je možné konštatovať že je výhodnejšie vyizolovať menšie množstvo ale vysoko kvalitnej mRNA. Izolácia pomocou kítu zabezpečuje rýchle získanie kvalitnej RNA (1 h verus 4 h pri izolácii metódou Chomczynski). Je však finančne náročnejšia. Bola popísaná i modifikácia metódy Chomczynski, umožňujúca získať RNA v priebehu jednej hodiny (Gauthier, et al. 1997).

Analýza koncentrácie *Cdo* mRNA po kultivácii *T. mentagrophytes* kmeň TM-10 na médiách so zdrojom keratínu (ľudské vlasy) alebo po pridání L-cystínu do kultivačného média, potvrdila výrazný nárast transkripčnej aktivity *Cdo*. To je v súlade s hypotézou predpokladajúcou význam CDO pri degradácii keratínu (Kunert 1976). Úloha CDO a sulfit-efluxných púmp SSU bola nedávno potvrdená i prípravou mutantov s knock-out génom pre *CDO*, *SSU1*, prípadne dvojitéch mutantov (Grumbt, et al. 2013). Inaktivácia týchto génov viedla k hypersenzitívite mutantov k L-cysteínu a cysteín

sulfinátu a neschopnosti mutantov rásť na médiu s obsahom L-cysteínu alebo keratínu (vlasy, nechty). To naznačuje výraznú závislosť patogenicity huby na oboch génových produktoch.

Práca bola tiež zameraná na prípravu enzymaticky aktívneho rekombinantného proteínu rCDO a určenie optimálnych podmienok expície k získaniu enzýmu s najvyššou enzymatickou aktivitou. Aktivita rCDO bola analyzovaná formovaním cysteín sulfinátu z L-cysteínu pomocou ESI hmotnostnej spektrometrie. Bolo preukázané, že podmienky kultivácie, dĺžka expície a spôsob purifikácie proteínu výrazne ovplyvňujú enzymatickú aktivitu rekombinantného proteínu. Najvyššia aktivita bola detegovaná u vzorky exprimovanej 18h pri 20 °C. Nižšia kultivačná teplota negatívne ovplyvnila nielen celkový výťažok proteínu ale i jeho enzymatickú aktivitu (viz. Tabuľka č. 11). Je zaujímavé, že i rCDO purifikované z kultúr kultivovaných pri 4 °C, teplote odpovedajúcej metabolickému minimu *E. coli*, sú enzymaticky aktívne. Celkový výťažok, ale i aktivita rCDO produkovaných pri 4 °C môžu byť ovplyvnené rozdielmi v skladaní proteínu alebo jeho neúplnej syntéze. Ďalšou príčinou výrazného vplyvu kultivačných podmienok na enzymatickú aktivitu rCDO môže byť formovanie thioéterovej väzby medzi reziduami Cys93 a Tyr157 u krysej CDO, alebo Cys113 a Tyr183 u *T. mentagrophytes* (Kasperova, et al. 2011), ktorá zvyšuje u eukaryotického analógu CDO enzymatickú aktivitu viac ako 10 krát (Stipanuk, et al. 2011). Formovanie inklúzných teliesok, v ktorých môže byť proteín denaturovaný a teda dochádza k zníženiu jeho enzymatickej aktivity, môže tiež výrazne ovplyvniť výťažok enzymaticky aktívneho proteínu. Nevýhodou inklúzných teliesok je totiž nutnosť ich lýzy denaturačným činidlom, napr. roztokom 6 mM GuHCl alebo 8 mM Urey. Purifikáciou rCDO za denaturačných podmienok a následnou renaturáciou sa nám nepodarilo pripraviť enzymaticky aktívny proteín. Maximálna nameraná aktivita CDO bola celkovo nižšia ako aktivity, uvádzané u CDO iných biologických druhov v literatúre (Dominy, et al. 2006). Príčinou môže byť použitie reakčného pufru s nižším pH (pH4,5) z dôvodu kompatibility s nasledovne použitou metódou MS analýzy pre vyhodnotenie aktivity. To je nižšie ako predpokladané optimálne pH (pH6,0-6,2) pre stanovenie aktivity CDO (Stipanuk, et al. 2008). Inou príčinou môže byť nižšia koncentrácia CDO, obsahujúcej thio-éterovú väzbu medzi reziduami Cys114 a Tyr184, nevyhnutnú pre katalytickú aktivitu enzýmu. Siakkou et al. (Siakkou, et al. 2011) popisali, že len 40-50% krysej CDO exprimovanej v *E. coli* obsahuje túto enzymaticky

dôležitú väzbu vznikajúcu posttranslačne. Rôzne zastúpenie oboch foriem CDO proteínu se uplatňuje nielen pri produkcii CDO ako rekombinantného proteínu exprimovaného v *E. coli*, tak i pri indukovanej expriácii CDO v *T. mentagrophytes* ako je popísané nižšie.

rCDO, spolu s pripravenou DNA vakcínou, boli použité k imunizácii myši s cieľom získať sérum, ktoré špecificky reaguje s CDO proteínom umožňujúcim Western Blot kvantifikáciu CDO proteínu v celkovom proteínovom lyzáte huby. Pretože celkové sérum získané z myši malo nízku špecifickosť, bolo nutné špecifické protilátky zo séra afinitne prečistiť. Takto afinitne purifikované protilátky boli už dostatečne špecifické k expresnej analýze CDO.

CDO bola pomocou SDS-PAGE a Western Blot metód detegovaná ako dvojband. Takýto dvojband bol popísaný i u cicavčích CDO (Dominy, et al. 2006; Dominy, et al. 2008; Stipanuk, et al. 2004; Stipanuk, et al. 2004). Dvojband vzniká ako následok formovania kovalentnej thioéterovej väzby medzi reziduami Cys93 a Tyr157 u krysej CDO v aktívnom mieste enzýmu, označovanom ako aminokyselinový kofaktor (Stipanuk, et al. 2004). Formovanie tejto kovalentnej väzby je závislé na dostupnosti substrátu bohatého na cysteín alebo jeho prekurzory a na rýchlosti katabolizmu (Bella, et al. 1999; Dominy, et al. 2006) a výrazne ovplyvňuje celkovú aktivitu CDO. Takýto aminokyselinový kofaktor sa pravdepodobne formuje u *T. mentagrophytes* medzi aminokyselinovými reziduami Cys113 a Tyr183 ako bolo predikované na základe 3D modelovania proteínovej štruktúry (Kasperova, et al. 2011). Tomu odpovedá pozorovanie na Western Blot, kde je možné v súvislosti s expozíciou huby cystínu pozorovať jednak zvýšenie koncentrácie mRNA transkriptu jednak zvyšujúcu sa denzitu spodného bandu obsahujúceho thioéterovú väzbu u vzoriek CDO proteínov (Obr. 10 a 11). Spodný band reprezentuje tzv. zrelú formu enzýmu (Stipanuk, et al. 2011). Pri zablokovaní formovania tejto kovalentnej väzby u cicavčej CDO mutáciou rezidua Cys93 alebo Tyr157, mutovaná CDO migruje v SDS-PAGE ako jeden band (Dominy, et al. 2008).

Na základe kryštálovej štruktúry ľudskej CDO (Ye, et al. 2007) bol s použitím programu SWISS-MODEL (Arnold, et al. 2006) pripravený štrukturálny model CDO *T. mentagrophytes*. Obe sekvencie CDO vykazovali 38,6% identitu. Všetky reziduá

v aktívnom mieste CDO *T. mentagrophytes* odpovedali pozíciám príslušných reziduí v aktívnom mieste ľudskej CDO.

U cicavcov je aktivita CDO regulovaná predovšetkým posttranslačnými úpravami (Bella, et al. 1999; Bella, et al. 1999). Krysy na proteínovej diéte majú zvýšenú koncentráciu a aktivitu CDO, ale nezmenené množstvo mRNA v pečeni, čo naznačuje, že cicavčia CDO je regulovaná zmenami koncentrácie a aktivity enzýmu (Bella, et al. 1999). Z dôvodu objasnenia regulačných mechanizmov CDO u dermatofytov, sme analyzovali množstvo CDO izolovanej z mycélii *T. mentagrophytes* kultivovaných na želatinovom médiu s alebo bez doplnenia L-cystínu v časovom intervale 1 až 48 hod (Graf č. 2, Obr. č. 11). Naše výsledky naznačujú, že intracelulárna koncentrácia CDO proteínu sa postupne zvyšuje v intervale od 1 po 8 hod po vystavení mycélii L-cystínu a následne pomaly klesá. Na úrovni mRNA takýto rýchly nárast (po 1 hod kultivácie) nie je pozorovaný, čo naznačuje, že u dermatofytov by CDO mohla byť tiež regulovaná posttranslačnými úpravami. Pri porovnaní množstva CDO proteínu s príslušnými *Cdo* mRNA izolovanými z mycélii neovplyvnených L-cystínom bolo zistené, že i keď *Cdo* mRNA sú detegované pomocou real-time PCR na konštantnej úrovni, CDO proteíny sú nedetegovateľné. U dermatofytov je *Cdo* mRNA pravdepodobne v neprítomnosti L-cystínu exprimovaná na konštantne nízkej hladine a CDO proteíny sú rýchlo po translácii degradované, alebo je translácia blokovaná, až kým L-cystín nie je dodaný. Približne 2,5 hod po dodaní L-cystínu sa mRNA koncentrácia zvyšuje – množstvo proteínu však dramaticky rastie a dosahuje vrchol asi 4 hod po dodaní L-cystínu a v jeho prítomnosti sa ďalej nemení. Z našich výsledkov vyplýva, že u dermatofytov sa uplatňuje ako regulácia na úrovni transkripcie tak i na ko-alebo posttranslačnej úrovni.

Ďalšie štúdium regulačných mechanizmov CDO *T. mentagrophytes* je nevyhnutné pre budúci vývoj efektívnej terapie, založenej na modifikácii metabolizmu dermatofytov. Príprava mutantov dermatofytov s knock-out génmy pre CDO alebo sulfítový transportér SSU1, vedie k neschopnosti dermatofytov rásť na vlasoch alebo nehtoch (Grumbt, et al. 2013). Významnou stratégiou k navodeniu imunitnej odpovede hostiteľa môžu byť i atenuované vakcíny, prípadne proteínové CDO vakcíny. Napr. k navodieniu protektívnej imunitnej odpovede u teliat, boli experimentálne zvieratá intramuskulárne imunizované 4 druhmi vakcín: vakcínami Trichoben a Trichobin obsahujúcimi atenuovaný kmeň *T. verrucosum*, rekombinantným proteínom hsp60 *T.*

mentagrophytes a DNA vakcínou kódujúcou hsp60 *T. mentagrophytes* (Raska, et al. 2004). Všetky typy imunizácií významne redukovali výskyt kožných lézií v porovnaní s kontrolnými neimunizovanými zvieratami. Najlepšie protektívne výsledky boli dosiahnuté po imunizácii zvierat živou atenuovanou vakcínou Trichoben. Príprava atenuovaných vakcín z kmeňov dermatofytov s inhibovanou expéciou alebo funkciou CDO tak môže predstavovať sľubnú stratégiu vývoja atenuovaných vakcín a prevencie dermatofytóz.

7. Záver

V súlade s cieľmi dizertačnej práce bola z *T. mentagrophytes* kmeň TM-10 vyizolovaná RNA a reverzne prepísaná do cDNA. cDNA bola amplifikovaná pomocou PCR a ligovaná do klonovacieho vektora pCR II Blunt TOPO. Po overení identity reštrikčnou analýzou a sekvenovaním, bola cDNA preligovaná do expresných vektorov Champion™ pET101 D-TOPO a pcDNA 3.1 D/V5-His TOPO.

V expresom systéme *E. coli* bol produkovaný rekombinantný proteín rCDO, ktorý bol afinitne prečistený na Ni-NTA kolóne za denaturačných i natívnych podmienok. Aminokyselinová sekvencia purifikovaného proteínu bola detegovaná a overená pomocou MALDI-TOF MS.

Aktivita rCDO a vplyv kultivačných podmienok na aktivitu enzýmu boli analyzované ESI-MS a to formovaním cysteín sulfínátu z L-cysteínu v reakčnej zmesi octanu amónneho, železnatých iónov a rCDO. Najvyššia aktivita bola nameraná pre vzorku exprimovanú 18h pri 20 °C a CDO purifikovaný za natívnych podmienok.

K stanoveniu transkripčnej aktivity *Cdo* na úrovni mRNA pomocou real-time PCR, bol kmeň TM-10 kultivovaný na GP médiu so zdrojom keratínu (ľudské vlasy), alebo s dodaním L-cystínu. V oboch prípadoch transkripčná aktivita *Cdo* mRNA vzrástla približne osem krát v porovnaní s nestimulovanou kultúrou, rastúcou na GP médiu. Zvýšená transkripčná aktivita *Cdo* potvrdzuje zapojenie CDO do procesu degradácie keratínu a produkcie sulfítov.

Transkripčná aktivita *Cdo* mRNA bola tiež analyzovaná vo vzorkách, získaných z mycélia TM-10 kultivovaného na želatínovom médiu, s výmenou média za médium s L-cystínom a následnou kultiváciou 1h; 2,5h; 4,5h; 8h; 24h a 48h. Dodanie L-cystínu do média výrazne stimulovalo transkripčnú aktivitu *Cdo* mRNA, ktorá vzrástla viac ako osem krát už 1h po výmene média.

Rekombinantný proteín rCDO spolu s DNA vakcínou boli použité k imunizácii experimentálnych myší s cieľom získať sérum, obsahujúce anti-CDO protilátky. Po afinitnej purifikácii protilátok, nutnej k zvýšeniu špecificity, boli protilátky použiteľné k analýze expresie CDO na úrovni proteínu. Pomocou metód SDS-PAGE a Western

Blot bola potvrdená zvýšená exprésia CDO proteínov izolovaných zo vzoriek mycélii kultivovaných na želatínovom médiu s L-cystínom.

CDO z *T. metagrophytes* je významným enzýmom zapojeným do degradácie keratínu. Pochopenie mechanizmov regulácie a funkcie CDO je nevyhnutné pre správny vývoj terapie dermatofytóz založených na modifikácii metabolizmu, exprésie a/alebo funkcie tohoto enzýmu.

8. Literatúra

- Almeida SR. 2008. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166, 277-283.
- Aluri S, de Visser SP. 2007. The mechanism of cysteine oxygenation by cysteine dioxygenase enzymes. *J Am Chem Soc*, 129, 14846-14847.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201.
- Bella DL, Hahn C, Stipanuk MH. 1999. Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol*, 277, E144-153.
- Bella DL, Hirschberger LL, Hosokawa Y, Stipanuk MH. 1999. Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo. *Am J Physiol*, 276, E326-335.
- Bistis GN. 1960. Pleomorphism and Growth Cycles in Trichophyton mentagrophytes. *Mycologia*, 52, 394-409.
- Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. 1991. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from Trichophyton rubrum. *J Invest Dermatol*, 96, 657-661.
- Bowman SM, Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28, 799-808.
- Bowman SM, Piwowar A, Al Dabbous M, Vierula J, Free SJ. 2006. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in Neurospora crassa. *Eukaryot Cell*, 5, 587-600.
- Bragulla HH, Homberger DG. 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214, 516-559.

- Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. 2010. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp*.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-1535.
- Bruce Fraser RD, Parry DA. 2012. The role of disulfide bond formation in the structural transition observed in the intermediate filaments of developing hair. *J Struct Biol*, 180, 117-124.
- Burzykowski T, Molenberghs G, Abeck D, Haneke E, Hay R, Katsambas A, Roseeuw D, van de Kerkhof P, van Aelst R, Marynissen G. 2003. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses*, 46, 496-505.
- Calderon RA, Hay RJ. 1987. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology*, 61, 289-295.
- Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. 2006. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect*, 8, 372-379.
- Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski LA. 2002. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 5, 386-391.
- Cook AM, Denger K, Smits TH. 2006. Dissimilation of C3-sulfonates. *Arch Microbiol*, 185, 83-90.
- Dahl MV. 1987. Immunological resistance to dermatophyte infections. *Adv Dermatol*, 2, 305-320.
- Dahl MV, Carpenter R. 1986. Polymorphonuclear leukocytes, complement, and *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol*, 86, 138-141.

- Degreef H. 2008. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*, 166, 257-265.
- Denger K, Smits TH, Cook AM. 2006. L-cysteate sulpho-lyase, a widespread pyridoxal 5'-phosphate-coupled desulphonative enzyme purified from *Silicibacter pomeroyi* DSS-3(T). *Biochem J*, 394, 657-664.
- Dominy JE, Jr., Hirschberger LL, Coloso RM, Stipanuk MH. 2006. Regulation of cysteine dioxygenase degradation is mediated by intracellular cysteine levels and the ubiquitin-26 S proteasome system in the living rat. *Biochem J*, 394, 267-273.
- Dominy JE, Jr., Hwang J, Guo S, Hirschberger LL, Zhang S, Stipanuk MH. 2008. Synthesis of amino acid cofactor in cysteine dioxygenase is regulated by substrate and represents a novel post-translational regulation of activity. *J Biol Chem*, 283, 12188-12201.
- Dominy JE, Jr., Simmons CR, Hirschberger LL, Hwang J, Coloso RM, Stipanuk MH. 2007. Discovery and characterization of a second mammalian thiol dioxygenase, cysteamine dioxygenase. *J Biol Chem*, 282, 25189-25198.
- Dominy JE, Jr., Simmons CR, Karplus PA, Gehring AM, Stipanuk MH. 2006. Identification and characterization of bacterial cysteine dioxygenases: a new route of cysteine degradation for eubacteria. *J Bacteriol*, 188, 5561-5569.
- Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirre CR, Goodenough PW. 2001. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci*, 26, 740-746.
- Elewski BE, Haley HR, Robbins CM. 2004. The use of 40% urea cream in the treatment of moccasin tinea pedis. *Cutis*, 73, 355-357.
- Emery P, Bradley H, Arthur V, Tunn E, Waring R. 1992. Genetic factors influencing the outcome of early arthritis--the role of sulphoxidation status. *Br J Rheumatol*, 31, 449-451.

- Faergemann J, Correia O, Nowicki R, Ro BI. 2005. Genetic predisposition--understanding underlying mechanisms of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 19 Suppl 1, 17-19.
- Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W, Jr., Martinez-Rossi NM. 2006. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol*, 55, 1093-1099.
- Ferreira-Nozawa MS, Silveira HC, Ono CJ, Fachin AL, Rossi A, Martinez-Rossi NM. 2006. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med Mycol*, 44, 641-645.
- Fontana M, Amendola D, Orsini E, Boffi A, Pecci L. 2005. Oxidation of hypotaurine and cysteine sulphinic acid by peroxynitrite. *Biochem J*, 389, 233-240.
- Froelich JM, Reid GE. 2009. The effect of post-translational and process-induced modifications on the multistage gas-phase fragmentation reactions of protonated peptides. *Comb Chem High Throughput Screen*, 12, 175-184.
- Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. 1997. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*, 389, 978-981.
- Gander JE. 1974. Fungal cell wall glycoproteins and peptido-polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 28, 103-119.
- Gauthier ER, Madison SD, Michel RN. 1997. Rapid RNA isolation without the use of commercial kits: application to small tissue samples. *Pflugers Arch*, 433, 664-668.
- Gong H, Zhou H, McKenzie GW, Yu Z, Clerens S, Dyer JM, Plowman JE, Wright MW, Arora R, Bawden CS, et al. 2012. An updated nomenclature for keratin-associated proteins (KAPs). *Int J Biol Sci*, 8, 258-264.
- Gordon C, Bradley H, Waring RH, Emery P. 1992. Abnormal sulphur oxidation in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 339, 25-26.

- Green TR, Fellman JH, Eicher AL, Pratt KL. 1991. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, 1073, 91-97.
- Grumbt M, Defaweux V, Mignon B, Monod M, Burmester A, Wostemeyer J, Staib P. 2011. Targeted gene deletion and in vivo analysis of putative virulence gene function in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae*. *Eukaryot Cell*, 10, 842-853.
- Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kunert J, Staib P. 2013. Keratin Degradation by Dermatophytes Relies on Cysteine Dioxygenase and A Sulfite Efflux Pump. *J Invest Dermatol*.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 41, 95-98.
- Hashimoto T. 1991. Infectious propagules of dermatophytes. In: Cole GT and Hoch HC (Ed.): The fungal spores and disease initiation in plants and animals. *Plenum Press, New York*, 181-202.
- Heddergott C, Bruns S, Nietzsche S, Leonhardt I, Kurzai O, Kniemeyer O, Brakhage AA. 2012. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot Cell*, 11, 673-682.
- Hill P, Brantley H, Van Dyke M. 2010. Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*, 31, 585-593.
- Horvath AL. 2009. Solubility of structurally complicated materials: 3. Hair. *ScientificWorldJournal*, 9, 255-271.
- Huppert M, Keeney EL. 1959. Immunization against superficial fungous infection. II. Studies on human volunteer subjects. *J Invest Dermatol*, 32, 15-19.
- Chai LY, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, van de Sande WW, Warris A, Kwon-Chung KJ, Kullberg BJ. 2010. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*, 215, 915-920.

- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Jausion H, Sohier R. 1930. Claso-Vaccines : Vaccinotherapy of the Dermatomyces and their Allergie Sequelae. . *Presse Medicale*, 38, 621-625.
- Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schroder JM, Kleine M, Neumann C, Proksch E, Brasch J. 2007. Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in tinea corporis. *J Invest Dermatol*, 127, 1720-1727.
- Kaplan MJ, Radic M. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*, 189, 2689-2695.
- Kasperova A, Kunert J, Horynova M, Weigl E, Sebel M, Lenobel R, Raska M. 2011. Isolation of recombinant cysteine dioxygenase protein from *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses*, 54, e456-462.
- Kasperova A, Kunert J, Raska M. 2013. The possible role of dermatophyte cysteine dioxygenase in keratin degradation. *Med Mycol*, 51, 449-454.
- Katajima Y, Nozawa Y. 1977. Architecture of dermatophyte cell walls: Electron microscopic and biochemical analysis. *Japan J Med Microbiol*, 18, 3-15.
- Kaufman G, Berdicevsky I, Woodfolk JA, Horwitz BA. 2005. Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton* dermatophytosis. *Infect Immun*, 73, 6584-6590.
- Kawai M, Yamazaki M, Tsuboi R, Miyajima H, Ogawa H. 2006. Human beta-defensin-2, an antimicrobial peptide, is elevated in scales collected from tinea pedis patients. *Int J Dermatol*, 45, 1389-1390.
- Kerrigan AM, Brown GD. 2009. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, 214, 562-575.

- Klein BS, Tebbets B. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol*, 10, 314-319.
- Klein DT. 1965. Effect of carbon and nitrogen nutrition on pleomorphism in Trichophyton mentagrophytes. *Am J Bot*, 52, 979-983.
- Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. 2001. Immunohistochemical localization of activated and mature CD83+ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. *Eur J Dermatol*, 11, 527-529.
- Koga T, Shimizu A, Nakayama J. 2001. Interferon-gamma production in peripheral lymphocytes of patients with tinea pedis: comparison of patients with and without tinea unguium. *Med Mycol*, 39, 87-90.
- Kopp E, Medzhitov R. 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 15, 396-401.
- Krensky AM. 2000. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Pharmacol*, 59, 317-320.
- Kuklova I, Skorepova M, Olexova M, Stara J, Sedlakova K. 2012. Deratomykózy v materiálu dermatovenerologické kliniky. *Lipovské Dermatovenerologické Fórum, Lázně Dolní Lipová XX. ročník*.
- Kumar D, Sastry GN, Goldberg DP, de Visser SP. 2012. Mechanism of S-oxygenation by a cysteine dioxygenase model complex. *J Phys Chem A*, 116, 582-591.
- Kumar D, Thiel W, de Visser SP. 2011. Theoretical study on the mechanism of the oxygen activation process in cysteine dioxygenase enzymes. *J Am Chem Soc*, 133, 3869-3882.
- Kumar V, Maresca B, Sacco M, Goewert R, Kobayashi GS, Medoff G. 1983. Purification and characterization of a cysteine dioxygenase from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry*, 22, 762-768.

- Kunert J. 1972. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. *Experientia*, 28, 1025-1026.
- Kunert J. 1976. Keratin decomposition by dermatophytes. II. Presence of s-sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition products. *Z Allg Mikrobiol*, 16, 97-105.
- Kunert J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. In: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.): *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micologia, Bilbao*, 77-85.
- Langbein L, Schweizer J. 2005. Keratins of the human hair follicle. *Int Rev Cytol*, 243, 1-78.
- Latge JP. 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*, 12, 863-872.
- Lechenne B, Reichard U, Zaugg C, Fratti M, Kunert J, Boulat O, Monod M. 2007. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology*, 153, 905-913.
- Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. 1996. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 178, 4724-4726.
- Lund A, Deboer DJ. 2008. Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals. *Mycopathologia*, 166, 407-424.
- Maranhao FC, Paiao FG, Fachin AL, Martinez-Rossi NM. 2009. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. *J Med Microbiol*, 58, 163-168.
- Maresca B, Lambowitz AM, Kumar VB, Grant GA, Kobayashi GS, Medoff G. 1981. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 4596-4600.
- Martinez DA, Oliver BG, Graser Y, Goldberg JM, Li W, Martinez-Rossi NM, Monod M, Shelest E, Barton RC, Birch E, et al. 2012. Comparative Genome Analysis of

Trichophyton rubrum and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. *MBio*, 3.

McCoy JG, Bailey LJ, Bitto E, Bingman CA, Aceti DJ, Fox BG, Phillips GN, Jr. 2006. Structure and mechanism of mouse cysteine dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3084-3089.

Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BP, et al. 2012. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell*, 24, 322-335.

Moll R, Divo M, Langbein L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, 705-733.

Monod M. 2008. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*, 166, 285-294.

Monod M, Lechenne B, Jousson O, Grand D, Zaugg C, Stocklin R, Grouzmann E. 2005. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology*, 151, 145-155.

Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S. 2002. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 935-937.

Neisser A. 1902. Plato's Versuche uiber die Herstellung und Verwendung von "Trichophytin. *Arch Dermatol Symp*, 60, 63-76.

Nenoff P, Herrmann J, Graser Y. 2007. *Trichophyton mentagrophytes* sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges*, 5, 198-202.

Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CA, Van der Meer JW, Kullberg BJ. 2006. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des*, 12, 4195-4201.

- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*, 172, 3712-3718.
- Ni Z, Walcheck B. 2009. Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) T cells up-regulate P-selectin ligand expression upon their activation. *Clin Immunol*, 133, 257-264.
- Nickerson WJ, van Rij NJW. 1949. The effect of sulfhydrylcompounds, penicillin, and cobalt on the celldivisionmechanism of yeasts. *Biochim Biophys Acta*, 3, 461-475.
- Nir-Paz R, Elinav H, Pierard GE, Walker D, Maly A, Shapiro M, Barton RC, Polacheck I. 2003. Deep infection by *Trichophyton rubrum* in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol*, 41, 5298-5301.
- Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, Koga T, Ran YP, Rashid A, Sohnle PG, Stevens DA, Tsuboi R. 1998. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med Mycol*, 36 Suppl 1, 166-173.
- Perry TL, Norman MG, Yong VW, Whiting S, Crichton JU, Hansen S, Kish SJ. 1985. Hallervorden-Spatz disease: cysteine accumulation and cysteine dioxygenase deficiency in the globus pallidus. *Ann Neurol*, 18, 482-489.
- Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. 1991. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature*, 349, 796-799.
- Pierard GE, Arrese JE, Pierard-Franchimont C. 1996. Treatment and prophylaxis of tinea infections. *Drugs*, 52, 209-224.
- Pollack JH, Lange CF, Hashimoto T. 1983. "Nonfibrillar" chitin associated with walls and septa of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores. *J Bacteriol*, 154, 965-975.
- Polonelli L, Casadevall A, Han Y, Bernardis F, Kirkland TN, Matthews RC, Adriani D, Boccanera M, Burnie JP, Cassone A, et al. 2000. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med Mycol*, 38 Suppl 1, 281-292.

- Radovic-Kovacevic V, Ratkovic R, Milenkovic A. 1990. [Obytin in the treatment of superficial skin mycoses]. *Med Pregl*, 43, 329-331.
- Raska M, Belakova J, Horynova M, Krupka M, Novotny J, Sebestova M, Weigl E. 2008. Systemic and mucosal immunization with *Candida albicans* hsp90 elicits hsp90-specific humoral response in vaginal mucosa which is further enhanced during experimental vaginal candidiasis. *Med Mycol*, 46, 411-420.
- Raska R, Rybnikar A, Chumela J, Belakova J, Evzen W. 2004. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophytes* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea-pigs. *Mycoses*, 47, 407-417.
- Rogers MA, Langbein L, Praetzel-Wunder S, Winter H, Schweizer J. 2006. Human hair keratin-associated proteins (KAPs). *Int Rev Cytol*, 251, 209-263.
- Rybnikar A, Vrzal V, Chumela J. 1998. Protective efficacy of vaccines against bovine dermatophytosis after double and single vaccination. *Mycoses*, 41, 83-86.
- Sacco M, Maresca B, Kumar BV, Kobayashi GS, Medoff G. 1981. Temperature- and cyclic nucleotide-induced phase transitions of *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol*, 146, 117-120.
- Sakakibara S, Yamaguchi K, Hosokawa Y, Kohashi N, Ueda I. 1976. Purification and some properties of rat liver cysteine oxidase (cysteine dioxygenase). *Biochim Biophys Acta*, 422, 273-279.
- Sanchez-Vallet A, Saleem-Batcha R, Kombrink A, Hansen G, Valkenburg DJ, Thomma BP, Mesters JR. 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife*, 2, e00790.
- Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD, Jr., Ariizumi K. 2006. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*, 281, 38854-38866.

- Seebacher C, Brasch J, Abeck D, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hipler UC, Hof H, et al. 2007. Onychomycosis. *Mycoses*, 50, 321-327.
- Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. 2006. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol*, 55, 1175-1185.
- Siakkou E, Rutledge MT, Wilbanks SM, Jameson GN. 2011. Correlating crosslink formation with enzymatic activity in cysteine dioxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 1814, 2003-2009.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M, Heesemann J. 2002. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med*, 196, 1017-1024.
- Specht CA, Liu Y, Robbins PW, Bulawa CE, Iartchouk N, Winter KR, Riggle PJ, Rhodes JC, Dodge CL, Culp DW, et al. 1996. The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol*, 20, 153-167.
- Stipanuk MH, Dominy JE, Jr., Lee JI, Coloso RM. 2006. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr*, 136, 1652S-1659S.
- Stipanuk MH, Dominy JE, Jr., Ueki I, Hirschberger LL. 2008. Measurement of Cysteine Dioxygenase Activity and Protein Abundance. *Curr Protoc Toxicol*, 38, 6 15 11-16 15 25.
- Stipanuk MH, Hirschberger LL, Londono MP, Cresenzi CL, Yu AF. 2004. The ubiquitin-proteasome system is responsible for cysteine-responsive regulation of cysteine dioxygenase concentration in liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E439-448.
- Stipanuk MH, Londono M, Hirschberger LL, Hickey C, Thiel DJ, Wang L. 2004. Evidence for expression of a single distinct form of mammalian cysteine dioxygenase. *Amino Acids*, 26, 99-106.

- Stipanuk MH, Londono M, Lee JI, Hu M, Yu AF. 2002. Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *J Nutr*, 132, 3369-3378.
- Stipanuk MH, Simmons CR, Karplus PA, Dominy JE, Jr. 2011. Thiol dioxygenases: unique families of cupin proteins. *Amino Acids*, 41, 91-102.
- Stipanuk MH, Ueki I, Dominy JE, Jr., Simmons CR, Hirschberger LL. 2009. Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino Acids*, 37, 55-63.
- Strickler A. 1915. The vaccine treatment of ringworm of the scalp. *JAMA*, 65, 224-227.
- Sudbery P, Gow N, Berman J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 12, 317-324.
- Tateishi Y, Sato H, Akiyama M, Abe M, Kobayashi H, Umehara S, Yamaguchi J, Shibaki H, Shimizu H. 2004. Severe generalized deep dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* (trichophytic granuloma) in a patient with atopic dermatitis. *Arch Dermatol*, 140, 624-625.
- Thomas D, Surdin-Kerjan Y. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 503-532.
- Tosti A, Hay R, Arenas-Guzman R. 2005. Patients at risk of onychomycosis--risk factor identification and active prevention. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 19 Suppl 1, 13-16.
- Traub EF, Tolmach JA. 1935. Dermatotriconophytosis its treatment with trichophytin. . *Arch Dermatol*, 32, 413-421.
- Valtavaara M, Papponen H, Pirttila AM, Hiltunen K, Helander H, Myllyla R. 1997. Cloning and characterization of a novel human lysyl hydroxylase isoform highly expressed in pancreas and muscle. *J Biol Chem*, 272, 6831-6834.

- Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. 2008. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166, 267-275.
- Wagner DK, Sohnle PG. 1995. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin Microbiol Rev*, 8, 317-335.
- Waldman A, Segal R, Berdicevsky I, Gilhar A. 2010. CD4+ and CD8+ T cells mediated direct cytotoxic effect against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Int J Dermatol*, 49, 149-157.
- Ward GW, Jr., Karlsson G, Rose G, Platts-Mills TA. 1989. Trichophyton asthma: sensitisation of bronchi and upper airways to dermatophyte antigen. *Lancet*, 1, 859-862.
- Ward GW, Jr., Woodfolk JA, Hayden ML, Jackson S, Platts-Mills TA. 1999. Treatment of late-onset asthma with fluconazole. *J Allergy Clin Immunol*, 104, 541-546.
- Wawrzkievicz K, Wawrzkievicz J. 1992. An inactivated vaccine against ringworm. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 15, 31-40.
- Weitzman I, Summerbell RC. 1995. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*, 8, 240-259.
- Woodfolk JA, Slunt JB, Deuell B, Hayden ML, Platts-Mills TA. 1996. Definition of a Trichophyton protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J Immunol*, 156, 1695-1701.
- Wu-Yuan CD, Hashimoto T. 1977. Architecture and chemistry of microconidial walls of *Trichophyton mentagrophytes*. *J Bacteriol*, 129, 1584-1592.
- Yague J, Nunez A, Boix M, Esteller M, Alfonso P, Casal JJ. 2005. Oxidation of carboxyamidomethyl cysteine may add complexity to protein identification. *Proteomics*, 5, 2761-2768.

Yamaguchi K, Hosokawa Y, Kohashi N, Kori Y, Sakakibara S, Ueda I. 1978. Rat liver cysteine dioxygenase (cysteine oxidase). Further purification, characterization, and analysis of the activation and inactivation. *J Biochem*, 83, 479-491.

Yang L, Wang L, Peng J, Yu L, Liu T, Leng W, Yang J, Chen L, Zhang W, Zhang Q, et al. 2007. Comparison between gene expression of conidia and germinating phase in *Trichophyton rubrum*. *Sci China C Life Sci*, 50, 377-384.

Ye S, Wu X, Wei L, Tang D, Sun P, Bartlam M, Rao Z. 2007. An insight into the mechanism of human cysteine dioxygenase. Key roles of the thioether-bonded tyrosine-cysteine cofactor. *J Biol Chem*, 282, 3391-3402.

9. Zoznam skratiek

ABC	ATP-binding cassette transporter
APC	antigén prezentujúce bunky
ATP	adenozíntrifosfát
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCD	Charge Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation protein
cDNA	Complementary DNA
CDO	cystein dioxygenáza
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CMI	Cell Mediated Immunity
CSD	cystein sulfinát dekarboxyláza
C _T	Crossing Treshold
DC	dendritická bunka
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesin molecule-3 Grabbing Non-Integrin
DTH	Delayed Type of Hypersensitivity
ELAM1	endoteliálna leukocytová adhezívna molekula 1
ESI	Electrospray ionization
FIBCD1	Fibrinogen C-Domain containing protein 1
GP	glukóza-peptónové médium
HF	High fidelity
Hyp A	Hydrophyobin A
i.d.	intra-dermálne
Ig	imunoglobulín
IH	Immediate Hypersensitivity

IL	interleukín
INF γ	interferón gamma
IPTG	izopropyl β -D-thiogalaktopyranozid
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
kDa	kilodalton
LB	Lauria Broth
LC	Langerhansové bunky
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption/Ionization Time of Flight
Mdr2	Multidrug resistant 2 P-glycoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MnSOD	Manganase Superoxide Dismutase
mRNA	mediátorová RNA
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NETs	Neutrophils Extracellular Traps
NETóza	bunková smrť neutrofilov
nF- κ B	nukleárny faktor kappa B
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
NK	Natural killer cell
nkat	nanokatal
O.D. ₆₀₀	optická denzita pri 600 nm
O/N	overnight
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PMNs	polymorfonukleárne bunky
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride

PRRs	Pathogen Recognition Receptors
PVDF	polyvinylidén difluorid
rCDO	rekombinantný proteín cysteín dioxygenázy
RegIIIg	Regenerating islet-derived 3 gamma protein
SDS	Sodium Dodecil Sulphate
SIGN-R1	Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin Related 1 molecule
SP	Surfaced protein
SYBR Green	asymetrické cyanínové farbivo k detekcii nukleových kyselín
Syk	Spleen tyrosine kinase
TDT	Tellurite-resistance/Dicarboxylate Transporter
Th1/Th2	Helper T cells
TLRs	Toll-like receptors
TNF	tumor nektorizujúci faktor
Treg	regulačný T lymfocyt
UV	Ultra Violet
Ym1	chitinázový lektín
WB	Western Blot