

Rekombinantní cysteinové peptidasy klíšťat

Jindřich Srba

Abstrakt

Intracelulární proteolýza krevních proteinů je zásadním fyziologickým procesem u klíšťat. U klíštěte *Ixodes ricinus* jsou cysteinové peptidasy, katepsiny B a L, součástí multi-peptidasového komplexu střev. Tato diplomová práce se zabývá přípravou rekombinantních prokatepsinů B a L a charakteristikou funkčních a biochemických vlastností katepsinů B a L. Po expresi prokatepsinů B a L v *E. coli* a jejich purifikaci z inkluzních tělísek afinitní chromatografií se hledala základní strategie, která by umožnila dosáhnout úspěšného refoldingu. Vhodným typem refoldingu se ukázal pro oba studované prokatepsiny "bazický" refolding. Oba prokatepsiny byly auto-aktivovány v kyselém prostředí pH 4,0; katepsin B (nikoli katepsin L) také při pH 5,5. Byla určena závislost aktivity na pH, substrátová a inhibiční specifita. Optimální pH pro hydrolytickou aktivitu katepsinů B a L byla v rozmezí 4,5 – 5,5 a 3,0 – 3,5. Oba enzymy byly blokovány skupinovým inhibitorem cysteinových peptidas a každý z nich specifickým inhibitorem navrženým pro savčí katepsiny B a L. Výsledky této diplomové práce ukazují, že katepsiny B a L produkované ve střevě klíštěte *I. ricinus* vykazují výraznou exo- resp. endo-peptidasovou aktivitu, což potvrzuje jejich předpokládanou úlohu v proteolytické kaskádě degradace proteinů z krve hostitele. Tyto proteiny představují potenciální antigeny při vývoji vakcíny zabráňující sání klíštěte a patogenů.