

## Abstrakt

Cysteinové katepsiny se účastní řady patologických procesů jako jsou nádorová, neurodegenerativní, kardiovaskulární nebo autoimunitní onemocnění. Tato práce se zaměřuje na katepsin B, L a V (CatB, CatL, CatV), které jsou atraktivními cílovými molekulami pro vývoj inhibitorů jako potenciálních chemoterapeutik a diagnostických nástrojů. Cílem práce bylo připravit uvedené katepsiny a strukturně charakterizovat jejich komplexy s vybranými syntetickými peptidomimetickými inhibitory. CatB a CatL byly rekombinantně připraveny v kvasinkách *Pichia pastoris* a podmínky exprese byly optimalizovány pro přípravu proenzymových forem. Pro CatB a CatL byl navržen chromatografický purifikační protokol a CatV byl purifikován na základě již známého protokolu. Získané enzymy byly použity k přípravě komplexů se šesti peptidomimetickými inhibitory vybavenými karbamátovou, vinylsulfonovou nebo azanitrilovou reaktivní skupinou, které selektivně inhibují CatB, CatL, resp. CatV. Byly určeny jejich inhibiční parametry v kinetickém testu a identifikovány počáteční krystalizační podmínky. Po optimalizaci krystalizačních podmínek pro CatB se třemi karbamátovými inhibitory byly získány krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Na základě krystalových struktur těchto komplexů byl analyzován vazebný mód karbamátových inhibitorů v aktivním místě CatB a jejich unikátní inhibiční mechanismus, kdy je kovalentní reakce s katalytickým cysteinem doprovázena odštěpením části inhibitoru. Získané výsledky umožní racionální návrh nové generace inhibitorů CatB s potenciálním využitím v biomedicině.

**Klíčová slova:** cysteinové katepsiny, rekombinantní exprese, peptidomimetické inhibitory, krystalizace proteinu, 3D struktura proteinu, inhibiční mechanismus