

## Abstrakt

Monogenea z čeledi Diplozoidae (podtřída Heteronchoinea) jsou krevsající ektoparaziti nacházející se na žábrách kaprovitých ryb. Trávení krve u diplozoidů probíhá intracelulárně v lysozomálním cyklu buněk gastrodermis střeva za přítomnosti peptidáz parazita. Avšak informace o způsobu trávení krve u této skupiny pocházely dosud pouze z ultrastrukturálních a histochemických analýz. Proto jsem se v této práci zaměřila na biochemickou a molekulární charakteristiku vybraných bioaktivních molekul, které by se mohly podílet na zpracování krve dospělci *Eudiplozoon nipponicum*, a to konkrétně na cysteinové peptidázy typu katepsinů L a B, aspartické peptidázy typu katepsinu D a na inhibitory serinových peptidáz Kunitzova typu.

V homogenátech a exkrečně/sekrečních (E/S) produktech dospělců *E. nipponicum* dominovala aktivita cysteinových peptidáz typu katepsinu L, následovaná aktivitou aspartických peptidáz typu katepsinu D a minoritním podílem aktivity katepsinů B. Hemoglobinolytická aktivita těchto vzorků byla kompletně zablokována inhibitory jmenovaných typů peptidáz. V transkriptomu dospělců *E. nipponicum* byly objeveny transkripty kódující 10 katepsinů L a pouze 1 katepsin B. Primární struktury kódovaných enzymů byly bioinformaticky a fylogeneticky porovnány. Dva abundantní katepsiny L (EnCL1, EnCL3) byly exprimovány v expresních systémech *P. pastoris*/*E. coli* a následně biochemicky a funkčně charakterizovány. Oba enzymy byly lokalizovány uvnitř trávicích buněk, ale i v lumen střeva dospělého červa. Výsledky tedy odhalily pravděpodobnou extracelulární fázi trávení krve u *E. nipponicum* a zároveň přítomnost široké škály katepsinů L s rozdílnými strukturálními vlastnostmi a pravděpodobně i funkcemi.

Vedle peptidáz účastnících se degradace přijatých krevních proteinů potřebují krevsající paraziti také bioaktivní molekuly zabraňující srážení nasávané krve. K regulaci hemostázy využívají často inhibitory serinových peptidáz účastnících se koagulační kaskády. Mezi ně patří např. inhibitory Kunitzova typu nalezené i v transkriptomu dospělců *E. nipponicum*. Jeden z nich (nazvaný EnKT1) byl vybrán pro heterologní expresi v systému *E. coli*. Rekombinantní EnKT1 inhiboval peptidolytickou aktivitu lidského faktoru Xa, plazminu a plazmového kallikreinu *in vitro*. Jeho antikoagulační aktivita založená na inhibici faktoru Xa byla potvrzena tromboelastograficky *in vitro*. Navzdory schopnosti inhibovat plazmin nebyl prokázán jeho vliv na fibrinolýzu. Na druhou stranu EnKT1 efektivně blokoval cytolytickou aktivitu rybiho

komplementu *in vitro*. Pomocí metod *in situ* hybridizace a imunohistochemie se podařilo EnKT1 lokalizovat uvnitř trávicích buněk parazita. Protein má sekreční signální sekvenci a byl detekován v E/S produktech parazita. Na základě uvedených vlastností se lze domnívat, že EnKT1 funguje jako bifunkční inhibitor blokuující koagulaci přijaté krve ve střevě parazita a zároveň chrání buňky gastrodermis před útokem komplementu. Jedná se o první Kunitz protein parazitárního původu s prokázaným inhibičním účinkem na komplementovou kaskádu v krvi hostitele.