

ABSTRAKT

Proteiny vázající zinek představují přibližně desetinu proteomu a významnou část z nich tvoří hydrolasy závislé na zinku. Tato disertační práce se zaměřuje na biochemickou a strukturní charakterizaci glutamátcarboxypeptidasy II (GCPII) a histondeacetylasy 6 (HDAC6), které jsou členy rodiny metalohydrolas závislých na zinku, a popisuje interakce s jejich přirozenými substráty a inhibitory.

GCPII je homodimerní membránová proteasa, která v centrální a periferní nervové soustavě katalyzuje odštěpení glutamátu z neuroprénašeče N-acetyl-aspartyl glutamátu (NAAG) a v tenkém střevě z folátů přijatých v potravě. Tento enzym je spojován s několika neurologickými poruchami a představuje také ideální cíl pro diagnostiku a léčbu rakoviny prostaty. Inhibitory GCPII obvykle nesou skupinu vázající zinek a dále obsahují funkční skupinu specificky rozpoznávanou v S1' místě enzymu (tvořenou glutamátovým zbytkem nebo jeho isosterem). Tyto sloučeniny jsou přirozeně hydrofilní molekuly, což brání jejich průniku přes hematoencefalickou bariéru a znemožňuje inhibici GCPII v centrální nervové soustavě. V této disertační práci představujeme různé strategie zaměřené na záměnu tradičního P1' glutamátového zbytku nevětvenými neproteinogenními aminokyselinami a bioisostery glutamátu. Dále pak sledujeme vliv zavedení aminohexanového linkeru na afinitu a biologické vlastnosti inhibitorů na bázi fosforamidátů. Analýza krystalových struktur komplexů GCPII s těmito novými inhibitory odhalila dosud nepopsanou flexibilitu S1' místa, která umožňuje proteinu GCPII vázat objemné zbytky. Identifikovali jsme nové inhibitory se zvýšenou lipofilicitou, které i když nejsou silnými inhibitory, mohou sloužit jako prekursori pro následní racionální návrh nových léčiv.

Acetylace lysinu 40 v α -tubulinu chrání mikrotubuly před následky mechanického stárnutí a hraje i roli v pohybu buněk, větvení axonů a růstu a udržování výběžků neuronů. HDAC6 je hlavní deacetylase tubulinu a jeho význam jakožto možného cíle pro léčbu rakoviny a neurodegenerativních onemocnění stále roste. Tím pádem vzrůstá i potřeba hlubšího pochopení jeho interakce s tubulinovým substrátem. V této práci ukazujeme, že HDAC6 deacetyluje dimery tubulinu 1500 krát vyšší rychlostí než mikrotubuly. Naše data naznačují, že s výjimkou aminokyselin na pozicích P₁ a P₋₁ přispívají aminokyseliny obklopující Lys40 k rozpoznávání substrátu minimálně, a že účinná deacetylase vyžaduje komplexní interakce s tubulinovým dimerem.