

## Abstrakt

Proteasy se účastní řady významných fyziologických procesů a jejich nedostatečná kontrola je spojena s řadou patologií. Přírodní inhibitory představují účinný nástroj pro regulaci jejich aktivity. Disertační práce se zaměřuje na živočišné a rostlinné inhibitory aspartátových a serinových proteas a přináší identifikaci, biochemickou charakterizaci a strukturní popis jejich mechanismu inhibice.

Rostlinné inhibitory z Kunitzovy rodiny jsou produkovány jako obranné proteiny s unikátní schopností blokovat široké spektrum proteas. V této práci byl s využitím metod funkční proteomiky popsán trávicí proteolytický systém mandelinky bramborové, herbivorního škůdce lilkových rostlin. Byl podán přímý důkaz, že trávicí aspartátové a serinové proteasy tohoto herbivora jsou efektivně blokovány pomocí dvou Kunitzových inhibitorů (nazývaných PCDI a PSPI), které jsou produkovány v lilku brambor. Pomocí strukturní analýzy byly na molekulách PCDI a PSPI identifikovány nové typy reaktivních center pro inhibici aspartátových proteas typu katepsinu D a serinových proteas typu trypsinu a chymotrypsinu. Popis reaktivního centra na PCDI inhibitoru společně s krystalovou strukturou trávicí proteasy typu katepsinu D mandelinky bramborové umožnilo vysvětlit mechanismus jejich vzájemné interakce.

Pro lidský katepsin D byly identifikovány sfingolipidy jako první specifické endogenní inhibitory. Tyto bioaktivní molekuly jsou známé svou protinádorovou aktivitou a lze předpokládat, že jedním z mechanismů jejich působení je regulace katepsinu D, který se tvorby nádorů účastní. Dále byla na bázi peptidomimetického inhibitoru aktivního místa vyvinuta proteomická sonda pro detekci katepsinu D jako prognostického nádorového markeru.

Pro serinové proteasy typu kalikreinů byl identifikován dosud nejúčinnější přírodní rostlinný inhibitor BbKI z Kunitzovy rodiny, který je selektivní pro nádorový marker kalikrein 4. Jejich interakce byla popsána pomocí strukturního modelu. Pro epidermální kalikreiny byl sestaven proteomický detekční systém selektivních substrátů a inhibitorů pro monitorování aktivit, který byl testován na geneticky modifikovaných myších.

Disertační práce přináší významné informace o specifitě a mechanismech inhibice aspartátových a serinových proteas, které lze využít pro racionální vývoj nových inhibičních molekul s uplatněním v biomedicíně a zemědělských biotechnologiích.