

Abstrakt

Intramembránové proteasy z rodiny rhomboidů jsou v přírodě široce rozšířeny a vyskytují se ve všech doménách života. Podílejí se na mnoha důležitých procesech, jako například kontrola kvality membránových proteinů nebo mitochondriální dynamika. Jejich aktivita souvisí s nemocemi jako Parkinsonova nemoc nebo rakovina. Proto se rhomboidy jeví jako potenciální terapeutické cíle. V této práci jsme se snažili objasnit detailní mechanismus fungování modelové proteasy GlpG z *E. coli*. Zaměřili jsme se i na mechanismus rhomboidu RHBDL2, což je jeden ze čtyř eukaryotických rhomboidů, jejichž funkce není příliš prostudována. Pro pochopení vazby mezi substrátem a enzymem jsme připravili řadu nových peptidyl-chlormethylketonových inhibitorů odvozených od proteinu TatA, což je substrát rhomboidu v *P. stuartii*. Díky krystalové struktuře komplexů GlpG s těmito inhibitory jsme prozkoumali vazebná místa substrátu S1 až S4, což nám umožnilo objasnit strukturní podstatu substrátové specifity enzymu. Ukázali jsme, že rychlost štěpení substrátu může být významně ovlivněna modifikací sekvence substrátu na pozicích P1 až P5. Na základě těchto pozorování jsme vyvinuli fluorogenní transmembránový peptidový substrát rhomboidových proteas, který je použitelný jak v detergentu, tak v liposomech, a je vhodný pro testování s vysokou propustností. Pomocí těchto substrátů jsme dokázali, že rhomboidy pro efektivní zpracování substrátu vyžadují takřka kompletní transmembránovou část substrátu a že interakce mezi enzymem a substrátem nejspíš probíhá uvnitř membrány. Díky těmto znalostem se nám podařilo navrhnout silné inhibitory proteas z rodiny rhomboidů, jejichž základem jsou peptidyl- α -ketoamidy. Tyto inhibitory jsou aktivní v nanomolárních koncentracích a působí selektivně na proteasy z rodiny rhomboidů. Pomocí krystalových struktur jsme prokázali, že vazba peptidyl- α -ketoamidu na rhomboid je kovalentní, podobná tetraedrál nímu meziprojektu štěpení substrátu. Pomocí pokročilých metod fluorescenční spektroskopie (FRET a FCCS) jsme objasnili chování rhomboidové proteasy RHBDL2 v jejím přirozeném prostředí. Zatímco dosavadní výsledky naznačovaly možnost alosterické aktivace rhomboidů jejich dimerizací, my jsme nenašli žádné důkazy o dimerizaci RHBDL2 v bimembráně. Během této práce se nám podařilo vyvinout metodiku široce aplikovatelnou na studium dimerizace membránových proteinů. Všechny poznatky popsane v této práci významně přispívají k pochopení mechanismu fungování rhomboidových proteas.