

Abstrakt

Aspartátové proteázy (AP) mají zásadní význam pro různé buněčné procesy. Tato diplomová práce se zabývá problematikou exprese a charakterizace vakuolární aspartátové endoproteasy Apr1p z *Candida albicans* a srovnává ji s jejím orthologem Pep4p ze *Saccharomyces cerevisiae*.

Rekombinantní exprese Apr1p v *Escherichia coli* poskytla neaktivní proenzym, proApr1p. Rozsáhlé snahy o aktivaci nevedly k maturaci Apr1p, což naznačuje závislost aktivace na posttranslačních modifikacích, jako je glykosylace a specifické interakce s jinými proteázami podobně jako u Pep4p. Pokusy o využití vakuolárních enzymů nebo buněčných lyzátů k aktivaci proApr1p byly také neúspěšné, což může být způsobeno křehkostí izolovaných vakuol a komplexní směsí enzymů v buněčných lyzátech ztěžující analýzu aktivace. Tyto problémy podtrhují složitou povahu aktivace proteas kdy ani různé *in vitro* techniky nedokážou simulovat *in vivo* aktivaci proteas.

Slibné výsledky se však objevily u heterologní exprese proApr1p v *Saccharomyces cerevisiae*, kde frakcionovaný buněčný lyzát vykazovaly specifickou proteolytickou aktivitu při kyselém pH po inhibici jiných proteáz. To by mohlo naznačovat, že Apr1p může být produkován v aktivní formě v rámci eukaryotického systému, nicméně je třeba dále zkoumat jeho purifikaci.

Experiment s reciproční výměnou genů, při kterém byl gen *PEP4* v *S. cerevisiae* nahrazen genem *APR1* a naopak, odhalil překvapivě podobné růstové vzorce a toleranci vůči stresu mezi vyměněnými a divokými kmeny. To naznačuje možnou funkční komplementaci mezi těmito orthology, přinejmenším za námi zvolených laboratorních podmínek. Objevily se však rozdíly ve využití zdrojů dusíku, což naznačuje možné jemné rozdíly v regulaci metabolismu.

Celkově tato práce přispívá k našemu poznání exprese, aktivaci a funkce aspartátových proteáz. Zdůrazňuje problémy při replikaci složitých biologických procesů *in vitro* a zdůrazňuje význam zkoumání alternativních strategií aktivace a purifikace proteinů. Experiment s výměnou genů navíc podtrhuje možnost malých funkčních rozdílů mezi orthologickými proteázami, což je důvodem pro další zkoumání jejich specifických rolí v buněčné fyziologii a adaptaci.

Klíčová slova: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, vakuola, peptidasa, proteasa