

## **Abstrakt**

Tato studie se zabývá rekombinantními cysteinovými peptidázami - cathepsiny B - původem z ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti*, která je jedinečná v rámci celé čeledě pro svoji schopnost migrovat nervovou tkání až do míst konečné lokalizace. Peptidázy napomáhají invazi tohoto parazita do hostitele, migraci ve tkáni, degradaci hostitelských proteinů a pravděpodobně také úniku před hostitelským imunitním systémem.

Tato práce navazuje na výzkum prováděný pracovníky Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Karlovy Univerzity a měla za cíl prohloubit charakteristiku rekombinantních cathepsinů B původem z *T. regenti*.

U *T. regenti* byly již dříve charakterizovány 2 cysteinové peptidázy cathepsin B1 (TrCB1) a cathepsin B2 (TrCB2). TrCB1 je lokalizován ve střevě schistosomul a je pravděpodobně zodpovědný za trávení. TrCB2 byl nalezen v postacetabulárních žlázách cercárií a zřejmě napomáhá při penetraci.

Rekombinantní pro-cathepsiny B (izoformy TrCB1.1 a TrCB1.4 a dále TrCB2) byly získány expresí v systému *P. pastoris*. Byl rovněž proveden pokus o produkci rekombinantní izoformy TrCB1.6, jehož cystein aktivního místa je nahrazen glycinem, v kvasinkovém systému *Pichia pastoris*.

Zatímco TrCB2 byl schopen se sám aktivovat za podmínek expresního media, TrCB1.1 a TrCB1.4 zymogeny byly efektivně aktivovány až po inkubaci s Macro-Prep-High-S Support (matrice pro iontově výměnou chromatografií) či s pepsinem. Využitím specifického syntetického substrátu Hippuryl-His-Leu-OH byla potvrzena exopeptidázová aktivita u rekombinantních cathepsinů B. Všechny 3 rekombinantní cathepsiny B byly schopné štěpit vybrané proteinové substráty - myelin basic protein, fibrinogen, albumin, IgG, kolagen a částečně i hemoglobin. Následně byla pomocí MALDI-MS/MS, LC-MS/MS identifikována štěpná místa v substrátech myelin basic proteinu a hemoglobinu vzniklá po působení těchto enzymů.

**Klíčová slova:** cathepsin B, *Trichobilharzia*, *Schistosoma*, peptidáza, rekombinantní protein, enzym, *Pichia*