

ABSTRAKT

Rhomboidy jsou serinové membránové proteasy, které patří do evolučně rozšířené rodiny rhomboidních proteinů. Rhomboidy si ve srovnání s klasickými serinovými proteasami vyvinuly odlišný katalytický mechanismus; místo běžně triády (Ser/His/Asp) k proteolýze využívají pouze katalytickou dyádu (Ser/His) a jejich aktivní místo se nachází uvnitř lipidové membrány, což — společně s faktem, že jsou hydrofobní — komplikuje jejich studium. Přestože je známo jejich zapojení v mnoha důležitých biologických procesech, stále u většiny rhomboidů není jasný konkrétní mechanismus, kterým přispívají k regulaci těchto procesů nebo k patologickým projevům souvisejících onemocnění (jako např. malárie, Parkinsonova choroba nebo rakovina). Pochopení těchto dějů je ztíženo nedostatkem nástrojů k jejich studiu jak *in vitro*, tak *in vivo*. Ve své práci uvádím nové fluorogenní substráty založené na Försterově rezonančním přenosu energie (FRET) a odvozené od sekvence LacYTM2, které umožňují široké využití pro kontinuální sledování aktivity mnoha rhomboidů *in vitro*. Modifikacemi v P5-P1 pozicích je možné zvýšit specifitu substrátu k cílovému rhomboidu, zatímco výběr FRET páru fluoroforů absorbujícího v červené oblasti viditelného světla umožňuje jejich využití pro rychlé testování knihoven molekul.

Selektivní a účinné inhibitory jsou cenným nástrojem ke studiu molekulárních mechanismů enzymů, avšak pro rhomboidy zatím žádné takové inhibitory nejsou známy. Inhibitory vyvinuté v rámci této práce jsou netoxické, jednoduše synteticky dostupné a modifikovatelné. Inhibitory odvozené od N-methylen saccharinu nebo benzoxazin-4-onu sice nejsou dostatečně aktivní pro biologické aplikace, ale další modifikace by mohly vést ke zvýšení účinnosti. Peptidyl ketoamidy jsou inhibitory založené na mechanismu interakce rhomboidu se substrátem a jsou zatím nejslibnější skupinou inhibitorů rhomboidů. Spojují peptidovou část odvozenou od substrátu s ketoamidovou elektrofilní reaktivní skupinou rozšířenou hydrofobním substituentem. Výsledné inhibitory jsou účinné, selektivní, kovalentní a reversibilní. Vzhledem k jejich aktivitě *in vivo* při nízkých nanomolárních koncentracích jsou peptidyl ketoamidy v současnosti zdaleka nejefektivnějšími inhibitory rhomboidů. Optimalizace peptidové části a C-koncového hydrofobního substituentu umožní návrh selektivních inhibitorů dalších členů této rodiny.